



## Получение культуры клеток из скелетной мускулатуры крысы для применения в клеточной терапии ишемических поражений сердца

Чепелева Е.В.<sup>1,3</sup>, Павлова С.В.<sup>1,2,3</sup>, Малахова А.А.<sup>1,2,3</sup>, Покушалов Е.А.<sup>1</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 10

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 8 сентября 2015 г. Принята к печати 17 ноября 2015 г.

При лечении ишемической болезни сердца, в дополнение к хирургическим и медикаментозным методам, активно используют клеточную терапию. Изучают различные типы клеток организма (эмбриональные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, региональные стволовые клетки сердца и др.), а также сравнивают условия их получения, культивирования и доставки в организм для выбора оптимальной стратегии лечения полученными клетками. В качестве возможного материала для трансплантации при терапии ишемической болезни сердца также рассматривают миобласты скелетных мышц – клетки-предшественники миоцитов. Преимущества этих клеток – простота получения от донора, а также способность к дифференцировке в сократительные клетки, что может привести к улучшению сократительной функции сердца при трансплантации в перинфарктную ткань. В исследовании рассматривается протокол получения культур клеток из скелетных мышц крысы и оценивается возможность их дифференцировки в кардиомиогенном направлении. Также в работе изучается влияние типа культуральной поверхности на фенотип полученных клеток.

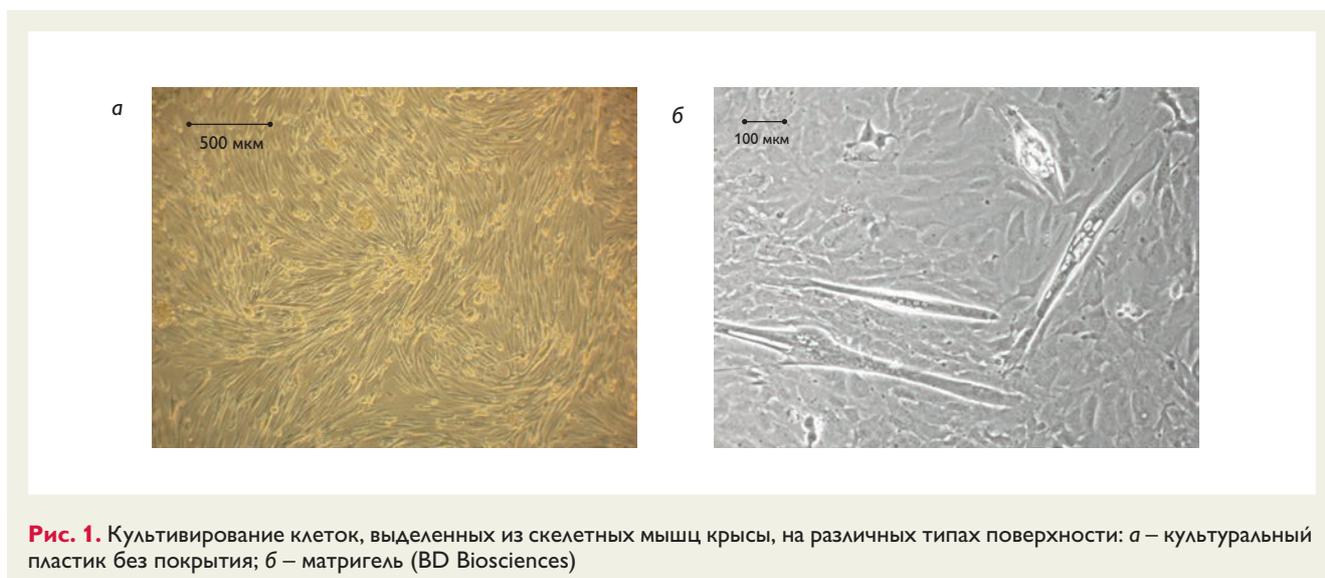
### Ключевые слова

Миобласты скелетных мышц • Культура клеток • Клеточная терапия

Сердечно-сосудистые заболевания, в частности инфаркт миокарда, – основная причина смертности и потери трудоспособности среди взрослого населения [1]. Развитие хирургических и фармакологических методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний привело к увеличению выживаемости пациентов после инфаркта, однако остается высоким риск постинфарктных осложнений и ухудшения уровня жизни [2]. После перенесенного инфаркта миокарда активируются локальные компенсаторные механизмы в сердце, снижается уровень метаболизма в миокарде, что приводит к сердечной недостаточности и, возможно, внезапной смерти [3]. Своевременное проведение реперфузии, тромболитической терапии замедляет неблагоприятное развитие ремоделирования сердца [4].

Аортокоронарное шунтирование и ангиопластика со стентированием коронарных артерий – общепризнанные методы реваскуляризации. Однако, по данным зарубежных авторов, приблизительно в 25% случаев их применение ограничено вследствие малого диаметра сосудов, диффузного и/или дистального поражения коронарного русла [5].

Перспективы восстановления функции утраченной ткани миокарда открывают методы клеточной терапии: имплантация стволовых клеток или их производных непосредственно в сердце или активация эндогенных механизмов репарации сердца, чтобы заменить поврежденные кардиомиоциты и способствовать ангиогенезу в участке поражения [6]. Для клеточной терапии ишемической болезни сердца изучают возможность



**Рис. 1.** Культивирование клеток, выделенных из скелетных мышц крысы, на различных типах поверхности: а – культуральный пластик без покрытия; б – матригель (BD Biosciences)

применения различных типов стволовых клеток, включая эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, стволовые клетки костного мозга, а также региональные стволовые клетки сердца.

Миобласты скелетных мышц происходят из клеток-сателлитов мышечной ткани и являются клетками-предшественниками миоцитов. Преимущества этих клеток в простоте получения непосредственно от пациента, а также способности к дифференцировке в сократительные клетки [7]. В ранних неконтролируемых клинических исследованиях сообщали, что имплантированные скелетные миобласты приживлялись в сердце, в дальнейшем у пациентов отмечалось улучшение показателей сердечной деятельности [8]. Однако эти результаты не воспроизводились в последующем рандомизированном контролируемом исследовании с участием 97 пациентов с тяжелой дисфункцией левого желудочка, которым выполняли транспикардальную имплантацию аутологичных скелетных миобластов во время коронарного шунтирования. Через 6 мес. после операции у пациентов, получивших лечение клетками, не было отмечено различий функционального состояния левого желудочка по сравнению с контрольной группой, однако возросла частота желудочковой тахикардии, что привело к досрочному завершению исследования [9]. Аналогичные результаты получены в клиническом исследовании SEISMIC, где использовали трансэндокардальную трансплантацию скелетных миобластов. Через четыре года после процедуры не было

отмечено различий в функции левого желудочка между опытной и контрольной группами пациентов [10]. Считается, что трансплантированные скелетные миобласты не способны обеспечить полноценную электрическую проводимость в сердце донора [11].

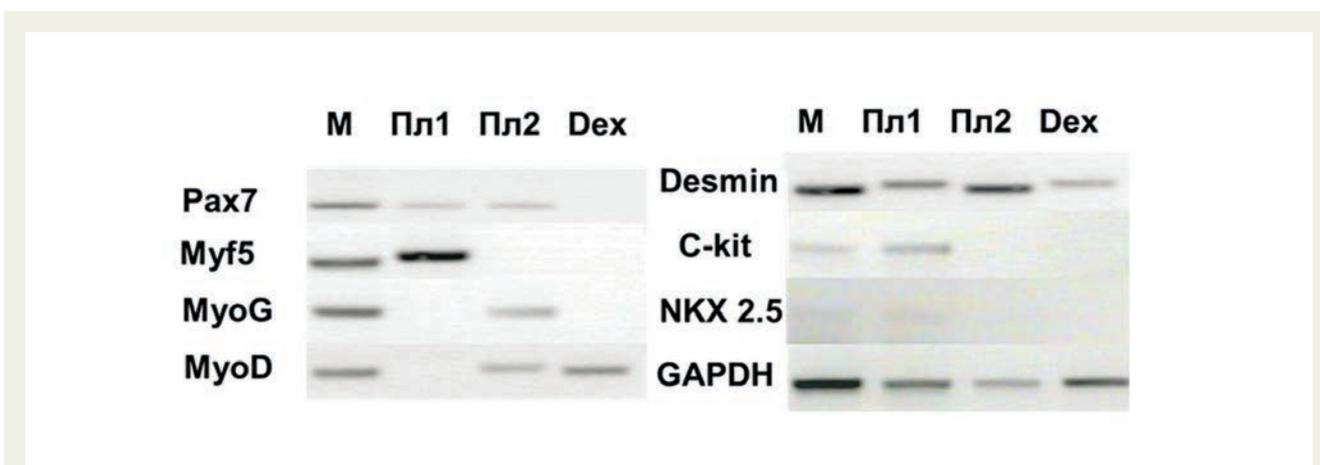
Исходя из этих данных мы предположили, что для использования клеток, полученных из скелетной мышцы, в терапии ишемической болезни сердца необходимо предварительно попытаться стимулировать их к дифференцировке в кардиомиогенном направлении.

## Материал и методы

### Получение и культивирование клеток скелетной мускулатуры крысы

Культуры клеток получали из бедренных мышц взрослых крыс линии WAG. Изолированную мышечную ткань измельчали и помещали в 0,2% раствор коллагеназы NB4 (Serva) в течение 30 мин при 37 °С. Часть полученных клеток высаживали на культуральный пластик без подложки в ростовой среде DMEM/F12 (Invitrogen) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (foetal bovine serum, FBS; Autogene Bioclear), 100 Ед/мл пеницилина (Gibco), 100 Ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen). Смену среды проводили каждые трое суток. Для неспецифической дифференцировки полученной культуры проводили инкубацию с дексаметазоном ( $10^{-8}$  М) в течение 10 дней.

Оставшиеся клетки полученной первичной культуры высаживали на культуральный пластик в слое матриге-



**Рис. 2.** Анализ экспрессии генов в клетках культур, полученных из скелетных мышц крысы, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. М – культура клеток из скелетной мышцы крысы на матрикеле с ростовыми факторами; Pl1 – культура клеток из скелетной мышцы крысы на культуральном пластике (прикрепленные клетки); Pl2 – культура клеток из скелетной мышцы крысы на культуральном пластике (плавающие клетки); Dex – культура клеток из скелетной мышцы крысы на культуральном пластике в присутствии дексаметазона в течение 10 дней

ля с пониженным содержанием ростовых факторов (BD Biosciences). Матригель предварительно заливали в культуральные флаконы из расчета 50 мкл/см<sup>2</sup> и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Для культивирования использовали среду DMEM/F12 (Invitrogen) с добавлением 10% FBS (Autogene Bioclear), 100 Ед/мл пеницилина (Gibco), 100 Ед/мл стрептомицина (Gibco), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen). Смену среды проводили каждые трое суток.

### Выделение РНК и синтез кДНК

РНК выделяли из культур клеток с помощью TRI Reagent (Sigma) согласно инструкции производителя. Для очистки образцов РНК от контаминации ДНК использовали набор реагентов TURBO DNA-free (Ambion). Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы М-MLV (Promega).

### Анализ культур методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Biometra TRIO-Thermoblock по стандартному протоколу. Полученные фрагменты ДНК анализировали методом гель-электрофореза.

Праймеры, использованные для анализа транскрипции генов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР): GAPDH (5'-TGTTG-CCATC-AATGA-CCCCT-T-3', 3'-CTCCA-CGACG-TACTC-AGCG-3'), c-kit (5'-GGCCT-AGCCA-GAGAC-

ATCA -3', 3'-GAGAG-GCTGT-GTGG-AGAGG -3'), Nkx 2.5 (5'-CAGTG-GAGCT-GGACA-AAGCC -3', 3'-TAGCG-ACGGT-TCTGG-AACCA -3'), desmin (5'-TGGAG-CGTGA-CAACC-TGATA-3', 3'-CTGGA-CCTGC-TGTTCTGA-3'), Pax7 (5'-GAAAG-CCAAA-CACAG-CATCG-A-3', 3'-ACCCT-GATGC-ATGGT-TGATG-G-3'), Myf5 (5'-GGTGG-AGATC-CTCAG-GAATG-3', 3'-GGTTG-CTCTG-AGGAG-GTGAT-3'), MyoG (5'-CTACA-GGCCT-TGCTC-AGCTC-3', 3'-ACGAT-GGACG-TAAGG-GAGTG-3'), MyoD (5'-ACTAC-AGCGG-CGACT-CAGAC-3', 3'-GTGGA-GATGC-GCTCC-ACTAT-3') [12, 13].

### Результаты

При культивировании клеток, полученных после обработки коллагеназой участков скелетной мускулатуры, на пластике без подложки (рис. 1, а) в течение 48 ч получили 2 популяции клеток, которые отличались по морфологии и адгезивным свойствам. Одни клетки имели округлую или овальную форму с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, росли группами во взвешенном состоянии, не прикрепляясь к поверхности культурального пластика, другие – росли в монослое, имели вытянутую форму и отростки. Плавающие клетки собирались и культивировались с дексаметазоном (10<sup>-8</sup> М) в течение 10 дней отдельно от прикрепленных клеток.

При культивировании клеток, полученных после обработки коллагеназой участков скелетной мускулатуры

в слое матригеля (экстракт базальной мембраны), отмечена тенденция к слиянию отдельных миобластов в волокна, и на третьи сутки в культуре наблюдали ритмичные сокращения слившихся клеток (рис. 1, б). Через 10–12 дней культивирования из части полученных клеток исследуемых культур ( $10^6$  клеток) выделяли РНК и проводили сравнительный анализ методом ОТ-ПЦР (рис. 2).

С помощью ОТ-ПЦР-анализа показано, что культуры клеток отличаются наличием мРНК транскрипционных факторов, характерных для ранних стадий миогенной и кардиогенной дифференцировки.

## Обсуждение

Первичная культура, полученная при ферментативном гидролизе скелетной мышцы, гетерогенна по составу и содержит сателлитные клетки, миобласты и мышечные клетки на разных стадиях дифференцировки. При культивировании клетки делились на две группы в зависимости от адгезивных свойств (плавающие в суспензии и прикрепленные к субстрату клетки). Плавающие клетки по морфологии схожи с клетками-сателлитами, прикрепленные – с одноядерными миобластами.

Различия в клеточном составе полученных культур также показаны с помощью анализа экспрессии маркеров мышечных клеток, находящихся на различных стадиях дифференцировки. В обеих культурах присутствовал транскрипционный фактор Pax7, который экспрессируется в покоящихся и активированных сателлитных клетках скелетной мышцы. Этот фактор отвечает за их самообновление и поддержание популяции в мышечной ткани на всех стадиях развития [14]. Транскрипционные факторы миогенеза MyoD и MyoG выявлены в популяции плавающих клеток, фактор Myf5 – в прикрепленных. Известно, что MyoD активирует дифференцировку клеток-сателлитов в миобласты, а MyoG – терминальную дифференцировку миобластов и их слияние с образованием миофибрилл. Myf5 необходим для пролиферации миобластов и поддержания их способности к дифференцировке [14]. На основании этих данных мы сделали вывод, что популяция плавающих клеток была обогащена сателлитными клетками мышечной ткани, а также содержала миобласты, способные к дальнейшей дифференцировке. Популяция прикрепленных клеток состояла из сформировавшихся миобластов, дифференцирующихся в миогенном направлении.

Для проведения неспецифической дифференциации клеток с помощью дексаметазона выбрали популяцию плавающих клеток, так как в ней присутствовало значительное число клеток-сателлитов (стволовых клеток скелетной мышцы). После 10 дней культивирования в присутствии дексаметазона ОТ-ПЦР-анализ показал, что в культуре исчезают факторы Pax7 и MyoG, но сохраняется фактор MyoD. Из этого можно сделать вывод, что в присутствии дексаметазона в культуре клеток происходит дифференцировка клеток-сателлитов в миобласты, но в то же время исчезает способность к поддержанию самообновляющейся популяции.

При ОТ-ПЦР-анализе клеток, культивировавшихся в слое матригеля, показано наличие факторов Pax7, MyoD, MyoG и Myf5. Таким образом, мы получили культуру клеток, содержащую сателлитные клетки, миобласты и зрелые миофибриллы, обладающие сократительной активностью.

Во всех исследуемых культурах присутствовал десмин – цитоплазматический белок, который начинает экспрессироваться в мышечных клетках на ранних стадиях развития и сохраняется в дальнейшем. Анализ всех полученных культур на присутствие в них маркеров, характерных для кардиальной дифференцировки, показал, что в клетках, которые росли в прикрепленном состоянии, и в клетках, выросших в слое матригеля, присутствуют кардиальный транскрипционный фактор NKX 2.5 и маркер кардиальных и гемопоэтических стволовых клеток c-kit. Можно предположить, что в культурах, полученных из скелетной мышцы, присутствует небольшая часть клеток, способная к дифференцировке в кардиальном направлении, однако для обогащения культур этими клетками требуются дополнительные методы, например предварительная сортировка первичной культуры на маркеры региональных стволовых клеток.

Популяции клеток, выделенные из эксплантов скелетной мышцы крысы, при различных условиях культивирования отличаются клеточным составом, адгезивными свойствами, экспрессией факторов миогенеза и темпами дифференцировки. Полученные результаты подходят для оптимизации условий получения культур клеток скелетно-мышечного происхождения, которые можно использовать в терапии ишемической болезни сердца.

*Работа поддержана бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН VI.60.1.2.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## Список литературы

- Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M. et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*. 2011. Vol. 123. № 4. P. e18–e209.
- Rosamond W.D., Chambless L.E., Heiss G., et al. Mosley T.H., Coresh J., Whitsel E., Wagenknecht L., Ni H., Folsom A.R. Twenty-Two Year Trends in Incidence of Myocardial Infarction, CHD Mortality, and Case-Fatality in Four US Communities, 1987 to 2008 // *Circulation*. 2012. Vol. 125. № 15. P. 1848–1857.
- Orn S., Manhenke C., Anand I.S., Squire I., Nagel E., Edvardson T., Dickstein K. Effect of Left Ventricular Scar Size, Location, and Transmurality on Left Ventricular Remodeling With Healed Myocardial Infarction // *Am. J. Cardiol*. 2007. Vol. 99. № 8. P. 1109–1114.
- White H.D., Aylward P.E., Huang Z. et al. Mortality and Morbidity Remain High Despite Captopril and/or Valsartan Therapy in Elderly Patients With Left Ventricular Systolic Dysfunction, Heart Failure, or Both After Acute Myocardial Infarction: Results From the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT) // *Circulation*. 2005. Vol. 112. № 22. P. 3391–3399.
- Чернявский А.М., Фомичев А.В., Чернявский М.А., Ларионов П.М., Бондарь В.Ю., Сергеевичев Д.С. Сравнительная характеристика эффективности методов непрямой реваскуляризации миокарда в хирургии ишемической болезни сердца // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2013. № 1. С. 15–20.
- Lafamme M.A., Murry C.E. Heart regeneration // *Nature*. 2011. Vol. 473. № 7347. P. 326–335. doi: 10.1038/nature10147.
- Taylor D.A., Atkins B.Z., Hungspreugs P., Jones T.R., Reedy M.C., Hutcherson K.A., Glower D.D., Kraus W.E. // *Nat. Med*. 1998. Vol. 4. № 8. P. 929–933.
- Menasché P., Haggè A.A., Vilquin J.T., Desnos M., Abergel E., Pouzet B., Bel A., Sarateanu S., Scorsin M., Schwartz K., Bruneval P., Benbunan M., Marolleau J.P., Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2003. Vol. 41. № 7. P. 1078–1083.
- Menasché P., Alfieri O., Janssens S., McKenna W., Reichenspurner H., Trinquart L., Vilquin J.T., Marolleau J.P., Seymour B., Larghero J., Lake S., Chatellier G., Solomon S., Desnos M., Haggè A.A. // *Circulation*. 2008. Vol. 117. № 9. P. 1189–1200.
- Veltman C.E., Soliman O.I., Geleijnse M.L., Vletter W.B., Smits P.C., ten Cate F.J., Jordaens L.J., Balk A.H., Serruys P.W., Boersma E., van Domburg R.T., van der Giessen W.J. Four-year follow-up of treatment with intramyocardial skeletal myoblasts injection in patients with ischaemic cardiomyopathy // *Eur. Heart J*. 2008. Vol. 29. № 11. P. 1386–1396.
- Leobon B., Garcin I., Menasche P., Vilquin J.T., Audinat E., Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. Vol. 100. № 13. P. 7808–7811.
- Conconi M.T., De Coppi P., Bellini S., Zara G., Sabatti M., Marzaro M., Zanon G.F., Gamba P.G., Parnigotto P.P., Nussdorfer G.G. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. № 15. P. 2567–2574.
- Tamaki T., Akatsuka A., Ando K., Nakamura Y., Matsuzawa H., Hotta T., Roy R.R., Edgerton V.R. // *J. Cell Biol*. 2002. Vol. 157. № 4. P. 571–577.
- Parker M.H., Seale P., Rudnicki M.A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis // *Nature Reviews Genetics*. 2003. Vol. 4. № 7. P. 497–507.

### Cell culture from rat skeletal muscles to be used for cellular therapy of ischemic heart disease

Chepeleva E.V.<sup>1,3</sup>, Pavlova S.V.<sup>1,2,3</sup>, Malakhova A.A.<sup>1,2,3</sup>, Pokushalov E.A.<sup>1</sup>, Zakiyan S.M.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, 15 Rechnunovskaya St., 630055 Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup> The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 8 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

\* Corresponding author. Email: e\_chepeleva@meshalkin.ru

When treating ischemic heart disease, surgery and drug therapy can be efficiently complemented with cellular therapy. At present, various cell types (embryonic stem cells, mesenchymal stem cells, regional cardiac stem cells, etc.) are studied and the conditions for their generation, cultivation and delivery to the organism are compared to choose the best possible strategy of cellular treatment. Skeletal muscle myoblasts, progenitor cells of myocytes are considered as a promising material for transplantation into peri-infarction tissue. The advantage of these cells lies in the fact that they are easy to be obtained from a donor and that they are capable of differentiating in contractile cells which can improve the myocardial contractile function when engineered in peri-infarction tissue. The study looks at a protocol of deriving cell cultures from rat skeletal muscles and their potential for cardiac myogenic differentiation. Also studied is the impact of a type of culture surface upon the derived cell phenotype.

**Key words:** skeletal muscle myoblasts; cell culture; cellular therapy

Received 8 September 2015. Accepted 17 November 2015.