

Stamceller i cellterapi som behandlingsmetod vid Parkinsons sjukdom – fördelar och nackdelar

Vilka stamceller kan man använda effektivast i cellterapi som behandlingsmetod för Parkinsons sjukdom?



Oscar Cidon Sporrang

Independent Project in Biology

Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2013

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Innehållsförteckning	
Sammandrag	3
Inledning	3
Parkinsons sjukdom (PS)	3
Syfte och frågeställningar	4
Dopaminerga neuroner	5
Indelning av dopaminerga neuroner	6
Traditionell behandling	7
Levodopa, L-dopa behandling	7
Deep Brain Stimulation (DBS) behandling	8
Cellterapiens historik inom Parkinsons sjukdom.....	9
Stamceller	9
Vad är stamceller?	9
<i>Embryonala stamceller (ES-celler)</i>	11
<i>Dopaminerga neuroner från hES-celler vid behandling av råttor med 6-OHDA</i>	11
<i>Transplantation av dopaminerga neuroner i apor som behandlats med MPTP</i>	12
<i>Kliniska aspekter</i>	12
<i>Inducerade pluripotenta stamceller (IPS-celler)</i>	13
Neurala stamceller (NS-celler)	13
Diskussion och slutsats	14
Vad är utmaningarna med stamcellsforskning?	14
Cellterapi med hjälp av stamceller	15
Kliniska problem gällande cellterapi	15
Framtidsutsikter för cellterapi	15
Slutsats	16
Tack.....	16
Referenslista.....	16

Sammandrag

Parkinsons sjukdom (PS) är den mest vanligt förekommande neurologiska sjukdomen efter Alzheimers sjukdom. Sjukdomen drabbar mestadels äldre människor och vanliga motoriska symtom är stelhet, långsamma kroppsrörelser, instabil kroppshållning. Icke motoriska symtom är blodtrycksfall, nedstämdhet, depression. PS påverkar det centrala nervsystemet genom en förlust av en celltyp kallad A9 dopaminerga neuroner i substantia nigra, området i basala ganglierna lokaliserat i storhjärnan under hjärnbarken. En av orsakerna till förlusten av de dopaminerga neuronerna är utvecklandet av Lewykroppar. De är små sfäriska proteinstrukturer som ger upphov till celldöd i hjärnan, dessa kroppar är uppkallade efter den tyske läkaren Friedrich Heinrich Lewy. Hittills är medicinering med L-dopa och DBS, Deep Brain Stimulation, de mest beprövade behandlingsmetoderna för att behandla patienter med PS. För att patienten ska ha möjlighet att återgå till ett normalt liv igen försöker man i dagsläget med stamcellstransplantationer att ersätta skadade dopaminerga neuroner, som blivit degenererade under sjukdomsförloppet, med nya friska dopaminerga neuroner. Genom cellterapibehandlingen reduceras patientens motoriska symtom och den dopaminerga nivån ökar i striatum. I den här litteraturstudien har jag undersökt och jämfört studier på människor med andra studier där man har tillämpat två behandlingar på primater och råttor som försöksorganismer. 6-OHDA och MPTP är två neurotoxiska behandlingar som används för att frambringa liknande symtom som patienter med PS upplever. Symtomen behandlades sedan genom att transplantera in friska dopaminerga neuroner *in vitro* i individens hjärna. I den här studien undersöks också hur tre olika typer av stamceller kan användas i cellterapi och undersöker även vilken eller vilka av dessa som är effektivast, för att generera dopaminerga neuroner till hjärnan. De tre typerna är pluripotenta stamceller, inducerade pluripotenta stamceller (IPS-celler) och multipotenta stamceller (MS-celler). Embryonala stamceller (ES-celler) som tillhör klassen pluripotenta stamceller visar sig bäst lämpade i stamcellstransplantationer eftersom de kan differentiera till nästan vilken celltyp som helst i kroppen. Transplantationsförsök med stamceller på humana patienter har genomförts med varierande resultat. Resultaten baseras på de kliniska aspekterna som man måste ha i åtanke. Risken för kontaminering hos stamcellerna kan leda till teratomer¹ vid transplantationstillfället, ohejdad celltillväxt, som leder till att de transplanterade stamcellerna i hjärnan dör. I framtiden krävs en hel del forskning för att förstå bakgrunden till sjukdomsförloppet hos patienter med PS och hur man på ett säkrare sätt kan transplantera in stamceller.

Inledning

Parkinsons sjukdom (PS)

Sjukdomen upptäcktes för första gången år 1817 av Dr. James Parkinson genom dokumenterade observationer av sin egen trädgårdsmästare. Vid upptäckten fick sjukdomen namnet shaking palsy², senare fick den namnet Parkinsons sjukdom (PS) (Singh *et al.* 2007). PS är efter Alzheimers sjukdom den mest förekommande neurodegenerativa sjukdomen som finns idag (Dauer & Przedborski 2003). Ungefär 10 miljoner människor runt om i världen lever idag med PS, varav cirka 4 % av de patienter som har sjukdomen diagnostiseras innan 50 års ålder (parkinsonsdiseasefoundation.org 2013). I Sverige har ungefär 15 000 – 20 000 personer sjukdomen och varje år diagnostiseras 2000 nya fall (vårdguiden.se 2011). PS är

Teratomer¹ = tumör som utgår från stamceller

Shaking palsy² = skakning pares, numera kallat Parkinsons sjukdom

klart mest vanligt bland äldre människor, statistiskt sett ökar sannolikheten ju äldre man blir att drabbas av sjukdomen (Toulouse & Sullivan 2008). Patienter med PS upplever både motoriska och icke motoriska symtom. De motoriska symtomen består av muskelskakningar, stelhet, långsamma kropps rörelser, instabil kroppshållning och balanssvårigheter (Singh *et al.* 2007). Icke motoriska symtom består av sömnproblem, blodtrycksfall, depression och nedstämdhet (parkinsonguiden 2014). Patienten försämras gradvis med tiden och dagliga aktiviteter begränsas på grund av sjukdomen. I de flesta fall är sjukdomsförloppet så allvarligt att det leder till allvarlig funktionsnedsättning hos patienten (Garcia-Borreguero *et al.* 2003). Parkinsons sjukdom delas oftast in i tre stadier: symtomen lindras eller bromsas med behandling, kallas för den tidiga fasen. När symtomen kommer och går under dagen kallas den för fluktuationsfasen. Efter en längre tid med sjukdomen, cirka 10 år inträffar komplikationsfasen, vilket innebär att patienten endast under korta perioder av dagen har full rörlighet (socialstyrelsen 2013). Parkinsons sjukdom påverkar det centrala nervsystemet (CNS) som hos vertebrater består av hjärnan och ryggmärgen. Sjukdomen uppstår genom en förlust av de dopaminerga neuronerna³ i substantia nigra som är en del av basala ganglia i storhjärnan. Det leder till att nivån av dopamin sjunker vilket i sin tur leder till de typiska symtomen (Toulouse & Sullivan 2008). När de första symtomen börjar visa sig är endast 20 % av de dopaminerga neuronerna fortfarande friska i området substantia nigra (Singh *et al.* 2007). Troliga orsaker som kan leda till PS hos patienten är specifika mutationer i generna, mutationerna förekommer mest om flera familjemedlemmar är drabbade. Miljögifter och andra miljöfaktorer kan leda till att man utvecklar PS vid ett senare skede i livet (Mayoclinic.org). En annan orsak till varför man utvecklar PS upptäcktes av en tysk läkare vid namn Friedrich Heinrich Lewy. Genom att färga in snitt av hjärnvävnad med haematoxylin och eosin, de vanligaste infärgningar som används inom histologi, kunde han se att en av färgerna specifikt färgade in Lewykropparna. Lewykroppar är proteinansamlingar som finns närvarande vid degenerering av nervceller vid Parkinsons sjukdom. Deras storlek och form varierar beroende på var de är lokaliserade i CNS (Holdorff 2010).

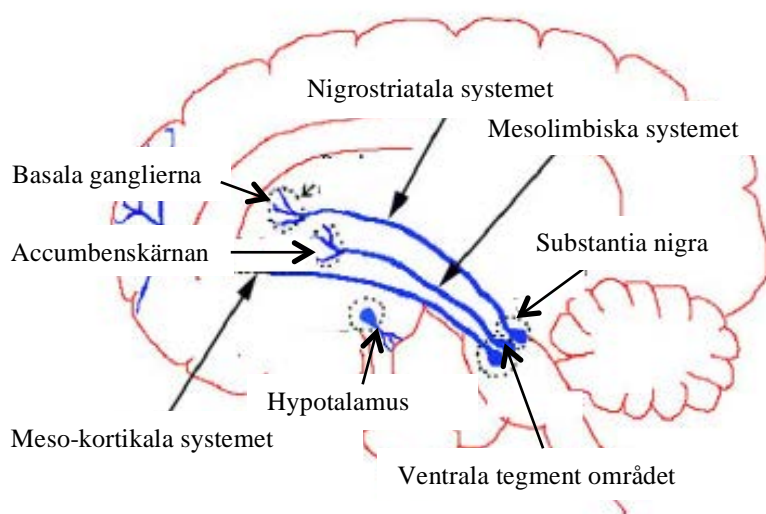
Syfte och frågeställningar

Cellterapi innebär att man använder nya friska stamceller för att behandla en sjukdom. I framtiden vill man att den här metoden ska användas för att bland annat bota Parkinsons sjukdom, cancer och diabetes. I dag finns ett stort intresse att använda stamceller i cellterapi som behandlingsmetod för att försöka bota Parkinsons sjukdom. Detta innebär att man ersätter degenererade dopaminerga neuronerna genom att transplantera in friska stamceller. Genom stamcellsbehandling återställs patientens funktionella förmåga, det är den enda behandlingen hittills som kan visa att patienten kan återgå till sin normala funktionella förmåga igen (Singh *et al.* 2007). Syftet med det här litteraturarbetet är att undersöka vilka fördelar och nackdelar som finns med stamceller i cellterapi som behandlingsmetod. I den här studien undersöks tre olika stamceller: inducerade pluripotenta stamceller (IPS-celler), multipotenta stamceller (MS-celler) och embryonala stamceller (ES-celler) som tillhör klassen pluripotenta stamceller (PS-celler). Huvudfrågeställningen är: Vilken eller vilka stamceller är effektivast som behandlingsmetod i cellterapi för Parkinsons sjukdom? Vilka är fördelarna och nackdelarna med cellterapi? Vilka utmaningar finns det inom stamcellsforskningen?

Dopaminerga neuronerna³ = nervceller som signalerar med dopamin

Dopaminerga neuroner

Dopamin tillhör gruppen katekolaminer, ett hormon som insöndras⁴ av binjuremärgen när man drabbas av psykisk stress och vid låga blodsockernivåer. Hormonet är kopplat till hjärnans belöningssystem som bland annat reglerar vårt välbefinnande och koordination av rörelser vilket i sin tur är kopplat till de basala ganglierna. Dopamin bildas huvudsakligen av dopaminerga neuroner som är lokaliserade i den övre delen av hjärnstammen i substantia nigra. På svenska kallas substantia nigra för den svarta substansen på grund av att nervcellskropparna, soma⁵, som är lokaliserad här har ett pigment som innehåller melanin. Finmotoriken som koordinerar våra rörelser kontrolleras av dopaminerga neuroner i de basala ganglierna. Sådana rörelser sker med hjälp av det somatiska nervsystemet, nerver som reglerar de viljestyrda musklerna i kroppen, som bland annat pendling med armarna, muskelrörelser och reglering av den mimiska ansiktsmuskulaturen. När man får PS dör de dopaminerga neuronerna i substantia nigra som har förbindelse med de basala ganglierna. Till de basala ganglierna hör strukturerna putamen, yttre skalkärnan, caudate, svanskärnan och nucleus accumbens, accumbenskärnan, alla tre stukturer kallas med ett samlingsnamn för striatum, strimmiga kroppen. Utöver dessa strukturer tillhör även substantia nigra, svarta substansen och globus pallidus, den inre bleka kärnan, de basala ganglierna. Nervcellernas dopamindistribution fördelas även till andra områden där belöningssystemet ingår, dessa områden inkluderar tinningloben, amygdala och frontalloben (hjärnguiden.se 2009). Figur 1 ger en översikt av hjärnans belöningssystem. Figur 2 visar ett tvärsnitt av de anatomiska strukturerna i området basala ganglierna i hjärnan.

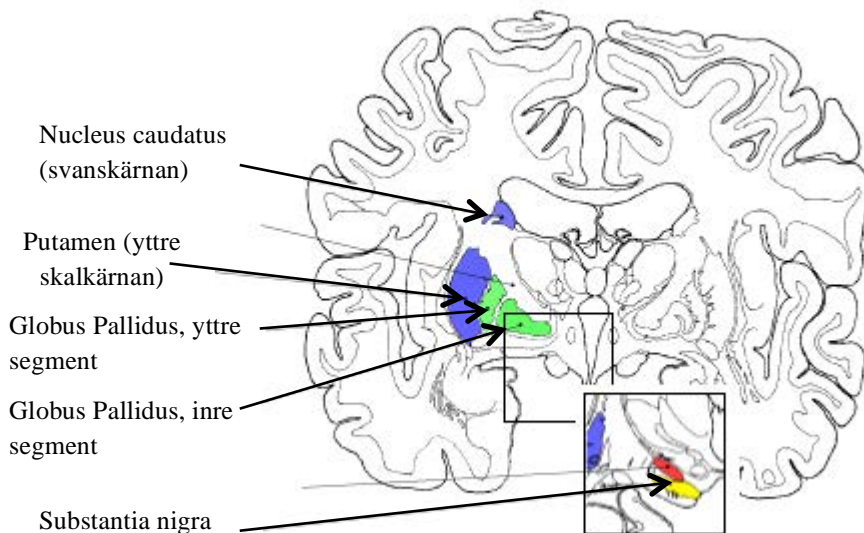


Figur 1.

Substantia nigra är lokaliserat i den övre delen av hjärnstammen, nervcellstyperna i det här området ingår i det nigrostriatala systemet som går ända upp till striatum, i de basala ganglierna, som reglerar vår rörelsefunktion. Precis under substantia nigra ligger ventrala tegment området, lite högre upp finns det mesolimbiska systemet som reglerar hjärnans belöningssystem. Till belöningssystemet hör bland annat ventrala tegment området, accumbenskärnan, frontalloben. Bilden är omarbetad efter Shankar *et al* (2005).

Insöndras⁴ = inre sekretion av hormon till blodet

Soma⁵ = nervcellens centrala del som reglerar ämnesomsättning



Figur 2.

De anatomiska strukturerna för de basala ganglierna. Omarbetad efter Gillies (1995).

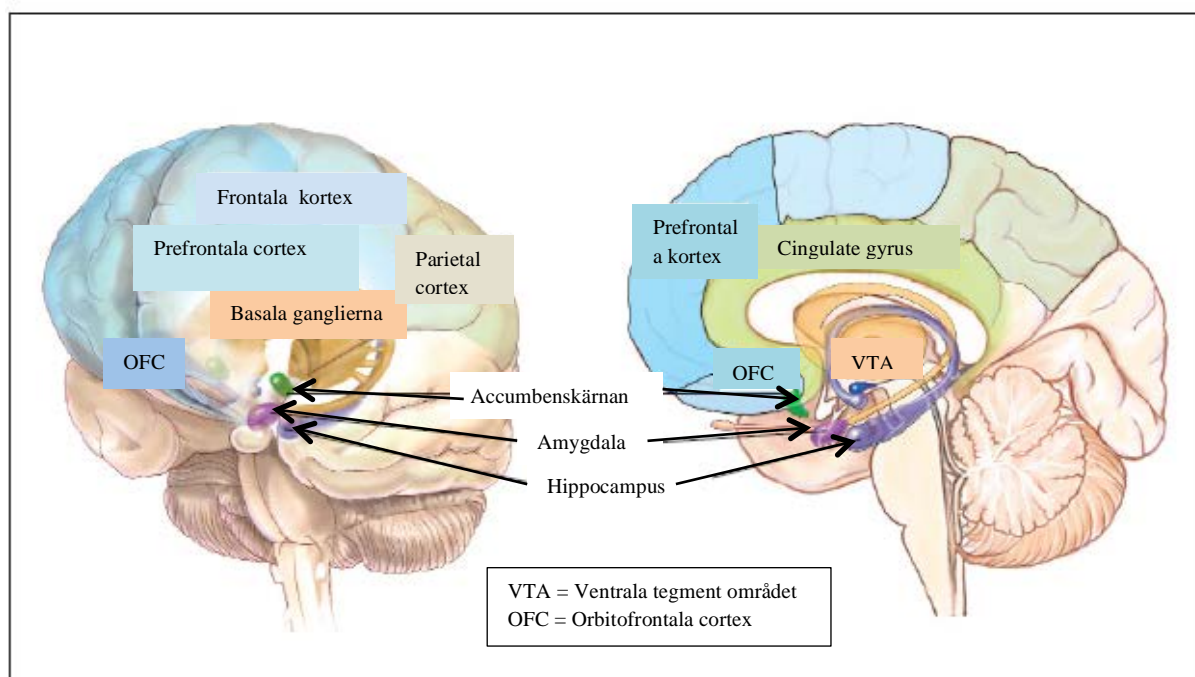
Indelning av dopaminerga neuroner

Distributionen av dopaminerga neuroner sträcker sig från mellanhjärnan som bland annat består av thalamus och hypotalamus, mitthjärnan som kontrollerar basala kroppsfunktioner som bland annat syn, hörsel, motorisk kontroll, temperaturreglering och luktcentra. Ett av de betydelsefulla dopaminerga systemen i mellanhjärnan kallas för det nigrostriatala, fördelning av dopaminerga neuroner i detta system sker från substantia nigra och distribueras ända till dorsala⁵ striatum i de basala ganglierna. Detta system är av betydelse för reglering av frivilliga rörelser. De andra två systemen kallas för de mesolimbiska och det mesokortikala. De dopaminerga neuronerna som tillhör dessa system har sitt ursprung i det ventrala⁶ tegmentområdet (Shankar *et al.* 2005). Man uppskattar att ungefär 75 % av alla dopaminerga neuroner är lokaliserade i den ventrala delen av mellanhjärnan hos en vuxen individ. I retrorubrala fältet, lokaliserat i mellanhjärnans ventrala del i tegmentområdet, hittar man A8 dopaminerga neuroner som är involverade i hjärnans belöningssystem och känslor. I substantia nigra pars compacta kan man identifiera A9 dopaminerga neuroner (Hegarty *et al.* 2013a). Klassen A9 dopaminerga neuroner är involverade i det motoriska systemet som reglerar hjärnans posturala reflexer, postural från lat. som betyder ställning och initiering av rörelse. De dopaminerga neuronerna hittar man även lateralt⁷ nära striatum i de basala ganglierna. Den vanligaste orsaken till att PS uppstår är att A9 dopaminerga neuroner reduceras i mellanhjärnan i de basala ganglierna (Momčilović *et al.* 2012). I ventrala tegmentområdet som är involverat i belöningssystemet finner man A10 dopaminerga neuroner (Hegarty *et al.* 2013a). De dopaminerga neuronerna i ventrala tegmentområdet är distribuerade i accumbenskärnan, luktknölen, del av luktcortex, septum, amygdala och hippocampus (Shankar *et al.* 2005). A10 dopaminerga neuroner hittar man även i ventrala striatum och i delar av limbiska systemet, där våra känslor skapas. Dessa neuroner påverkar bland annat hur anpassningsbar hjärnan är när saker i din omgivning förändras (Momčilović *et al.* 2012). Figur 3 ger en tydlig bild av hjärnans belöningssystem.

Dorsala⁵ = ryggsidan av en organism

Ventral⁶ = lokalisering av anatomisk struktur ner mot buksidan hos en individ

Lateralt⁷ = vid sidan om

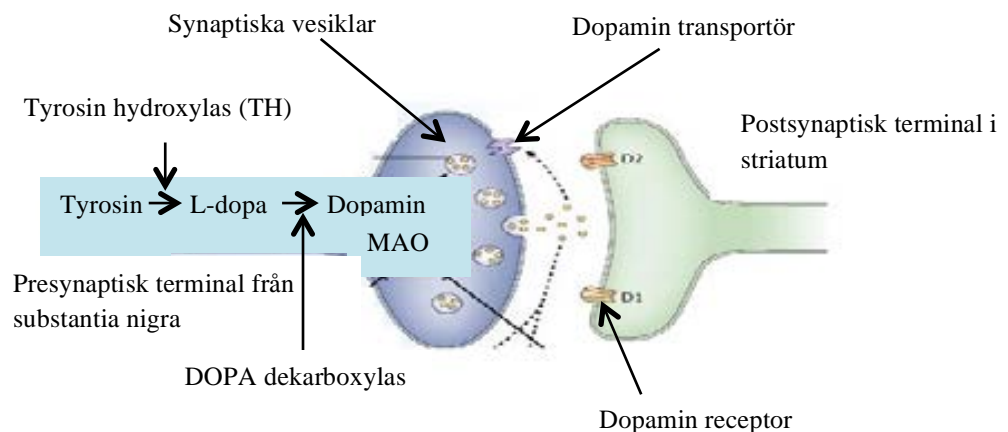


Figur 3.
 Bilden visar de anatomiska strukturerna som är kopplade till hjärnans belöningsystem. Bilden är omarbetad efter Fowler *et al.* (2007)

Traditionell behandling

Levodopa, L-dopa behandling

I dagsläget använder man Levodopa (L-dopa) som medicinering för att behandla patienter med PS, vilket reducerar deras karaktäristiska skakningsymtom (Cools 2006). L-dopa är ett förstadium till dopamin som tränger igenom blod-hjärnbarriären och fördelas med hjälp av hjärnans blodkärl ut i hjärnvävnaden. Dopamin kan inte penetrera blod-hjärnbarriären. Medicineringen sker i början med låg dos för att efter ett tag succesivt ökas för att ge patienten bästa möjliga lindring av symtomen. Patienten brukar uppleva en effekt av L-dopa medicinering efter några veckors behandling och en maximal effekt kan dröja upp till flera månader (parkinsonförbundet.se). Hittills är L-dopa den mest effektiva medicineringen vid behandling av motoriska symtom (Toulouse & Sullivan 2008). Figur 4 illustrerar hur L-dopa omvandlas till substansen dopamin i den presynaptiska terminalen i substantia nigra och förmedlas vidare via vesiklar som transmittor transportörer till den postsynaptiska terminalen i striatum. En vesikel är generellt sett en organell som oftast bara är en lipidbubbla (Moussa *et al.* 2006).



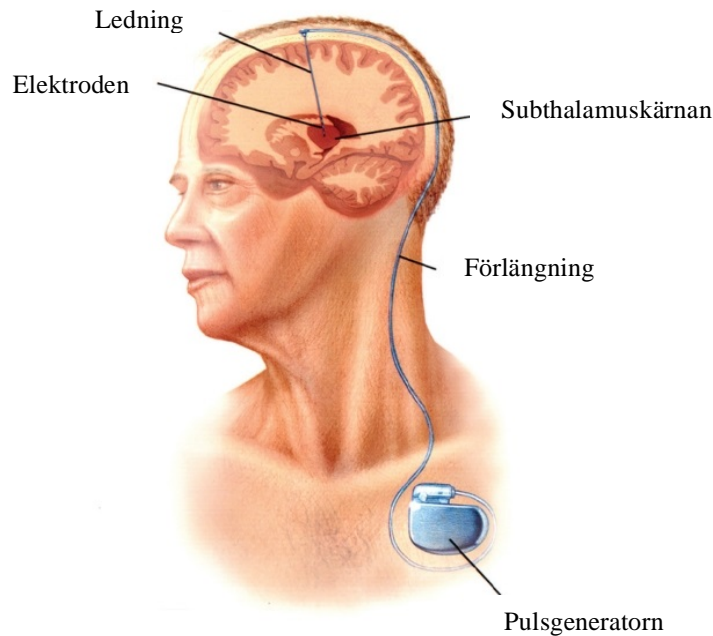
Figur 4.

Tyrosin omvandlas till L-dopa med hjälp av enzymet tyrosin hydroxylas. Ett annat enzym DOPA dekarboxylas, omvandlar i sin tur L-dopa till dopamin. MAO står för monoamin oxidas A som är ett enzym som degraderar dopamin när det inte behövs mer. Dopamin transporteras med vesiklar via exocytos från den presynaptiska änden till den postsynaptiska terminalen i striatum, där dopamin binder till dopaminreceptorerna D1 och D2. Bilden är omarbetad efter Moussa *et al.* (2006).

Deep brain stimulation (DBS) behandling

En annan behandlingsmetod som finns idag är eng. Deep Brain Stimulation (DBS) (djup stimulering i hjärnan) (Björklund *et al.* 2001). DBS behandlingen går ut på att man opererar in elektroder i hjärnan där man skickar elektriska impulser med hög frekvens för att frigöra hormonet dopamin (Toulouse & Sullivan 2008). Man behöver fyra komponenter för att genomföra en DBS behandling: en elektrod, en tunn ledning som man för in i en smal öppning i huvudet som opereras in i den specifika delen av hjärnan som ska stimuleras, en förlängning som kopplas via en ledning till elektroden som går under huden vid skallområdet via nacken till ryggen. Den fjärde komponenten är neurostimuleraren, även kallad pulsgeneratoren, som man opererar in under huden vid nyckelbenet. Den kopplas till elektroden och förlängningen (parkinson.org 2014). Vid användning av den här metoden har man lyckats stimulera subthalamuskärnan (eng. subthalamic nucleus), figur 5, vilket bidragit till återetablering av patientens funktionella förmåga och lett till att förbättra patientens vardagliga liv (Witt *et al.* 2013). Hur sjukdomens fysiologiska orsak är kopplad till subthalamuskärnan är fortfarande okänd, men man vet att stimulering av den här delen med DBS behandling förbättrar PS patienters motoriska symtom. Prognosen efter en genomgången behandling är positiv för de flesta patienterna med minskade symtom vid PS. I kombination med L-dopa medicinering efter att man genomgått DBS behandling har forskare observerat reducerade motoriska symtom när det gäller koordination av ofrivilliga muskelrörelser. Nackdelen med DBS behandling i samband med anestesi⁸ är att sannolikheten ligger mellan 1-3% att drabbas av en infektion, stroke, kranieblödning eller annan typ av komplikation efter behandlingen (parkinson.org 2014). I figur 5 kan man se de olika komponenterna som används vid en DBS behandling samt lokalisering av subthalamuskärnan.

Anestesi⁸ = bedövning av kroppens sinnesintryck



Figur 5.

Figuren illustrerar de olika komponenterna som behövs vid en DBS behandling. I bilden kan man se att pulsgeneratoren är inopererad vid nyckelbenet. Från pulsgeneratoren går en förlängning som kopplas till en ledning som har förbindelse med elektroden som är lokaliserad i subthalamuskärnan. Omarbetad efter Lyons *et al.* (2011).

Cellterapiens historik inom Parkinsons sjukdom

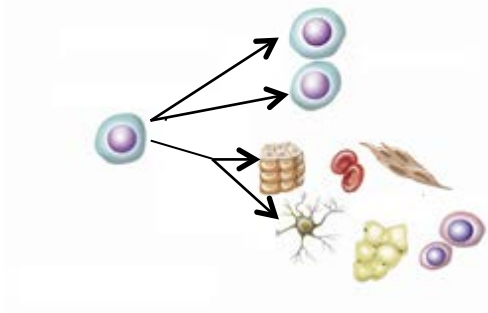
År 1987 gav cellterapiforskningen resultat. Då lyckades man genomföra den första kliniska transplantationen av stamceller på en patient genom att använda embryonal vävnad från mellanhjärnan av ett foster. Efter det här genombrottet har man lyckats genomföra den här behandlingen på fler än 400 patienter med PS (Nishimura & Takahashi 2013). Transplantation av nya dopaminerga neuroner som ersätter degenererade neuroner är ett lovande tillvägagångsätt för behandling av PS (Singh *et al.* 2007).

Stamceller

Vad är stamceller?

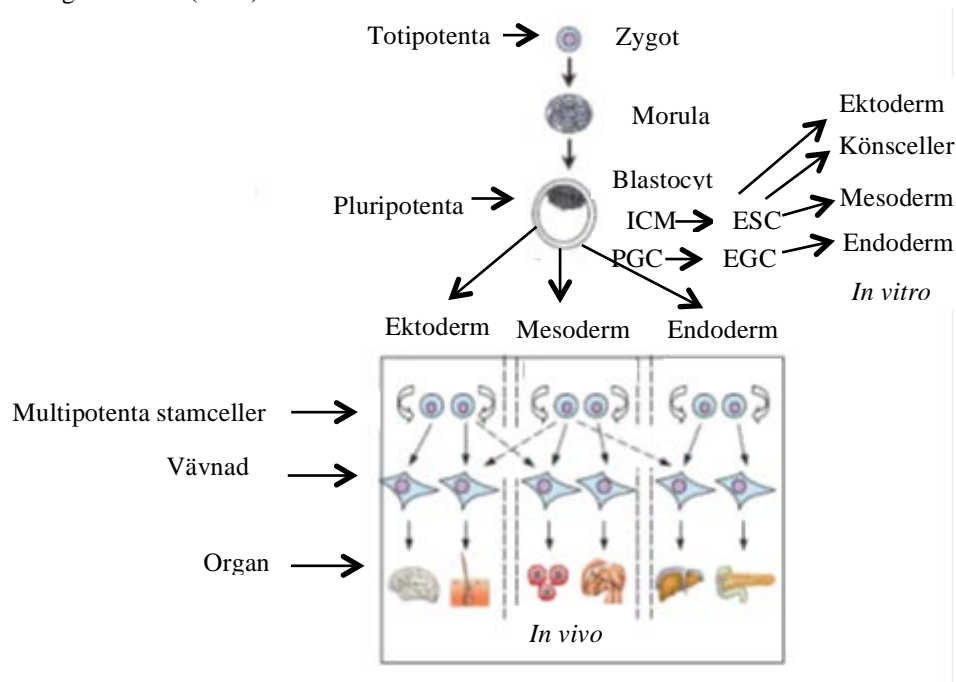
Stamceller definieras som celler som inte har en specialiserad funktion. Dessa celler kan dela sig och ge upphov till ett stort antal differentierade, användbara och mogna stamceller. Stamceller delas in i tre klasser: totipotenta, pluripotenta och multipotenta. Den översta klassen i stamcellshierarkin kallas för totipotenta stamceller, de är unika på grund av sin förmåga att skapa alla möjliga celltyper i kroppen och i placentan. Klassen som kommer efter de totipotenta kallas för den pluripotenta även kallade embryonala stamceller (ES-celler) som är isolerade från det inre cellagret från eng. inner cell mass (ICM) från blastocyster, ett utvecklingsstadium hos ett embryo efter morula fasen, en cellklump som består av nio celler eller fler. Till skillnad mot totipotenta stamceller kan ES-cellerna nästan ge upphov till alla typer av differentierade stamceller i kroppen förutom i placentan. Man har under senare tid lyckats utveckla en ny klass av pluripotenta stamceller som kallas inducerade pluripotenta stamceller (IPS-celler) som har sitt ursprung från vuxna somatiska celler, alla kroppens celler förutom könscellerna. Multipotenta stamceller är den tredje klassen som ger upphov till

differentierade celltyper i organ och vävnader. De har förmågan att återskapa sig själva men är mer begränsade än pluripotenta stamceller, genom att de endast kan ge upphov till differentierade celler av en viss typ (Parish & Arenas 2007). Neurala stamceller (NS-celler) är en klass av multipotenta stamceller som kan differentiera till tre celltyper i CNS: neuroner, astrocyter och oligodendrocyter (Kim & de Vellis 2009). I figur 6 kan man se hur en stamcell genom celledelning ger upphov till differentierade stamceller (nas-sites.org/stemcells 2013). Figur 7 ger en överblick av strukturen för de olika typer av stamceller som representeras av klasserna totipotenta, pluripotenta och multipotenta stamceller (Wobus & Boheler 2005).



Figur 6.

Figuren visar hur en stamcell från början inte har någon specialiserad funktion. De kan efter en viss tid antingen självåterskapa sig genom celledelning eller ge upphov till differentierade stamceller i hela kroppen. Blodceller, muskelceller, nervceller och celler i de langerhanska öarna är bara några exempel. Omarbetad efter nas-sites.org/stemcells (2013).



Figur 7.

Den totipotenta klassen avser zygot och tidig celledelningsfas fram till morula fasen. De pluripotenta stamcellerna (ES-cellerna) bildas från det inre cellagret från blastocyster som är ett utvecklingsstadium efter morula fasen. Dessa stamceller ger upphov till de tre groddbladen: endoderm, ektoderm och mesoderm och köns-cellerna men inte celler i placentan. I den vuxna människokroppen finns multipotenta stamceller, från organ och vävnader sker differentiering till specifika celltyper, exempelvis hjärtceller, muskelceller, nervceller. Bilden är omarbetad efter (Wobus & Boheler 2005).

Embryonala stamceller (ES-celler)

ES-celler, kallade pluripotenta stamceller, kommer från det inre cellagret hos blastocyter som är ett utvecklingsstadium efter morula fasen. De här cellerna kan odlas *in vitro* och producera differentierade stamceller som i sin tur kan ge upphov till specifika celler (Loewenbrück & Storch 2011). Celltyper som är producerade *in vitro* av ES-celler är att föredra om man jämför med multipotenta stamceller för tillämpning inom medicinska forskningsområden (Bishop *et al.* 2002). Detta eftersom multipotenta stamceller är mer begränsade till att skapa specifika celltyper, dessa celler ger endast upphov till differentierade stamceller från specifika organ eller vävnader (Campbell *et al.* 2008 pp 462-463). Man har börjat använda sig av humana embryonala stamceller (hES-celler) från den inre cellmassan från humana blastocyter för försök på råttor med Parkinsonliknande symtom (Ben-Hur *et al.* 2004). I dagsläget befinner sig stamcellsforskning med hES-celler i ett grundläggande skede. Detta beror bland annat på de etiska riktlinjerna, cellernas tillväxt måste kontrolleras noggrant annars är risken för tumörutveckling hög. De differentierade cellerna måste introduceras och anpassas till den nya vävnaden i kroppen vid transplantation. Ett annat problem är avstötningsreaktionerna, en kraftig immunologisk reaktion där mottagarens immunförsvar slår bort de främmande cellerna (Läkartidningen 2001).

Dopaminerga neuroner från hES-celler vid behandling av 6-OHDA behandlade råttor

I en studie av Yang *et al.* (2008) transplanterades *in-vitro* differentierade dopaminerga neuroner genom operation i striatum hos råttor genom att använda pluripotenta humana embryonala stamceller. I studien injicerades ett neurotoxiskt gift kallat 6-hydroxydopamine (6-OHDA) i striatum i de basala ganglierna i mellanhjärnan hos råttorna. Giftet används för att förstöra neuroner som innehåller dopamin och för att framkalla PS symtom liknande de humana patienterna får. Efter ungefär 2-3 veckor differentierades de här cellerna till multipotenta stamceller, efter ytterligare 5 veckor differentierades de multipotenta stamcellerna till Tyrosin Hydroxylas celler (TH-celler), dessa celler insöndrar dopamin då de katalyserar bildandet av L-dopa, förstadium till dopamin. Efter *in vitro* differentieringen transplanterade man in dessa dopaminerga neuroner *in vivo* i striatum hos de behandlade råttorna. De kliniska aspekterna är det stora problemet i studien. Vid transplantation av *in vitro* genererade dopaminerga neuroner är risken för tumörbildningar hög hos de behandlade råttorna. Man observerade under ett visst antal veckor cellernas chans att överleva, hur väl de hade differentierat och deras spridning i hjärnan. I studien kunde man observera ökade tumörbildningar hos de *in vitro* differentierade dopaminerga neuronerna från hES-celler under en 8-13 veckor period efter transplantation. En råtta avled 2 veckor efter transplantation på grund av orsaker som inte var relaterade till transplantation av dopaminerga neuroner. För alla andra överlevande råttor kunde man observera att dopaminerga neuroner hade introducerats i striatum i deras hjärna efter transplantation. Efter en längre period, ungefär 5 månader, identifierade man fler överlevande dopaminerga neuroner och färre teratombildningar. Majoriteten av de här neuronerna uttryckte de förväntade egenskaperna i mellanhjärnan hos råttor med 6-OHDA behandling. De motoriska symtomen hade reducerats och visade på en förbättrad återhämtning av rörelseförmågan hos de behandlade råttorna.

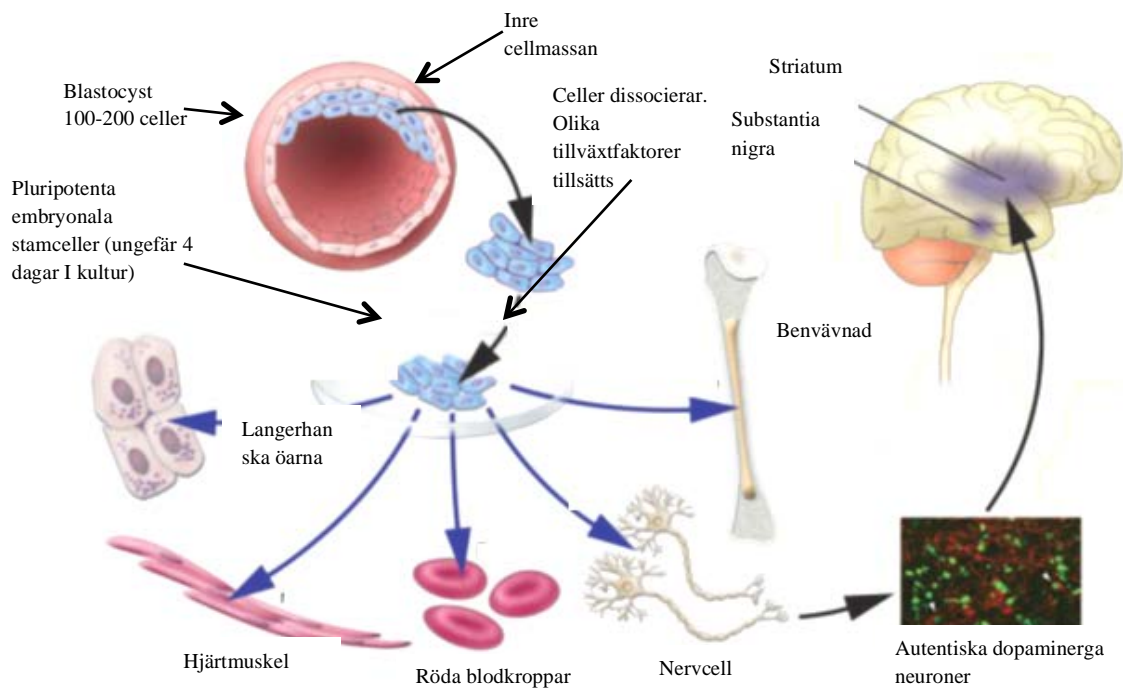
Transplantation av dopaminerga neuroner i apor som behandlats med MPTP

ES-celler från friska apor användes för att utveckla differentierade dopaminerga neuroner för transplantation av apor som blivit behandlade med ett neurotoxiskt gift kallat 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) (Takagi *et al.* 2005). MPTP är ett nervgift som skadar nervceller som innehåller dopamin. På samma sätt som 6-OHDA ger giftet upphov till symtom som liknar de som patienter med PS får. ES-celler från apor differentierades till NS-celler genom att kultiveras *in vitro*, de gjordes till neurosfärer, en samling av stamceller som man kan manipulera. Dessa innehöll dopaminerga neuroner. I provet tillsatte man fibroblast tillväxt faktor 20 från eng. fibroblast growth factor 20 (FGF 20). Tillväxtfaktorn gör att de differentierade dopaminerga neuronerna skyddas i substantia nigra. Med tillväxtfaktorn som en av huvudkomponenterna vid transplantationen, tillsammans med de *in vitro* differentierade ES-cellerna, kunde man observera en ökad mängd dopaminerga neuroner. Efter transplantation kunde man med hjälp av behandlingsmetoden transplantera in de differentierade dopaminerga neuronerna hos arten krabmakak⁹ som behandlats med MPTP. Efter en viss tid kunde man se att de ursprungliga ES-cellerna uppförde sig som dopaminerga neuroner i deras hjärna. Man kunde även observera en minskning av symtomen. Slutsatsen var att *in vitro* behandling av ES-celler tillsammans med fibroblast tillväxt faktor 2 (FGF 2), FGF 20 gav upphov till en ökad andel dopaminerga neuroner hos de behandlade individerna. Efter 10 veckor observerade man en enorm förbättring av symtomen. Kroppshållningen var en av förbättringarna men även deras rörlighet. Huvudskakningssymtomen var dock oförändrade.

Kliniska aspekter

Trots ovan beskrivna försök har transplantation av pluripotenta stamceller i humana individer för att utveckla dopaminerga neuroner inte visat sig ge samma effekt om man jämför med försök där man transplanterat pluripotenta stamceller i möss. Dels beror det på att dopaminerga neuroner från pluripotenta stamceller visar en försämrad överlevnad *in vivo* hos humana individer i jämförelse med möss, men även när cellerna är introducerade i den humana hjärnan är risken stor att utveckla teratomer, obegränsad celltillväxt (Kriks *et al.* 2011). Lyckade försök som beskrivits ovan har genomförts för att erhålla dopaminerga neuroner från ES-celler *in vitro*, dock är dessa forskningsresultat i allmänhet varierande och mer forskning krävs inom ES-celler och dess tillämpning inom PS. En av orsakerna till varierande resultat kan bero på att cellkulturen som innehåller dopaminerga neuroner *in vitro* kan innehålla neuroner som inte blivit dopaminerga, vilket ger upphov till kontaminering och som oftast leder till teratomer (Ganat *et al.* 2012). En annan orsak kan vara utbredningspotentialen eftersom man inte vet om miljön där man introducerar de dopaminerga neuronerna är den mest optimala. Det kan baseras på att de dopaminerga neuronerna måste erhålla en korrekt cellfenotyp i stor kvantitet under ett längre tidsperspektiv efter en transplantation. Figur 8 visar en översikt av hur ES-celler tas från det inre cellagret från blastocyter, de växer sedan *in vitro* ungefär 4 dagar. De kan sedan differentiera och antingen bli nervceller, benvävnadsceller, hjärtmuskelceller eller dopaminerga neuroner (Langston 2005).

Krabmakak⁹ = en ursprunglig trädlevande apa som tillhör släktet makaker



Figur 8.

En bild som visar en översikt av hur ES-celler tas från ett embryo för att utvecklas till att bli differentierade dopaminerga neuroner i striatum och substantia nigra. De pluripotenta stamcellerna differentieras *in vitro* till att bli differentierade stamceller och sedan specifika celler. Bilden är omarbetad efter Langston (2005).

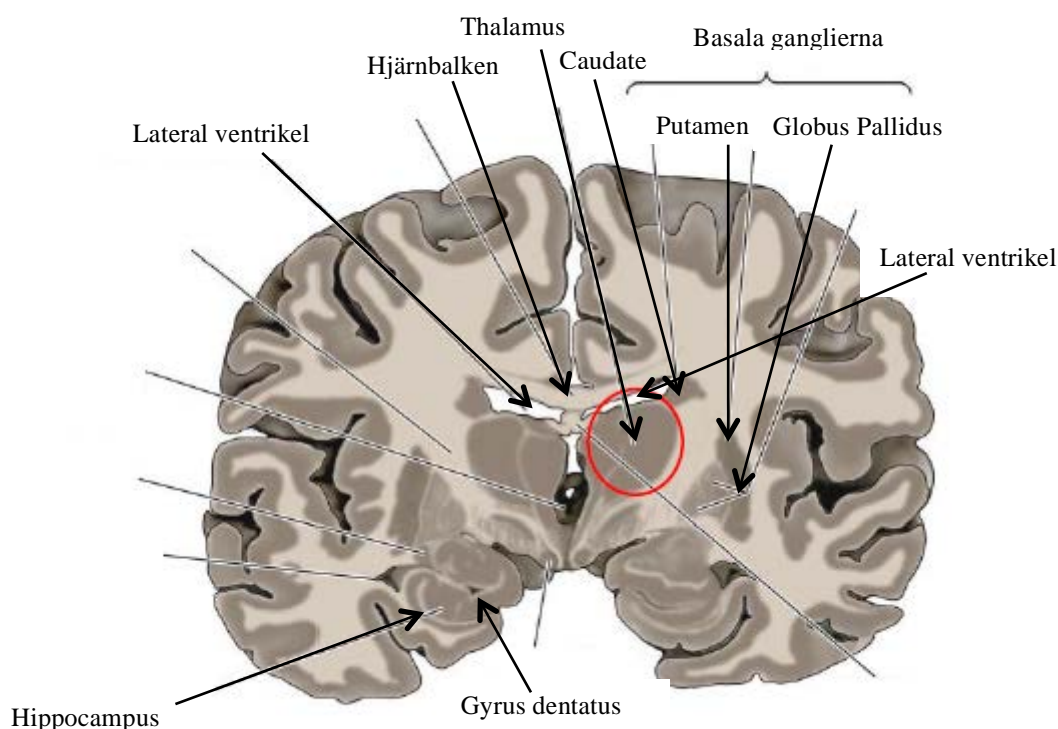
Inducerade pluripotenta stamceller (IPS-celler)

Det som särskiljer IPS-celler från ES-celler är att patienter som lider av en sjukdom kan få sina egna celler omprogrammerade till att bli IPS-celler. En metod är att man tar hudceller från en patient. Cellerna kultiveras *in vitro* med hjälp av transkriptionsfaktorer så att cellerna blir IPS-celler. Genom att behandla IPS-cellerna med lämpliga komponenter kan de differentiera till olika celltyper, exempelvis hjärtceller som sedan transplanteras in till den vävnad som blivit skadad. Celler omprogrammerade till IPS-celler har redan börjat användas på patienter med diabetes typ 1, Parkinsons sjukdom, Alzheimers sjukdom och andra sjukdomar (Campbell *et al.* 2008 pp. 462- 463). IPS-celler och ES-celler har liknande egenskaper gällande deras pluripotens, kapacitet att skapa samtliga stamceller i kroppen och hur teratomer kan uppstå (Aguila *et al.* 2012). Följande krav är uppsatta för att IPS-celler på ett säkert sätt ska kunna transplanteras in i en patient och speciellt i dess hjärna: De får inte ha någon avvikande kromosomstruktur och det får endast ske minimala *de novo* förändringar, mutationer som inte har ärvts. Man måste med hög sannolikhet kunna erhålla A9 dopaminerga neuroner (Cooper *et al.* 2012).

Neurala stamceller (NS-celler)

Neurala stamceller är en klass av multipotenta stamceller som har sitt ursprung i CNS. Idag finns det möjligheter att använda patientens egna NS-celler för att på så sätt bilda dopaminerga neuroner (Lindvall 2003). De har också förmågan att återskapa sig själva, och samtidigt skapa inriktade celltyper genom differentiering (Gage 2000). När CNS är under

utveckling skapas nästan alla nervceller från NS-cellerna. I den vuxna hjärnan hos människor är NS-celler lokaliserade till framförallt två områden i hjärnan, den subgranulära zonen vilket är en del av gyrus dentatus i hippocampus och den subventrikulära zonen lokaliserad längs de laterala ventriklarna, figur 9. Eftersom NS-celler har förmågan att differentiera till olika celltyper i den vuxna hjärnan är de lämpliga för cellterapi behandling av PS (Palm *et al* 2012). I framtiden kommer troligen möjligheten finnas att plocka ut NS-celler från hjärnan. De här cellerna skulle klassificeras *in vitro* och sedan transplanteras åter i hjärnan. I dagsläget finns det ingen teknik för att kunna utföra den här metoden. Det finns olika orsaker till det, bland annat i hur stor utsträckning NS-celler kan erhållas från hjärnan för att bli differentierade dopaminerga neuroner (Lindvall 2003).



Figur 9.

De neurala stamcellerna kan lokaliserats i två områden, den subgranulära zonen som är belägen i gyrus dentatus i området hippocampus och den subventrikulära zonen som är lokaliserad längs de laterala ventriklarna. Omarbetad efter Purves *et al.* (2012).

Diskussion och slutsats

Vad är utmaningarna med stamcells forskning?

Föreställ er att man kan byta ut degenererade neuroner och ersätta dessa med dopaminerga neuroner från exempelvis ES-celler, NS-celler eller IPS-celler utan några som helst kliniska komplikationer. I framtiden kommer det troligen att vara möjligt då tekniken för att göra stamcellstransplantationer succesivt förbättras. Innan man kan börja behandla neurologiska sjukdomar med stamceller måste man lösa de kliniska problemen. Trots att ES-celler visat sig mest lämpade inom cellterapi finns det dock en risk när de kommer till transplantationer eftersom risken för utveckling av tumörbildningar är hög. I de flesta

stamcellstransplantationer där man har lyckats återställa patientens funktionella förmåga har man kunnat minska medicinering med L-dopa. En patient kunde dra tillbaka sin medicinering med L-dopa 3 år efter en stamcellsbehandling (Piccini *et al.* 1999). Lindvall (2003) poängterar faktorer som kan reducera patienternas PS symtom efter en transplantation. Cellerna som differentierar måste ha en specifik form och fysiologiska egenskaper för att bli tillämpbara som dopaminerga neuroner, det krävs ungefär 100 000 dopaminerga neuroner för att man på längre sikt ska kunna se deras överlevnadschanser, speciellt i området putamen i striatum. Man måste även kunna skapa ett dopaminsystem i stora delar av striatum där dopamin kan frigöras, de dopaminerga neuronerna ska även kunna bilda ett nätverk i de basala ganglierna för att bland annat ha möjligheten att återskapa det nigrostriatala nätverket.

Cellterapi med hjälp av stamceller

Det finns två olika sätt att använda stamceller för transplantation i PS. Det första är att stamcellerna är klassificerade *in vitro* som dopaminerga neuroner före transplantationen, de kan sedan standardiseras och kvalitetskontrolleras med avseende på sin användbarhet och renhet. Det andra sättet är att när man har implanterat stamcellerna *in vivo* kan de differentieras till dopaminerga neuroner i substantia nigra eller striatum. Att utföra cellterapi med hjälp av NS-celler för att behandla den infekterade eller sjuka hjärnan har på senare tid ökat chanserna att kunna behandla neurologiska sjukdomar (Kim *et al.* 2013). Med hjälp av cellterapi underlättar man PS symtomen (Politis *et al.* 2012). När det gäller de kliniska aspekterna måste man tänka på att dopaminerga neuroner som är genererade från stamceller måste ha samma fenotypiska egenskaper som de dopaminerga neuronerna i hjärnan och uppfylla de egenskaper som krävs för att bli dopaminerga neuroner i substantia nigra (Lindvall 2012). Rent hypotetiskt är det troligen möjligt att framställa dopaminerga neuroner från fyra olika källor, ES-celler från fertiliserande ägg, NS-celler från embryonal eller vuxen hjärna och från stamceller i andra vävnader (Lindvall 2002).

Kliniska problem gällande cellterapi

Det finns några problem som man måste ha i åtanke gällande stamceller i cellterapi som behandlingsmetod. Det första problemet är bildandet av tumörer, teratomer hos nya stamceller som man transplanterar in i hjärnan. Problemet är störst hos ES-celler som är odifferentierade. Där är sannolikheten betydligt högre att teratomer bildas i jämförelse med pre-differentierade ES-celler *in vitro* som utvecklas till dopaminerga neuroner. Vid användande av dessa celler har man lyckats ta bort tumörbildningen innan de transplanteras in i hjärnan hos patienter (Luo *et al.* 2009). Ett annat problem är kostnaden för att genomgå en stamcellstransplantation, i Lund ligger kostnaden på omkring 150 000 – 200 000 kronor om man gör en bilateral operation, ytterligare forskning kommer dock göra att kostnaderna kan reduceras (lakartidningen 2014).

Framtidsutsikter för cellterapi

Eftersom stamceller kan användas för att generera vilken celltyp som helst är intresset stort för att behandla kroniska neurodegenerativa sjukdomar, hjärtsjukdomar och diabetes. Flera studier som har tagits upp i det här litteraturarbetet visar på att transplanterbara dopaminerga neuroner kan utvecklas från ES-celler och prövas i olika försöksdjur: vanligast är primater, råttor, möss och även människor med undantag på grund av etiska och moraliska skäl.

Slutsats

I den här litteraturstudien har jag försökt få svar på frågeställningar genom att jämföra de tre olika stamcellerna och att undersöka vilken typ som är den mest effektiva i cellterapibehandling. För att sammanfatta de olika stamcellstyperna är pluripotenta stamceller ett intressant forskningsområde då dessa celler kan differentiera till vilken celltyp som helst i hela kroppen. I framtiden tror jag att intensivare forskning kommer att bedrivas på PS-celler för att få en djupare insikt till hur man kan bota sjukdomar som Alzheimers och Parkinsons sjukdom. Det är svårt att dra en parallell och säga att den ena stamcellstypen är att föredra framför den andra. NS-celler kan precis som PS-celler utvecklas till dopaminerga neuronerna och det gäller även IPS-celler. Framtiden får visa vilken stamcellstyp som är den mest pålitliga och användbara. Dock är de kliniska problemen i cellterapibehandling av betydelse, då det är svårt att genomföra lyckade transplantationer på människor utan att komplikationer ska kunna inträffa.

Tack

Jag skulle vilja rikta ett tack till alla som har bidragit till att hjälpa mig under hela skrivprocessen.

Referenslista

1177.se Parkinsons sjukdom. WWW Dokument 2013-11-12: <http://www.1177.se/Uppsala-lan/Fakta-och-rad/Sjukdomar/Parkinsons-sjukdom/>. Hämtad 2013-11-12.

Aguila, J.C., Hedlund, E., Sanchez-Pernaute, R., 2012. Cellular programming and reprogramming: sculpting cell fate for the production of dopamine neurons for cell therapy. *Stem Cells Int.* 2012, 412040.

Ben-Hur, T., Idelson, M., Khaner, H., Pera, Martin., Reinhartz, Etti., Itzik., A., Reubinoff., B.E., 2004. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors Improves Behavioral Deficit in Parkinsonian Rats. *Stem Cells.* **22**: 1246-1255.

Bishop, A.E., Buttery, L.D.K., Polak, J.M., 2002. Embryonic stem cells. *J. Pathol.* **197**: 424–429.

Björklund, LM., Pernaute, RS., Chung, S., Andersson, T., Chen, I., McNaught, K., Brownell, A., Jenkins, B., Wahlstedt, C., Kwang, K., Isacson, O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *PNAS* **99**: 2344-2349

Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB. 2008. *Campbell Biology.* 9th ed. pp. 462-463

Cools, R., 2006. Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-dopa treatment in Parkinson's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**: 1–23.

Cooper, O., Parmar, M., Isacson, O., 2012. Chapter 13 - Characterization and criteria of embryonic stem and induced pluripotent stem cells for a dopamine replacement therapy, in: Stephen B. Dunnett and Anders Björklund (Ed.), *Progress in Brain Research, Functional Neural Transplantation III Primary and Stem Cell Therapies for Brain Repair, Part I*. Elsevier, pp. 265–276.

Dahlqvist, G., 2001. Etiska riktlinjer för stamcells forskning i Sverige.

Läkartidningen **98**: 51-52.

Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **39**: 889-909.

Fowler, J.S., Volkow, N.D., Kassed, C.A., Chang, L. 2007. Imaging the Addicted Human Brain. *Science & Practice Perspectives* **3(2)**: 4-16.

Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* **287**: 1433–1438.

Ganat, Y.M., Calder, E.L., Kriks, S., Nelander, J., Tu, E.Y., Jia, F., Battista, D., Harrison, N., Parmar, M., Tomishima, M.J., Rutishauser, U., Studer, L., 2012. Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *J. Clin. Invest.* **122**: 2928–2939.

Garcia-Borreguero, D., Larrosa, O., Bravo, M., 2003. Parkinson's disease and sleep. *Sleep Med. Rev.* **7**: 115–129.

Gillies, A.J, 1995. The role of the Subthalamic Nucleus in the Basal Ganglia.

Hjarnguiden - WWW-dokument 2014-04-04:

http://hjarnguiden.se/index.php?option=com_content&view=article&id=52&Itemid=94

Hämtad: 2014-04-04

Hegarty, S.V., Sullivan, A.M., O'Keefe, G.W., 2013a. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol.* **379**: 123–138.

Holdorff, B., 2010. Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and His work. *Journal of the History of the Neurosciences: Basic and Clinical Perspectives* **11:1**: 19-28.

Keitel, A., Wojtecki, L., Hirschmann, J., Hartmann, C.J., Ferrea, S., Südmeyer, M., Schnitzler, A., 2013. Motor and cognitive placebo-/nocebo-responses in Parkinson's disease patients with deep brain stimulation. *Behav. Brain Res.* **250**: 199–205.

Kim, S.U., de Vellis, J., 2009. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J. Neurosci. Res.* **87**: 2183–2200.

Kim, S.U., Lee, H.J., Kim, Y.B., 2013. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology* **33**: 491–504.

- Kriks, S., Shim, J.W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Reid, L.C, Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L, Beal, M.F., Surmeier, D.J., Kordower, J.H., Tabar, V., Studer, L., 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**: 547-551.
- Langston, J.W., 2005. The promise of stem cells in Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* **115**: 23–25.
- Lindvall, O., Aquilonius, S.M., 2001. Celltransplantation vid Parkinsons sjukdom. *Läkartidningen* **98**: 5193-5195.
- Lindvall, O., 2003. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* **47**: 279–287.
- Lindvall, O., 2012. Dopaminergic neurons for Parkinson's therapy. *Nat. Biotechnol.* **30**: 56–58.
- Loewenbrück, K., Storch, A., 2011. Stem cell-based therapies in Parkinson's disease: future hope or current treatment option? *J. Neurol.* **258**: 346–353.
- Luo, Yu., Kuang, S.Y., Hoffer, B., 2009. How useful are stem cells in PD therapy? *Parkinsonism and Related Disorders* **15S3**: 171-175.
- Lyons, M.K., 2011. Deep Brain Stimulation: Current and Future Clinical Applications. *Mayo Clinic Proc.* **86 (7)**: 662-672.
- Mayoclinic.org. WWW-dokument 2014-06-15:
<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/parkinsons-disease/basics/causes/con-20028488>. Hämtad 2014-06-15
- Momčilović, O., Montoya-Sack, J., Zeng, X., 2012. Dopaminergic differentiation using pluripotent stem cells. *J. Cell. Biochem.* **113**: 3610–3619.
- Moussa, B.H., Edmondson, D., Tipton, K.F., 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature reviews neuroscience* **7**: 295-309
- Neurosphere (biology). WWW-dokument 2013-12-07:
<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/1072336/neurosphere>. Hämtad 2013-12-07
- Nishimura, K., Takahashi, J., 2013. Therapeutic application of stem cell technology toward the treatment of Parkinson's disease. *Biol. Pharm. Bull.* **36**: 171–175.
- Olanow, C.W., Kordower, J.H., Lang, A.E., Obeso, J.A., 2009. Dopaminergic transplantation for parkinson's disease: Current status and future prospects. *Ann. Neurol.* **66**: 591–596.
- Palm, T., Bahnassawy, L., Schwamborn, J.C., 2012. MIRNAs and neural stem cells: A team to treat parkinsons disease? *Ann. RNA Biol.* **9:6**: 720-730.

Parkinsonförbundet. WWW-dokument 2014-04-19:
<http://www.parkinsonforbundet.se/meny2/Om%20Parkinsons%20sjukdom/Behandling%20och%20mediciner.html>. Hämtad 2014-04-19.

Parkinsonguiden. WWW-dokument 2014-05-23:
<http://www.parkinsonguiden.se/category/vad-ar-parkinson/symtom/icke-motoriska/>. Hämtad 2014-05-23.

Parkinsons.org. WWW-dokument 2014-04-19: <http://www.parkinson.org/parkinson-s-disease/treatment/surgical-treatment-options/deep-brain-stimulation>. Hämtad 2014-04-19.

Parish, C.L., Arenas, E., 2007. Stem-Cell-Based Strategies for the Treatment of Parkinson's Disease. *Neurodegener. Dis.* **4**: 339–347.

Pawitan, J.A., 2011. Prospect of cell therapy for Parkinson's disease. *Anat. Cell Biol.* **44**: 256–264.

Piccini, P., Brooks, D.J., Björklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., Lindvall, O., 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosci.* **2**: 1137–1140.

Politis, M., Wu, K., Loane, C., Quinn, N.P., Brooks, D.J., Oertel, W.H., Björklund, A., Lindvall, O., Piccini, P., 2012. Serotonin neuron loss and nonmotor symptoms continue in Parkinson's patients treated with dopamine grafts. *Sci. Transl. Med.* **4**: 128ra41.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall CW, LaMantia AS, White LE. 2012. *Neuroscience*. **5th ed.** pp. 734.

Shankar, J.C., Andersen, J.K., 2005. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 942-946.

Singh, N., Pillay, V., Choonara, Y.E., 2007. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**: 29–44.

Sjukskrivning vid Parkinsons sjukdom (Socialstyrelsen). WWW-dokument 2013-11-13:
<http://www.socialstyrelsen.se/riktlinjer/forsakringsmedicinsktbeslutsstod/parkinsonssjukdom>. Hämtad 2013-11-13

Statistics on Parkinson's - Parkinson's disease Foundation (PDF) WWW-dokument 2013-11-12:
http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics. Hämtad 2013-11-12

Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y., Hashimoto, N., 2005a. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* **115**: 102–109.

Tolouse, A., Sullivan, A., 2008. Progress in Parkinson's disease - Where do we stand? Progress in Neurobiology **85**: 376-392

What-Is-Download.jpg. WWW-dokument 2013-12-08:
<http://nas-sites.org/stemcells/files/2013/01/What-Is-Download.jpg>.
Hämtad 2013-12-08.

Witt, K., Kuhn, J., Timmermann, L., Zurowski, M., Woopen, C., 2013. Deep Brain Stimulation and the Search for Identity. Neuroethics **6**: 499–511.

Wobus, A.M., Boheler, K.R., 2005. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. Physiol. Rev. **85**: 635–678.

Xi, J., Zhang, S.-C., 2008. Stem cells in development of therapeutics for Parkinson's disease: a perspective. J. Cell. Biochem. **105**: 1153–1160.

Yang, D., Zhang, Z., Oldenburg, M., Melvin, A., Chun, Z., 2007. Human Embryonic Stem Cell-Derived Dopaminergic Neurons Reverse Functional Deficit in Parkinsonian Rats. Stem Cells **26**: 55-63