

Terapie komórkowe w leczeniu całkowitych urazowych uszkodzeń rdzenia kręgowego

Włodzimierz Jarmundowicz , Paweł Tabakow

Katedra i Klinika Neurochirurgii AM we Wrocławiu

Rodzaje uszkodzeń rdzenia kręgowego

Pierwotne



- Wstrząśnienie
- Stłuczenie
- Zranienie
- Zmiażdżenie
- Rana postrzałowa

Wtórne

Wtórne uszkodzenie rdzenia kręgowego / przyczyny /

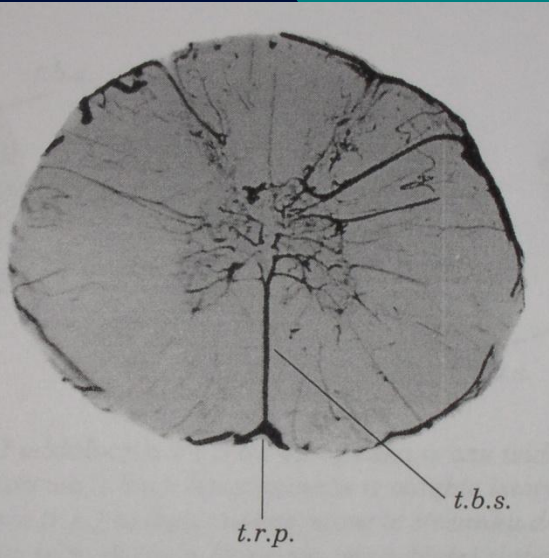
Przyczyny pozardzeniowe

- wstrząs pourazowy / niedokrwienie i niedotlenienie/
- przedłużający się ucisk rdzenia przez fragmenty kostne kręgów

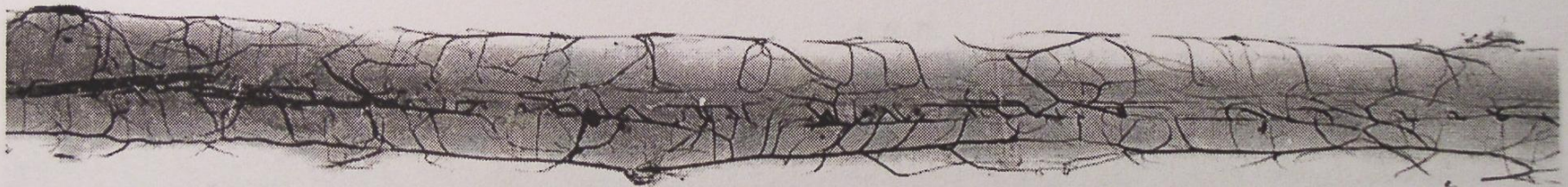
Przyczyny wewnątrzrdzeniowe

- teoria Halla i Wolfa

obraz prawidłowy normal image

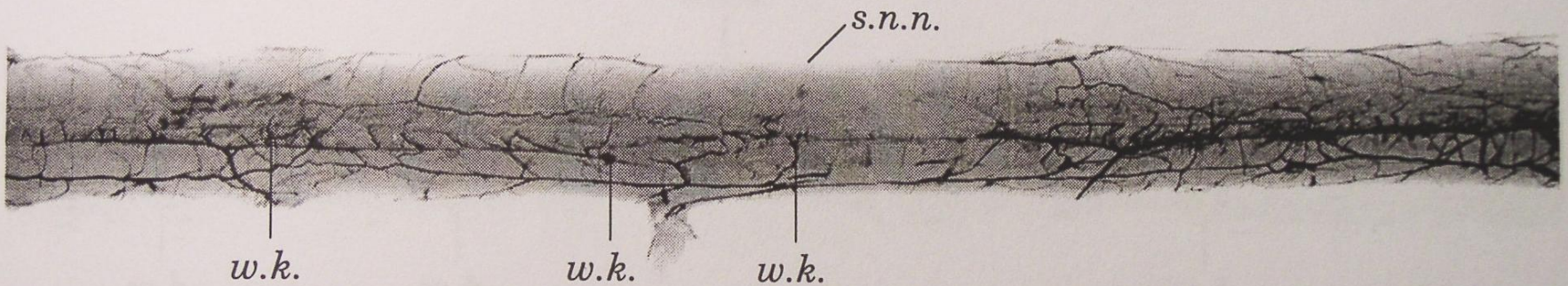
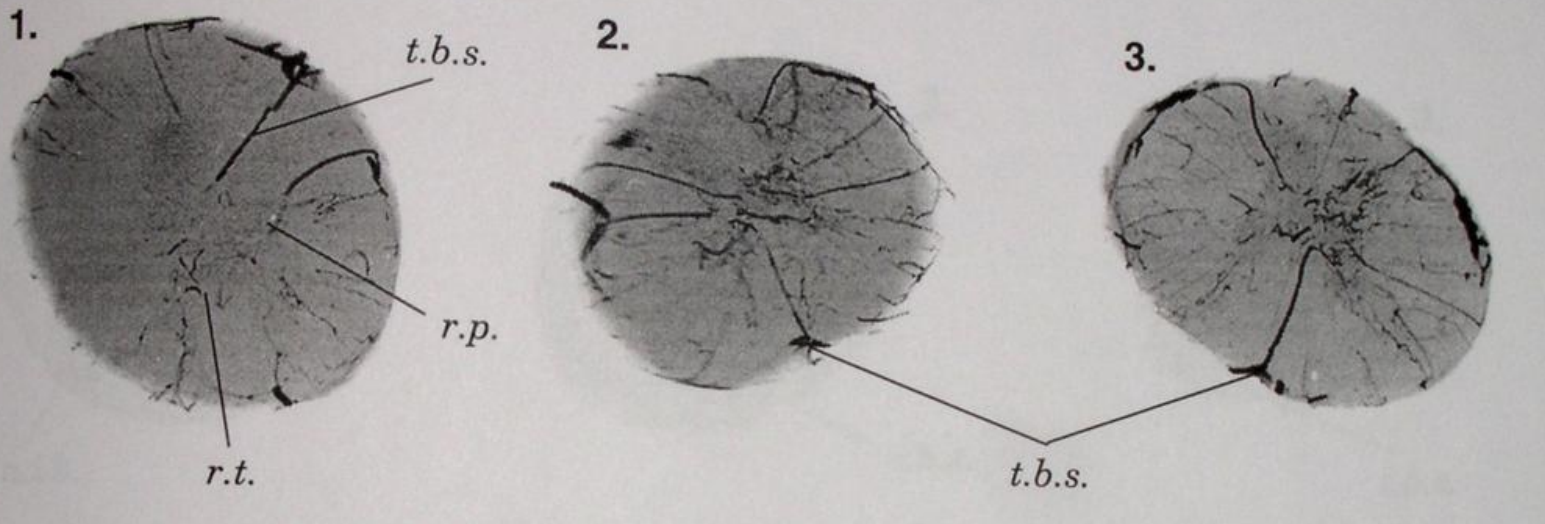


Prawidłowy obraz mikroangiograficzny przekroju rdzenia kręgowego nie poddanego urazowemu uszkodzeniu. Widoczna jest tętnica rdzeniowa przednia (t.r.p.) i odchodząca od niej tętnica bruzdowo-spoidłowa (t.b.s.). Od obwodu wnikać liczne, koncentrycznie układające się naczynia unaczyniające istotę białą. Unaczynienie w centrum rdzenia kręgowego jest bardzo bogate i regularne przez co uwidacznia się zarys istoty szarej. Naczynia krwionośne mają prawidłowy przebieg i są dobrze wypełnione środkiem cieniującym. (Pow. 20 ×).

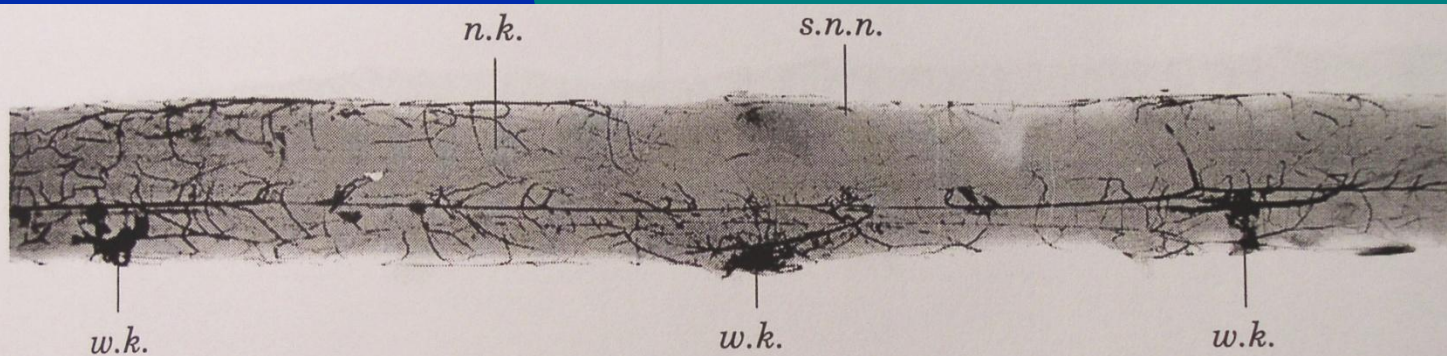
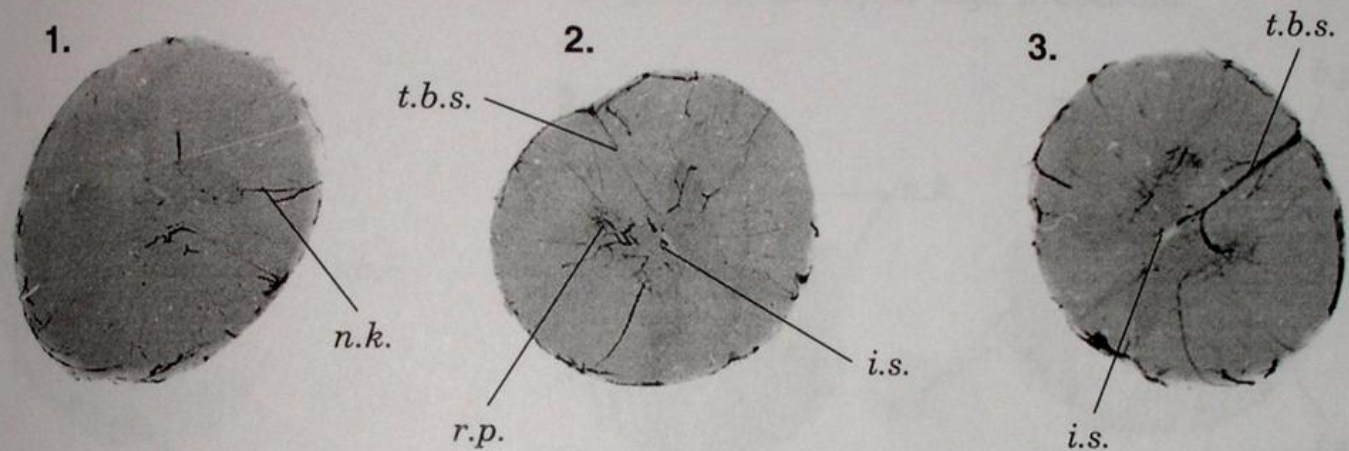


Patofizjologia

2 godziny kompresji 2 hours of compression



6 godzin kompresji



Patofizjologia

12 godzin kompresji

Wtórne uszkodzenie rdzenia kręgowego / przyczyny /

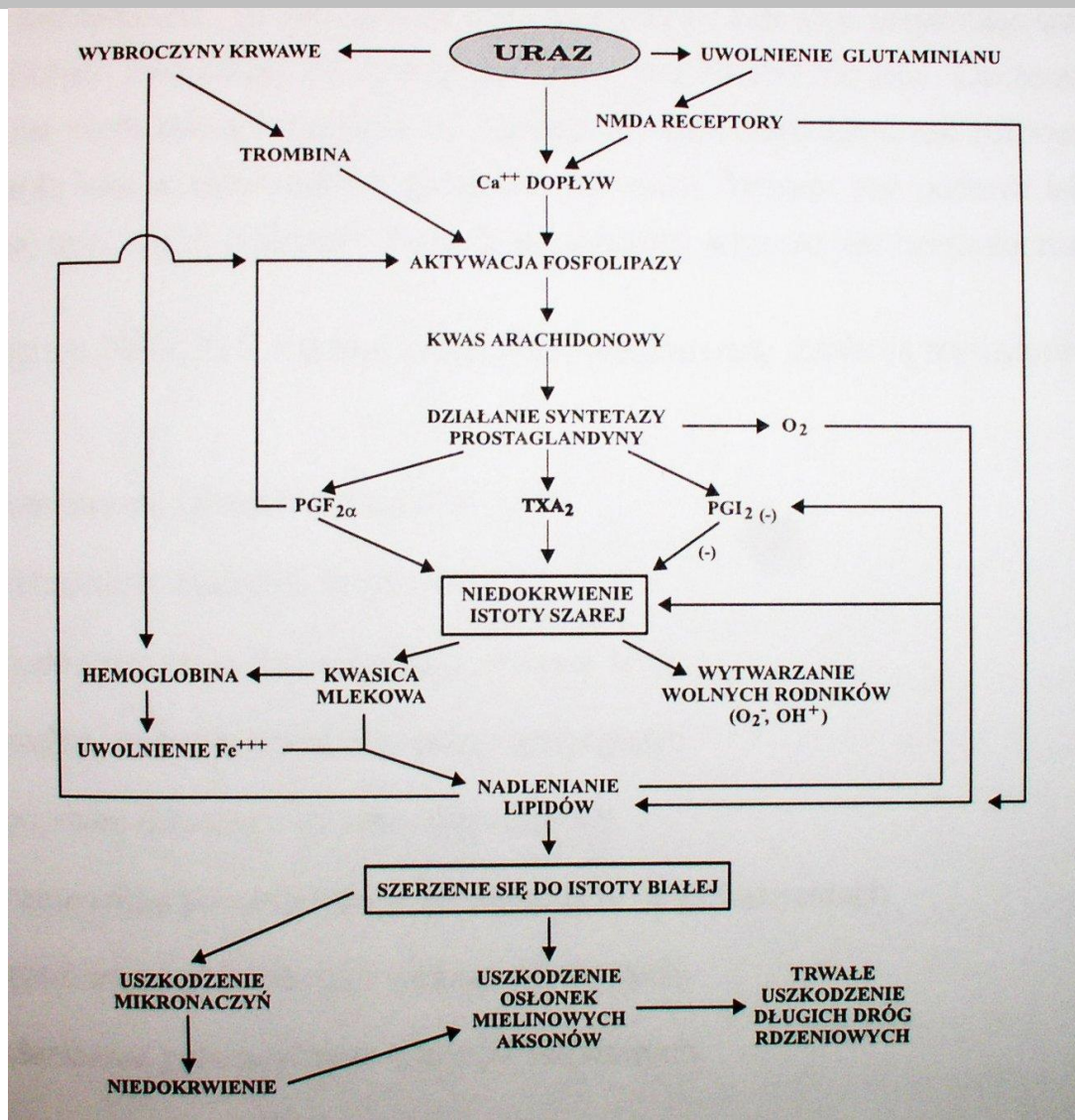
Przyczyny pozardzeniowe

- wstrząs pourazowy / niedokrwienie i niedotlenienie/
- przedłużający się ucisk rdzenia przez fragmenty kostne kręgów

Przyczyny wewnątrzrdzeniowe

- teoria Halla i Wolfa

Patofizjologia - pathophysiology /diagram of Hall & Wolf/



Neuroprotekcja farmakologiczna

Programy:

- NASCIS I ,II i III /metylprednisolon /
bolus i.v 30 mg/kg w ciągu 15 min, po
45 min 5,4 mg/kg/23 godz lub 47 godz
- 21 – aminosteroidy /lazaroidy/
- Inhibitory kanałów wapniowych np.nimodipinum

Stopnie uszkodzenia rdzenia kręgowego

```
graph TD; A[Stopnie uszkodzenia rdzenia kręgowego] --> B[uszkodzenia częściowe]; A --> C[uszkodzenia całkowite];
```

uszkodzenia częściowe

uszkodzenia całkowite

Skale oceny stopnia uszkodzenia rdzenia rdzenia kręgowego

Skala Frankela

Skala ASIA

diagnostyka kliniczna

skala FRANKELA

Frankel A	Complete motor and sensory loss
Frankel B	Preserved sensation only
Frankel C	Sensation normal, no voluntary motor function
Frankel D	Motor function lower grade
Frankel E	Complete motor and sensory function

Devilee R, Sanders R, de Lange S. Treatment of fractures and dislocations of the thoracic and lumbar spine by fusion and Harrington instrumentation. Arch Orthop Trauma Surg. 1995;114(2):100-2.

diagnostyka kliniczna

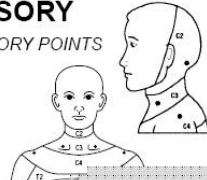
skala ASIA

ASIA

STANDARD NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY

		MOTOR KEY MUSCLES		LIGHT TOUCH		PIN PRICK		SENSORY KEY SENSORY POINTS	
	R	L		R	L	R	L	R	L
C2									
C3									
C4									
C5			Elbow flexors						
C6			Wrist extensors						
C7			Elbow extensors						
C8			Finger flexors (distal phalanx of middle finger)						

0 = absent
1 = impaired
2 = normal
NT = not testable



Postępowanie lecznicze w urazach rdzenia kręgowego

■ uszkodzenia częściowe - uszkodzenia całkowite

* dekompresja rdzenia

* dotychczas brak jest
skutecznych metod
leczenia

* stabilizacja kręgosłupa

Ramon Cajal

**Degeneration and Regeneration of the Central
Nervous System /1928 /**

Ostatnie dwie dekady ubiegłego wieku

wzrost zainteresowania i rozwój badań nad neuroregeneracją
rdzenia kręgowego

- + badania na 9 i 12 dniowych oposumach / ssaki z rodziny Torbaczy /
- + badania na rdzeniach kręgowych jaszczurek

Przyczyny braku spontanicznej regeneracji w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) dorosłych ssaków

- obecność na powierzchni osłonki mielinowej białek hamujących odrost aksonów, tzw. myelin associated proteins /MAP/ z grupy Nogo / NI-35 i NI-250 /
- brak troficznego wpływu astro- i oligodendrocytów na uszkodzone ośrodkowe neurony / spadek ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę czynników neurotroficznych/
- powstawanie w miejscu uszkodzenia OUN blizny glejowej, nieprzepuszczalnej dla regenerujących aksonów

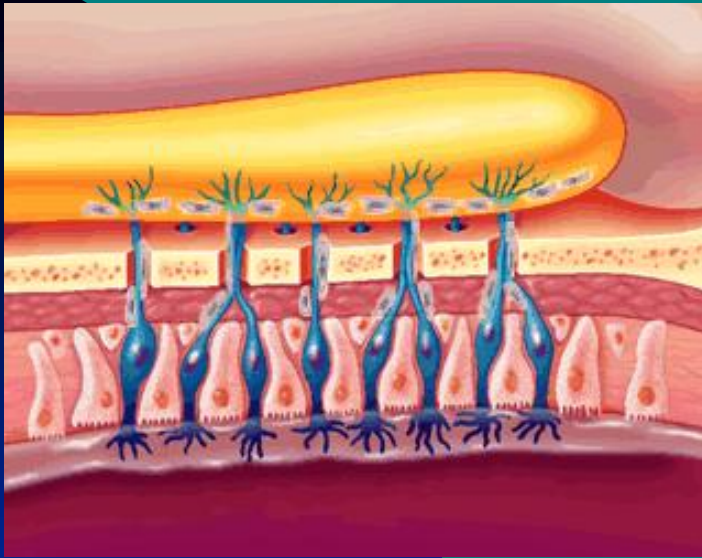
Sposoby stymulacji regeneracji w OUN

- miejscowa aplikacja czynników neurotroficznych
- podaż przeciwciał blokujących białka centralnej mieliny
- dordzeniowa transplantacja komórek o właściwościach neurotroficznych

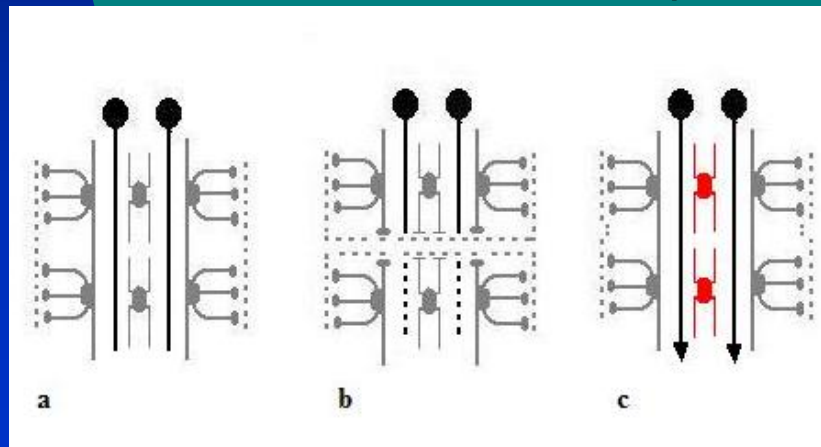
Populacje komórkowe posiadające właściwości neurotroficzne, przeszczepiane eksperymentalnie do ogniska pierwotnego uszkodzenia rdzenia kręgowego

- glejowe komórki wężowe
- komórki Schwanna
- płodowe neurony
- tanicyty podwzgórzowe
- komórki macierzyste
- komórki genetycznie zmodyfikowane
- aktywowane makrofagi

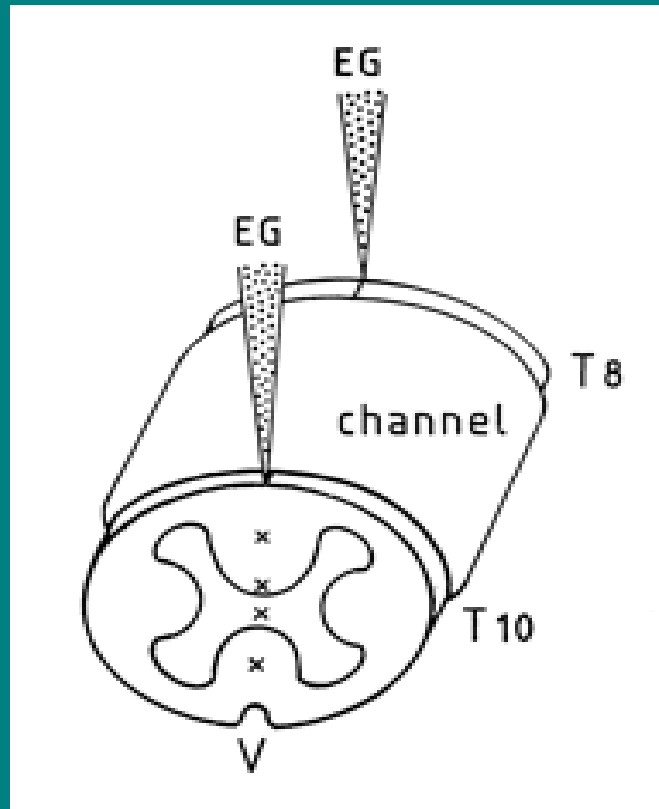
Basic science background



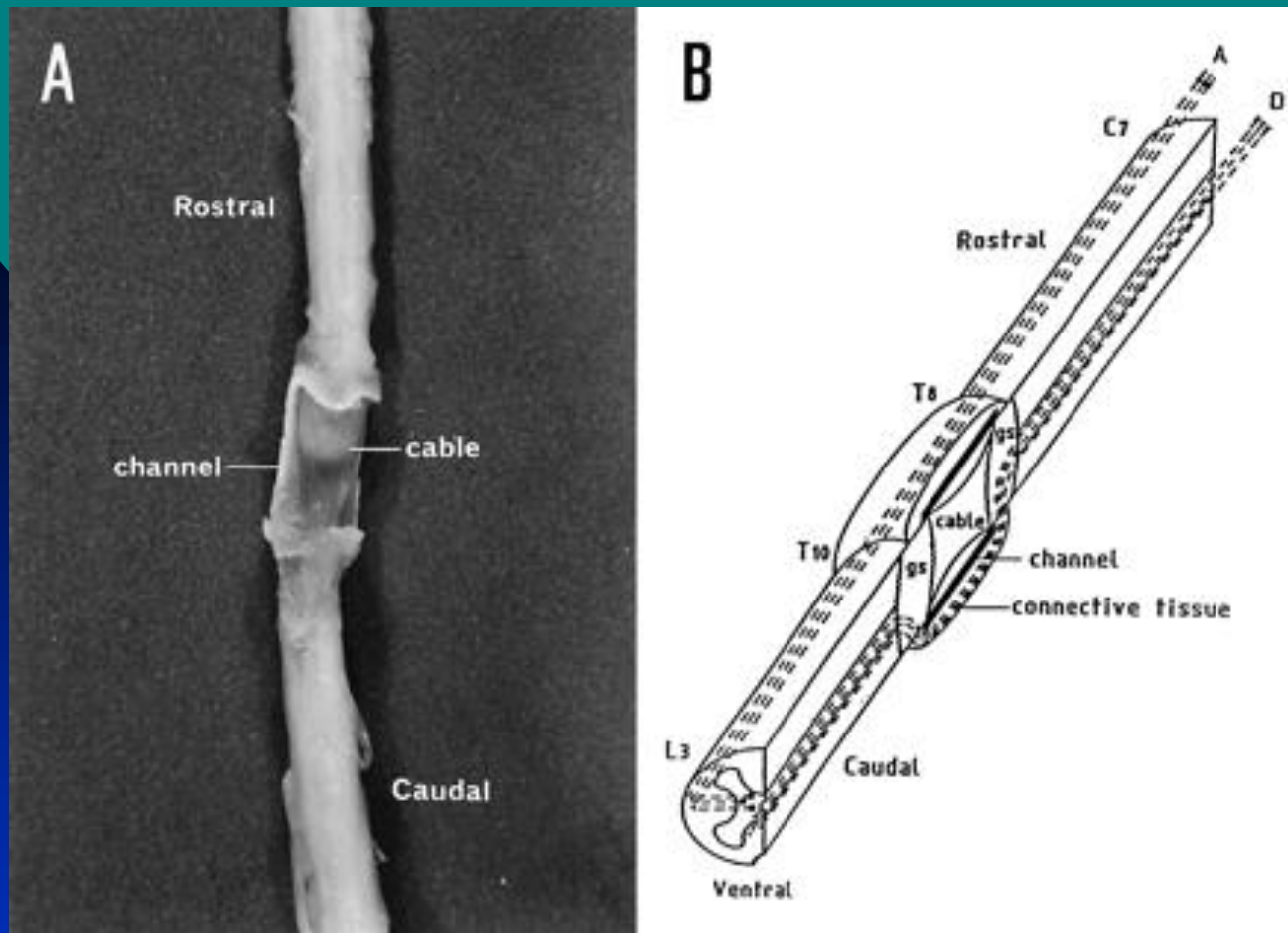
- more than 370 publications about neurotrophic properties of OECs in vitro and in vivo
- *pathway hypothesis* (Li Y, Li D, G Raisman J Neurocytol, 2005, 34: 343-351)
- the concept of interaction between OECs and olfactory fibroblasts (G. Raisman)



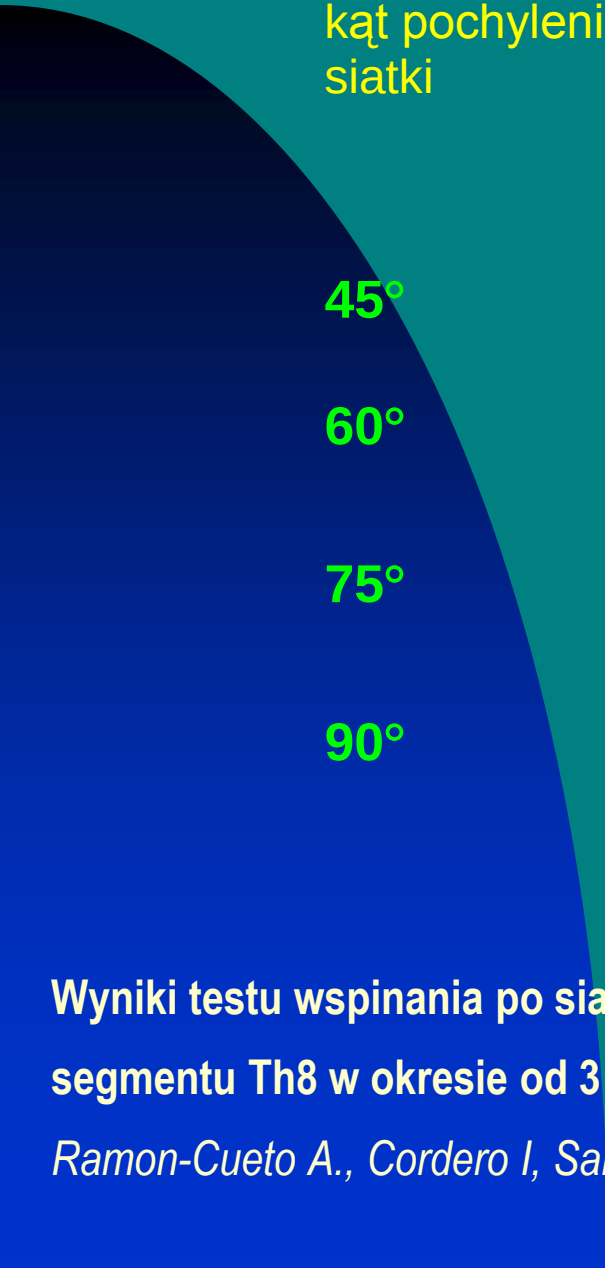
pathway hypothesis: a- normal spinal cord; b-injured spinal cord;
c-spinal cord after transplantation of OECs;



Schematyczne przedstawienie stereotaktycznej podaży zawiesiny glejowych komórek
węchowych (*Ramon-Cueto A., Plant G., Avila J., Bunge M., J Neurosci 1998, 18(10):3803-3815*).



Sześć tygodni po transplantacji, glejowe komórki węchowe tworzyły pomost pomiędzy proksymalnym i dystalnym odcinkiem przeciętego rdzenia kręgowego.



kął pochylenia siatki	szczury z przeciętym rdzeniem i przeszczepionymi GKW	szczury z przeciętym rdzeniem
45°	100%	0%
60°	78%	0%
75°	67%	0%
90°	22%	0%

Wyniki testu wspinania po siatce u szczurów z przeciętym rdzeniem kręgowym na poziomie segmentu Th8 w okresie od 3 do 7 miesiąca po urazie.

Ramon-Cueto A., Cordero I, Santos-Benito F., Avila J., Neuron, 2000, 25:425-435.

Mechanizm działania glejowych komórek węchowych przeszczepionych do ogniska uszkodzenia rdzenia kręgowego

stymulacja neuroregeneracji i przewodnictwa aksonalnego

wydzielanie czynników neurotroficznych: NGF, BDNF, NT-3, PDGF, neuropeptyd Y

produkcja czynników adhezji komórkowej: NGF, L1, laminina, NCAM

migracja GKW wzdłuż istoty białej i szarej rdzenia kręgowego

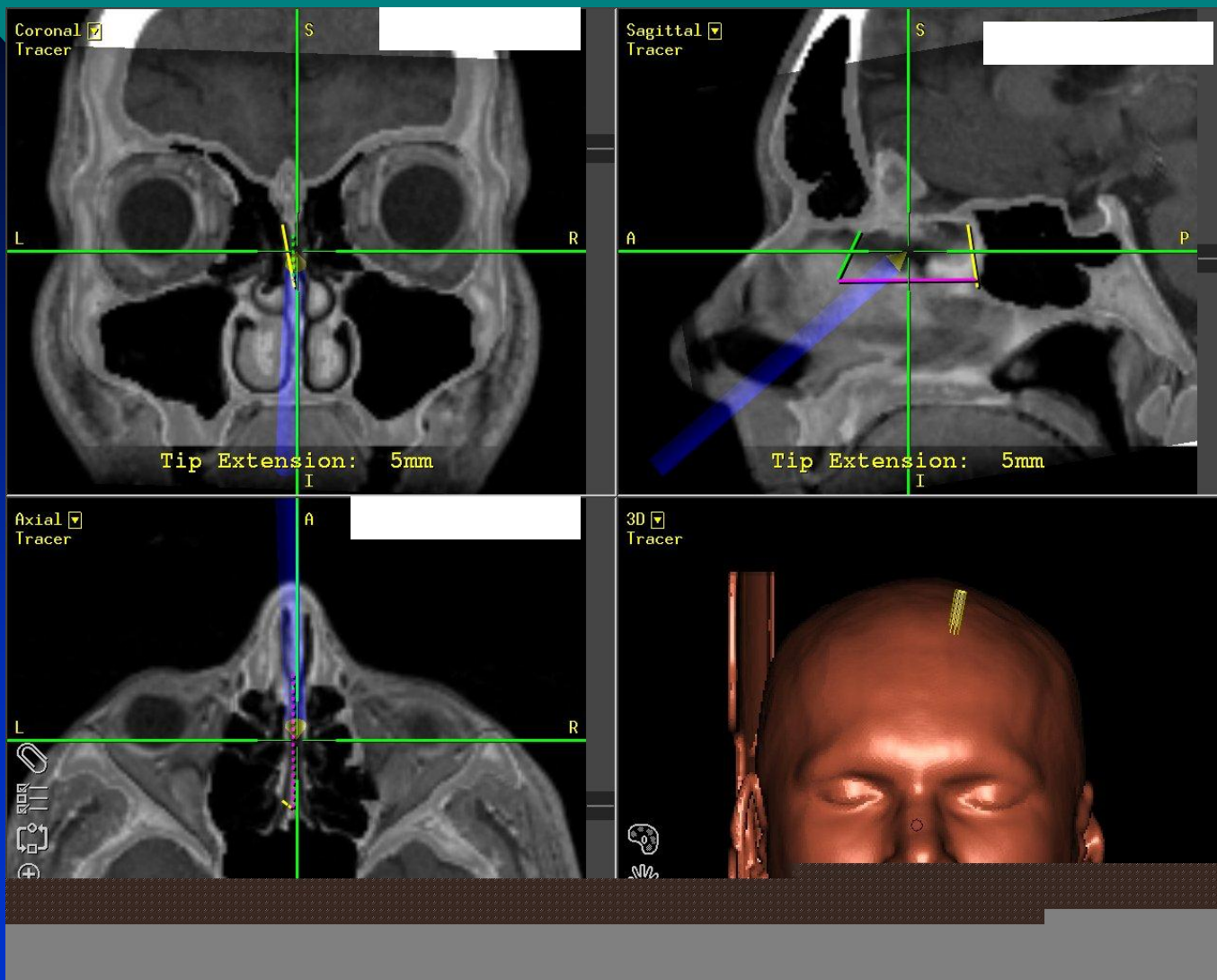
mielinizacja włókien nerwowych

eliminacja czynników hamujących regenerację

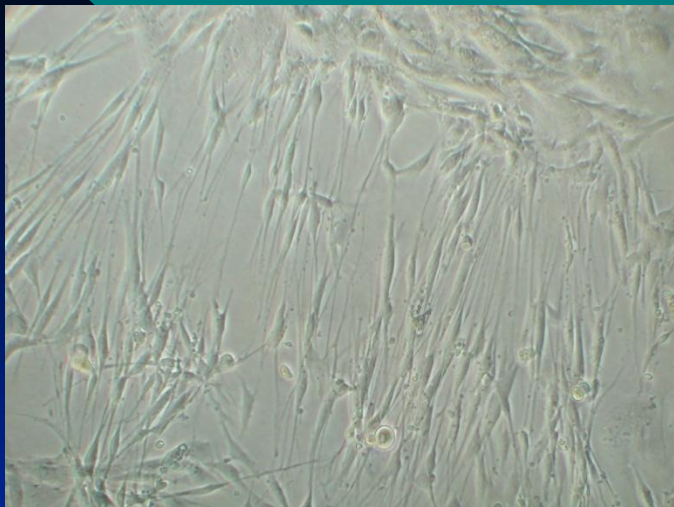
hamowanie tworzenia blizny glejowej w ognisku pierwotnego uszkodzenia rdzenia kręgowego

inaktywacja białek MAP

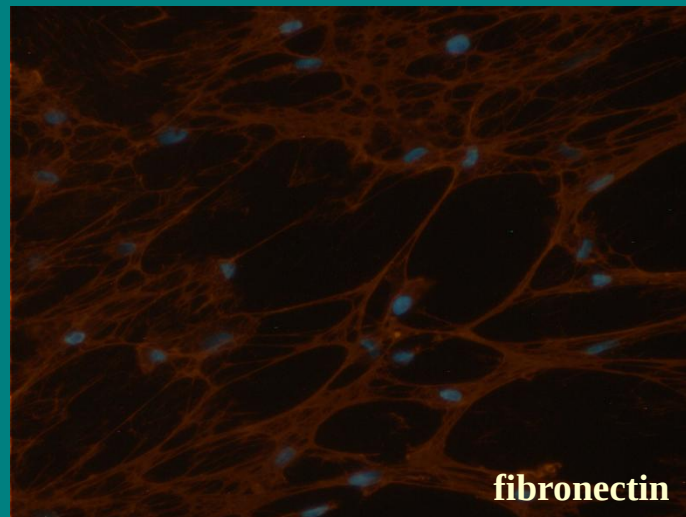
Pobieranie błony węchowej nosa



Izolacja i hodowla GKW / Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu



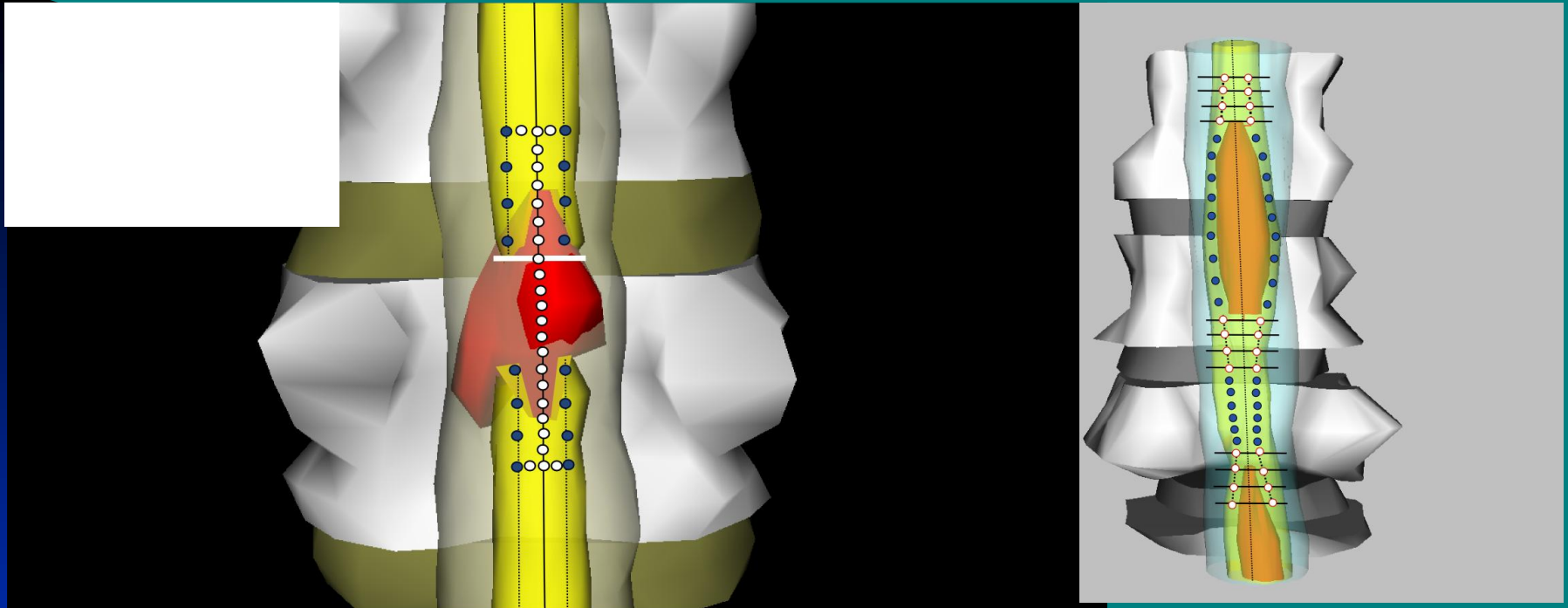
S100



fibronectin

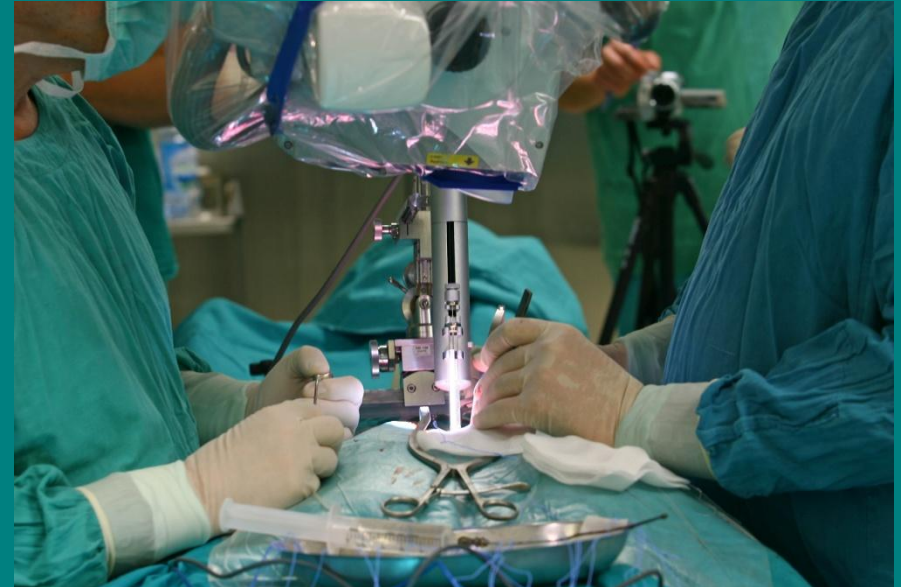
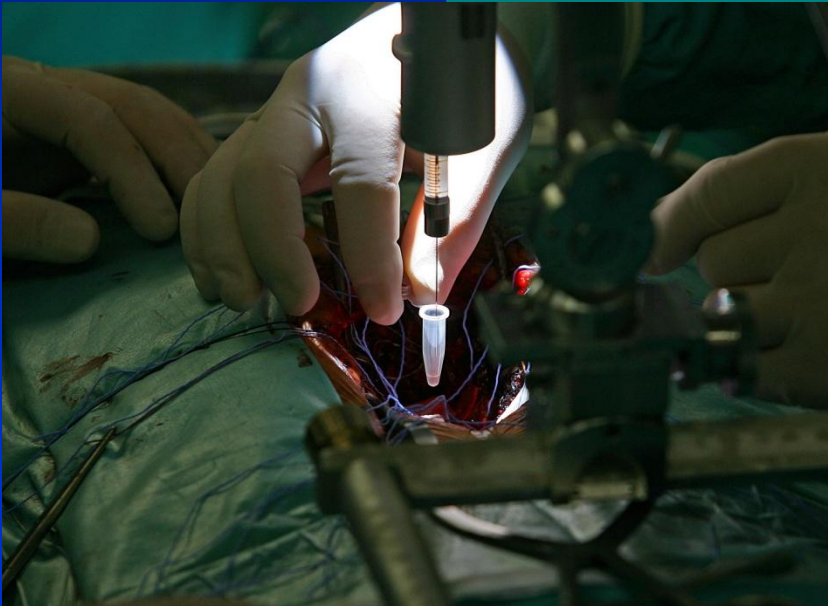
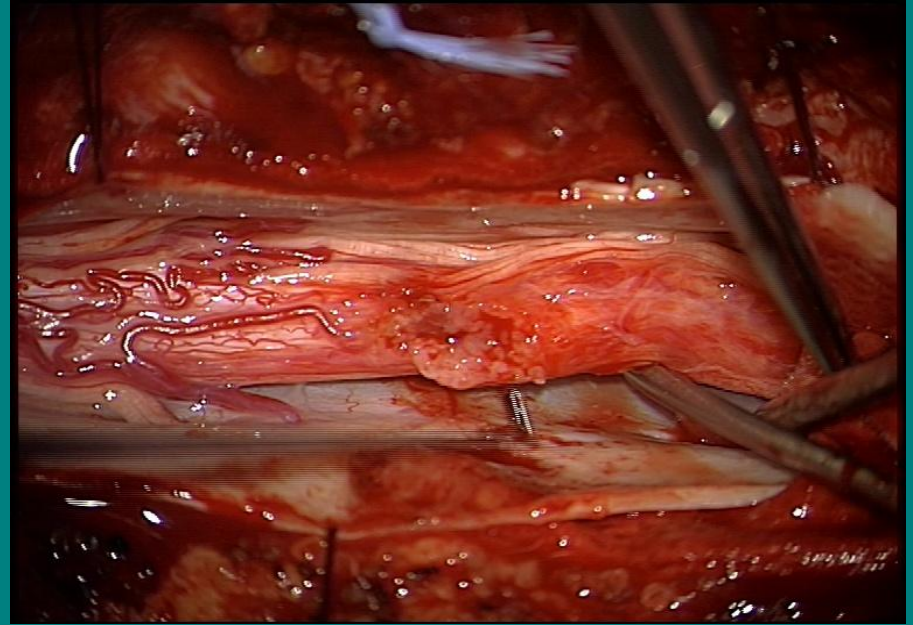
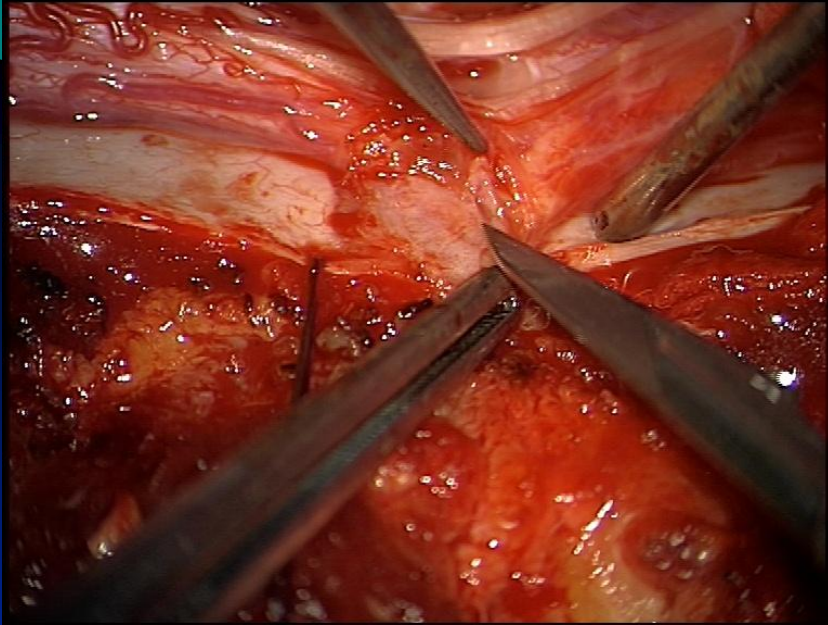
p75NGFR

Stereotactic intraspinal microinjection of OECs- 3D model

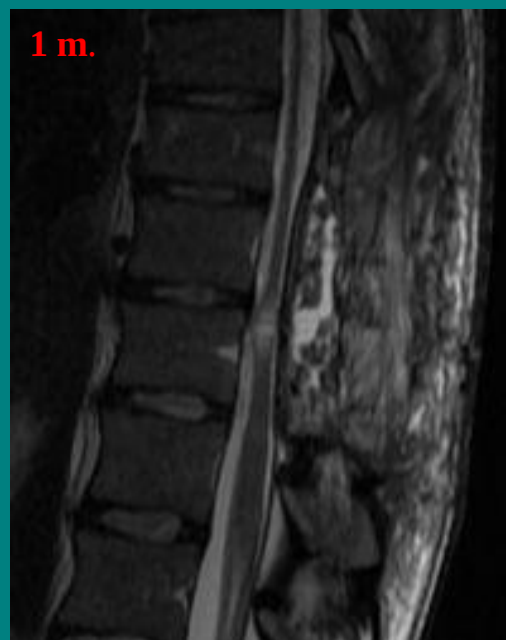


	volume of single injection	velocity of cell injection	total number of injections	total volume	average number of grafted cells	time of operation
P1	0,5 ul	2 ul/min	112	56 ul	1 680 000	11 h
P2	0,5 ul	2 ul/min	146	73 ul	1 825 000	9 h

Myeloadhesiolysis and OEC-grafting



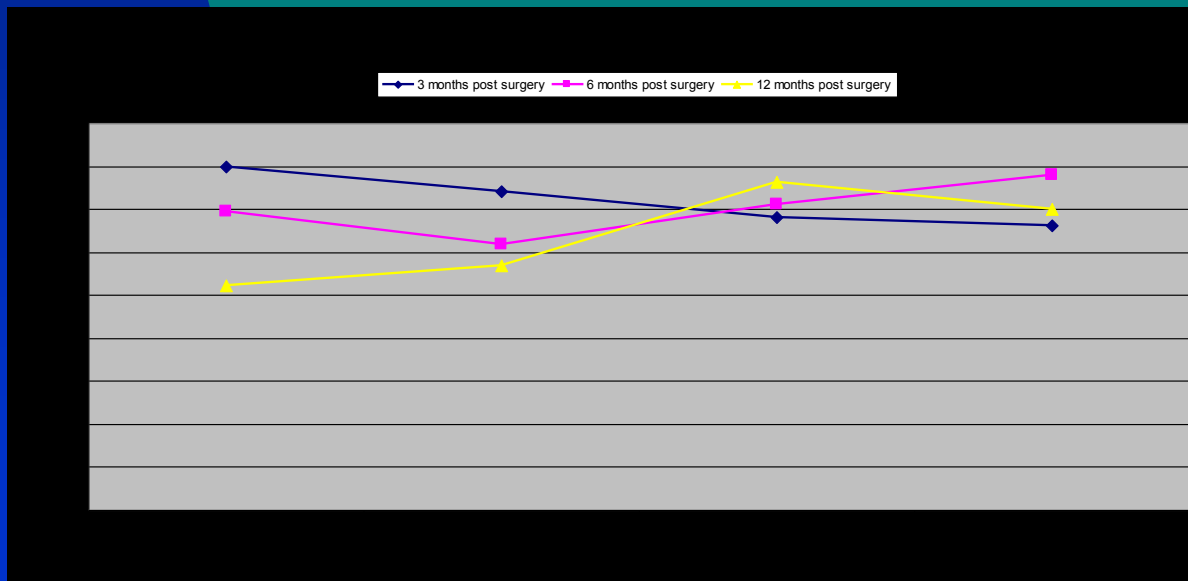
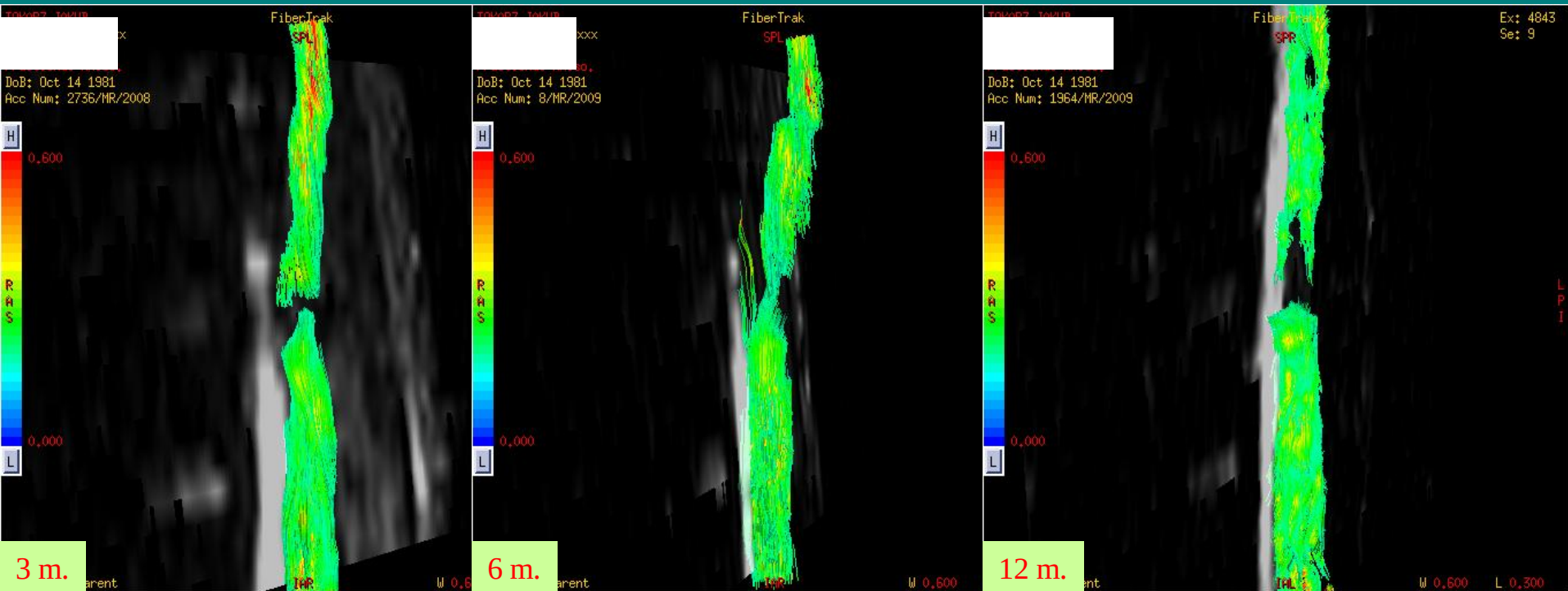
Results-MRI findings-P1



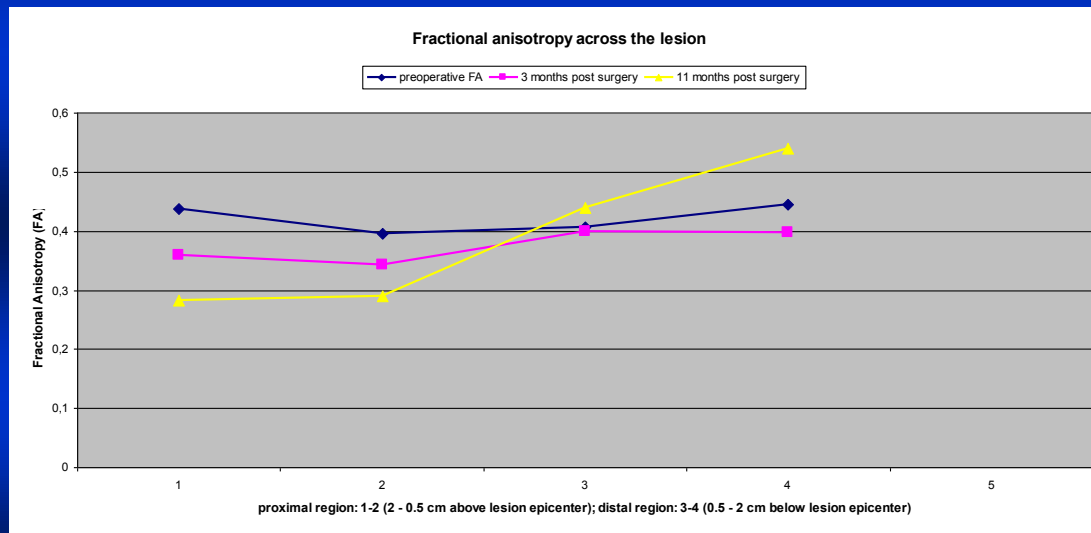
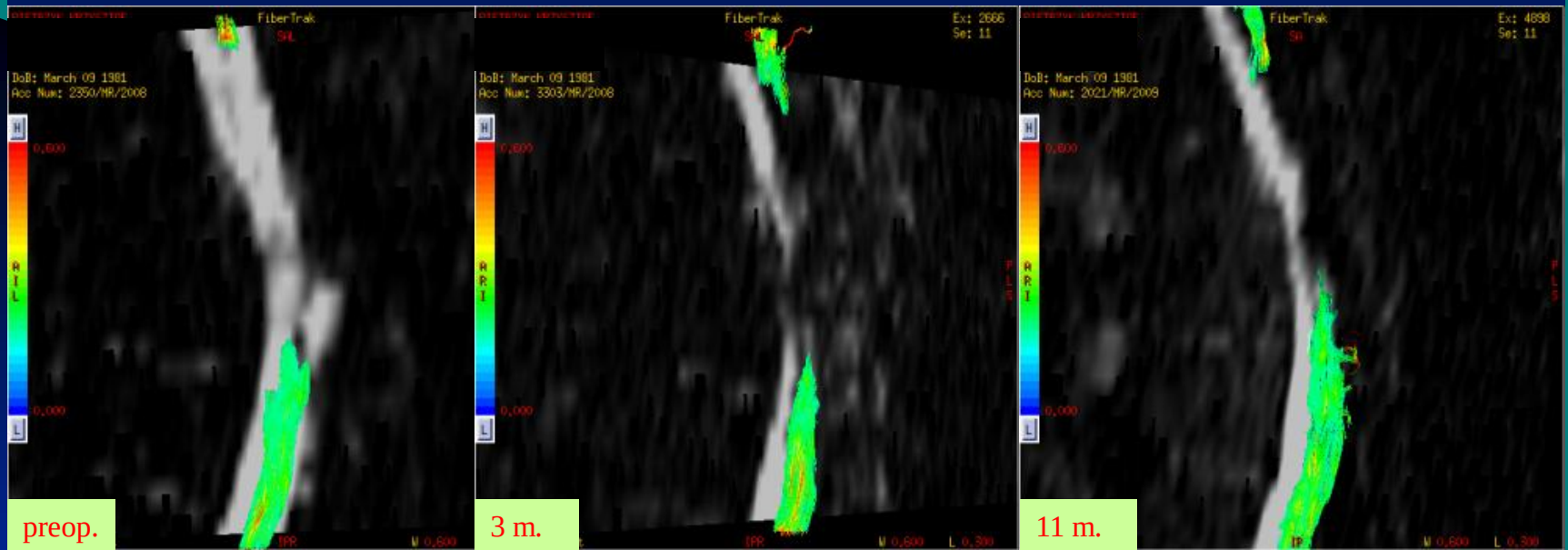
Results-MRI findings-P2



Results from DTI-P1



Results from DTI-P2



Problemy związane z zastosowaniem komórkowej terapii urazów rdzenia kręgowego u ludzi przy użyciu glejowych komórek węchowych

- źródło pozyskiwania g.k.w.
- liczba komórek niezbędna do zapoczątkowania procesu ośrodkowej neuroregeneracji
- czas transplantacji
- obiektywna ocena powrotu funkcji senso-motorycznej po urazie rdzenia kręgowego

Aktualnie prowadzone eksperymenty oceniające efekt transplantacji ludzkich glejowych komórek węchowych do uszkodzonego w wyniku urazu rdzenia kręgowego człowieka

- Waite, Mackay-Sim, Feron, Li, Australia

dordzeniowa transplantacja zawiesiny oczyszczonych hodowli autogenicznych glejowych komórek węchowych pobranych z błony śluzowej jamy nosowej

- Lima i wsp., Portugalia

dordzeniowa transplantacja autogenicznych fragmentów błony węchowej

- Huang i wsp., Chiny

dordzeniowa transplantacja allogenicznych glejowych komórek węchowych pobranych z opuszek węchowych ludzkich płodów

Wnioski

- Obserwacja kliniczna pacjentów po upływie 1,5 roku od operacji wskazuje, że przeszczepienie glejowych komórek węchowych /GKW/ do rdzenia kręgowego jest bezpieczne

Obserwowana poprawa funkcji neurologicznych u obu pacjentów z ASIA A do ASIA C /P1/ i ASIA B /P2/ oraz wyraźne zmniejszenie spastyczności należy przypisać transplantacji GKW oraz mieloadhezjolie. Nie było to obserwowane u pacjentów z grupy kontrolnej

Poprawa w badaniu DTI może być dowodem bezpośrednim na regenerację włókien nerwowych długich dróg rdzeniowych

Wyciąganie ostatecznych wniosków dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności przeszczepiania GKW w leczeniu urazowych uszkodzeń rdzenia kręgowego wymaga dłuższej / 2-3 lata / obserwacji oraz badań na większej liczbie pacjentów







