

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

УДК 57.085.23

А. Я. Давыдова, Н. А. Смолина, А. А. Костарева, Р. И. Дмитриева

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ
ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГЕНЕРАЦИИ И ДЕГЕНЕРАЦИИ
МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ *IN VITRO**

В данной работе мы сравнили экспериментальные модели, которые позволили бы исследовать молекулярные механизмы регенерации и дегенерации мышечной ткани *in vitro*. В работе были использованы три типа клеточных культур: коммерчески доступная линия мышечных миобластов C2C12, резидентные стволовые клетки мышечной ткани, клетки-сателлиты (СК) и резидентные фибро-адипогенные клетки-предшественники, происходящие из мезодермальной мезенхимы (ФАК). Все клеточные образцы были *Myf5*-позитивны, и уровень экспрессии *Myf5* в разных типах клеток существенно не различался. Как и ожидалось, стимуляция миогенной дифференцировки в C2C12 приводила к согласованным изменениям экспрессии ранних (*Myf5*, *MyoD*) и поздних (*Myogenin*, *Mrf4*) регуляторов миогенеза. По сравнению с C2C12, СК продемонстрировали более активную динамику роста экспрессии позднего маркера дифференцировки *Mrf4* и формирования миотрубок. Стимуляция миогенеза в ФАК не вызвала роста экспрессии регуляторов миогенеза и не сопровождалась формированием миотрубок; наоборот, стимуляция адипогенеза в ФАК сопровождалась выраженным ростом экспрессии адипомаркеров (*PPAR γ* , *Fabp4*, *Pgc1a*) и активным формированием адипоцитов. Стимуляция адипогенеза в СК вызвала увеличение экспрессии как маркеров адипогенеза, так и миогенеза. Формирования адипоцитов не происходило, напротив, наблюдалось активное формирование миотрубок, позитивных по маркеру МНС. Мы предполагаем, что эти эффекты были обусловлены межклеточными взаимодействиями и регуляторные механизмы включают в себя активацию *PPAR γ /Pgc1a* комплекса. Таким образом, было показано, что C2C12 являются удобной моделью для изучения динамики дифференцировки. Первичные клеточные культуры, обогащенные СК, могут быть хорошей и относительно простой клеточной моделью для исследования межклеточных взаимодействий, ответа мышечной ткани на молекулярном и клеточном уровнях на различные физиологические и фармакологические вмешательства, а также для моделирования *in vitro* патологий, которые сопровождаются нарушениями регенерации скелетной мускулатуры. Библиогр. 21 назв. Ил. 6. Табл. 1.

Ключевые слова: миогенная дифференцировка, адипогенная дифференцировка, сателлитные клетки, фибро-адипогенные прекурсоры мышечной ткани, линия миобластов мыши C2C12, *PPAR γ* , *Fabp4*, *Pgc1a*, *Myf5*, *MyoD*, *Mrf4*, *Myogenin*.

А. Я. Давыдова: ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова», Российская Федерация, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2; Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; Н. А. Смолина, А. А. Костарева, Р. И. Дмитриева (renata.i.dmitrieva@gmail.com): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

* Работа была выполнена при поддержке РФФ, соглашение № 14-15-00745

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF MOUSE CELL CULTURE MODELS TO STUDY MECHANISMS OF MUSCLE REGENERATION AND DEGENERATION *IN VITRO*

A. Ya. Davydova^{1,2}, N. A. Smolina², A. A. Kostareva², R. I. Dmitrieva²

¹ Almazov Federal Medical Research Centre, 2, ul. Accuratova, St. Petersburg, 197341, Russian Federation

² St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; renata.i.dmitrieva@gmail.com

In present work we compare different experimental models that would allow to investigate the molecular mechanisms of muscle tissue regeneration and degeneration *in vitro*. Three types of cell cultures were tested: commercially available murine myoblasts line C2C12, and primary murine muscle cells, s+atellite cells (SC) and mesenchymal fibro-adipogenic precursors (FAP). All cells were *Myf5*+ with similar levels of *Myf5* expression. As expected, stimulation of myogenic differentiation in C2C12 resulted in consistent changes in expression of early (*Myf5*, *MyoD*) and late (*Myogenin*, *Mrf4*) regulators of myogenesis. As compared to C2C12, SC demonstrated increased dynamics of both, myotubes formation, and *Mrf4* expression. In FAP myogenic stimulation did not affect the level of regulators of myogenesis, while spontaneous adipocyte formation was detected; conversely, an increase in adipomarkers expression (*PPARg*, *Fabp4*, *Pgc1a*), and a massive adipocytes formation occurred in FAP after stimulation of adipogenesis. Surprisingly, in SC adipogenic cocktail caused significant increase in expression of both adipo- and myo- regulators, however, the massive adipogenesis was not observed. Instead, active formation of MHC-positive myotubes was detected.

Thus, our results indicate that C2C12 demonstrate better time course and reciprocal regulation of early and late regulators of myogenesis, while SC show better dynamics of myogenesis *in vitro*. Moreover, we assume that SC-FAP interactions could play an important role in regulation of muscle regeneration/ degeneration, and a SC/FAP dynamic culture system could be a good and relatively simple *in vitro* model to perform “proof of principle” experiments investigating how muscle tissue responds at molecular and cellular levels to different physiological and pharmacological interventions. Refs 21. Figs 6. Tables 1.

Keywords: myogenic differentiation, adipogenic differentiation, murine myoblasts line C2C12, satellite cells, mesenchymal fibro-adipogenic precursors, *PPARg*, *Fabp4*, *Pgc1a*, *Myf5*, *MyoD*, *Mrf4*, *Myogenin*.

Введение

Существует ряд состояний и заболеваний, которые могут сопровождаться нарушениями целостности мышечной ткани: это простые повреждения скелетной мускулатуры, возникающие при чрезмерной физической нагрузке или ранении, некоторые заболевания иммунной системы, дегенеративные мышечные заболевания. При этом известно, что скелетные мышцы обладают значительным потенциалом к регенерации, который реализуется сателлитными клетками, расположенными между базальной ламиной и клеточной мембраной (сарколеммой) скелетного мышечного волокна [1]. Однако при некоторых патологиях, которые сопровождаются нарушением целостности мышечной ткани, программа регенерации нарушается, мышечная ткань деградирует и скелетные мышцы начинают заселяться адипоцитами. Ярким примером накопления жировых клеток в мышечной ткани является мышечная дистрофия Дюшенна, заболевание, при котором мышечная ткань может быть почти полностью замещена адипоцитами [2]. Накопление жировых клеток в мышечной ткани также может наблюдаться и при нейрогенной мышечной атрофии, диабете второго типа, ожирении, саркопении (возрастном атрофическом дегенеративном изменении скелетной мускулатуры) [3–6]. Точное происхождение адипоцитов в мышечной ткани неизвестно; также неизвестно, какие стимулы могут способствовать их накоплению в мышечной ткани *in vivo*. Отчасти это связано с отсутствием адекватных клеточных

моделей исследования: регенерация тканей процесс комплексный, в него вовлечены разные типы клеток, и доступные клеточные модели исследования не воспроизводят полностью реальную картину развития патологии.

Известны различные подходы к исследованию механизмов развития мышечной ткани *in vitro*, в том числе использование клеточной линии мышечных миобластов C2C12 (первоначально полученных из бедренных мышц самок мышей линии СЗН возраста 3 месяцев) и первичных культур резидентов мышечной ткани — сателлитных клеток. Линия миобластов C2C12 является классической, хорошо описанной, стабильной моделью исследования развития мышечной ткани *in vitro* [7]. Работы, направленные на исследование роли взаимодействий мышечных сателлитных клеток с другими резидентными клетками мышечной ткани, появились относительно недавно [8–10]. Результаты этих исследований убедительно демонстрируют, что межклеточные взаимодействия действительно играют важную роль в регуляции мышечной регенерации и дегенерации. В частности, это взаимодействия сателлитных клеток (СК) с так называемыми фибро-адипогенными клетками-предшественниками, происходящими из мезодермальной мезенхимы (ФАК).

В настоящей работе было проведено прямое сравнение двух клеточных моделей с точки зрения их пригодности для исследования механизмов мышечной регенерации / дегенерации: линии мышечных миобластов C2C12 и модели, включающей в себя резидентные клетки мышечной ткани двух типов: СК и ФАК.

Материал и методика

Культивирование клеток линии C2C12. Клетки линии C2C12 были любезно предоставлены нашими коллегами из Каролинского Института (Thomas Sejersen, Group of myopathy research, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). Клетки культивировали в среде α -MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 1% L-глутамин (Invitrogen, США), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 1% раствора антибиотика Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, США). Замена среды производилась через 1–2 дня.

Получение первичных культур резидентных клеток мышечной ткани, обогащенных фракциями СК и ФАК. Выделение и получение клеточных культур, обогащенных фракциями мышечных клеток-предшественников СК и ФАК, проводили согласно описанным ранее методикам [11, 12] с использованием метода селекции по адгезии. Метод основан на том, что ФАК-предшественники должны обладать хорошей адгезией к пластику, в то время как СК прикрепляются только к специально обработанным культуральным поверхностям. Для получения клеток использовали мышей (самцов) 4-месячного возраста. После цервикальной дислокации из животных иссекали бедренную мышцу *m. tibialis anterior*, промывали в растворе фосфатного буфера и среде DMEM (Invitrogen, США) с 1% антибиотика Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, США), переносили в культуральные чашки, измельчали скальпелем и добавляли свежеприготовленный фильтрованный 0,02%-ный раствор коллагеназы II типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в DMEM с 1% антибиотика и инкубировали в течение 1,5 ч при +37°C. Затем препарат переносили в пробирку и центрифугировали (2500g, 10 мин, +20°C). Супернатант удаляли, клеточный осадок промывали несколько раз теплой культуральной средой DMEM

с добавлением 10%-ной лошадиной сыворотки (Gibco, США) и 1% антибиотика. Для получения культуры, обогащенной ФАК, клеточный осадок переносили в необработанную культуральную посуду и культивировали при +37°C в течение 30 мин в среде DMEM с добавлением 20% эмбриональной телячьей (HyClone, США), 10% лошадиной сыворотки, 1% антибиотика и 1% куриного эмбрионального экстракта (USBiological, США). Прикрепившиеся клетки представляли обогащенную фиброадипогенными предшественниками ФАК-фракцию, и их в дальнейшем культивировали в среде α -MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 1% L-глутамин (Invitrogen, США), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 1% раствора антибиотика Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, США). Неприкрепившиеся клетки переносили в обработанную Geltrex в DMEM культуральную посуду, а после их прикрепления обогащенную СК-фракцию культивировали в среде DMEM с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 10% лошадиной сыворотки, 1% антибиотика и 1% куриного эмбрионального экстракта (USBiological, США). Таким образом, получали две фракции клеток: обогащенную ФАК и обогащенную СК.

Обработку культуральной посуды проводили в течение 1,5 ч в культуральном CO₂ инкубаторе при +37°C раствором Geltrex (Invitrogen, США) в DMEM в соотношении 1:100.

Миогенная дифференцировка. Миогенную дифференцировку клеток производили согласно методикам из работ [7, 11] при культивировании в дифференцировочной среде, состоящей из питательной среды α -MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 1% L-глутамин (Invitrogen, США), 1% антибиотика Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, США) и 2% лошадиной сыворотки (Gibco, США). Замену первичной среды на дифференцировочную производили через сутки после начала культивирования.

Адипогенная дифференцировка. Адипогенную дифференцировку стимулировали после достижения клетками субконфлюэнтности: в культуральную среду добавляли изобутил метилксантина (0,5 мМ, Sigma, США), дексаметазон (0,5 мкМ, Sigma, США), розиглитазон (2 мкМ, Sigma, США) и инсулин (1 мкг/мл, Sigma, США), через три дня производили замену среды на культуральную среду с добавлением только инсулина, еще через 3 дня среду заменяли на обычную культуральную среду.

Иммуноцитохимия. Для проведения иммуноцитохимического исследования клетки отмывали фосфатным буфером и фиксировали 4%-ным параформальдегидом при +4°C в течение 10–15 мин, отмывали фосфатным буфером, в течение 5 мин инкубировали с 0,2%-ным раствором TRITONx100, отмывали фосфатным буфером, блокировали 30 мин 15%-ным раствором эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) в фосфатном буфере. Инкубацию с первичными и вторичными антителами проводили согласно инструкции производителя (антитела к МНС, *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin*, R&D BioSystems, США).

Анализ экспрессии генов. РНК выделяли стандартным тризольным методом, концентрацию и качество РНК измеряли на спектрофотометре ND-1000 (Thermo Scientific, США). кДНК синтезировали из 1 мкг тотальной РНК при помощи набора MMLV RT kit (Evrogen, Россия). Уровень экспрессии измеряли при помощи метода ПЦР в реальном времени на программируемом амплификаторе 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+ROX (Evrogen, Россия). Дизайн праймеров производили

с применением программы PrimerQuest (Integrated DNA Technologies). Список праймеров с последовательностями представлен в таблице. Обработку результатов проводили, используя стандартную методику, включающую нормализацию по гену домашнего хозяйства (*HPRT*) и внутреннему калибратору в каждом эксперименте. Все измерения проводили в трех и более независимых биологических образцах. Статистическая обработка проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия с $p < 0,05$.

Праймеры, использованные в исследовании

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>mPAX3</i>	5' TTCGAGAGAACCCACTACC 3'	5' TTGGCTCCAGCTTGT'TTC 3'
<i>mMyf5</i>	5' TGTCTGGTCCCGAAAGAA 3'	5' GCTGGACAAGCAATCCAA 3'
<i>mMyoD</i>	5' TACGACACCCGCTACTAC 3'	5' TCCACTTATGCTGGACAGG 3'
<i>mMyogenin</i>	5' GGCAATGCACTGGAGTT 3'	5' AAGGGAGTGCAGATTGTG 3'
<i>mMrf4</i>	5' GCCTCGTGATAACTGCTAAG 3'	5' AAGAAAGGCGCTGAAGAC 3'
<i>mPPARγ</i>	5' TGACAGTGACTTGGCTATATTT 3'	5' GCAGGTTGTCTTGGATGT 3'
<i>mPgc1a</i>	5' GAGGAATGCACCGTAAATCT 3'	5' TTCTCAAGAGCAGCGAAAAG 3'
<i>mUcp1</i>	5' GTACCAAGCTGTGCGATG 3'	5' CATGATGACGTTCCAGGAC 3'
<i>mFabp4</i>	5' CACCGAGATTTCCTTCAAAC 3'	5' CCCGCCATCTAGGGTTAT 3'
<i>mHPRT</i>	5' GCTGGTGAAAAGGACCTCT 3'	5' CACAGGACTAGAACACCTGC 3'

Результаты и обсуждение

Характеристики исследуемых типов клеток. Клеточная линия C2C12 является коммерчески доступной, хорошо описанной классической линией для исследования миогенеза. Первичные же клеточные культуры всегда необходимо охарактеризовать, чтобы убедиться в том, что их свойства соответствуют условиям, необходимым для решения поставленной в данном исследовании задачи. Поэтому полученные нами культуры СК и ФАК были охарактеризованы с точки зрения базального уровня экспрессии маркеров мышечной и жировой тканей.

В первую очередь мы убедились в том, что оба типа первичных клеток были *Muf5*-позитивны, что подтверждает их миогенный потенциал, и что уровень экспрессии *Muf5* в СК и ФАК существенно не различался (рис. 1, а).

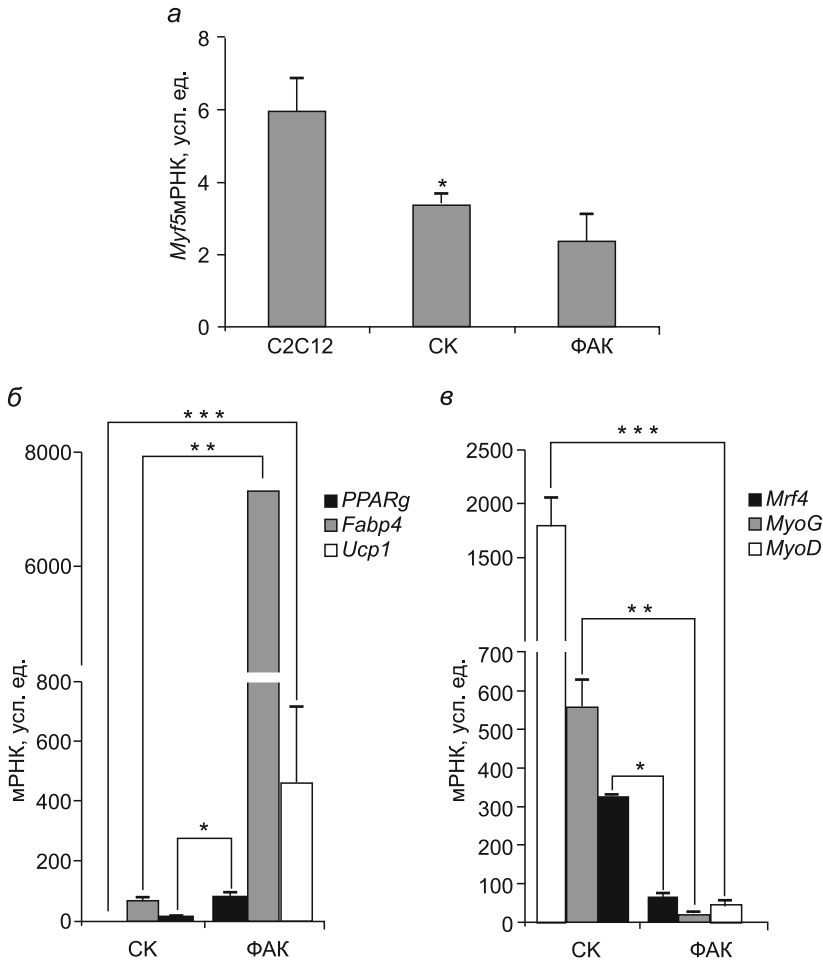


Рис. 1. Экспрессия *Muf5* в спутниковых клетках мышечной ткани мыши, фибробластоподобных резидентных клетках мышечной ткани и миобластах линии C2C12 (* $p < 0,05$ по сравнению с C2C12; $n = 3-4$) (а). Базальный уровень экспрессии адипомаркеров в клетках СК и ФАК (** $p < 0,05$; * $p < 0,005$; ** $p < 0,0005$; (СК vs ФАК); $n = 3$) (б). Базальный уровень экспрессии миомаркеров в клетках СК и ФАК (* $p < 0,0001$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,01$; (СК vs ФАК); $n = 3$) (в).

Затем сравнили базальный уровень экспрессии адипо- и мио-маркеров в СК и ФАК. В качестве миомаркеров использовали классические регуляторы миогенеза *MyoD*, *Myogenin* и *Mrf4*. Для анализа адипогенного потенциала были выбраны: *PPARγ* (экспрессируется главным образом в белой и бурой жировой ткани; его экспрессия намного ниже в скелетных мышцах, сердце и других органах; рецепторы *PPARγ* участвуют в регуляции сигнальных путей, отвечающих за контроль адипогенеза,

липидного обмена, воспалительных процессов и в поддержании метаболического гомеостаза [12]); *Fabp4* (маркер дифференцировки адипоцитов [13]) и *Ucp1* (маркер бурой жировой ткани [14]). Базальный уровень экспрессии адипомаркеров и маркеров мышечной дифференцировки в клетках СК и ФАК показан на рис. 1, б и 1, в соответственно. Как и предполагалось, полученные результаты убедительно демонстрируют преобладание миогенного потенциала в СК-клетках и адипогенного потенциала в ФАК-клетках. Интересно, что удалось продемонстрировать высокий уровень экспрессии маркера бурой жировой ткани *Ucp1* в ФАК-клетках (рис. 1, б). Это наблюдение хорошо согласуется с недавними исследованиями, показавшими, что комплекс транскрипционных факторов, включающих C/EBP β -PRDM16, может стимулировать в миобластах, фибробластах, а также в клетках белого жира экспрессию генов-маркеров адипогенеза, снижение экспрессии генов-маркеров клеток скелетной мышечной ткани и в конечном итоге — формирование из *Myf5*-позитивных предшественников резидентных клеток бурой жировой ткани [15]. Базальный уровень экспрессии как *MyoD*, *Myogenin*, *Mrf4*, так и *PPAR γ* , *Fabp4*, *Ucp1* (данные для C2C12 не показаны) в клетках C2C12 был существенно ниже, чем в ФАК и СК, что, скорее всего, свидетельствует о значительной гетерогенности и/или динамичности полученных первичных культур.

Исследование динамики миогенной дифференцировки линии C2C12. Культура C2C12 является классической моделью исследования миогенной дифференцировки, и в наших экспериментах после стимуляции дифференцировки динамика экспрессии факторов транскрипции *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* и *Mrf4*, регулирующих развитие мышечной ткани в ходе эмбрионального развития, хорошо согласовывалась с современными представлениями о регуляции миогенеза [16]. Экспрессия раннего фактора дифференцировки *Myf5* снижалась к седьмому дню после стимуляции, в то время как экспрессия *MyoD* поддерживалась на неизменном уровне до седьмого дня и возрастала незначительно к 15-му дню после стимуляции; экспрессия факторов, отвечающих за слияние миобластов и формирование миотрубок (*Myogenin* и *Mrf4*) возрастала существенно (рис. 2).

Динамика дифференцировки также подтверждалась соответствующими морфологическими изменениями и иммуноцитохимическим анализом (рис. 3).

Исследование динамики формирования миотрубок в первичных культурах резидентных клеток мышечной ткани. СК показали высокий базальный уровень экспрессии маркеров миогенной дифференцировки *Myogenin* и *MyoD* — уровень их экспрессии не менялся в ходе дифференцировки, при этом уже к 4-му дню после стимуляции дифференцировки наблюдались снижение экспрессии *Myf5*, рост экспрессии позднего маркера дифференцировки *Mrf4*, а также формирование спонтанно сокращающихся миотрубок (рис. 4, а, б). Интересно, что ФАК ответили на стимуляцию миогенной дифференцировки ростом экспрессии *Myf5* и *Mrf4* (рис. 5, а), но ни слияния клеток, ни формирования трубок в культуре не наблюдалось; напротив, в культурах была зафиксирована спонтанная адипогенная дифференцировка (рис. 5, в). Дополнительные исследования необходимы для выяснения, является ли рост экспрессии *Myf5* и *Mrf4* следствием гетерогенности полученной культуры, или же имеет функциональное значение в данных условиях.

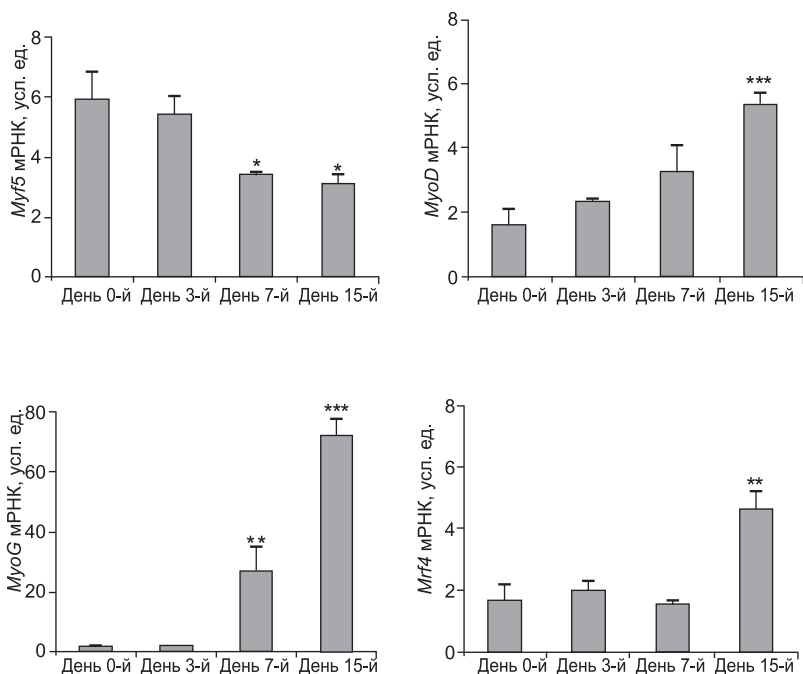


Рис. 2. Динамика экспрессии маркеров миогенеза в ходе стимуляции миогенной дифференцировки в клетках линии C2C12 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,004$; $n=3$)

Результаты сравнения стимуляции адипогенеза в первичных культурах СК и ФАК также оказались неожиданными. Стимуляция адипогенеза в ФАК-клетках, как и предполагалось, сопровождалась стимуляцией экспрессии генов, регулирующих адипогенез (рис. 5, б), при этом и морфология клеток изменялась соответствующим образом: клетки становились округлыми, с большим количеством липидных капель, которые быстро увеличивались в размерах (см. рис. 5, в). Неожиданным оказалось то, что стимуляция адипогенеза в СК-клетках хоть и вызывала, как и в ФАК, рост экспрессии факторов, регулирующих развитие жировой ткани, но в отличие от них рост экспрессии этих факторов не сопровождался активным формированием адипоцитов и накоплением жировых капель в клетках. Более того, в культурах наблюдалась существенная стимуляция экспрессии *Mrf4* и *Myf5* и на 3–4-й день начиналось активное

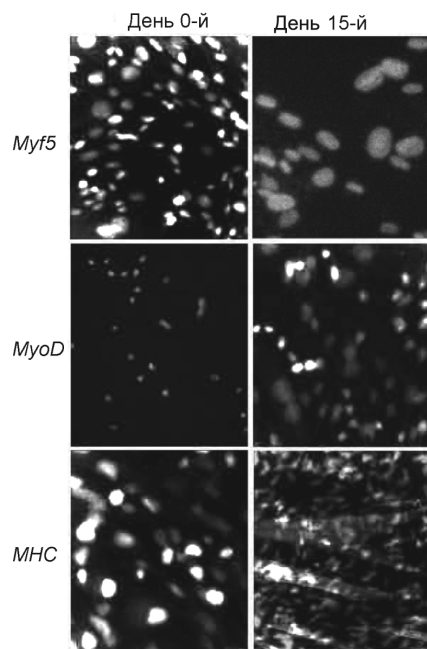
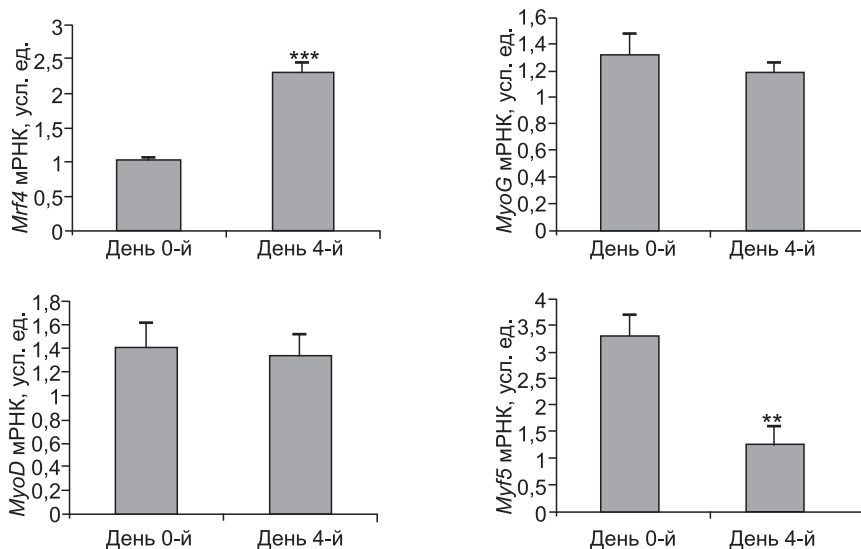


Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ маркеров / регуляторов миогенеза в ходе стимуляции миогенной дифференцировки в C2C12 (увеличение 200x)

а



б

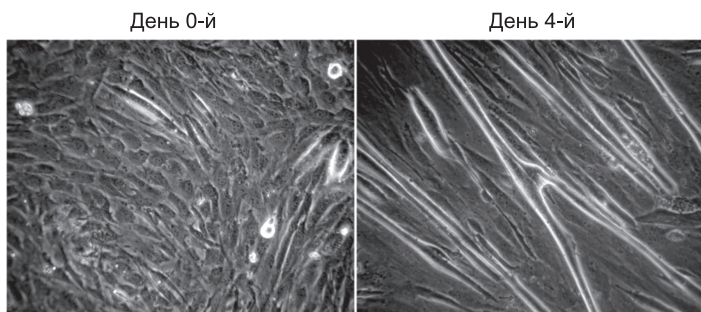


Рис. 4. Динамика экспрессии маркеров миогенеза в ходе стимуляции миогенной дифференцировки в СК (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0002$; $n = 3-4$) (а). Морфология СК до стимуляции миогенеза (левая панель) и после четырех дней стимуляции миогенеза (правая панель) (б)

формирование миотрубок (рис. 6). Морфология миотрубок, сформировавшихся из СК на фоне стимуляции адипогенеза, существенно отличалась от морфологии миотрубок, полученных при стимуляции миогенеза в СК (см. рис. 4, б). Природу этих отличий, как и молекулярные механизмы формирования миотрубок СК при стимуляции адипогенеза предстоит выяснить в ходе дальнейших исследований. Мы предполагаем, что эти отличия могут быть связаны с рядом обстоятельств. Во-первых, при оценке полученных результатов необходимо учитывать тот факт, что метод обогащения клеточной культуры фракцией СК с использованием селекции по адгезии не позволяет получать абсолютно гомогенные клеточные образцы (в отличие от клеточного сортирования на специфичные маркеры СК, позволяющего минимизировать процент гетерогенности получаемых культур), и возможно, именно взаимодействия клеток разных типов в культуре (в том числе СК-ФАК взаимодействия) могли

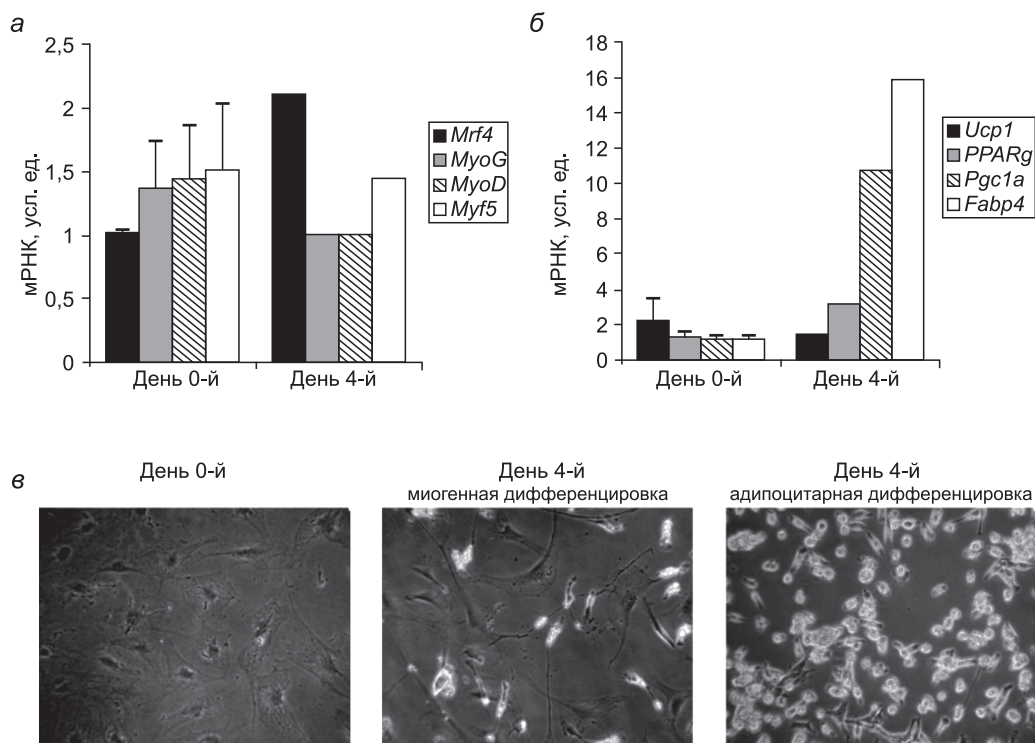


Рис. 5. Динамика экспрессии миогенных маркеров при стимуляции миогенеза в ФАК в течение четырех дней ($n=3$; некоторые образцы были объединены перед проведением Q-PCR в связи с ограниченным количеством клеточного материала) (а). Динамика экспрессии адипогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в ФАК в течение четырех дней ($n=3$; некоторые образцы были объединены перед проведением Q-PCR в связи с ограниченным количеством клеточного материала) (б). Морфология ФАК до стимуляции (левая панель), после четырех дней стимуляции миогенеза (центральная панель) и адипогенеза (правая панель) (в)

определять направление дифференцировки. Выявление природы клеток, модулирующих сигнальные пути, отвечающие за направление дифференцировки, а также молекулярных механизмов, отвечающих за эти процессы, должно стать предметом дальнейших исследований. Также необходимо учитывать тот факт, что адипогенная дифференцировка стимулируется коктейлем, который содержит агонист рецептора PPAR γ . Действительно, в наших экспериментах при попытке стимуляции *in vitro* адипогенеза (но не миогенеза, данные не показаны) в СК была выявлена существенная стимуляция экспрессии PPAR γ и его ко-активатора *Pgc1 α* (см. рис. 6, б). При этом известно, что *Pgc1 α* играет важную роль в формировании медленных моторных единиц, регулирует механизмы, повышающие устойчивость к мышечной атрофии и саркопении и эффективность тренировок на выносливость [17–21]. Возможно, что в нашей клеточной модели формирование миотрубок также было обусловлено активацией PPAR γ / *Pgc1 α* комплекса, и дальнейшие исследования необходимы для выявления возможной роли PPAR γ / *Pgc1 α* сигнальных путей в регуляции мышечной регенерации/дегенерации.

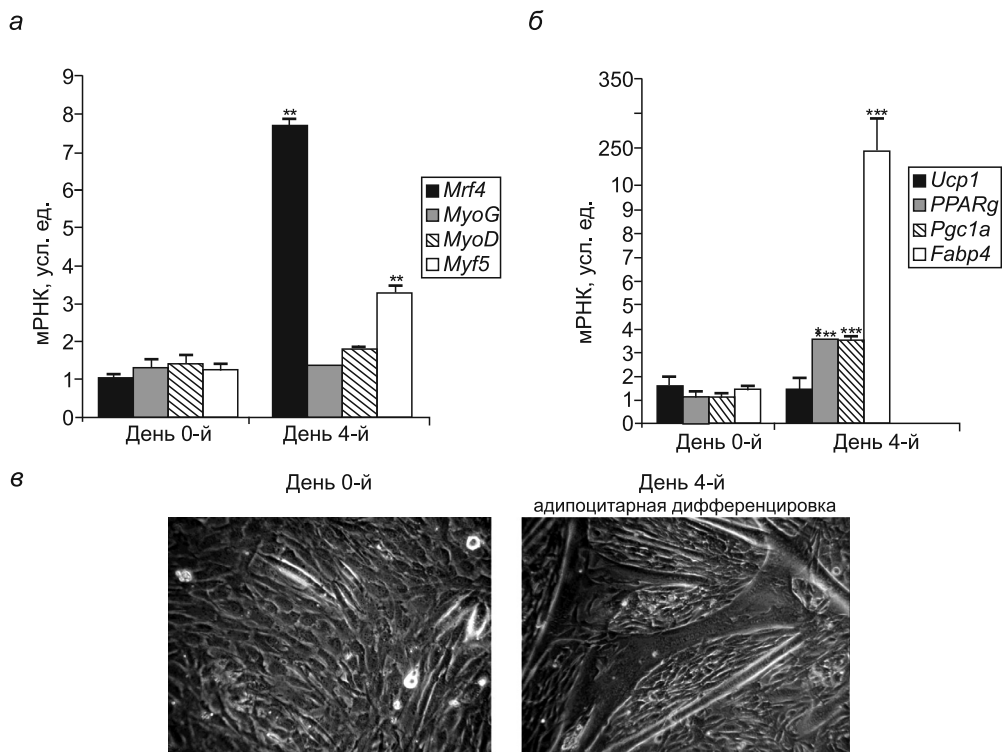


Рис. 6. Динамика экспрессии миогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в СК в течение четырех дней ($n=3$; $**p<0,001$) (а). Динамика экспрессии адипогенных маркеров при стимуляции адипогенеза в СК в течение четырех дней ($n=3$; $***p<0,001$) (б). Морфология СК до стимуляции адипогенеза (левая панель) и после четырех дней стимуляции (правая панель) (в).

Таким образом, в данном исследовании было показано, что в условиях стимуляции миогенной дифференцировки клетки C2C12 демонстрируют согласованный контроль экспрессии ранних и поздних регуляторов миогенеза, что делает их удобной моделью для изучения динамики дифференцировки. Первичные клеточные культуры, обогащенные СК, отвечали на стимуляцию быстрым формированием трубок с выраженной морфологией. Мы полагаем, что клеточные модели, основанные на использовании таких образцов, могут быть хорошей и относительно простой клеточной моделью для исследования межклеточных взаимодействий, ответа мышечной ткани на молекулярном и клеточном уровнях на различные физиологические и фармакологические вмешательства, а также для моделирования *in vitro* патологий, которые сопровождаются нарушениями регенерации скелетной мускулатуры.

Литература

1. Bischoff R. Satellite and stem cells in muscle regeneration // *Myology* / 3 rd ed. New York: McGraw-Hill, 2004. Vol. 1, P. 66–86.
2. Banker B. Q., Engel A. G. Basic reactions of muscle // *Myology* / 3 rd ed. New York: McGraw-Hill, 2004. Vol. 1, P. 691–747.
3. Carpenter S., Karpati G. Cells and structures other than skeletal muscle fibers // *Pathology of Skeletal Muscle* / 2nd ed. Oxford: Oxford University Press. 2. 2001. P. 314–369.

4. Goodpaster B. H., Wolf D. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes // *Pediatr. Diabetes*. 2004. Vol. 5. P. 219–226.
5. Insulin resistance in morbid obesity: reversal with intramyocellular fat depletion / Greco A. V., Mingrone G., Giancaterini A., Manco M., Morrioni M., Cinti S., Granzotto M., Vettor R., Camastra S., Ferrannini E. // *Diabetes*. 2002. Vol. 51. P. 144–151.
6. Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons / Visser M., Goodpaster B. H., Kritchevsky S. B., Newman A. B., Nevitt M., Rubin S. M., Simonsick E. M., Harris T. B. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2005. Vol. 60. P. 324–333.
7. Yaffe D., Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation // *Diff.* 1977. Vol. 7, N 3. P. 159–166.
8. Rodeheffer M. S. Tipping the scale: muscle versus fat // *Nature Cell Biol.* 2010. Vol. 12, N 2. P. 102–104.
9. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle / Uezumi A., Fukada S., Yamamoto N., Takeda S., Tsuchida K. // *Nature Cell Biol.* 2010. Vol. 12, N 2. P. 143–152.
10. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis / Joe A. W., Yi L., Natarajan A., Le Grand F., So L., Wang J., Rudnicki M. A., Rossi F. M. // *Nature Cell Biol.* 2010. Vol. 12, N 2. P. 153–163.
11. Keire P., Shearer A., Shefer G., Yablonka-Reuveni Z. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells // *Methods Mol. Biol.* 2013. Vol. 946. P. 431–468.
12. PDGF, NT-3 and IGF-2 in combination induced transdifferentiation of muscle-derived stem cells into Schwann cell-like cells / Yi Tang, Hua He, Ning Cheng, Yanling Song, Weijin Ding, Yingfan Zhang, Wenhao Zhang, Jie Zhang, Heng Peng, Hua Jiang. // *PLoS One*. 2014. Vol. 9(1). e73402.
13. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future / Ahmadian M., Suh J. M., Hah N., Liddle C., Atkins A. R., Downes M., Evans R. M. // *Nat Med*. 2013. Vol. 19, N 5. P. 557–566.
14. Shan T., Kuang S. Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues // *FASEB J.* 2013. Vol. 27, N 1. P. 277–287.
15. Ucp1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic / Shabalina I. G., Petrovic N., De Jong J. M., Kalinovich A. V., Cannon B., Nedergaard J. // *Cell Rep.* 2013. Vol. 12, N 5. P. 1196–1203.
16. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16/CEBP β transcriptional complex / Kajimura S., Seale P., Kubota K., Lunsford E., Frangioni J. V., Gygi S. P., Spiegelman B. M. // *Nature*. 2009. Vol. 460, N 7259. P. 1154–1159.
17. Bentzinger C. F., Wang Y. X., Rudnicki M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. Vol. 4. P. ii-a008342.
18. Ljubicic V., Burt M., Jasmin B. J. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets // *FASEB J.* 2013 Nov. 18. [Epub ahead of print] PMID: 24249639.
19. Egan B., Zierath J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation // *Cell Metab.* 2013. Vol. 17. P. 162–184.
20. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres / Lin J., Wu H., Tarr P. T., Zhang C., Wu Z., Boss O., Michael L. F., Puigserver P., Isotani E., Olson E. N., Lowell B. B., Bassel-Duby R., Spiegelman B. M. // *Nature*. 2002. Vol. 418. P. 797–801.
21. Lira V. A., Benton C. R., Yan Z., Bonen A. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010. Vol. 299. P. E145–E161.

Статья поступила в редакцию 27 июня 2014 г.

Сведения об авторах

Давыдова Александра Яковлевна — студентка
Смолина Наталья Александровна — младший научный сотрудник
Костарева Анна Александровна — кандидат медицинских наук
Дмитриева Рената Игоревна — кандидат биологических наук

Davydova Alexandra Ya. — student
Smolina Natalia A. — Senior Researcher
Kostareva Anna A. — Ph.D., MD
Dmitrieva Renata I. — Ph.D.