

STANIČNA KULTURA HUMANIH MIOBLASTA – MODEL ZA ISTRAŽIVANJE METABOLIČKIH MIOPATIJA

MARIJA ZEKUŠIĆ¹, ŽELJKA MAJIĆ³, MARIO ČUK^{2,3}, KLARA DUBRAVČIĆ¹, KARMEN BILIĆ¹,
ANA ŠKARIČIĆ¹, KSENIJA FUMIĆ¹, IVO BARIĆ^{2,3}

Nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH; EC 1.1.3.3.) dokazan je dosad u devetero bolesnika. Iako je klinička slika varijabilna, svi bolesnici koji boluju od ove multisistemske bolesti od rođenja imaju miopatiju. Budući da je nejasno zašto je baš mišićno tkivo najviše pogođeno kod bolesnika s nedostatkom SAHH-a, od iznimne je važnosti uspostava kulture mioblasta kao modela za daljnje proučavanje patogeneze ove bolesti na razini metabolita, proteina i gena. Uz pomoć enzimске digestije mioblasti su izdvojeni iz bioptata skeletnog mišića te su uzgajani u sterilnim uvjetima u mediju s faktorima rasta. Pošto su postigli konfluenciju od 70-80%, mioblasti su tripsinizacijom podijeljeni u subkulture te je uspostavljena kultura humanih mioblasta. Uporabom magnetskoga staničnog separatora mioblasti su odvojeni od fibroblasta i pohranjeni u tekući dušik. Čistoća pročišćenih mioblasta potvrđena je metodom protočne citometrije s površinskim biljezima CD 56+ i CD 45-. Pročišćeni mioblasti diferencirani su u miotube (nezrela mišićna vlakna). Prikazan je optimizirani postupak uzgoja i pohrane pročišćenih humanih mioblasta in vitro.

Deskriptori: MIOBLASTI; TEHNIKE STANIČNE KULTURE – metode; MIOPATIJE, STRUKTURNE, KONGENITALNE

UVOD

Skeletni mišić sastoji se od mišićnih stanica (mioblasta). Aktivacija mioblasta nakon ozljede mišića ili mišićnih bolesti važan je korak u procesu regeneracije mišića. Tijekom regeneracije mišića mioblasti ulaze u proliferacijski proces, na kraju kojeg se većina mioblasta diferencira u miocite, koji se spoje u multinuklearni sincicij što sazrijeva u mišićna vlakna (1-3). Funkcionalna svojstva skeletnih mišića ovise o međusobnom odnosu mišićnih vlakana, motornih neurona, krvnih žila i vezivnog tkiva.

Stanične kulture mioblasta daju mogućnosti *in vitro* proučavanja brojnih svojstava mišićnih stanica, što je izrazito važno za razjašnjavanje brojnih prirodnih i stečenih bolesti mišića, za razumijevanje fizioloških zbivanja u mišiću i preduvjet za proučavanje brojnih lijekova koji mogu imati različita željena i neželjena djelovanja na mišić. Zato metoda koju ovdje opisujemo otvara i u Hrvatskoj mogućnost ovakvih istraživanja.

MATERIJALI I METODE

Uzorci mišića

Mioblasti su izolirani enzimskom digestijom iz bioptata skeletnog mišića bolesnika s nasljednom metaboličkom miopatijom (nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze, SAHH; EC 1.1.3.3.) (4-7) i iz kontrolnog uzorka mišića. Uzorci skeletnog mišića prikupljeni su u skladu s hrvatskim i europskim zakonima.

Prijenos primarnog bioptata do laboratorija

Uzorak mišića se odmah nakon biopsije u uvjetima kirurške asepse prenio u

prethodno pripremljene sterilne epruvete s proliferacijskim medijem. Temeljni medij je bio gotova komercijalna smjesa SGM („Promocell”) u koji se, neposredno prije kultivacije, dodalo još 5% faktora rasta. Taj dodatak su činili epidermalni faktor rasta, faktor rasta fibroblasta te inzulin. Na to se još dodalo 10% goveđeg seruma, 1,5% glutamina i antibiotici. Biopstat se zatim stavio u epruvetu s medijem, vodeći računa o sterilnosti, i žurno dostavio u laboratorij za staničnu kulturu, jer brzina i potencijal dijeljenja stanica s vremenom opadaju.

Primarna kultura mioblasta

Svi su se postupci stanične kultivacije izvodili u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Uzorak skeletnog mišića usitnio se enzimskom digestijom u mediju koji sadrži tripsin. Usitnjeni komadići prebacili su se u za to posebno dizajniranu staklenu tikvicu s magnetičem. Mioblasti su se izolirali iz bioptata uz laganu vrtnju na magnetskoj mješalici na +37°C, 15 minuta. Enzimska digestija prekida se dodatkom medija za ispiranje stanica. Postupak se ponavljao tri puta.

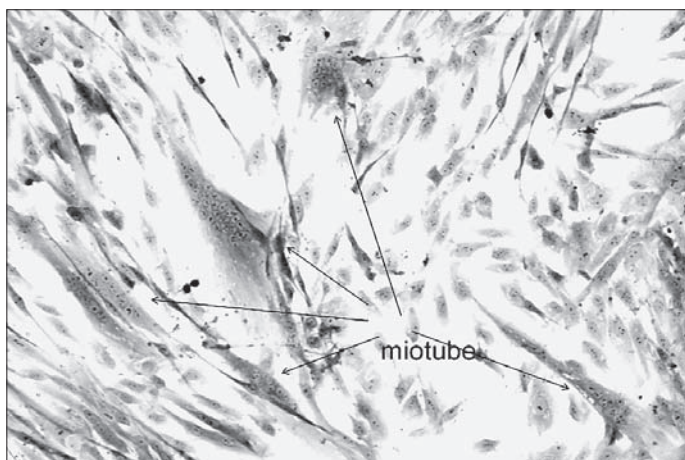
¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Zagreb

² Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb

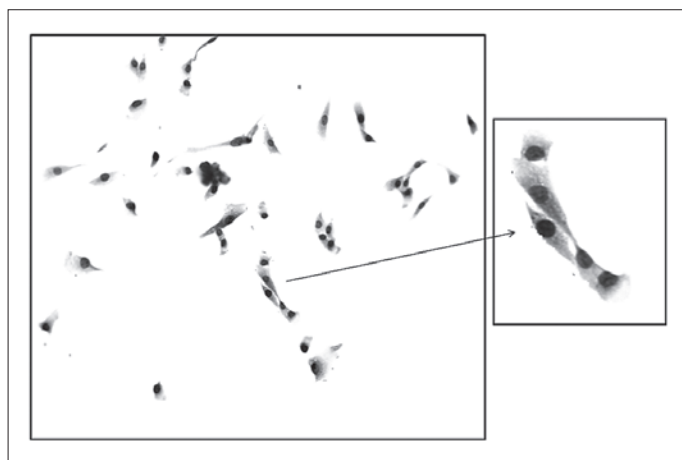
³ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Marija Zekušić, dipl. biolog, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, e-mail: zekusicm@yahoo.com



Slika 1. Prikaz nezrelih mišićnih vlakana u kulturi (uvećanje 400x)



Slika 2. Matične stanice mioblasta i fibroblasta izdvojene iz biopata skeletnog mišića (uvećanje 400x)

Ovako dobivene stanice mioblasta, uz manji dio fibroblasta, zasijale su se u kultivacijske bočice ili Petrijeve zdjelice u proliferacijskom mediju i pohranjene su u inkubator na $+37^{\circ}\text{C}$ s $5\% \text{ CO}_2$. Proliferacijski medij mijenjao se svaka tri dana. Nekoliko dana nakon zasijavanja primarne kulture mioblasta (tzv. nulte pasaže; $p=0$) na dnu kultivacijske posude vidjele su se pojedinačno izolirane ovalne stanice mišića (mioblasti). Za 7 do 10 dana ove stanice su se podijelile te su pokrivala 60-70% dna kultivacijske posude, stoga su bile spremne za presađivanje u sekundarne kulture (tzv. subkulture 1, 2, 3, 4 itd.). Tijekom kultivacije izgled i rast mioblasta pratio se pod invertnim mikroskopom s faznim kontrastom, kako bi se mioblasti pravodobno tripsinizirali i podijelili u nove kultivacijske bočice (subkulture).

Subkulture mioblasta

Skeletni mioblasti zasijani su u subkulture ravnomjerno u gustoći oko 1×10^6 po kulturi, $3-5 \times 10^4$ po cm^2 . Stanice su inkubirane u sterilnim uvjetima na $+37^{\circ}\text{C}$ u vlažnoj atmosferi s $5\% \text{ CO}_2$ u mediju SGM. Medij se mijenjao svaka tri dana. Pošto su stanice postigle konfluenciju oko 70-80%, matične stanice mišića su tripsinizirane s $0,25\% \text{ tripsin}/1\text{mM EDTA}$ i ovim je započeo postupak odvajanja mioblasta od prisutnih fibroblasta.

Izdvajanje mioblasta od fibroblasta

U ovom stadiju izolacije mioblasta bitno je izdvojiti što više mioblasta od zaostalih fibroblasta. Radi toga je potrebno najprije iskoristiti različite adherentne karakteristike ovih stanica u primarnoj kul-

turi, pri čemu fibroblasti prije adheriraju u odnosu na mioblaste. Tripsinizirane stanice inkubirane su 20 minuta na $+37^{\circ}\text{C}$ i $5\% \text{ CO}_2$. Nadalog je odmah nakon toga prebačen u drugu kultivacijsku bočicu. Zbog različite brzine adheriranja, većina fibroblasta spustila se na dno kultivacijske bočice, dok je u nadalogu zaostala većina mioblasta. Na taj se način subkultura može značajno obogatiti mioblastima (11).

Ovako „grubo“ pročišćeni mioblasti pogodni su za pročišćavanje upotrebom magnetskog separatora. Mioblasti se najprije obilježavaju specifičnim monoklonskim protutijelom (NCAM/CD56, Invitrogen) i IgG-mikrokuglicama. Zatim su se na magnetskom MiniMACS-separatoru (engl. *Magnetic-Activated Cell Sorting*) (Miltenyl Biotec, GmbH) razdvojili od fibroblasta (8-10).

Diferencijacija mioblasta u nezrela mišićna vlakna

Pročišćeni mioblasti mogu se odgo-varajuće zamrznuti i dugotrajno čuvati u tekućem dušiku. Tek ovako pročišćeni mioblasti rabljeni su za daljnje kultiviranje. Diferencijacija mioblasta provodila se kad su mioblasti postigli konfluenciju oko 50-60%. Proliferacijski medij zatim je zamijenjen diferencijacijskim medijem koji je sadržavao $2\% \text{ konjskog seruma}$. Nakon 4-6 dana u kulturi s diferencijacijskim medijem mogu se vidjeti stanice koje sadrže više jezgri, stvarajući tako nezrela mišićna vlakna (slike 1 i 4). Diferencijacija mioblasta u nezrela mišićna vlakna promatrana je mikroskopom s faznim kontrastom. Miogenski fuzijski indeks (engl. *Myogenic Fusion Index*, MFI)

može se odrediti kao broj jezgri u multinuklearnim nezrelim mišićnim vlaknima u odnosu na ukupan broj jezgri u vidnom polju (12).

REZULTATI

Opisanim postupcima uspostavljena je kultura matičnih stanica mioblasta i fibroblasta iz vrlo malog komadića biopata mišića od oko 5 mm^3 . Pod mikroskopom nije moguće u kulturi razlikovati ova dva tipa stanica (slika 2). Nisu uočene razlike u uspostavi kulture mioblasta između bolesnika s nasljednom metaboličkom miopatijom i kontrolnog uzorka, ako je početno zasijan isti broj stanica.

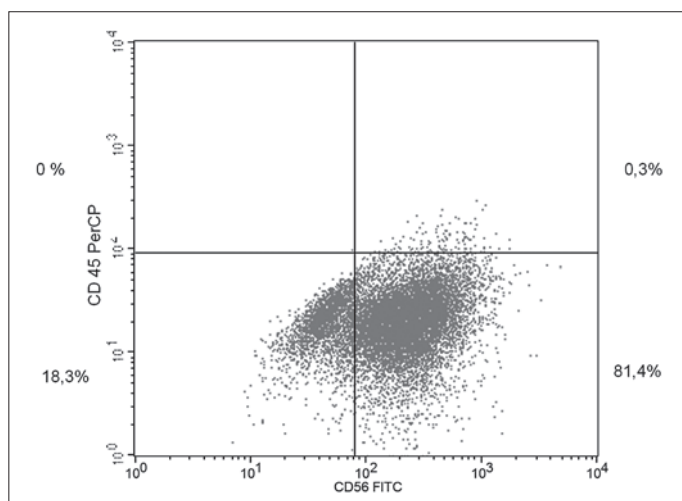
Uporabom magnetskog staničnog separatora mioblasti su odvojeni od fibroblasta i pohranjeni u tekući dušik. Zaleđeno je oko $1,5 \times 10^6$ mioblasta po ampuli. Vijabilnost mioblasta nakon zaleđivanja iznosila je oko 80%.

Čistoća pročišćenih mioblasta potvrđena je metodom protočne citometrije s biljezima CD 56+ i CD 45-, pritom je potvrđeno da 81,4% stanica nosi biljeg CD56+, odnosno da su mioblasti (slika 3).

Ovako pročišćeni mioblasti diferencirani su u nezrela mišićna vlakna (slike 1 i 4).

RASPRAVA

Svako mišićno vlakno okružuje tanki sloj vezivnog tkiva. Odatle prisutnost fibroblasta, stanica vezivnog tkiva u kulturi s mioblastima. Fibroblasti imaju proliferacijske sposobnosti mnogo veće u odnosu na sve druge stanice i često prerastu sve stanice u kulturi, čak i kad je inicijalno broj fibroblasta u kulturi vrlo mali



Slika 3. Metodom protočne citometrije potvrđeno je 81,4% mioblasta u kulturi



Slika 4. Prikaz nezrelih mišićnih vlakana u kulturi (uvećanje 1000x)

(11). U staničnoj kulturi nije moguće pod svjetlosnim mikroskopom razlikovati mioblaste od fibroblasta. Za njihovo razdvajanje potrebno je stanice obilježiti odgovarajućim protutijelima (13). Metoda razdvajanja koju smo mi primijenili u ovom radu pokazala je vrlo dobar stupanj pročišćenosti mioblasta (8, 11). Razvoj tehnika koje omogućuju praćenje pojedinih staničnih linija *in vitro* otvara mogućnosti za istraživački rad i stvaranje banke mioblasta različitih miopatija. Takav potencijal ima i ova metoda uzgoja mioblasta u kulturi, a može se primjenjivati kao buduća stanična terapija kardiomiopatija (14, 15).

Nedostatak SAHH-a, koji smo prvi put opisali prije devet godina, dokazan je dosad u devetero bolesnika (4-7). Iako je klinička slika varijabilna, svi bolesnici koji boluju od ove višeorganske bolesti od rođenja imaju miopatiju i značajno povišenu serumsku aktivnost enzima kreatin kinaze. Liječenje ima povoljan učinak na neke kliničke i biokemijske parametre, ali u mišićima izostaje pozitivan učinak ili je on mnogo manji. Budući da je nejasno zašto je baš mišićno tkivo pogođeno kod bolesnika s nedostatkom SAHH-a, uspostava kulture mioblasta od iznimne je važnosti za daljnje proučavanje patogeneze ove bolesti na razini gena, proteina i metabolita.

ZAKLJUČAK

Mogućnost uspostave i pohrane staničnih kultura mioblasta bolesnika s nedostatkom SAHH-a preduvjet je za daljnje proučavanje ove kongenitalne miopatije. To je ujedno i put koji otvara

mogućnosti za otkrivanje uzroka propadanja mišića i u drugim bolestima mišića i stanjima sa smanjenim metilacijskim indeksom.

Stanična kultura humanih mioblasta otvara nove mogućnosti u području rijetkih bolesti, prvenstveno miopatija i mitohondrijskih bolesti (16, 17). Ovaj biološki materijal omogućuje studije staničnih i molekularnih mehanizama koji mogu pridonijeti razumijevanju patofiziologije, otkrivanju novih biomarkera i ubrzanju razvoja novih terapijskih pristupa.

Autori izjavljuju da nisu bili u sukobu interesa.
Authors declare no conflict of interest.

Zahvala

Rad je izrađen u okviru IPA-projekta (engl. *Instrument for Pre-Accession assistance*): "Creation of research related infrastructure for Translational Medicine and Applied Genomics" financiranog od Europske unije. Ovaj rad poduprlo je i Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske kroz znanstveni projekt 0108-1081870-1885. Zahvaljujemo na suradnji dr. sc. Oliveru Vugreku, voditelju IPA-projekta na Institutu „Ruđer Bošković“ Zagreb te dr. sc. Ivani Tonković i dr. sc. Kristini Crkvenac iz Kabineta za prenatalnu dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

LITERATURA

1. Chargé Sophie BP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-38.
2. Asakura A, Rudnicki MA. Cellular and molecular mechanisms regulating skeletal muscle development. In: Rossant J, Tm PT. *Mouse Development*:

Patternning, Morphogenesis, and Organogenesis. 1st ed. Orlando, FL: Academic; 2002; 253-78.

3. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002;159:123-34.

4. Barić I, Fumić K, Glenn B, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:4234-9.

5. Ćuk M, Lovrić M, Fumić K, et al. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: Further evidence of congenital miopathy. *Clin Chem Lab Med*. 2007;5:A43.

6. Barić I, Ćuk M, Petković-Ramadža D, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency - a review of nine patients. *Mol Genet Metab*. 2012; 105:303.

7. Barić I, Ćuk M, Fumić K, et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inher Metab Dis*. 2005;6: 885-902.

8. Sinanan AC, Hunt NP, Lewis MP. Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell adhesion-molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;40:25-34.

9. Kitzmann M, Bonniet A, Duret C, et al. Inhibition of Notch signaling induces myotube hypertrophy by recruiting a subpopulation of reserve cells. *J Cell Physiol*. 2006;3:538-48.

10. Lequerica JL, Mirabet V, Montero JA, Hurtado C, Piquer S, Carbonell F. *In vitro* proliferation, differentiation and immuno-magnetic bead purification of human myoblasts. *Ann Transplant*. 1999; 4:103-96.

11. Yoon GP, Jae HM, Jin KA. Comparative study of magnetic-activated cell sorting, cytotoxicity and preplating for the purification of human myoblasts. *Yonsei Med J*. 2006;2:179-83.

12. Barro M, Carnac G, Flavier J, Mercier Y, Vasetsky Y, Laoudj-Chenivess D. Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. *J Cell Mol Med*. 2010;1-2:275-89.

13. Singer KH, Searce RM, Tuck DT, Whichard LP, Denning SM, Haynes BF. Removal of fibroblasts from human epithelial cell cultures with use of a complement fixing monoclonal antibody reactive with human fibroblasts and monocytes/macrophages. *J Invest Dermatol*. 1989;92:166-70.

14. Menasché P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. Prog Cardiovasc Dis. 2007;1:7-17.
15. Gulbins H, Meiser BM, Reichenspurner H, Reichart B. Cell transplantation--a potential therapy for cardiac repair in the future? Heart Surg Forum. 2002;4:E28-34.
16. Dumoulin R, Mandon G, Collombet JM, et al. Human cultured myoblasts: A model for the diagnosis of mitochondrial diseases. J Inher Metab Dis. 1993;3:545-7.
17. Nehlin JO, Just M, Rustan AC, Gaster M. Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism. Biogerontology. 2011;4:349-65.

Summary

HUMAN MYOBLAST CELL CULTURE - A MODEL FOR THE STUDY OF METABOLIC MYOPATHIES

M. Zekušić, Ž. Majić, M. Ćuk, K. Dubravčić, K. Bilić, A. Škaričić, K. Fumić, I. Barić

Insufficiency of S-adenosyl-homocysteine hydrolase (SAHH; EC 1.1.3.3.) has been confirmed in nine patients so far. Although clinical symptoms are variable, myopathy is present from the birth in all patients who are affected by this multisystem disease. It is unclear why muscle tissue is affected in patients with SAHH insufficiency; therefore establishment of myoblast cell culture as a model has great value and presents the first step towards understanding the pathogenesis of the disease at the metabolite, protein and gene levels. Myoblasts were isolated from biopsy of skeletal muscle by enzymatic digestion. Myoblasts were cultivated in sterile conditions in a medium with growth factors. After achieving confluence of 70%-80%, myoblasts were divided by trypsinization into subcultures. A culture of myoblasts was established and purified by using an immune-magnetic sorting system and then stored in liquid nitrogen. Purity of myoblasts was confirmed by flow cytometry method using CD56+ and CD45- surface markers. Pure myoblasts were differentiated into myotubes (immature muscle fibers). In this report, optimized procedure of isolation, cultivation, differentiation and storage of myoblasts in vitro is presented.

Descriptors: MYOBLASTS; CELL CULTURE TECHNIQUES – methods; MYOPATHIES, STRUCTURAL, CONGENITAL

Primljeno/Received: 9. 10. 2012.

Prihvaćeno/Accepted: 7. 12. 2012.