

Ю. М. Гаин, С. С. Кулинич, М. М. Зафранская, С. В. Шахрай, М. Ю. Гаин

МОРФО-ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОГЕННЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

В работе представлены результаты исследования морфо-фенотипических особенностей миогенных клеток-предшественников поперечнополосатой мышечной ткани. Получены первичные культуры гетероморфных клеток, способные к долгосрочной пролиферации без сопутствующей миодифференцировки, что создает благоприятные условия для экспансии культур и наращиванию клеточной биомассы. Миогенный потенциал клеток-предшественников подтвержден спонтанной и индуцированной дифференцировкой в миобласты с их слиянием и образованием многоядерных миотуб с характерным миогенным фенотипом и сократительной активностью.

Ключевые слова: миогенные клетки-предшественники, миосателлиты, миотубы, миоспецифические маркеры, сократительные белки.

Yu. M. Gain, S. S. Kulinich, M. M. Zafranskaya, S. V. Shakhraj, M. Ju. Gain

MORPHO-PHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF MYOGENIC PROGENITOR CELLS OF CROSS-STRIATED MUSCULAR TISSUE

In work results of research morpho-phenotypic features of myogenic progenitor cells of cross-striated muscular tissue are presented. Primary cultures of various-formed cells have been established, which were capable to long-term proliferation without accompanying myodifferentiation, that creates favorable conditions for expansion of cultures and to escalating of a cellular biomass. The myogenic potential of progenitor cells is confirmed by the spontaneous and induced differentiation in myoblasts with their multinuclear myotube merge and formation with characteristic myogenic phenotype and contractive activity.

Key words: myogenic progenitor cells, myosatellites, myotubes, myospecific markers, mantle proteins.

Регенерации тканей принадлежит огромное значение в процессе восстановления поврежденных тканей и органов. Регенерационный миогистогенез состоит из трех фаз: фазы активации и пролиферации источников развития поврежденной ткани, фазы дифференцировки и фазы адаптивной перестройки тканевых структур в новых условиях функционирования. Основным источником регенерации поперечнополосатой мышечной ткани явля-

ются миосателлиты (около 2–5% от всех ядер скелетных мышц) – гетерогенная популяция клеток, включающая коммитированные клетки-предшественники миогенной линии дифференцировки и мультипотентные предшественники миосателлитов – стволовые клетки мышечной ткани [1, 6]. Миосателлиты имеют уникальную анатомическую локализацию между базальной пластинкой и сарколеммой мышечных волокон и являются морфо-

функциональной основой камбиального резерва тканевой системы скелетной мышцы. После серии митозов в посттравматическом рабдомиогенезе из них формируется популяция миобластов, которые, сливаясь, образуют новые мышечные симпласты [8]. Учитывая высокий пролиферативный потенциал, способность к экспансии *in vitro* и тканекоммитированность миогенных клеток-предшественников (МКП), разработка методов их трансплантации в целях восстановления структурно-функциональной целостности мышечной ткани является одним из перспективных направлений тканевой инженерии [2, 7]. При этом ключевыми вопросами, возникающими при разработке технологий клеточной трансплантации, являются выбор источника ауто/аллогенных клеток и степени их дифференцированности в миогенном направлении, а также определение условий получения, культивирования и наращивания клеточных культур *in vitro* [3, 4].

Цель исследования: оценить морфо-фенотипические особенности и миогенный потенциал клеток-предшественников поперечнополосатой мышечной ткани человека и лабораторных крыс, а также определить возможность экспансии клеток *in vitro* с целью их дальнейшего использования в клинической практике.

Материалы и методы

Забор фрагментов поперечнополосатой мышечной ткани человека (*musculus cremaster* или *musculus obliquus externus abdominis*) осуществляли после получения информированного согласия у 5 пациентов с паховой грыжей в ходе выполнения хирургического вмешательства – герниотомии и пластики пахового канала по Лихтенштейну. Изолированную ткань объемом 0,8–1,0 см³ механически измельчали на фрагменты размером 1,0–1,2 мм² и подвергли ферментативному расщеплению в растворе 0,3% коллагеназы (Sigma, Германия) и 0,6% диспазы (Sigma, Германия) в течение 2-х часов при 37 °С. Выделенную суспензию клеток в концентрации 2,5–5×10⁵/см² эксплантировали на адгезивный пластик, дополнительно покрытый 2% желатином и культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco, Великобритания), содержащей 15–20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, NuClone, Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 50 ед/мл бензилпенициллина-натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата (Gibco, Великобритания). Замену среды проводили каждые 72–96 часов. Для снятия клеток с культурального пластика при пересеве на 1 и 2 пассажи использовали 0,25% раствор трипси-

на/ЭДТА (Gibco, Великобритания). Для активации процесса миогенной дифференцировки и формирования мышечных трубочек ЭТС в питательной среде заменяли на лошадиную сыворотку и понижали ее уровень до 2%.

МКП лабораторных крыс выделяли аналогичным способом из бедренных мышц (n = 8).

Мониторинг клеточного роста и дифференцировки осуществляли с использованием универсального инвертированного микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия).

Экспрессию миогенных маркеров в полученных культурах МКП оценивали методом иммуноцитохимии с использованием моноклональных антител к саркомерному α-актину (разведение 1:100, Sigma, Германия), гладкомышечному α-актину (α-SMA, 1:10, R&D Systems, Канада), тяжелым цепям миозина (1:10, R&D Systems, Канада), коллагену III типа (1:50, R&D Systems, Канада). Для визуализации образовавшихся комплексов антиген-антитело использовали систему иммунопероксидазного окрашивания LSAB+System-HRP (Dako, США). Ядра клеток окрашивали гематоксилином по стандартной методике. Экспрессию маркеров оценивали с использованием инвертированного микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия).

Результаты и обсуждение

Полученные первичные культуры МКП человека и лабораторных животных, отличались морфологической гетерогенностью и включали два типа клеток: мелкие клетки округлой морфологии с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, небольшим ядром и конденсированным интерфазным хроматином, что характерно для клеток-сателлитов, и биполярные веретеновидные более дифференцированные миогенные предшественники (рис. 1). Средний период прикрепления клеток составил 2–3 дня. Дополнительное покрытие культурального пластика желатином увеличивало концентрацию адгезивных клеток в 4–5 раз.

Культуры МКП, полученные из тканей животных, достигали конfluence к концу 2-й недели культивирования, в отличие от культур клеток из поперечнополосатых мышц человека, которые при аналогичной концентрации посева образовывали монослой лишь на 4–6 неделе. Медленные темпы роста МКП человека обуславливают необходимость дополнительной активации клеток за счет включения в питательную среду активаторов клеточного деления (факторов роста), которые в условиях *in vivo* при повреждении мышечной ткани вызывают пролиферацию миосателлитов, находящихся в митотически неактивной фазе G₀ [4, 8].

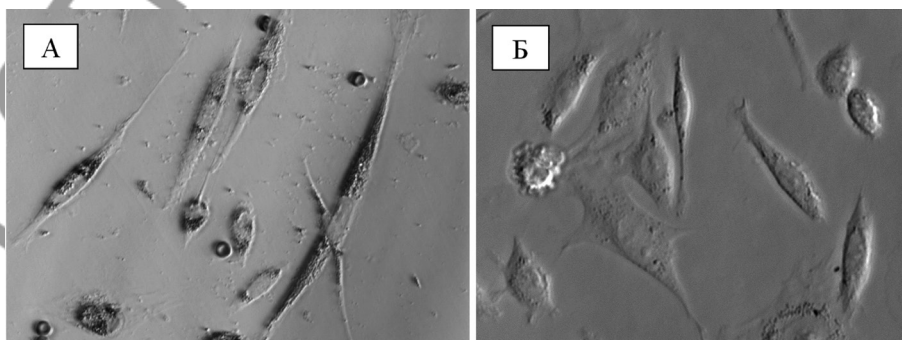


Рис. 1. Морфология первичных культур МКП поперечнополосатой мышечной ткани на желатиновом покрытии пластика, увеличение 400. А – МКП человека, 4-е сутки культивирования. Б – МКП крыс, 6-е сутки культивирования

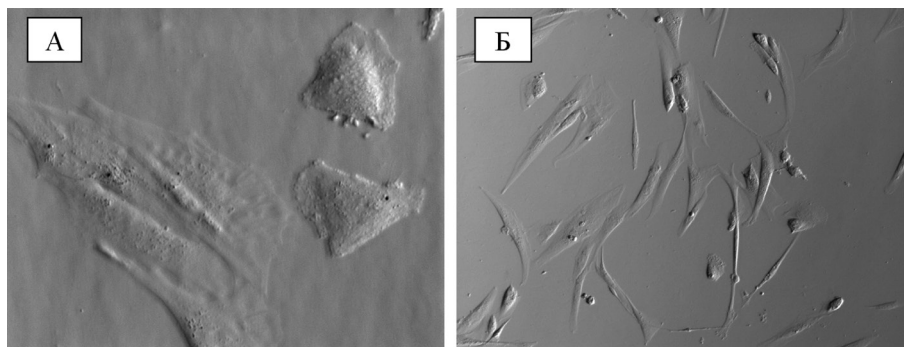


Рис. 2. Морфология культур 1-го пассажа МКП поперечнополосатой мышечной ткани человека, 4 сутки культивирования. А – увеличение 400. Б – увеличение 100

При пересеве МКП на 1–2 пассаже морфологическая гетерогенность культур сохранялась за счет ассиметричного деления миосателлитов, в результате которого происходило восполнение собственного пула клеток и образование более дифференцированных миогенных клеток-предшественников (рис. 2). С одной стороны, ассиметричное деление клеток-сателлитов дает возможность долгосрочной пролиферации МКП и создает благоприятные условия для экспансии культур и наращивания клеточной биомассы. В тоже время, ассиметричное деление может стать барьером для клеточного роста в культуре. В результате продолжающегося деления транзиторных дочерних клеток может происходить нарастание числа неделящихся клеток без соразмерного увеличения числа миосателлитов [5].

Коммитированность полученных клеток в миогенном направлении подтверждалась их дифференцировкой в миобласты и способностью к слиянию с образованием многоядерных миотуб.

В первичных культурах МКП лабораторных животных через 8–12 дней культивирования в присутствии 15–20% ЭТС отмечалось спонтанное слияние одноядерных миобластов и первые признаки формирования двуядерных клеток, а впоследствии многоядерных мышечных миотуб (рис. 3). Процесс дифференцировки в миогенном направлении значительно усиливался при снижении процента ЭТС до 2% и замены ее на лошадиную сыворотку. В культурах МКП поперечнополосатых мышц человека спонтанной дифференцировки не наблюдалось. Слияние клеток активировалось лишь при соответствующем изменении concentra-

ции сыворотки в среде через 4–5 дней культивирования. Миогенный потенциал клеток сохранялся и в последующих пассажах (1–2 пассаж).

Большинство исследователей отмечают, что для запуска миодифференцировки клеток-предшественников необходимо изменение условий культивирования (снижение уровня сывороточных белков, использование специального покрытия культурального пластика и др.) и/или добавление индукторов слияния клеток (ионофоры кальция и др.). Так как миодифференцировка клеток – Ca^{2+} -зависимый процесс, присутствие этих ионов в составе культуральной среды DMEM обуславливает возможность спонтанного слияния клеток, что необходимо учитывать при разработке методов экспансии МКП для получения большой биомассы клеток. Кроме того, на дифференцировочные свойства МКП влияет и контакт с компонентами экстрацеллюлярного матрикса. Нами показано, что частота спонтанного и индуцированного (в среде с 2% лошадиной сыворотки) образования миотуб в первичной культуре клеток на желатиновом покрытии была выше, чем на пластике.

На рисунке 4 представлен цитологический препарат МПК, культивируемых в дифференцировочной среде, окрашенный гематоксилином. По мере формирования сократительного аппарата многочисленные ядра из центра трубочек смещались и выстраивались по периферии образованной структуры (рис. 4). Следует отметить, что происходило окрашивание гематоксилином не только ядер, но и цитоплазмы миотуб, которое может быть обусловлено присутствием РНК/ДНК-содержащих структур. Для мы-

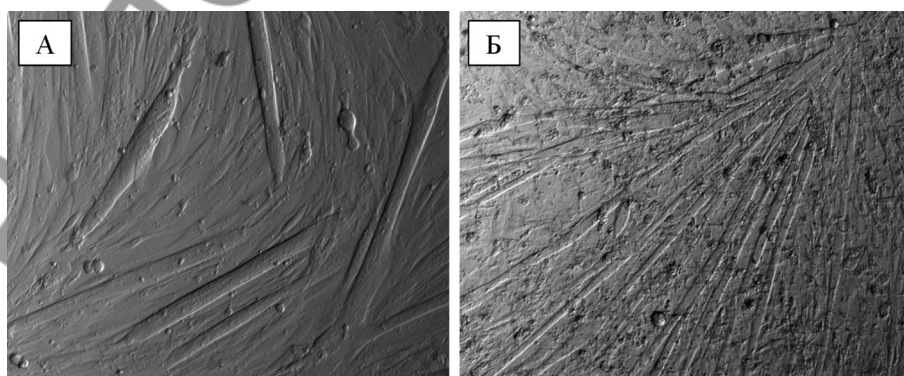


Рис. 3. Спонтанное и индуцированное (в присутствии 2% лошадиной сыворотки) образование миотуб, ув. 100. А – 15-е сутки культивирования, спонтанное слияние миобластов. Б – 18-е сутки культивирования, образование мышечных трубочек в дифференцировочной среде

шечных волокон характерно наличие большого количества митохондрий, расположенных между миофибриллами, которые обеспечивают энергетические потребности при сокращении симпластов [8].

Функциональная активность многоядерных мышечных структур подтверждалась их спонтанным несинхронным сокращением при культивировании в дифференцировочной среде.

В МКП человека и лабораторных животных методом иммуноцитохимического анализа выявлен синтез сократительных белков мышечного аппарата – саркомерного α -актина, гладкомышечного α -актина – как в одноядерных клетках (слабое окрашивание), так и в миотубах (интенсивное окрашивание) (рис. 5А-Б).

Наличие специфического окрашивания при использовании моноклональных антител к тяжелым цепям миозина определялось только в многоядерных миотубах (рис. 5В)

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что применяемая технология позволяет получить первичные культуры гетероморфных клеток, способных к долгосрочной пролиферации без сопутствующей миодифференцировки, что создает благоприятные условия для экспансии культур и наращиванию клеточной биомассы. Достаточный миогенный потенциал клеток-предшественников, подтвержденный спонтанной и индуцированной дифференцировкой в миобласты с их слиянием и образованием многоядерных миотуб с характерным миогенным фенотипом и сократительной активностью, позволяет с оптимизмом смотреть на перспективу разработки новой технологии регенерации мышечной ткани для лечения ряда патологических состояний и травм в клинических условиях.

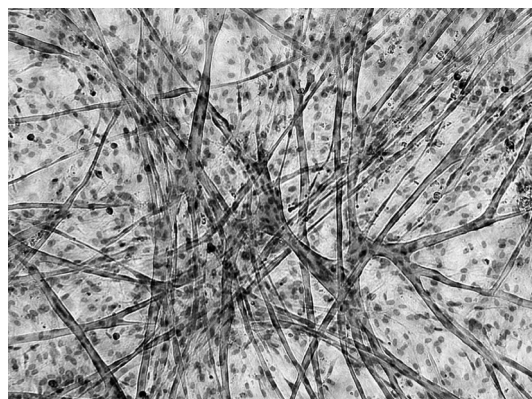


Рис. 4. Слияние мышечных трубочек в дифференцированной культуре МКП 1-го пассажа (в присутствии 2% лошадиной сыворотки) на 20 сутки культивирования, ув. 100. Окраска ядер гематоксилином

Выводы

1. Культуры миогенных клеток-предшественников переполосатой мышечной ткани человека и лабораторных крыс отличаются морфологической гетерогенностью, обусловленной присутствием клеток, находящихся на разных стадиях миодифференцировки.
2. Коммитированность клеток-предшественников в миогенном направлении подтверждается спонтанной и индуцированной дифференцировкой в миобласты и их слиянием с образованием многоядерных миотуб с характерным миогенным фенотипом и сократительной активностью.
3. Для успешной экспансии культур, высокой жизнеспособности, пролиферации и репликативной продолжительности

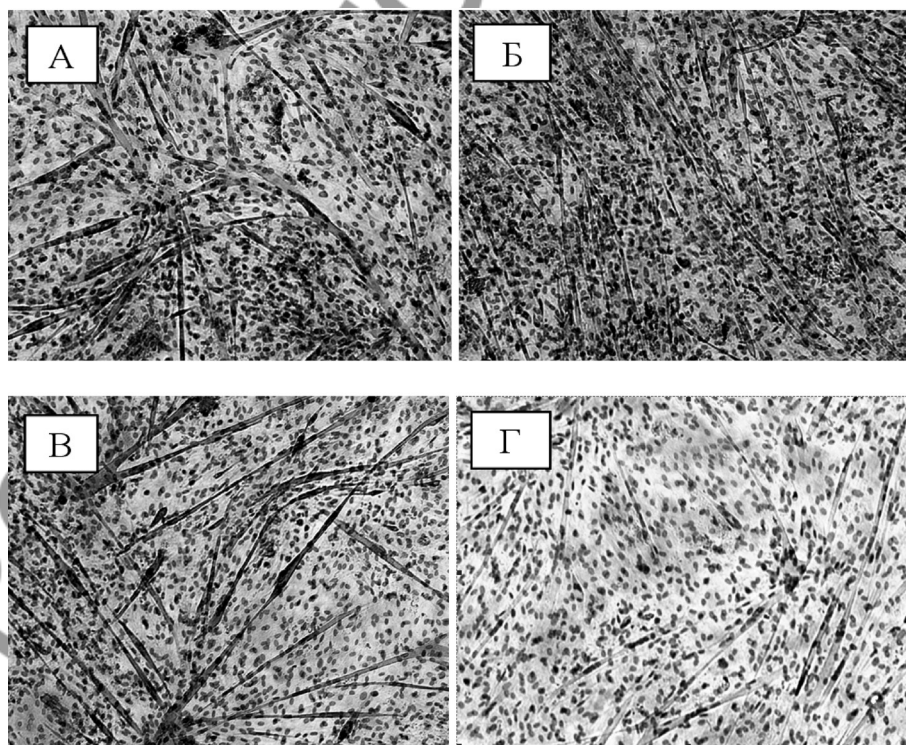


Рис. 5. Иммуноцитохимический анализ миоспецифических маркеров первичной культурой МКП, увеличение 100. А – окрашивание на саркомерный α -актинин. Б – окрашивание на гладкомышечный α -актин. В – окрашивание на тяжелые цепи миозина. Г – контроль

тельность жизни клеток необходимо присутствие естественных факторов микроокружения, таких как сигналы ростовых факторов, контакты с компонентами экстрацеллюлярного матрикса, межклеточное взаимодействие и др.

4. Полученные результаты исследования, касающиеся морфо-фенотипических и дифференцировочных особенностей миогенных клеток-предшественников, могут быть использованы в качестве альтернативы другим типам клеток, используемым для регенерации мышечной ткани (мезенхимальные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки), с целью выбора наиболее перспективного варианта клеток и оптимизации условий их культивирования и последующего клинического использования.

Литература

1. Одинцова, И. А. Проблема камбиальности скелетной ткани в регенерационном гистогенезе / И. А. Одинцова // Вопросы морфологии XXI века. – 2009. – № 2. – P. 147–152.

2. *Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering* / J. Stern-Straete [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 21. – P. 49–56.

3. *Lawson, M. A. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific* / M. A. Lawson, P. P. Purslow // *Cells tissues organs*. – 2000. – Vol. 167. – P. 130–137.

4. *Long-Term Self-Renewal of Postnatal Muscle-derived Stem Cells* / B. M. Deasy [et al.] // *MBC*. – 2005. – Vol. 16. – № 7. – P. 3323–3333.

5. *Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle* / S. Fukada [et al.] // *Stem cells*. – 2007. – Vol. 25. – P. 2448–2459.

6. *Regulation and Function of Skeletal Muscle Stem Cells* / M. Cerletti [et al.] // *Cold spring harbor symposia on quantitative biology*. – 2008. – Vol. LXXIII. – P. 317–322.

7. *Relaix, F. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage* / F. Relaix, P. S. Zammit // *Development*. – 2012. – Vol. 139. – P. 2845–2856.

8. *Yin, H. Satellite cells and the muscle stem cell niche* / H. Yin, F. Price, M. A. Rudnicki // *Physiol. Rev.* – 2013. – Vol. 93. – P. 23–67.