

Vekstfaktorer som nevroprotektiv behandling ved Parkinsons sykdom?

Sammendrag

Bakgrunn. En av flere teorier for å forklare Parkinsons sykdom postulerer at hjernen ikke danner nok vekstfaktorer til å holde dopaminerge nerveceller i live etter eksponering for hittil ukjente toksiner. Hensikten med denne studien var å evaluere hvorvidt ekstern tilførsel av vekstfaktorer beskytter de dopaminerge fibrene i basalgangliene i en dyremodell for Parkinsons sykdom.

Materiale og metode. Hos tre grupper med rotter ble det gjort selektiv ødeleggelse av de dopaminerge cellene i substantia nigra. I én gruppe ble det gitt behandling med vekstfaktoren gliacellulinjederivert nevrotrofisk faktor (GDNF), i en annen ble det gitt hjernederivert nevrotrofisk faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) og GDNF i kombinasjon. Den tredje gruppen fikk tilført saltvann. Vekstfaktorene ble infundert ved hjelp av osmotiske pumper over 28 dager. Vevssnitt fra dyrene ble evaluert immunocytokjemisk.

Resultater. I de vekstfaktorbehandlede gruppene var det stor forbedring i atferd. Immunocytokjemiske studier viste at i gruppen som fikk kombinasjonsterapi med GDNF-BDNF var det betydelige flere fibre i striatum enn i de to andre gruppene. Tilførsel av vekstfaktorer førte til en proliferasjon av subventrikulære celler ut i basalgangliene.

Fortolkning. Bedring i motorisk funksjon i denne dyremodellen kan skyldes at tilførsel av vekstfaktorer forsinket retrograd degenerasjon av nigrostriatale nervefibrer. Vekstfaktorer stimulerer også endogene stamceller og migrasjon av disse mot striatum. Funnene indikerer at infusjon av vekstfaktor har symptomatisk og nevroprotektiv effekt i denne dyremodellen.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

> Se også side 894

Reidun Torp

torp@basalmed.uio.no
Centre for Molecular Biology and Neuroscience (CMBN)
Universitetet i Oslo
Postboks 1105 Blindern
0317 Oslo

Preet Bano Singh

Centre for Molecular Biology and Neuroscience (CMBN)
og
Institutt for odontologi
Universitetet i Oslo

Dag R. Sørensen

Senter for komparativ medisin

Espen Dietrichs

Nevrologisk avdeling

Henry Hirschberg

Nevrokirurgisk avdeling

Rikshospitalet

Omtrent 8 000 nordmenn har Parkinsons sykdom, som er en kronisk neurodegenerativ lidelse. Debutalderen ligger på ca. 60 år. Sykdommen skyldes et gradvis tap av nerveceller. Tapet skjer først og fremst i et lite område i hjernestammen, substantia nigra, men mange andre områder kan være affisert. Noen hevder at det er andre kjerner som først blir rammet (1). Cellene i substantia nigra sender nervefibrer til nucleus caudatus og putamen i basalgangliene, der de skiller ut signalstoffet dopamin. Når cellene i substantia nigra forsvinner etter hvert som sykdommen utvikler seg, forsvinner også nervefibrene til basalgangliene, og resultatet blir stor mangel på dopamin. Dette gir seg særlig utslag i form av motoriske symptomer.

Hos to av tre debuterer sykdommen med lett skjelving i en kroppshalvdel (hviletremor). Etter hvert utvikler det seg typiske tegn som «maskeansikt» (reduert ansiktsmimikk), fremoverlutende kroppsholdning og korte og trippende skritt ved gange. Stemmen kan bli lavere og mindre kraftfull, og det er vanlig med dysartri. Ustøhet, dårlig balanse og tendens til å falle er vanligvis tegn som først opptrer etter en tids sykdom. Det gjelder også mer uttalt akinesi og alvorlig bevegelsesinnskrenkning som immobiliserer pasienten. I tillegg kan sykdommen bringe med seg en rekke ikke-motoriske plager, slik som depresjon og andre psykiske forandringer, søvnproblemer, generell tretthetsfølelse, blæreforstyrrelse, demens og annet (2). Alvorlighetsgrad og utviklingshastighet varierer fra person til person, men sykdommen representerer et betydelig han-

dikap for pasienten. Dessuten utgjør den et stort samfunnsøkonomisk problem, ikke minst på grunn av et betydelig pleiebehov hos mange med langtkommen sykdom.

Årsakene til Parkinsons sykdom er i det aller fleste tilfeller ukjent. Sykdommen synes å opptre sporadisk, men det finnes også forskjellige genetiske betingede former, både autosomt recessive og autosomt dominante. Kjente genetiske årsaker ligger bak i 2–4 % av tilfellene (3).

Dagens behandling innebærer å dempe symptomene så godt som mulig. Ved hjelp av en kombinasjon av forskjellige medikamenter er det ofte mulig å lindre symptomene effektivt i mange år. Etter hvert som tiden går og sykdommen utvikler seg, får stadig flere pasienter komplikasjoner i form av dårlig og uforutsigbar behandlingseffekt (4). Hos noen kan også dette kontrolleres, da med kirurgisk behandling med implantasjon av hjernestimulatore (5). Men også slik intervensjon er ren symptombehandling. Selv om pasientene får en betydelig bedret situasjon, hindres ikke sykdommen i å progrediere.

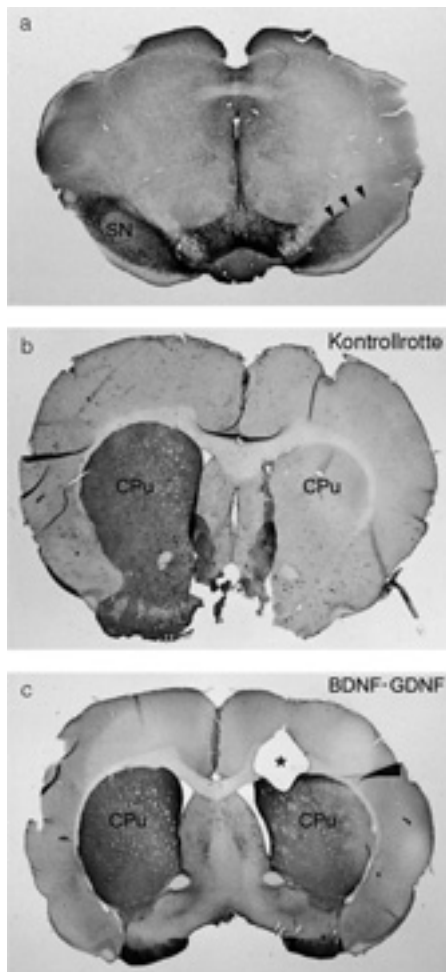
Transplantasjon av hjerneceller fra aborterte fostre har vært prøvd. Av etiske og juridiske årsaker er det ikke aktuelt med slike behandlingsforsøk i Norge. Dessuten har dobbeltblinde studier ikke kunnet vise sikker effekt av slike transplantasjoner (6). Stamcelletransplantasjon blir testet i dyreforsøk i mange land, men også disse forsøkene har vært beheftet med betydelige problemer og har foreløpig ikke ledet frem til anvendbar behandling (7).

Siden Parkinsons sykdom er progredierende, er håpet å finne frem til nevroprotektive strategier som bremser den degenerative prosessen, eventuelt stopper sykdomsutviklingen i en tidlig fase. Selv hos pasienter med langt fremskreden sykdom overlever mange dopaminerge fibre. En av flere eksisterende teorier for å forklare sykdommen postulerer at hjernen ikke danner tilstrekkelige mengder av



Hovedbudskap

- Infusjon av vekstfaktorer i hjernen er assosiert med bedret motorisk funksjon i en dyremodell for Parkinsons sykdom
- Vekstfaktorer synes å forsinke degenerasjonen av nigrostriatale nervefibrer samt stimulere endogene stamceller



Figur 1 Snitt gjennom hjernen etter en unilaterale injeksjon av 6-OHDA i en dyremodell for Parkinsons sykdom. a) De dopaminerge cellene i substantia nigra ødelegges unilateralt (piler). b) Saltvannbehandlede dyr viser bortfall av TH-positive fibrer på ipsilaterale side. c) GDNF-BDNF-behandlede dyr viser mange intakte dopaminerge fibrer på ipsilaterale side. (SN: substantia nigra. CPU: nucleus caudatus og putamen)

vekstfaktorer til å holde de dopaminerge nervecellene i live etter eventuell eksponering for hittil ukjente toksiner. Gliaceller kan produsere trofiske faktorer som beskytter nevner, slik som gliacelleinjerivert neurotrofisk faktor (GDNF) og hjernerivert neurotrofisk faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) (8, 9). Ut fra denne hypotesen har vi studert vekstfaktorenes innvirkning i hjernevevet ved å infundere henholdsvis GDNF og BDNF i en eksperimentell rottemodell for Parkinsons sykdom. Forsøkene har vist markert forbedring av motorisk kontroll – både ved behandling med GDNF og med BDNF alene, men mest uttalt ved en kombinasjon av disse. Vi gir her en oversikt over konseptet nevroproteksjon ved Parkinsons sykdom basert på litteratur og egne forsøk.

Materiale og metode

Dyremodeller er nødvendig for å kunne forstå patogenese og behandling av Parkinsons

sykdom. Siden dyr ikke utvikler sykdommen spontant, må de karakteristiske funksjonelle trekkene etterliknes ved bruk av nevrotoksiske agenser. Den eldste og mest brukte modellen er stereotaktisk innsprøytning av 6-hydroksydopamin (6-OHDA) i substantia nigra hos rotter. Vi har benyttet denne modellen, blant annet fordi reproduserbarheten er stor og lesjonene veldefinerte. Stoffet rammer de katekolaminerge fibrene og gir 80–90% tap av de dopaminerge synapser i striatum (tilsvarende nucleus caudatus og putamen hos menneske). Den selektive celledøden skyldes antakeligvis akkumulering av toksinet i de dopaminerge cellene, noe som fører til ødeleggelse via oksidativ stress.

Dyrene ble inndelt i tre grupper (seks rotter i hver), hvorpå alle ble utsatt for selektiv ødeleggelse av de dopaminerge cellene i substantia nigra. Gruppene ble behandlet med henholdsvis saltvann, GDNF og GDNF-BDNF. I forsøkene ble saltvann eller vekstfaktor infundert direkte i hjernevevet ved hjelp av osmotiske minipumper, lokalisert subkutant, med et kateter koblet til en kanyle som ble plassert stereotaktisk i det aktuelle området i hjernen (striatum). Implantering av osmotiske minipumper ble foretatt samme dag som lesjonene ble laget ved injeksjon av 6-OHDA. Vekstfaktorene ble infundert over en periode på 28 dager. De osmotiske pumpene har den fordel at de gir fra seg kontrollerte mengder, men det er begrensninger både når det gjelder diffusjonsdistanse og varighet av behandling. Motorisk test ble utført ved å injisere apomorfin systemisk. Slike dyr, men ikke friske rotter, roterer (går i ring) når de tilføres apomorfin. Antall rotasjoner per minutt ble målt hos rotter behandlet med 6-OHDA og vekstfaktorer og sammenliknet med antall rotasjoner hos rotter behandlet med 6-OHDA og saltvann (kontrollrotter). I hver gruppe ble seks dyr testet.

Mikroskopiske analyser

Både lys- og elektronmikroskopiske analyser ble foretatt for å evaluere hvorvidt vekstfaktorene påvirket overlevelsen av de dopaminerge fibrene i striatum. Antistoffer rettet mot tyrosinhydroksylase (TH) ble benyttet som markør for de dopaminerge fibrene. Proteinene Ki-67 og nestin ble brukt som markører for prolifererende celler.

Resultater

Etter behandling i 28 dager ble dyrene underkastet en motorisk test ved injeksjon av apomorfin. Seks dyr i hver gruppe ble testet. De som var behandlet med vekstfaktorer, hadde færre rotasjoner per minutt enn kontrolldyrene: Dyr behandlet med GDNF-BDNF hadde 0–3 rotasjoner, dyr behandlet med GDNF 0–5 rotasjoner, kontrolldyrene 10–12 rotasjoner.

Immuncytokjemiske studier med antistoff rettet mot tyrosinhydroksylase viste bortfall av dopaminerge celler i substantia nigra hos samtlige dyr. Gruppen med kombinasjonste-

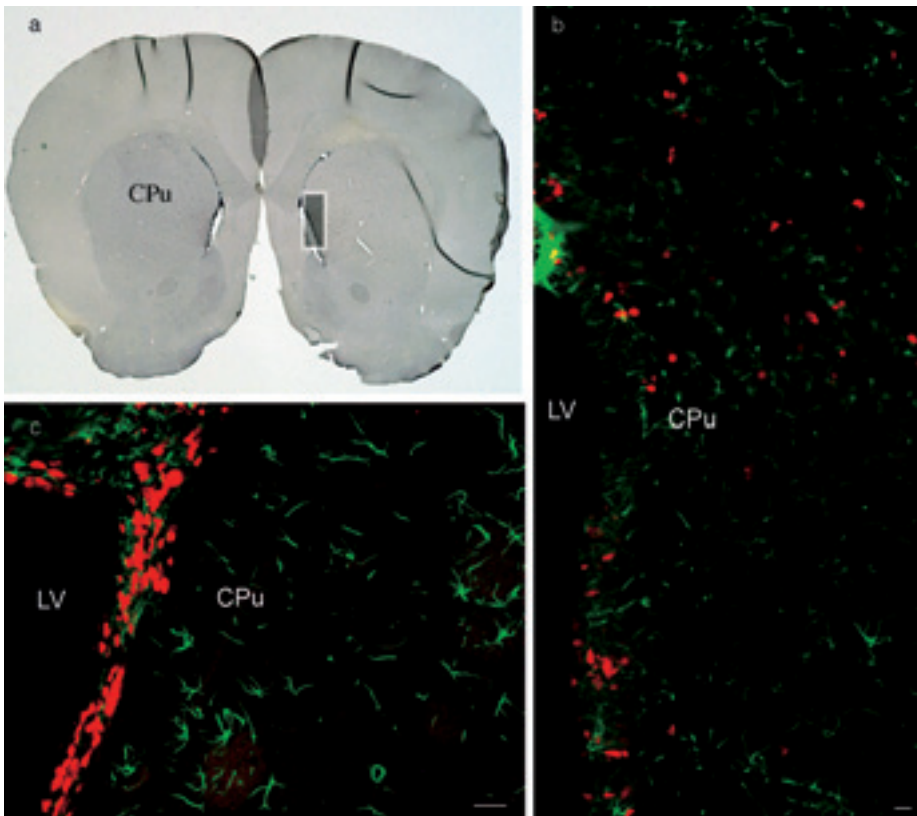
rapien GDNF-BDNF hadde betydelige flere resterende fibrer i terminalområdet (striatum) enn kontrollgruppen (fig 1). Tilførsel av vekstfaktorer førte også til en proliferasjon av subventrikulære celler, som anses for å være den viktigste populasjon av endogene stamceller i den voksne hjernen. Prolifrerende celler ble observert i en migrerende strøm av celler lateralt for infusjonsstedet hos vekstfaktorbehandlede dyr, mens det ikke var migrasjon av de samme cellene hos kontrolldyrene (fig 2). Cellene uttrykte både Ki67 og nestin, noe som tydet på at de var aktive progenitorceller. Siden de var negative for både gliale (GFAP-merking) og modne nervecellemarkører (Neu-N-merking), er det uvisst hvorvidt de vil utvikle seg til modne celler.

Diskusjon

Nervevekstfaktorbehandling av Parkinsons sykdom er en helt ny metode som har vist seg å være svært lovende (8). Både våre egne og andres forsøk i en rottemodell har demonstrert betydelig effekt av infusjon av vekstfaktorer i hjernen (8–10). Også transgene mus har vist at det noradrenerge system er mer resistent for degenerasjon når GDNF overuttrykkes (11). Våre studier viser at infusjon av GDNF-BDNF i kombinasjon fører til redusert tap av dopaminerge nerveterminaler i basalgangliene i dyr behandlet med 6-OHDA. Tilleggs effekten av prolifererende celler fra den subventrikulære sonen og ut i parenkymet er en ny observasjon ved denne kombinasjonsterapien, som muligens er med på å danne et gunstig miljø for opprettholdelse av dopaminerge fibrer. De første forsøk på vekstfaktorbehandling hos mennesker viste oppløftende resultater (12, 13). Pasientene viste stor fremgang både når det gjaldt motorikk og motivasjon, og de hadde fremdeles effekt av behandlingen ved oppfølging to år senere. Til tross for lovende resultater er det interesse for alternative metoder for å tilføre vekstfaktor til relevante områder i hjernen.

Langtidsbehandling med vekstfaktorer

Langtidsbehandling er nødvendig dersom vekstfaktorer skal kunne anvendes klinisk. Det er derfor ønskelig å forbedre metodene for tilførsel av vekstfaktorer til basalgangliene. Både hos dyr og mennesker har man så langt benyttet en pumpe implantert under huden med en slange tilkoblet en kanyle som leverer vekstfaktor inn i hjernen. Transplantering av innkapslede celler som konstitutivt gir fra seg neurotrofiske faktorer til omgivelsene er en ny og lovende form for langtidsbehandling (14). Hovedtrekkene ved denne metoden er at de innkapslede cellene kan overleve i lange perioder fordi de semipermeable membranene tillater diffusjon av næringsstoffer, men forhindrer en immunologisk respons. Og vekstfaktormengden som avgis, kan titreres ved å regulere celledøden i kapslene. Alginatgelene utnyttes på en slik



Figur 2 Snitt gjennom basalgangliene etter injeksjon med 6-OHDA og behandling. a) Rektangelet viser hvor utsnittene b og c er fotografert. b) Migrerende celler (rød farge) ut fra den subventrikulære sonen etter kombinasjonsbehandling med GDNF-BDNF. c) Kontrolldyrene viser ingen migrasjon av celler og cellene forblir i den subventrikulære sonen (rød farge). Snittene er dobbeltmerket med gliamarkøren GFAP (grønn farge). (LV: lateralveggen i sideventrikkelen. CPu: nucleus caudatus og putamen)

måte at cellelinjer som er genmanipulert til å produsere GDNF eller BDNF, blir skjermet fra det ytre miljø og immunsystemet. De lipofile alginatfærene huser hver og en til sammen om lag 100 celler, som stereotaktisk kan implanteres både i basalgangliene og i substantia nigra i våre eksperimentelle modeller. Disse alginatene har vist seg å være atoksiske og immunologisk inerte (15).

Dyremodeller

Så langt har 6-OHDA-modellen vært vårt hovedverktøy. Den er godt egnet der man ønsker å studere kvantitativt en akutt motorisk effekt, men egner seg mindre bra ved behandlingsstrategier der man tar sikte på nevroproteksjon over tid. Vi planlegger å arbeide med modeller som gir langsomt innsettende skader. Én mulighet er å injisere 6-OHDA i små mengder inn i striatum (16). Det gir mindre komplett ødeleggelse av cellene og langsommere degenerering av det nigrostriatale system. Metoden er derfor vel egnet for nevroproteksjonsstudier. En annen mulighet er å administrere pesticidet rotenon, som, hvis gitt intraperitonealt, raskt krysser blod-hjerne-barrieren og hemmer elektrontransporten i mitokondriene og på den måten gir cellulær skade (17). Administreres stoffet flere ganger, er det også ødeleggende for de nigrostriatale dopaminerge

cellene, dog i mildere grad enn ved bruk av 6-OHDA (18). Det ideelle ville være å studere en dyremodell som eksponerer alle karakteristika ved Parkinsons sykdom. I mangel på en slik ideell modell velger vi å bruke én akutt og én kronisk modell, både for å kunne forstå patogenesen og for å kunne vurdere effekten av vekstfaktorbehandling over tid.

Konklusjon

Det er et ønske å videreutvikle nye strategier for behandling av mennesker med Parkinsons sykdom. Vi har etablert en dyremodell basert på anerkjente modeller fra litteraturen, og vi bruker denne for å utrede effekten av vekstfaktorer. Forsøkene viser at ikke bare har rottene i løpet av behandlingsperioden fått en bedring i motorisk funksjon, de behandlede rottene har også flere intakte nigrostriatale nervefibrer. Dessuten skjer det celledeling av stamceller og migrasjon av disse mot striatum. Funnene kan tolkes i retning av at infusjon av vekstfaktor ikke bare har symptomatisk, men også nevroprotektiv effekt ved denne dyremodellen. Vekstfaktorer er allerede benyttet i kliniske studier av et begrenset antall pasienter med Parkinsons sykdom i England (12, 13). De som fikk infusjon av vekstfaktoren GDNF, hadde bedret motorisk funksjon selv mange måneder etter

at behandlingen var avsluttet. Til tross for lovende resultater er det viktig å studere effekten av vekstfaktorer tilført dyremodeller over tid, ikke minst for å utelukke langsiktige bivirkninger. Av denne grunn er det også av betydning å vurdere muligheten av alternative administrasjonsformer, slik vi har beskrevet i denne artikkelen.

Manuskriptet ble godkjent 17.1. 2006.

Litteratur

1. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 121–34.
2. Larsen JP. Diagnostikk og behandling av parkinsonisme hos sykehjemspasienter. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2005; 125: 1669–71.
3. Toft M, Aasly J. Genetikk ved Parkinsons sykdom. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2004; 124: 922–24.
4. Interessegruppen for Parkinsons sykdom i Norge. Behandlingsanbefaling. www.parkinson-gruppen.org (5.3.2005).
5. Jaggi JL, Umemura A, Hurtig HI et al. Bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: surgical efficacy and prediction of outcome. *Stereotact Funct Neurosurg* 2004; 82: 104–14.
6. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 403–14.
7. Drucker-Colin R, Verdugo-Diaz L. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24: 301–16.
8. Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004; 7: 105–10.
9. Shults CW, Kimber T, Altar CA. BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* 1995; 30: 1109–12.
10. Torp R, Singh PB, Sørensen D et al. Kan hjernens egne stamceller utnyttes i terapi? *Parkinsonposten* 2003; nr. 4: 7–8.
11. Zaman V, Li Z, Middaugh L et al. The noradrenergic system of aged GDNF heterozygous mice. *Cell Transplant* 2003; 12: 291–303.
12. Gill SS, Patel NK, Hotton GR et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003; 9: 589–95.
13. Patel NK, Bunnage M, Plaha P et al. Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* 2005; 57: 298–302.
14. Yasuhara T, Shingo T, Muroaka K et al. Early transplantation of an encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-producing cell demonstrating strong neuroprotective effects in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* 2005; 102: 80–9.
15. Winn SR, Tresco PA, Zielinsky B et al. Behavioral recovery following intrastriatal implantation of microencapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 1991; 113: 322–9.
16. Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C et al. Effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 1997; 4: 186–200.
17. Perier C, Bove J, Vila M et al. The rotenone model of Parkinson's model. *Trends Neurosci* 2003; 7: 345–6.
18. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* 2002; 17: 317–24.