

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

© Н. А. Смолина, А. Я. Давыдова, И. А. Щукина, А. В. Карпушев,
А. Б. Малашичева, Р. И. Дмитриева, А. А. Костарева¹

Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: kostareva_aa@almazovcentre.ru

Для успешного изучения патогенеза мышечных заболеваний требуются информативные клеточные модели. В настоящее время не существует универсальной культуры мышечных клеток, которая могла бы являться единым стандартом для исследования патофизиологии мышечных и нейромышечных заболеваний. Многие клеточные линии не обладают достаточной степенью дифференцировки, функционально незрелые и не всегда могут подвергаться генетическим модификациям. Целью данной работы был выбор доступной и информативной клеточной модели дифференцированных мышечных клеток, которая была бы пригодна для комплексного изучения функциональных свойств миоцитов и патогенеза мышечных заболеваний *in vitro*. Анализировали мультипотентные мезенхимные стволовые клетки человека, терминально дифференцированные миофибриллы мышцы и первичные сателлитные клетки мышцы. Показано, что лишь небольшая часть мезенхимных стволовых клеток и только при сокультивировании с клетками линии C2C12 способна к дифференцировке в мышечном направлении. В первичных миофибриллах мышцы лентивирусная трансдукция оказывалась токсичной, и трансдуцированные клетки были не способны реагировать на стимуляцию, т. е. были физиологически неактивны. Сателлитные клетки наиболее эффективно подвергались лентивирусной трансдукции и были способны в условиях дифференцировки формировать миотрубки. Функциональный анализ полученных миотрубок показал их способность отвечать сокращением на электрическую и химическую стимуляцию. Наличие кальциевых и натриевых каналов в мембране миотрубок было подтверждено методом пэгч-кламп. Таким образом, наиболее перспективными для дальнейшего применения оказались сателлитные клетки, которые в дифференцированном состоянии по морфологическим и функциональным признакам наиболее схожи со зрелыми мышечными клетками, миофибриллами и, кроме того, могут подвергаться генетическим модификациям.

Ключевые слова: мышечные клетки, сателлитные клетки, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, миофибриллы.

Принятые сокращения: ММСК — мультипотентные мезенхимные стволовые клетки.

Для изучения структуры и функции мышечных клеток ключевым является выбор оптимальной клеточной модели, которая дает возможность исследовать механизмы и процессы, лежащие в основе функционирования зрелых дифференцированных миофибрилл. Проведение функциональных исследований с использованием информативных клеточных моделей важно также для изучения клеточных и молекулярных взаимодействий, лежащих в основе патогенеза множества заболеваний, в частности нейромышечной патологии. Основную функциональную нагрузку в мышечной ткани взрослого организма выполняют высокодифференцированные, потерявшие способность к делению многоядерные мышечные волокна, которые формируются в результате слияния пролиферирующих и дифференцирующихся миобластов. Регенерация мышечной ткани во взрослом организме обеспечивается за счет пула сателлитных клеток, представляющих собой резидентные стволовые клетки скелетной мускулатуры, расположенные между базальной ламиной и сарколеммой мышечного волокна (Mauro, 1961; Konigsberg, 1963;

Yaffe, 1969; Yablonka-Reuveni et al., 2008). В ответ на повреждение или повышенную физическую нагрузку эти клетки способны активно пролиферировать, дифференцироваться и давать начало новым миофибриллам (Snow, 1977; Hawke, Garry, 2001; Day et al., 2007).

Изучение биологии зрелых мышечных клеток является сложной задачей вследствие ряда методических сложностей, препятствующих созданию функциональной клеточной модели. Мышечные волокна, изолированные из скелетных мышц млекопитающих, являются наиболее физиологичной моделью для изучения структуры и функции дифференцированных мышечных клеток. Однако вследствие отсутствия пролиферативного потенциала их применение в экспериментальных работах *in vitro* крайне ограничено (Pasut et al., 2013). В то же время сателлитные мышечные клетки, обладающие большим пролиферативным потенциалом, могут быть легко изолированы из биопсии скелетной мускулатуры посредством ферментативной обработки, легко культивируются и проходят до 8—10 пассажей в культуре (Musard, Barberi, 2010).

Тем не менее они обладают лишь небольшой частью свойств, характерных для дифференцированных мышечных клеток, не имеют характерных внутриклеточных структур и отличны по типу метаболизма (Biressi et al., 2007).

Иммортизированные клеточные линии также могут использоваться в качестве экспериментальных моделей для изучения биологии мышечных клеток. Так, общепринятым является использование линии мышечных миобластов C2C12 или иммортизированных кардиомиоцитов мышцы линии HL-1. Однако применение стабильных клеточных линий имеет ряд недостатков, одними из которых являются малая степень дифференцировки клеток, генетическая нестабильность и метаболические свойства, более характерные для эмбриональных клеток (Burattini et al., 2004; Ilkovski et al., 2005). Так, например, при анализе экспрессии генов клеточной линии C2C12, использованной в качестве модели для изучения патогенеза миодистрофии Дюшена, было показано, что эти клетки в значительной степени экспрессируют гены, характерные для эмбриональных мышечных клеток, в частности сердечный альфа-актин (Ravenscroft et al., 2007).

Важным свойством культуры клеток является способность эффективно подвергаться направленной генетической модификации посредством химической или вирусопосредованной трансфекции. Такие модификации позволяют использовать культуры клеток для расшифровки патогенеза многих моногенных заболеваний человека. При этом эффективная генетическая модификация первичных миофибрилл, выделенных из скелетно-мышечной ткани, является до сих пор крайне сложной задачей, значительно ограничивая возможности моделирования генетических дефектов, связанных с развитием нейромышечной патологии.

Существуют данные о проведении эффективной транзитной аденовирусной трансдукции миофибрилл *in vivo* с высоким уровнем экспрессии введенного гена. Однако в такой системе время экспрессии ограничивается несколькими неделями после трансдукции, сопровождаемая выраженным воспалительным и иммунным ответом (Nabel, 1995; Snyder et al., 1997). Иммортизированные клеточные линии также легко поддаются различным способам трансфекции — кальций-фосфатному, липофекции, электропорации и др. Однако наряду с транзитным характером экспрессии данные клеточные модели обладают недостатками (перечисленными выше), связанными с низкой степенью их дифференцировки.

Еще одним подходом к получению дифференцированных мышечных клеток является направленная дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК). В 1995 г. было впервые показано, что ММСК, полученные из костного мозга, могут дифференцироваться в миогенном направлении (Saito et al., 1995; Wakitani et al., 1995). Существуют работы, посвященные изучению миогенного потенциала ММСК жировой ткани (Stern et al., 2005). Относительная простота получения образцов ММСК жировой ткани от пациентов обуславливает привлекательность их использования для получения клеточных моделей нейромышечных патологий с доказанными генетическими дефектами, когда экзогенной модификации генома не требуется. Изучение динамики дифференцировки ММСК в таких моделях может позволить выявить нарушения молекулярных механизмов миогенной дифференцировки, связанных с развитием патологического процесса. Однако большинство авто-

ров указывают на то, что миогенная дифференцировка ММСК в клеточной культуре без микроокружения, сформированного мышечными клетками, протекает очень ограниченно, несмотря на то что ММСК под действием стимулов, запускающих миогенную дифференцировку, начинают экспрессировать как ранние, так и поздние маркеры миогенной дифференцировки (MyoD, Myf5, миогенин и MRF4) (Zuk et al., 2001, 2002; Mizuno et al., 2002; Rodrigues et al., 2005; Lee, Kemp, 2006). Слияние клеток и формирование миотрубок в культуре остаются редким событием, в некоторых случаях составляя менее 1 %, что делает данную модель малоприменимой для получения значительной популяции дифференцированных мышечных клеток. Показано, что модуляция направленной дифференцировки ММСК в миогенном направлении посредством сокультивирования с мышечными миобластами может повышать долю эффективно-дифференцированных клеток (Rodrigues et al., 2005; Di Rocco et al., 2006).

Цель данной работы заключалась в выборе доступной и информативной клеточной модели мышечной дифференцировки, которая была бы пригодна для комплексного изучения функциональных свойств мышечных клеток и патогенеза мышечных заболеваний *in vitro*.

Материал и методика

Получение первичных культур ММСК подкожной жировой ткани человека. ММСК выделяли из образцов аспирата подкожной жировой ткани человека. ММСК выделяли, используя последовательно энзиматическую диссоциацию и селекцию клеток по степени адгезии, согласно методикам, описанным нами ранее (Dmitrieva et al., 2012). Энзиматическую диссоциацию проводили, используя 0.5%-ный раствор коллагеназы III (Worthington, США). Затем фермент нейтрализовали добавлением к суспензии клеток культуральной среды α -МЕМ (ПанЭКО, Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 1 % L-глутамина (Invitrogen, США) и 1 % смеси пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США). Через 24—48 ч культивирования неприкрепленные клетки убирали, а прикрепленные клетки (представляющие собой ММСК) продолжали культивировать в свежей питательной среде. Смену среды осуществляли 1 раз в течение 2—3 сут.

Характеристика первичных культур ММСК. Международным обществом клеточной терапии (ISCT) в 2006 г. (Domici et al., 2006) было предложено применять термин ММСК к популяциям адгезивных к пластику мультипотентных клеток, экспрессирующих определенный набор поверхностных маркеров: CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻, или CD11b-4, CD19⁻, или CD79 α ⁻. В полученной нами популяции ММСК оценивали уровни экспрессии этих маркеров, используя антитела, конъюгированные с фикоэритрином, флуоресцеинизоцианатом и аллофикоцианином, прибор BD FACS Calibur (Becton-Dickinson BioSciences, США) и программное обеспечение CELLQuest.

Сокультивирование ММСК и C2C12, формирование миотрубок. ММСК сокультивировали с клетками линии C2C12 (иммортизированными миобластами мышцы) в течение 2 сут в среде, стимулирующей пролиферацию (альфа-МЕМ, содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % L-глутамина и 10 %

смеси пенициллина и стрептомицина). После этого среду заменяли на среду, стимулирующую миогенную дифференцировку (DMEM, содержащую 2 % лошадиной сыворотки), и продолжали культивирование в течение 4–6 сут, наблюдая формирование миотрубок. Состав миотрубок оценивали по экспрессии маркеров, специфичных для мышечных клеток и клеток человека. ММСК дополнительно метили с помощью карбоксифлуоресцеинсукцинимидилового эфира CFSE (Invitrogen, США). CFSE диффузно проникает внутрь клетки и после действия эстераз начинает флуоресцировать. Образующиеся конъюгаты белка с красителем остаются во внутриклеточном пространстве и при дальнейшем делении или слиянии передаются дочерней клетке. Таким образом, CFSE является удобным агентом для мечения клеток *in vivo* и слежения за их дальнейшей судьбой. Окраску проводили согласно инструкции фирмы-производителя с незначительными модификациями: конфлюэнтную культуру ММСК трипсинизировали, клетки отмывали от среды и трипсина фосфатным буферным раствором и ресуспендировали в нагретом до 37 °С фосфатном буфере (10⁶ кл./мл), добавляли CFSE (рабочая концентрация 5 мкМ) и инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Затем клетки отмывали и высевали в культуральный флакон (5000–10 000 кл./см²). Через 2–4 сут клетки использовали для экспериментов. Для иммуноцитохимического окрашивания клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом. Для детекции клеток человека использовали моноклональные антитела к ядерному белку человека (Millipore, США).

Для усиления эффекта дифференцировки клетки культивировали в условиях гипоксии. Для снижения уровня кислорода при сокультивировании использовали мультигазовый инкубатор MCO-18M (SANYO, Япония). Парциальное давление O₂ в тканях в норме колеблется на уровне 8–12 % (Lash et al., 2006), поэтому для создания умеренной гипоксии в условиях наших экспериментов мы понижали уровень O₂ в атмосфере до 5 %.

Выделение миофибрилл и сателлитных клеток. Для выделения миофибрилл и сателлитных клеток использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 8–12 нед. Животных убивали методом цервикальной дислокации. Для получения миофибрилл использовали мышцу *m. flexor digitorum brevis*, для выделения сателлитных клеток — мышцу *m. soleus*. Выделенные мышцы помещали в среду DMEM (Invitrogen, США) с антибиотиком. Для получения миофибрилл мышечную ткань обрабатывали 0.3%-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, Германия). Коллагеназу растворяли в среде DMEM с антибиотиками, а затем фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Мышцы помещали в раствор коллагеназы на 90 мин при 37 °С. Для отмывки от фермента использовали среду DMEM, содержащую 20 % эмбриональной телячьей сыворотки. Ферментативнообработанные мышцы разбивали на отдельные мышечные волокна путем многократного пипетирования (20 раз) пипеткой объемом 1 мл, которое проводили либо в среде DMEM с той же сывороткой, либо в среде DMEM, содержащей ту же сыворотку и концентрированный вирус, либо в неконцентрированной вирусной суспензии. Качество разделения мышц на отдельные волокна оценивали под световым микроскопом. Миофибриллы сеяли на 6-луночные планшеты. Лунки планшетов были покрыты Geltrex LDEV-free со сниженным количеством ростовых факторов (Invitrogen, США) для лучшей

адгезии клеток, которая обеспечивалась присутствием ламинина, коллагена IV, энтактина и гепаран-сульфат-протеогликана.

Клетки культивировали на среде DMEM, содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки.

Сателлитные клетки выделяли по описанному ранее методу (Keire et al., 2013). Для выделения сателлитных клеток использовали 0.1%-ный раствор коллагеназы. Инкубировали в течение 90 мин при 37 °С. После инкубации с ферментом полученную клеточную суспензию переносили в пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 2.5 мл среды DMEM (с 10 % лошадиной сыворотки), инкубировали 1–2 мин, затем переносили супернатант, содержащий клетки, в новую 15-миллилитровую пробирку. Отмывку от коллагеназы повторяли еще раз. Дважды собранный супернатант центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, после чего надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в 0.5 мл среды DMEM (содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки и 10 % лошадиной сыворотки и 1 % эмбрионального экстракта цыпленка). Затем клетки помещали на поверхность чашки, покрытую Geltrex, инкубировали 5 мин, после чего по каплям добавляли культуральную среду DMEM (с 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10 % лошадиной сыворотки, 1 % эмбрионального экстракта цыпленка). После ночной инкубации клеткам меняли среду. Для индукции дифференцировки пролиферативную среду заменяли дифференцировочной (DMEM, 2 % лошадиной сыворотки). Для подтверждения миогенной природы выделенных клеток проводили иммуноцитохимическую окраску антителами к десмину — маркеру мышечных клеток.

Генетические конструкции. κДНК гена *GFP* клонировали в лентивирусный вектор pLVTHM (Malašičeva et al., 2007). Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, несущие пакующие и функциональные гены вируса иммунодефицита человека, как это было описано ранее (Малашичева и др., 2008).

Трансдукция первичных миофибрилл и сателлитных клеток мыши лентивирусными конструктами. В связи с тем что эффективный протокол лентивирусной трансдукции первичных миофибрилл отсутствует, мы пробовали проводить ее, используя различные модификации протокола и выбирая наиболее эффективный путь заражения. Во-первых, для заражения использовали неконцентрированный и концентрированный вирусы. Во-вторых, для разбиения мышечного волокна на отдельные миофибриллы после ферментативной обработки использовали либо питательную среду, либо неконцентрированный вирус. В-третьих, варьировали время экспозиции миофибрилл вирусу до посадки на чашки от 1.5 до 4.5 ч. В-четвертых, посадку осуществляли либо на чашки, покрытые Geltrex, либо на чашки без покрытия с последующим перемещением их на чашки с Geltrex. Единственным неизменным фактором было добавление к клеткам полибрена (Sigma, Германия) в концентрации 8 мкг/мл. В случае трансдукции первичных сателлитных клеток концентрированный лентивирус добавляли к клеточной суспензии, затем клетки инкубировали в течение 5 мин в присутствии полибрена и высаживали на чашки с покрытием.

После трансдукции клетки инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе при 37 °С, на следующее утро клетки отмывали раствором PBS и меняли им среду. Эф-

фektivность трансдукции оценивали через 72 ч под флуоресцентным микроскопом. Для этого использовали экспрессионную плазмиду с зеленым флуоресцирующим белком.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида 10 мин при 4 °С, пермеабилizировали в 0.05%-ном растворе Тритона X-100 в PBS в течение 5 мин и блокировали неспецифическое связывание в 15%-ном растворе эмбриональной телячьей сыворотки в течение 30 мин. Инкубацию с первичными моноклональными антителами против десмина (D33, ДАКО, Дания) проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, после серии отмывок в PBS клетки инкубировали со вторичными антителами против мыши, конъюгированными с AlexaFluor 546 (Invitrogen, США), в течение 45 мин. Ядра дополнительно окрашивали DAPI.

Ca^{2+} -токи в миофибриллах и миотрубках регистрировали с помощью метода локальной фиксации мембранного потенциала (пэтч-кламп) в конфигурации whole-cell. Токи записывали, используя усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices, США), соединенный с персональным компьютером через аналого-цифровой преобразователь Digidata 1440A (Molecular Devices, США). Регистрацию и первичную обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения pClamp 10.2 (Molecular Devices, США). Микропипетки для пэтч-кламп вытягивали из филаментсодержащих капилляров (World Precision Inst., США), используя горизонтальную вытяжку микроэлектродов P-1000 (Sutter Instruments, США). Визуальные наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Германия), установленного на антивибрационном столе. Сопротивление микроэлектродов составляло 1.5—4 МОм при заполнении пипеточным раствором, содержащим (мМ): 120 CsCl, 5 MgATФ, 10 ЭГТА и 10 HEPES, pH 7.4 (CsOH). Раствор в экспериментальной

камере содержал (мМ): 120 TEA-Cl, 10 CsCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.001 TTX и 10 глюкозы, pH 7.4 (TEA-OH). Кальциевый ток вызывали серией деполяризационных импульсов длительностью до 200 мс от -40 до 60 мВ с шагом 10 мВ.

Кроме кальциевых токов через мембрану оценивали осцилляции кальциевых концентраций в саркоплазме. Саркоплазматический кальций детектировали с помощью флуоресцентного красителя fluo-3 AM (Invitrogen, США), имеющего высокое сродство к катионам кальция внутри клетки. Миотрубки инкубировали с 2 мкМ fluo-3 AM в течение 20 мин, затем несвязавшийся краситель отмывали в тиродном буфере еще в течение 20 мин. Клетки подвергали стимуляции током с частотами 1, 10 и 100 Гц с длительностью одного импульса 7 с. Кальциевые осцилляции представляли собой локальное увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала в саркоплазме, которые регистрировали под конфокальным микроскопом. Полученные изображения анализировали с использованием программы Image J. Измеряли среднее значение интенсивности пикселей в саркоплазме до начала стимуляции (F_0) и в течение стимуляции (F). Для оценки фонового сигнала также измеряли интенсивности пикселей в прилегающей к клетке области, эти значения впоследствии вычитали из средних значений, полученных для цитоплазмы. Изменения концентрации саркоплазматического кальция выражали как F/F_0 .

Результаты и обсуждение

Формирование миотрубок путем направленной дифференцировки ММСК в присутствии клеток линии C2C12. Для выявления возможности дифференцировки ММСК в миогенном направлении нами была использована модель сокультивирования ММСК человека с клетками линии C2C12. Диск-

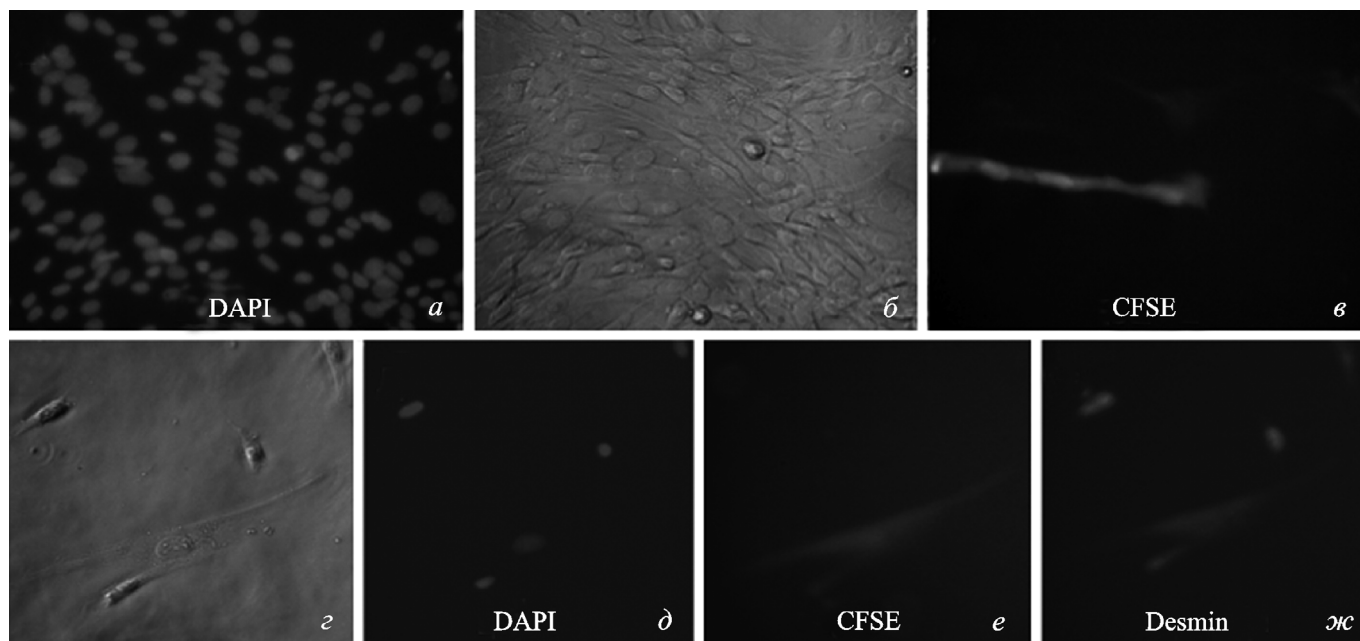


Рис. 1. Дифференцировка ММСК в мышечном направлении при сокультивировании с клетками C2C12.

a—в — формирование миотрубки только клетками ММСК; *г—ж* — мезенхимная клетка, успешно дифференцированная в мышечном направлении. Ядра окрашены DAPI (*a, д*), клетки — красителем CFSE (*б, е*) и мечены на десмин (*ж*).

риминацию клеток человека и клеток мышечных миобластов линии C2C12 проводили с помощью антител к ядерному белку человека. Дополнительно формирование трубок из ММСК детектировали окрашиванием CFSE. При сокультивировании с клетками линии C2C12 (в соотношении 4 : 1) в среде, стимулирующей дифференцировку, ММСК начинали экспрессировать ранний маркер миогенной дифференцировки десмин, экспрессия которого отсутствовала в исходной культуре ММСК (рис. 1, жс), и формировать миотрубки (рис. 1, в). Миотрубки формировались как путем слияния только ММСК, экспрессирующих десмин, так и вследствие слияния ММСК с миотрубками, образованными клетками линии C2C12. К сожалению, формирование трубок как из одних ММСК, так и после слияния ММСК и C2C12 было достаточно редким событием: не более 2 % ядер ММСК участвовали в их построении. Известно, что умеренная гипоксия стимулирует процессы регенерации тканей (Torsney et al., 2002), поэтому мы исследовали возможность увеличения эффективности миогенной дифференцировки ММСК в условиях умеренной гипоксии (5 % O₂) и при сокультивировании с C2C12. Действительно, в условиях гипоксии стимуляция формирования миотрубок происходила быстрее, однако доля трубок, сформированных ММСК, и частота слияния ММСК с C2C12 по-прежнему оставались невысокими, в большинстве случаев не превышая 2—3 %.

Получение культуры первичных миофибрилл и сателлитных клеток и оценка их функциональных свойств. Для получения миофибрилл мы выбрали *m. flexor digitorum brevis*, миофибриллы которой являются достаточно короткими, что обеспечивает их интактность при выделении и возможность культивирования многих фибрилл в одной культуральной чашке одновременно, тогда как при выделении первичных клеток из *m. extensor digitorum longus* миофибриллы часто разрушаются и требуют индивидуального культивирования вследствие большой длины (Shefer, Yablonka-Reuveni, 2005). Выделенные миофибриллы *m. flexor digitorum brevis* были способны находиться в культуре в среднем 3—4 сут, а в некоторых случаях даже 1 нед без признаков разрушения и дедифференцировки, сохраняя поперечную исчерченность.

После получения первичных миофибрилл сателлитные клетки в лунке появлялись через 24 ч после выделения (рис. 2, а). Мышечная природа полученных клеток подтверждалась иммуноцитохимической окраской на десмин — белок, специфичный для клеток миогенного происхождения (рис. 2, в, з). Не обработанные вирусными частицами миофибриллы сохраняли способность реагировать на электрическую стимуляцию, находясь в культуре в течение первых 3 сут после выделения.

Генетическая модификация первичных миофибрилл и сателлитных клеток с помощью лентивирусной трансдукции. В настоящее время исследования, требующие использования генетически модифицированных миофибрилл, проводятся с использованием аденовирусной трансдукции животных *in vivo* (Bachrach et al., 2004; Li et al., 2005) или трансгенных животных. Данные об использовании лентивирусной трансдукции первичных миофибрилл *in vitro* отсутствуют.

Для оценки возможности генетической модификации первичных миофибрилл и сателлитных клеток мы использовали трансдукцию клеток с помощью лентивирусов. Первичные миофибриллы и сателлитные клетки под-

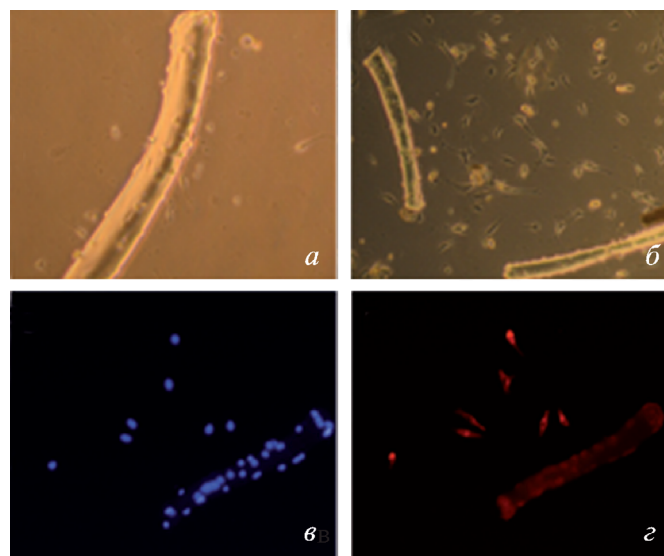


Рис. 2. Миофибрилла и сателлитные клетки через 24 (а) и 72 (б) ч после выделения.

в — окраска ядер DAPI, з — окраска клеток на десмин.

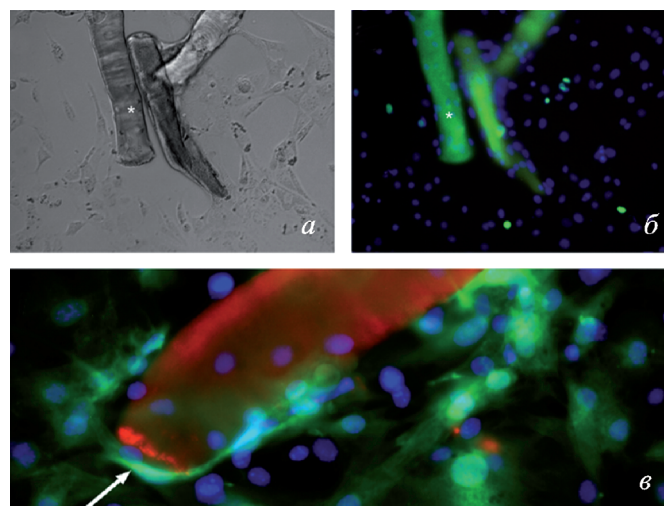


Рис. 3. Первичные и сателлитные клетки, трансдуцированные зеленым флуоресцентным белком.

а — фазовый контраст; видно, что две миофибриллы потеряли поперечную исчерченность, а одна сохранила (звездочка). б — флуоресценция (экспрессия зеленого флуоресцентного белка). в — окраска на десмин (красный цвет); стрелка показывает положительно трансдуцированную сателлитную клетку на поверхности миофибриллы. Ядра окрашены DAPI (синий цвет).

вергали трансдукции лентивирусной конструкцией, несущей зеленый флуоресцентный белок (GFP). Эффективность трансдукции оценивали по флуоресцентному сигналу в миофибриллах и сателлитных клетках. В первичных миофибриллах она оказалась невысокой. Наиболее эффективной трансдукция была при использовании протокола, в котором миофибриллы механически разбивали в концентрированной вирусной суспензии с последующей инкубацией в течение 3 ч и культивированием на чашках, покрытых Geltrex: зеленый флуоресцентный сигнал появлялся приблизительно в 5 % миофибрилл (рис. 3, а).

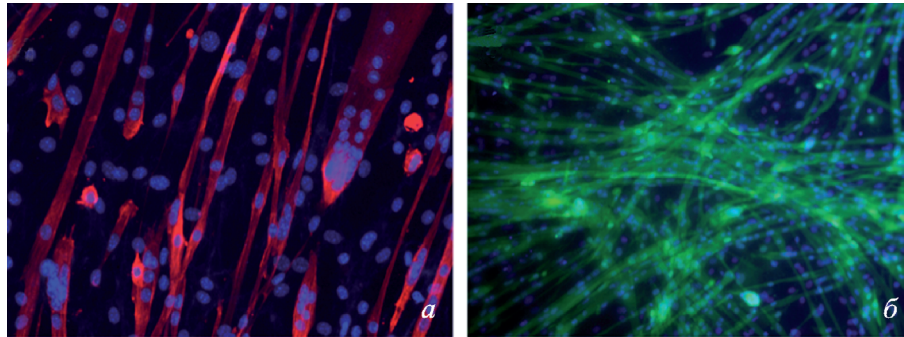


Рис. 4. Миотрубки, образованные после слияния первичных сателлитных клеток, трансдуцированных зеленым флуоресцентным белком.

a — окраска на тяжелые цепи миозина (красный цвет); *б* — экспрессия зеленого флуоресцентного белка. Ядра окрашены DAPI (синий цвет).

Генетически модифицированные первичные миофибриллы оказались функционально неактивны. Электрическая стимуляция не вызывала сокращения GFP-положительных миофибрилл, а сократительный ответ GFP-негативных миофибрилл, находящихся в той же культуральной чашке, сохранялся. Кроме того, анализ морфологического состояния GFP-позитивных клеток показал, что они склонны терять поперечную исчерченность, что отражает нарушение структуры саркомера, обеспечивающей процесс сокращения. Таким образом, лентивирусная трансдукция в первичные миофибриллы оказалась малоэффективной и не позволяла проводить дальнейшие функциональные исследования трансдуцированных клеток.

Поэтому для разработки *in vitro* модели генетически модифицированных миофибрилл выбрали другой подход — сначала получали модифицированные сателлитные клетки, а затем добивались их дифференцировки в зрелые функциональные миотрубки.

Трансдукцию сателлитных клеток проводили до посадки клеток на поверхность чашек, клетки инкубировали с концентрированной лентивирусной суспензией в течение 5 мин в присутствии полибрена. Анализ сателлитных клеток, подвергшихся трансдукции, показал, что они эффективно трансдуцируются лентивирусными кон-

струкциями, даже находясь в нише сателлитных клеток между саркоплазматической мембраной и базальной ламиной. Через 48 ч после заражения GFP-сигнал, свидетельствующий об эффективной трансдукции, сохранялся при миграции сателлитных клеток из-под базальной мембраны. Количество появившихся сателлитных клеток зависело от времени инкубации с вирусом. Чем дольше миофибриллы инкубировали с вирусной суспензией, тем меньше наблюдалось сателлитных клеток (данные не показаны). Возможно, эффект связан с токсическим влиянием лентивирусов на пролиферативную способность клеток. После трансдукции клетки сохраняли способность проходить до 4 пассажей и сохранять способность к экспрессии зеленого флуоресцентного белка после замораживания и размораживания.

Дифференцировка трансдуцированных сателлитных клеток в зрелые миотрубки и оценка их функциональных свойств. Сателлитные клетки не проявляют многих свойств терминально-дифференцированных мышечных клеток, не имеют развитого саркомера и Т-системы, вследствие чего не обладают свойственной зрелым мышечным клеткам сократимостью. Нами впервые была предпринята попытка миогенной дифференцировки трансдуцированных сателлитных клеток. Уже через 12 ч культивирования в дифференцировочной среде с низким содержанием сыворотки наблюдали активное слияние сателлитных клеток и формирование миотрубок, которые являются переходной стадией между пролиферирующими миобластами и терминально-дифференцированными миофибриллами в системе *in vitro* (Mancini et al., 2011; Abmayr, Pavlath, 2012). Полученные миотрубки по морфологическим и функциональным характеристикам были сходны со зрелыми мышечным волокнами, имели признаки саркомерной структуры в виде поперечной исчерченности и экспрессировали тяжелые цепи миозина — белка, характерного для терминально дифференцированных скелетно-мышечных клеток (рис. 4).

Для анализа функциональной активности оценивали способность сформированных миотрубок к сокращению в ответ на стимуляцию электрическим током. Дифференцированные миотрубки были способны к сокращению, а также отвечали на приложенную электрическую стимуляцию выбросом кальция из саркоплазматического ретикулума, что свидетельствовало о развитой системе дигидропиридиновых и рианодиновых рецепторов, характерной для терминально дифференцированных миофибрилл. Анализ кальциевых осцилляций доказал способность

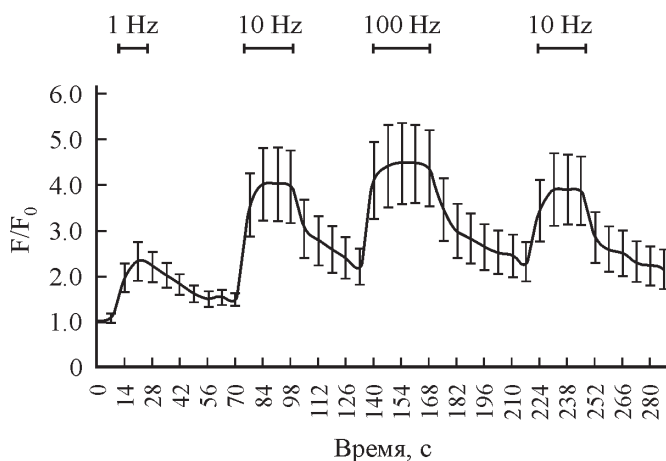


Рис. 5. Динамика кальциевых осцилляций в саркоплазме миотрубок под действием электрического тока.

F_0 и F — средние значения интенсивности флуоресценции fлюо-3 (пиксели) в саркоплазме до начала стимуляции и в процессе стимуляции соответственно. Данные представлены в виде средних значений и их ошибок.

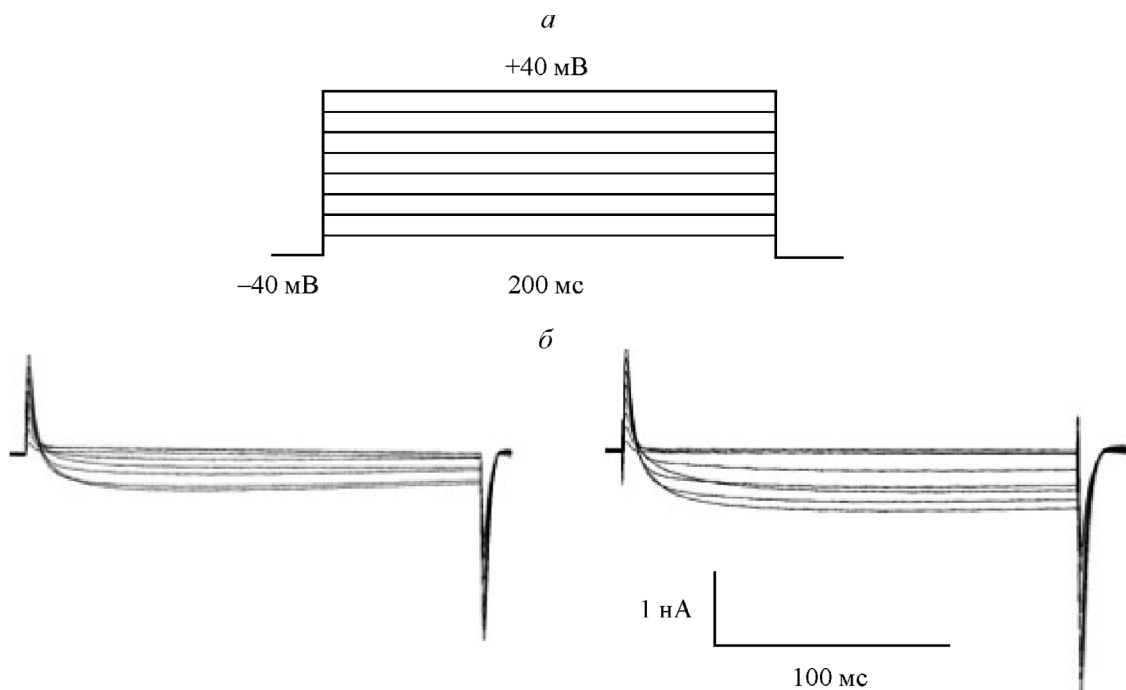


Рис. 6. Пример записи кальциевого тока в дифференцированной из миобластов миотрубке (а) и в выделенной миофибрилле (б). Ток вызван серией деполяризационных импульсов от -30 до 40 мВ с шагом 10 мВ длительностью до 200 мс.

сформированных миотрубок не только выбрасывать кальций в ответ на воздействие, но и транспортировать его обратно в саркоплазматический ретикулум при прекращении воздействия (рис. 5). Метод пэтч-кламп в конфигурации whole-cell подтвердил наличие потенциалзависимых каналов L-типа в сформированных миотрубках (рис. 6). Эксперименты показали присутствие в миотрубках тока входящего направления, соответствующего при данных условиях эксперимента кальциевому току, похожего по характеристикам на кальциевый ток L-типа. При подаче деполяризационных импульсов визуально наблюдали сокращения записываемых клеток. Зарегистрированный для миотрубок кальциевый ток по своим характеристикам сходен с кальциевым током, записанным для интактных миофибрилл, что также говорит в пользу функциональной зрелости миотрубок. Таким образом, по морфологическим и физиологическим характеристикам миотрубки, полученные из дифференцированных сателлитных клеток, являются достаточно зрелыми, сходными по многим функциональным свойствам с терминально дифференцированными миофибриллами.

В настоящей работе были проанализированы возможности использования различных первичных клеточных культур (ММСК человека, зрелые миофибриллы и сателлитные клетки скелетной мускулатуры мыши) в целях создания функциональных моделей исследования мышечной ткани *in vitro*. Мы показали, что дифференцировочный потенциал ММСК в мышечном направлении очень мал. ММСК начинали экспрессировать десмин — маркер зрелых мышечных клеток — только при сокультивировании с C2C12, что подтверждает роль микроокружения в определении клеточной судьбы (Yin et al., 2013). Кроме того, в этих же условиях они были способны к формированию миотрубок — как состоящих только из ММСК, так и химерных миотрубок, включающих в себя ядра ММСК

и ядра клеток линии C2C12. Однако доля положительно-дифференцированных клеток была очень мала и могла быть лишь незначительно увеличена путем культивирования клеток в условиях гипоксии. Проведенные исследования выявили крайне ограниченную способность дифференцированных миофибрилл подвергаться генетической модификации посредством лентивирусной трансдукции.

Наиболее перспективными клетками для создания эффективной модели мышечной ткани *in vitro* оказались сателлитные клетки, которые могут быть просто изолированы и длительное время находиться в культуре, а также эффективно подвергаться генетической модификации при помощи лентивирусов. Сателлитные клетки легко поддаются дифференцировке, терминальным этапом которой являются миотрубки. Функциональный анализ сформированных миотрубок показал их способность отвечать на электрическую стимуляцию выбросом кальция и сокращением, что свидетельствует о развитой системе риадиноновых и дигидропиридиновых рецепторов и подтверждает схожесть сигнальных путей, реализуемых в миотрубках и миофибриллах. Таким образом, сателлитные клетки являются наиболее информативной и перспективной клеточной моделью с точки зрения анализа молекулярных процессов, происходящих в клетках мышечной ткани в норме и при развитии патологического процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007—2013 гг.» (ГК № 11.519.11.2018) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры современной России» (ГК П1062, соглашения № 8105, 8786 и 8809).

Список литературы

- Малашичева А. Б., Канцлер Б., Толкунова Е. Н., Тронно Д., Томилин А. Н. 2008. Применение лентивирусов для тканеспецифичных генетических манипуляций. Цитология. 50 (4): 370—375. (Malashicheva A.B., Kanzler B., Tolkunova E. N., Trono D., Tomilin A. N. 2008. The application of lentiviral vectors for tissue-specific gene manipulations. Tsitologiya. 50 (4): 370—375.)
- Abmayr S. M., Pavlath G. K. 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. Development. 139: 641—656.
- Bachrach E., Li S., Perez A. L., Schienda J., Liadaki K., Volinski J., Flint A., Chamberlain J., Kunkel L. M. 2004. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101: 3581—3586.
- Biressi S., Molinaro M., Cossu G. 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. Develop. Biol. 308: 281—293.
- Burattini S., Ferri P., Battistelli M., Curci R., Luchetti F., Falciari E. 2004. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. Eur. J. Histochem. 48: 223—233.
- Day K., Shefer G., Richardson J. B., Enikolopov G., Yablonka-Reuveni Z. 2007. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. Develop. Biol. 304: 246—259.
- Di Rocco G., Iachininoto M. G., Tritarelli A., Straino S., Zacheo A., Germani A., Crea F., Capogrossi M.C. 2006. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. J. Cell Sci. 119: 2945—2952.
- Dmitrieva R. I., Minullina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Anisimov S. V., Zaritskey A. Y. 2012. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. Cell Cycle. 11: 377—383.
- Hawke T. J., Garry D. J. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J. Appl. Physiol. 91: 534—551.
- Ilkovski B., Clement S., Sewry C., North K. N., Cooper S. T. 2005. Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. Neuromuscul. Disord. 15: 829—835.
- Keire P., Shearer A., Shefer G., Yablonka-Reuveni Z. 2013. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. Methods Mol. Biol. 946: 431—468.
- Konigsberg I. R. 1963. Clonal analysis of myogenesis. Science. 140: 1273—1284.
- Lash G. E., Otun H. A., Innes B. A., Bulmer J. N., Searle R. F. et al. 2006. Low oxygen concentrations inhibit trophoblast cell invasion from early gestation placental explants via alterations in levels of the urokinase plasminogen activator system. Biol. Reprod. 74: 403—409.
- Lee J. H., Kemp D. M. 2006. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 341: 882—888.
- Li S., Kimura E., Fall B. M., Reyes M., Angello J. C., Welikson R., Hauschka S. D., Chamberlain J. S. 2005. Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. Gene Ther. 12: 1099—1108.
- Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. 2007. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. Genesis. 45: 456—459.
- Mancini A., Sirabella D., Zhang W., Yamazaki H., Shirao T., Krauss R. S. 2011. Regulation of myotube formation by the actin-binding factor drebrin. Skelet Muscle. 1: 36.
- Mauro A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 493—495.
- Mizuno H., Zuk P. A., Zhu M., Lorenz H. P., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoprecipitate cells. Plast Reconstr. Surg. 109: 199—209.
- Musarò A., Barberi L. 2010. Isolation and culture of mouse satellite cells. Methods Mol. Biol. 633: 101—111.
- Nabel E. G. 1995. Gene therapy for cardiovascular disease. Circulation. 91: 541—548.
- Pasut A., Jones A. E., Rudnicki M. A. 2013. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. J. Vis. Exp. 73: e50074.
- Ravenscroft G., Nowak K. J., Jackaman C., Clement S., Lyons M. A., Gallagher S., Bakker A. J., Laing N.G. 2007. Dissociated flexor digitorum brevis myofiber culture system — a more mature muscle culture system. Cell Motil. Cytoskeleton. 64: 727—738.
- Rodriguez A. M., Pisani D., Dechesne C. A., Turc-Carel C., Kurzenne J. Y., Wdziekonski B., Villageois A., Bagnis C., Breitmayer J. P., Groux H., Ailhaud G., Christian C. 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. J. Exp. Med. 201:1397—1405.
- Saito T., Dennis J. E., Lennon D. P., Young R. G., Caplan A. I. 1995. Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice *in vitro* and *in vivo*. Tissue Eng. 1: 327—343.
- Shefer G., Yablonka-Reuveni Z. 2005. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. Methods Mol. Biol. 290: 281—304.
- Snow M. H. 1977. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. Anat. Rec. 188: 201—217.
- Snyder R. O., Spratt S. K., Lagarde C., Bohl D., Kaspar B., Sloan B., Cohen L.K., Danos O. 1997. Efficient and stable adenovirus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. Hum. Gene Ther. 8: 1891—1900.
- Strem B. M., Hicok K. C., Zhu M., Wulur I., Alfonso Z., Schreiber R. E., Fraser J. K., Hedrick M. H. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J. Med. 54: 132—141.
- Torsney E., Charlton R., Parums D., Collis M., Arthur H. M. 2002. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing *in vivo*. Inflamm. Res. 51: 464—470.
- Wakitani S., Saito T., Caplan A. I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve. 18: 1417—1426.
- Yablonka-Reuveni Z., Day K., Vine A., Shefer G. 2008. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. J. Anim. Sci. 86 (14 Suppl.): E207—E216.
- Yaffe D. 1969. Cellular aspects of muscle differentiation *in vitro*. Curr. Top. Develop. Biol. 4: 37—77.
- Yin H., Price F., Rudnicki M. A. 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. Physiol. Rev. 93: 23—67.
- Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol. Biol. Cell. 13: 4279—4295.
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7: 211—228.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF DIFFERENT APPROACHES FOR OBTAINING
TERMINALLY DIFFERENTIATED MUSCLE CELLS

N. A. Smolina, A. Ya. Davidova, I. A. Schukina, A. V. Karpushev, A. B. Malashicheva,
R. I. Dmitrieva, A. A. Kostareva¹

V. A. Almazov Federal Heart, Blood, and Endocrinology Centre, St. Petersburg;
¹ e-mail: kostareva_aa@almazovcentre.ru

Relevant cell model is essential to study pathogenesis of muscle disorders. However, in the field of muscle research there is no ultimate cell line considered as a standard for studying muscular and neuromuscular diseases. Standard cell line claimed to be well differentiated in muscle lineage, be morphological and physiological similar to mature muscle cells and be easily genetically modified. Therefore, the goal of our study was to pick up available and fruitful cell model of muscle differentiation, that could be further applied for examination of muscular disorder pathogenesis *in vitro*. We characterized human mesenchymal stem cells (MSC), mature murine muscle fibers and primary murine satellite cells. It has been shown that MSC have very small capacity to myogenic differentiation; moreover, they were able to differentiate only in presence of C2C12 cells. Lentiviral transduction exhibited rather high toxic effect on primary myofibers, and positively transduced cells were not able to response to electrical stimulation, i. e. were functionally inactive. Satellite cells turned out to be the most fruitful cell model since they were easily transduced via lentiviruses and rapidly formed myotubes in differentiation media. Functional analysis of obtained myotubes has confirmed their ability to react to electrical and chemical stimulations; besides, potassium and calcium channels availability has been also demonstrated via patch-clump technique. Taken together, these results imply that satellite cells are the most promising cell line for further experiments aimed at exploring the molecular pathways of muscle pathologies.

Key words: muscle cells, satellite cells, mesenchymal stem cells, myofibrils.