

Metoder att kvantifiera muskulära och neurala faktorer vid passiv rörelse i handledsmuskulaturen hos barn och ungdomar med cerebral pares.

Eva Pontén

Bakgrund:

Barn med cerebral pares (CP), hindras inte bara av sitt rörelsehinder utan också av att musklerna med åren blir allt mer korta och styva, alltså kontrakta. Ofta måste de genomgå operationer på muskler och leder för att bibehålla sin funktion och undvika t ex att höftleden går ur led. Vad som konkret orsakar att musklerna blir korta och styva är okänt. Blir det en ökad mängd bindväv kring muskeln och/eller muskelfiberbuntarna eller muskelcellerna, dvs fibros?

Syfte:

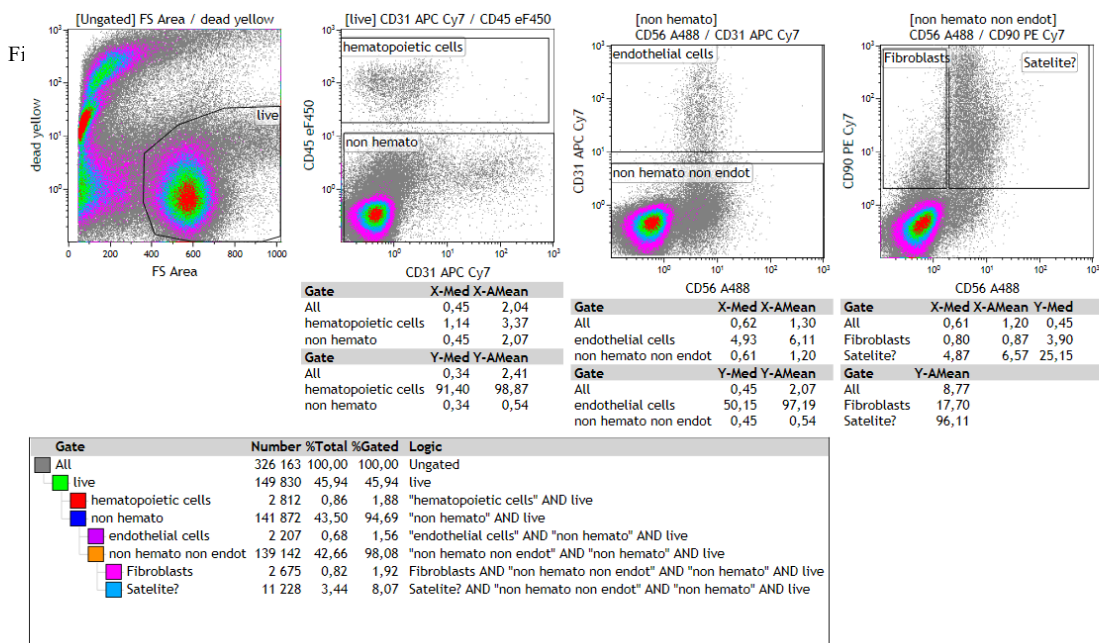
Vi vill med detta projekt utforska om en sådan process beror utav påverkan på muskelns stamceller – satellitcellerna. Mer specifikt tror vi att de hindras att utsöndra fibros-hämmande exosomer, små vätskefyllda blåsor som cellerna använder för att kommunicerar med andra celler. Sedan tidigare har vi funnit att antalet stamceller i muskeln är färre vid CP, och andra forskare har visat att möss som saknar dessa stamceller (satellitceller) får tillväxt av fibros vid träning av musklerna istället för muskeltillväxt. Detta tolkar vi som att satellitcellerna är viktiga inte bara för muskeltillväxt utan även för att sköta muskelns bindväv. Utsöndrade exosomer innehåller molekyler som kan påverka närliggande celler på många sätt. Satellitceller kan på detta sätt t ex påverka bindvävscellers uttryck av kollagen. Vår hypotes är att exosomer, utsöndrade av satellitceller, reglerar muskelns bindväv framförallt under tillväxt. Ett minskat antal satellitceller kan därför leda till patologiskt ökad mängd bindväv i muskeln=fibros. För att testa detta planerar vi att jämföra barn med CP med typiskt utvecklade barn genom följande:

1. Från muskelprover ta fram satellitceller, fibroblaster och myofibroblaster.
2. I laboratoriet samodla dessa celler och se hur de påverkar varandra.
3. Ta fram exosomer från hel muskel samt från isolerade muskelfibrer.

Metod: Barn med cerebral pares och typiskt utvecklade barn har rekryterats från patienter planerade för kirurgisk behandling av armen. Små muskelbitar har tagits under operation för cellisolering och biokemisk analys.

Resultat

Sedan ansökningstillfället har vi isolerat muskelceller och exosomer från underarmsmuskulaturen (handledsböjare) hos tre barn med cerebral pares. Vi har etablerat en metod att med FACS (cellsortering) tagit fram satellitceller (stamceller) från musklerna. Metoden bygger på att en antikropp identifierar ytstrukturen på de olika celler man vill få fram, och att de därför kan isoleras. De isolerade, framtagna cellerna kan sedan odlas i cell-lab. (Fig. 1).



Vi ska nu odla de celler vi tagit fram och isolera, dvs ta fram exosomer ur odlingsmediet. Vi har etablerat en metod att från både odlade celler och muskelbiopsier få fram exosomer. Vi har även kontrollerat att vår metod renar fram rätt storlek av exosomer, kring 130nm i diameter.

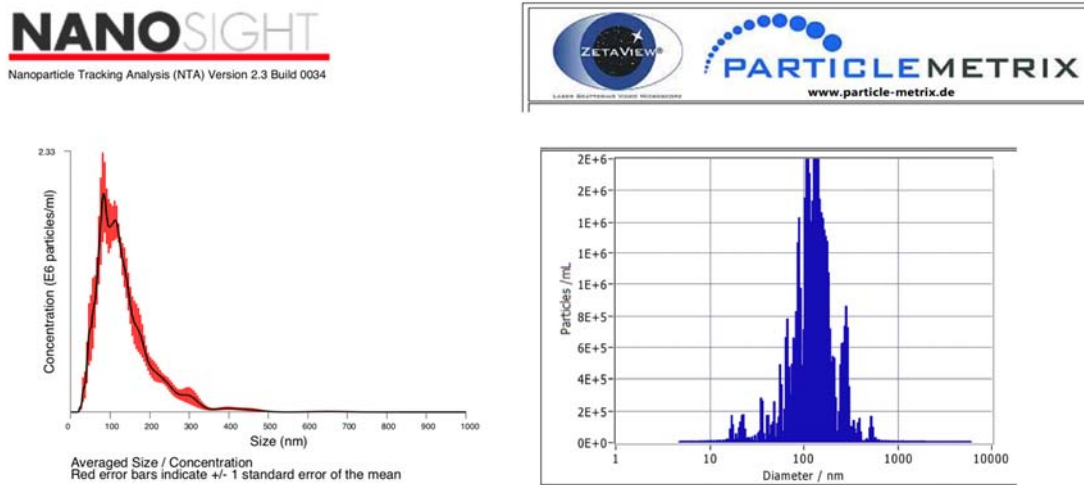


Fig. 2. Vänster: Angivelse av partikelstorlek med Nanosight-apparat. Höger: Angivelse av partikelstorlek med Zetaview-apparat.

Vi har även försäkrat oss om att de exosomer som vi har renat fram fungerar, d.v.s. att de kan användas för cellkultur-experiment och förväntas ha en biologisk effekt. Vi har genomfört ett så kallat transfektions-experiment på muskelceller i cellodlings-kultur där vi "laddat" de exosomer som vi renat fram med en konstgjord gen som producerar ett grönt fluorescerande protein. Med dessa exosomer har vi sedan lyckats att överföra denna gen till muskelcellerna som i sin tur börjat producera proteinet (Fig. 3). Vi tolkar detta som att de exosomer vi renar fram fungerar och kan överföra genetiskt material till celler som i sin tur har en biologisk effekt, d.v.s. i vårt testfall gröna celler.

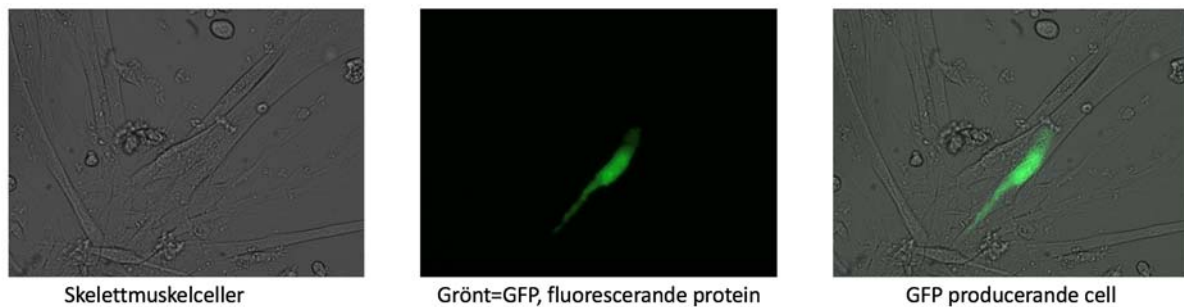


Fig. 3. Vänster: Odlade skelettmuskelceller. Mitten: Protein GFP lyser grönt när det exciteras med laser med rätt våglängd. Höger: GFP uttrycks av skelettmuskelcell som har fått detta genetiska material genom upptag av preparerade exosomer.

Vi vill nu fortsätta projektet genom att utöka insamling av biopsimaterial från barn med CP samt typiskt utvecklade barn. Flytten till NKS (Nya Karolinska Sjukhuset) har påverkat projektet negativt då ny biopsitagning varit problematisk p.g.a. minskat operationsutrymme. Under 2019 planeras en serie operationer då vi kan samla muskel för ytterligare analys

Konklusion/betydelse: Våra resultat visar att vi på ett stabilt och upprepbart sätt kan ta fram och isolera muskelstamceller samt exosomer från skelettmuskulatur, d.v.s. handledsböjare hos barn med CP. Vi har nu etablerat metodik för att utöka antalet barn i studien och experimentellt testa vår hypotes ytterligare under året som kommer.

Vetenskapliga publikationer: Insamling fortgår och resultaten har hittills redovisats som preliminära data inom ramen för interna seminarier vid Nya Karolinska samt Karolinska Institutet. Under 2019/2020 planeras artiklar i välrenommerade vetenskapliga tidskrifter.