

Odlade nervceller används som "modeller" för mänskliga hjärnor. Målet är att försöka återskapa de processer som sker i mänskliga hjärnor, men i ett mer lättillgängligt miniatyrformat, och som man kan experimentera med utan att man löper risk att skada en försöksperson. Hur började denna forskning och var står vi i dag? I denna krönika av **Carl-Johan Hörberg**, doktorand vid Lunds universitet, får vi en spännande inblick.

Hur går vi vidare **med odlade nervceller?**

Jag brukar få mycket uppmärksamhet när mitt jobb kommer upp som samtalsämne. Många har aldrig hört att man kan odla nervceller, inte minst vad det kan finnas för nytta i det, och det gäller även mina kollegor.

De som aldrig hört talas om det tycker ofta det låter futuristiskt och spännande, vissa tycker det känns obehagligt. De som har någon kunskap om det ser förmodligen nervceller lite som vilka celler som helst, på det sättet att de är celler men med det extra att de kan visa lite elektrisk aktivitet och bilda synapser. På ser odlade nervceller som kapabla till någon form av kognition, inlärning eller intelligens. Detta har även varit den rådande konsensus även inom fältet, och försök med att använda odlade nervceller för att modellera annat än fysiologiska processer har varit få och har sällan fått någon större spridning. Detta kan vara på väg att förändras; fler och fler forskare uttrycker nu behovet att undersöka odlade nervceller från ett annat perspektiv, där de undersöks utifrån sin funktion som informationshanterande enheter i nervsystemet. Låt oss överblicka fältet och dess historia, och hur framtiden kanske kommer ge oss nya perspektiv på hur hjärnan fungerar.

EN KORT ÖVERBLICK ÖVER ODLADE NERVCELLER

Att odla nervceller har en förvånansvärt lång historia. Fältet var redan på 1960-talet väl etablerat, och även om frågeställ-

ningarna, metoderna och inte minst utsikterna på den tiden känns främmande för samtida läsare, så var vissa experiment nära likvärdiga med de som görs i dag, i alla fall om man bortser från analysmetoderna. Om man läser dessa gamla publikationer så verkar drivkraften grunda sig i en starkt reduktionistisk anda. Frågor som ställdes då kunde röra nervcellers morfologi eller metabolism, exempelvis "Är purkinjellernas morfologi styrt av vävnaden som de lever i eller kan de bibehålla den morfologin i ett provrör?". Det var vid den tiden som man började använda enzymer för att bryta ner animalisk hjärnvävnad för att kunna isolera celler med större effektivitet, en teknik som även i dag är en av de vanligaste metoderna för att erhålla nervceller.

När man pratar om odlade nervceller så kan man inte överskatta vikten som mikroelektroder (micro-electrode arrays, eller MEA) har haft för fältet. Mikroelektroder kan konstrueras för många olika syften, men när man bygger in dem i odlingsbrunnar så är de ojämförbart effektiva på att avläsa elektrisk aktivitet hos odlade nervceller. Mikroelektroder är optimala verktyg för att få inblick i hur mellanstora (tusen till hundra tusen, däromkring) ansamlingar av nervceller interagerar. Eftersom att metoden är helt icke-invasiv, och elektroderna är inbyggda i odlingssubstratet går det att passivt lyssna på cellerna i månader och till och med år. Det första experimenten med mikroelektroder gjordes i skiftet mellan 1970- och 80-talet – samma teknik som jag själv an-

Få ser odlade nervceller som kapabla till någon form av kognition, inlärning eller intelligens. Detta kan vara på väg att förändras; fler och fler forskare uttrycker nu behovet att undersöka odlade nervceller från ett annat perspektiv, där de undersöks utifrån sin funktion som informationshanterande enheter i nervsystemet.

Illustration:
CARL-JOHAN HÖRBERG



vänder i mina experiment,¹ även om teknologin har pollerats avsevärt sedan dess. så är principen exakt densamma även i dag.

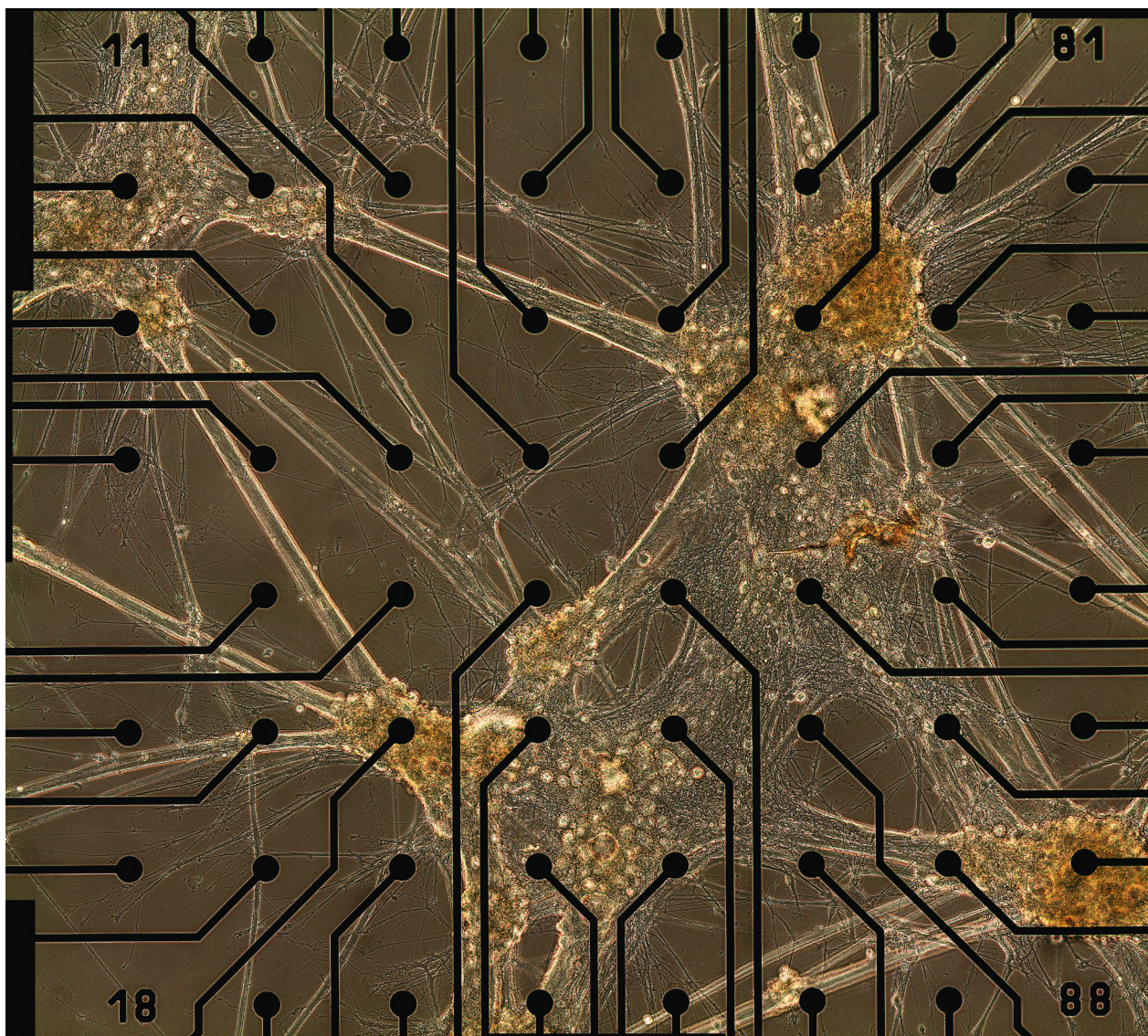
Nervsystemets bristande förmåga att regenerera eller läka efter en skada, har påkallat en särskild entusiasm för stamceller. I början av 1980-talet lyckades man för första gången isolera embryonala stamceller från mus,² och under det följande decenniet gjordes stora framsteg inom stamcellsforskningen. Självförnyande nervstamceller (så kallade "äkta" stamceller då förmåga för självförnyelse ses som ett krav för att kalla någonting för stamceller) isolerades 1994 från råttor,³ och motsvarande följdes av mänskliga nervstamceller 1999,⁴ vilket föregicks av de första mänskliga embryonala stamcellerna 1998.⁵ Skillnaden mellan embryonala stamceller och neuronala stamceller är att embryonala stamceller är så kallade pluripotenta – vilket betyder att de kan bilda vilken celltyp eller vävnadstyp som helst, medan neuronala stamceller är dedikerade till att bilda nervvävnad.

Att isolera stamceller är däremot bara ett litet steg på vägen mot regenerativ medicin. Fel stamceller på fel plats i kroppen kan orsaka tumörer eller andra svårigheter, och för att erhålla rätt cell från stamceller krävs det att man differentierar cellerna. Detta innebär i många fall tidskrävande interdisciplinärt arbete för att identifiera de molekylära faktorer som är inblandade i differentiering av stamcellerna till nervceller av olika typer. Parallellt med att man, breddat re-

pertoaren för vilka typer av nervceller man kan framställa genom differentiering så har man använt dem som modeller för att studera dessa celler i sin odlade form, ofta med hjälp av mikroelektroder.

En sant genombrott i ordets fulla bemärkelse kom när japanska forskare skapade de inducerade pluripotenta stamcellerna⁶ (så kallade iPS-celler – en lustig vink till Apples vana att namnge sina produkter med ett gement i som prefix). Plötsligt blev det möjligt att skapa stamceller från vuxna individer med känd medicinsk bakgrund, och en mångfald av nya möjligheter öppnade sig. Etablerade procedurer för att differentiera stamceller från föregående sekels stamcells forskning kunde appliceras på dessa celler och i rasande fart implementerades tekniken för att skapa exempelvis mänskliga odlingar från patienter med Parkinsons sjukdom. Denna utveckling samverkade starkt med en annan stor spelare i det nya milleniet – organoider.

Organoider är kort sagt en mer komplex odling av celler; ofta växer de i suspension eller i en gel, där stamceller tillåts skapa strukturer som liknar olika typer av vävnad. Neuronala organoider kan skapas av nervstamceller (som då i sin tur oftast kommer från pluripotenta embryonala stamceller eller iPS-celler), där de skapar vissa av de strukturer som finns i fosters hjärnor, exempelvis polariteten mellan ventriklarna och cortex.⁷ Det har bara under de senaste decenniet gjorts enorma framsteg i vår förmåga att efterlikna riktig hjärnväv-



Ljuskroskopi av mänskliga nervceller odlade på mikroelektroder. Bildens totala area motsvarar lite drygt en millimeter i kvadrat, och här syns ungefär 50.000 nervceller. Cellerna har en tendens att migrera till större kluster, som sammanlänkas med buntar av nervtrådar. De svarta cirkelarna är de exponerade mikroelektroder, och de svarta linjerna är ledande material som fortsätter långt utanför bild till utrustningen som mäter spänningen på elektroder. En elektrod kan uppfatta små skillnader i elektrisk spänning som uppstår när nervceller öppnar och stänger jonkanaler i sitt cellmembran. Varje elektrod kan uppfatta flera celler i sin närhet, och med nästan 60 elektroder så är det möjligt att observera upp emot ett hundratal celler samtidigt."

nad i provrör, så till den grad att många börjat ställa sig frågan om hur nära vi etiskt är kapabla att efterlikna mänskliga hjärnor i labbet.

KAN ODLADE NERVCELLER UPPVISA INTELLIGENS?

Vid millennieskiftet började någonting att vända inom fältet. Forskare vid Caltech, kanske präglade av 1990-talets teknikoptimism, gjorde experiment i sann visionär anda när de gjorde de första "closed-loop"-försöken med odlade nervceller. Här odlades nervceller på mikroelektroder, där aktivitet avlästes i realtid, vilket tolkades direkt till olika slumpmässiga handlingar i en simulerad värld, där olika tillstånd i världen skickades tillbaka som elektriska signaler till nervcellerna, därav "closed-loop" eller slutna cirkel på svenska. Den simulerade världen kunde exempelvis vara en mus som rör

sig i en labyrinth,⁸ eller som när forskargruppen visade upp sig för TV i en dokumentär från tidiga 2000-talet i ett simulerat jettflygplan. "Hypen" var ett faktum, men blev kortvarig. Forskarna gjorde ingen hemlighet av bristerna i sin studie, men har fortsatt att utveckla tekniken.

Det egentligt banbrytande här var att experimenten utgick ifrån frågan om isolerade och odlade nervceller besitter någon form av inlärningsförmåga eller förmåga att processa information, eller rentav någon inneboende handlingskraft. Än i dag beskrivs nervcellers elektriska och synaptiska aktivitet som ett fysiologiskt fenomen, och inte som ett informationsprocessande system. Att se odlade nervceller som kapabla för någon form av intelligens är ett synsätt som överskuggats av det fysiologiska synsättet, och som mycket sakta utvecklats sen den initiala entusiasmen som idén gav upphov till för mer än 20 år

sedan. Tiden får utvisa detta, men det kan ha gjorts ett betydande genombrott för fältet så sent som i december innan senaste årsskiftet. En forskargrupp bestående av bland annat Karl Friston, som beskrev hur den ”fria energi-principen” (free energy principle) kan appliceras på nervsystem som en förklaringsmodell för intelligent agerande, publicerade en artikel med den oerhört provocerande titeln ”In vitro neurons learn and exhibit sentience when embodied in a simulated game-world”.⁹ Notera här att ordet ’sentience’ kan översättas ungefär till ’medvetenhet’. Författaren använder dock sin egen, något nedtonade definition av begreppet ’sentience’. Artikeln beskriver ett experiment där odlade nervceller i ett closed-loop-system styr det klassiska spelet ”ping-pong”. Artikeln förtjänar att läsas i sin fulla längd, men hypotesen här var att cellerna skulle forma sin aktivitet, enligt den fria energi-principen, för att undvika oförutsägbara stimuli. Om de här resultaten reproduceras, kan det innebära en ny möjlighet att studera grunderna för intelligens och inlärning i odlade nervceller.

VAD SAKNAS I DAGENS NERVCELLSKULTURER?

Nästan alla typer av odlade nervcellskulturer saknar en viktig aspekt av riktiga hjärnor: Det korrekta ”kopplingsschemat” så att säga. När nervceller dissocieras från sin ursprungliga vävnad så förlorar man ordningen i hur cellerna är kopplade till varandra, där cellerna i vanliga fall har väldigt distinkta input- och output-system. I nästan alla odlade kulturer av nervceller så är kopplingarna mellan nervcellerna slumpmässiga och präglade av en stark positiv feedback. Det är högst troligt att en bristande likhet i nervcellernas struktur och kopplingar till egentlig nervvävnad har en negativ inverkan på våra modellers kvalitet med avseende på dess biologiska relevans. Lyckligtvis finns teknologin för att kontrollera nervcellers kopplingar även i odlade kulturer. Det kan röra sig om kemikalier som ”lockar” nervceller att växa i vissa riktningar, eller mikrofluidiska chip – någonting som kan jämföras med mikroskopiska labyrinter, eller mikrofibrer som kan hjälpa till att vägleda nervceller. Alla dessa tekniker är beprövade och relativt etablerade, men det explicita syftet att skapa en biologisk relevant kopplad kultur av nervceller har gått i stort sett utforskad, och mycket av forskningen tycks trampa vatten i en evig ”proof of concept”-fas.

En annan viktig aspekt av det riktiga nervsystemet som saknas hos odlade nervceller är information. Våra hjärnor är konstant utsatta för ett flöde av information, och det är sedan länge väl känt att information från sinnesorganen har en inverkan på hur våra nervceller beter sig. Information är inte bara någonting som flödar igenom ett system av nervceller – det är snarare ett substrat eller en miljö – och på precis samma sätt som näringslösningen de lever i och det fasta substratet de växer på, en väsentlig del av en tillförlitlig modell. Detta är däremot en teknologisk utmaning. Att förse nervceller med information är ingen egentlig utmaning i sig, det kan röra sig om enkel elektrisk stimulering eller stimulering med ljus (optogenetik). Att däremot skala upp detta, ofta rör det sig om ett 10-tal simultana kulturer, och samtidigt bibehålla informationsflödet under längre perioder, saknar enkla lösningar, och är väldigt långt ifrån en kommersiell produkt.

Med de utmaningar som vi står inför finns även stora bedrifter att göra. Med kontrollerade informationsflöden och kopplingsscheman hos odlade nervceller kommer vi kunna undersöka hur våra hjärnor bearbetar information, skapar minnen och hur inlärning fungerar. Med en biologiskt relevant modell kommer också förmågan att göra förutsägelser för hur exempelvis diet eller exponering för miljögifter kan påverka inlärning. Med iPS-cellsteknologi kommer vi även kunna undersöka hur genetiska variationer, såsom anlag för depression eller schizofreni och hur de påverkar informationsflöden mellan nervceller. Trots de brister som finns så ska man komma ihåg att från ett biologisk perspektiv är cellerna som vi kan framställa i dag inte annorlunda från de som hjälper dig läsa den här texten just nu, eller som bär på dina minnen och känslor. Vi kan säga att vi har här material som bygger våra subjektiva förnimmelser, själva grundämnet för kognition, nu är bara frågan, vad bygger vi med det?



CARL-JOHAN HÖRBERG

Doktorand vid Biologiska institutionen,
Lunds universitet.

carl-johan.hoerberg@biol.lu.se

Referenser

1. Hörberg CJ, Johansson UE, Johansson F, and O'carroll D. Spontaneous cell cluster formation in human ipsc-derived neuronal spheroid networks influences network activity. *eNeuro* 2022; 9:1–18.
2. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells (embryonic stem cells/inner cell masses/differentiation in vitro/embryonal carcinoma cells/growth factors). 1981:7634–7638. [Online]. Available: <https://www.pnas.org>.
3. Davis A and Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. 1994: 263–266.
4. Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, Jackson J, Sherman S, Seiger AK, and Wahlberg LU. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. 1999. [Online]. Available: <http://www.ideallibrary.com>.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. 1998:1145–1147. [Online]. Available: www.sciencemag.org.
6. Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663–676.
7. Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, Gu J, Buchanan J, Preissl S, Wang A, Wu W, Haddad GG, I. Chaim IA, Domissy A, Vandenberghe M, Devor A, Yeo GW, Voytek B, and Muotri AR. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell* 2019; 25:558–569.e7.
8. Demarse TB, Wagenaar DA, Blau AW, and Potter SM. The neurally controlled animat: Biological brains acting with simulated bodies. 2001; 305–310.
9. Kagan BJ, Kitchen AC, Tran NT, Habibollahi F, Khajehnejad M, Parker BJ, Bhat A, Rollo B, Razi A, and Friston KJ. In vitro neurons learn and exhibit sentience when embodied in a simulated game-world. *Neuron* 2022; 12.