

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИОБЛАСТОВ И МИОСАТЕЛЛИТОЦИТОВ *IN VITRO*

© Д.О. Буев¹, А.М. Емелин¹, И.А. Яковлев^{2,3}, Р.В. Деев²

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
Рязань, Российская Федерация (1)

Институт стволовых клеток человека, Москва, Российская Федерация (2)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация (3)

Наследственные миодистрофии являются тяжелыми заболеваниями, характеризующиеся прогрессирующим течением и зачастую полиорганным поражением, приводящим к инвалидности или гибели. Тяжесть этих состояний определяется широкой распространенностью и многофункциональностью скелетной мышечной ткани в организме человека. Одним из методов изучения миодистрофий, и, в частности, патофизиологии мышечной ткани, является метод клеточного культивирования. Этот метод позволяет изучить поведение нормальных и мутантных клеток в различных условиях, а также воздействие терапевтических препаратов на мышечные клетки. В исследованиях *in vitro* используются как первичные линии клеток, так и постоянные иммортализованные линии.

Одним из первых культивированием мышечных тканей стал заниматься Н.Г. Хлопин, разработавший методику эксплантации, которая легла в основу современных методов выделения. Современные методики можно разделить на две большие группы: методы, использующие ферментативную обработку, и методы, использующие эксплантацию отдельных мышечных волокон.

Немиогенным источником аллогенных миобластов служат индуцированные плюрипотентные клетки (ИПСК), получаемые из донорских фибробластов. Существует три варианта индукции миогенной дифференцировки: трансфекция ИПСК миогенными регуляторными факторами, пошаговая активация или ингибирование сигнальных путей, участвующих в миогенезе, и использование свободно плавающих сфероидов. Другими немиогенными источниками являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и фибробласты.

Наиболее распространенной иммортализованной миогенной линией является линия мышечных миобластов C2C12, способная к быстрой дифференцировке в миотубы. Менее распространенными линиями являются MM14, демонстрирующая диссоциацию фенотипов, и линия L6, применяющаяся для изучения процессов обмена глюкозы.

Ключевые слова: культура клеток; мышечная ткань; миобласт; скелетная мышца; C2C12.

CULTIVATION OF MYOBLASTS AND MYOSATELLITOCYTES *IN VITRO*

D.O. Buev¹, A.M. Emelin¹, I.A. Yakovlev², R.V. Deev²

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation (1)

Human Stem Cells Institute, Moscow, Russian Federation (2)

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation (3)



Hereditary myodystrophies are progressive severe leading to disability or death. Severity of these diseases is defined by abundance and multifunctionality of muscle tissue in a human body. One of methods used to study myodystrophies and, in particular, pathophysiology of muscle tissue is the method of cell culturing. This method allows to study behavior of normal and mutant cells in different conditions, and also influence of the therapeutic drugs on muscle cells. In *in vitro* studies both primary cell lines as well as permanent immortalized cells are used.

A pioneer of the muscle tissue cultivation was N.G. Khlopin who developed the method of explantation, which formed the basis for the modern protocols of muscle cell isolation. Modern methods are divided into two large groups: methods using fermentative digestion of tissues and methods using explantation of isolated muscle fibers.

Non-myogenic source of allogenic myoblasts are induced pluripotent stem cells (iPSC) obtained from donor's fibroblasts. There exist three types of myogenic differentiation induction: transfection of iPSC with myogenic regulatory factors, stepwise activation or inhibition of signal pathways participating in myohistogenesis, and differentiation via free-floating spheroids. Other non-myogenic sources are multipotent mesenchymal stromal cells and fibroblasts.

The most common immortalized myogenic cell line is C2C12 line of murine myoblasts capable of rapid differentiation to myotubes. Less common are MM14 line demonstrating dissociation of phenotypes, and L6 line used in studies of glucose metabolism.

Keywords: *cell culture; muscle tissue; myoblast; skeletal muscle; C2C12.*

Клетки, обладающие способностью к сокращению, которая обусловлена наличием развитого сократительного аппарата, состоящего из белков актомиозинового комплекса, могут быть объединены в единую гистологическую систему мышечных тканей и миоидных клеток [1]. В эту систему включают гладкую, поперечнополосатые скелетную и сердечную мышечную ткани, миофибробласты, миоидные клетки различной локализации, миоэпителиоциты, миопигментоциты радужной оболочки, перициты кровеносных сосудов, а также некоторые другие виды клеток [1]. Из всего множества частей этой системы в организме человека в наибольшем количестве представлена скелетная мышечная ткань, составляющая у взрослых до 40% массы тела [2]. Скелетные мышцы обеспечивают локомоцию, внешнее дыхание, жевание, движения глаз, сократительный термогенез, а также способствуют венозному кровообращению в конечностях за счет функционирования мышечно-венозной помпы. Такое многообразие функций мышц приводит к тяжелым клиническим проявлениям при миопатиях – заболеваниях, при которых происходит поражение скелетной мышечной ткани.

В настоящее время активно изучается морфология и физиология мышечной ткани, как в нормальных условиях, так и при патологии: база данных PubMed по запросу «pathology of muscle tissue» предоставляет свыше 160 тысяч результатов. Среди большого количества способов изучения мышечной ткани особо следует выделить метод клеточного культивирования, позволяющий проводить эксперименты на изолированных живых клетках.

Одним из пионеров культивирования мышечной ткани был советский ученый-гистолог, академик Николай Григорьевич Хлопин. Ему удалось выделить и изолировать в культуре отдельные мышечные волокна и «миобласты» (миосателлитоциты) кроликов [3]. Н.Г. Хлопин дал описание морфологии элементов скелетных мышц в условиях культуры, наблюдал *in vitro* рост и регенерацию поврежденных мышечных волокон, формирование мышечных трубочек из миобластов, а также так называемое «ценкеровское перерождение» (некроз) мышечных волокон и другие дегенеративные процессы [3].

Для получения культур Н.Г. Хлопин использовал метод эксплантации, который заключается в помещении фрагментов

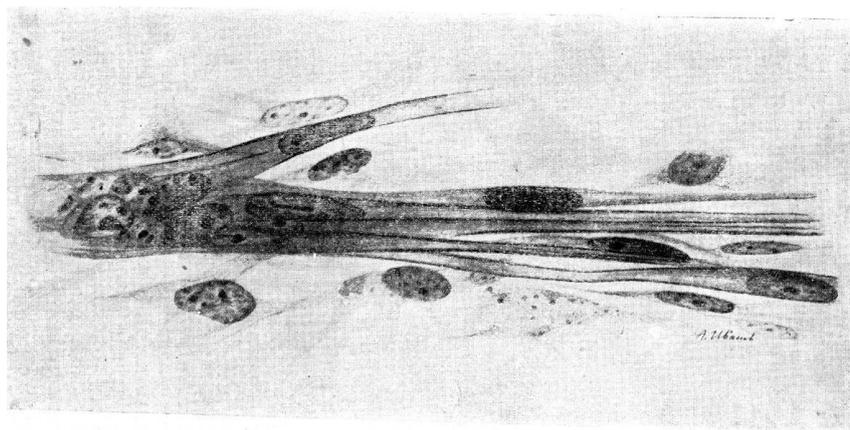


Рис. 1. Мышечные волокна в культуре. 4-дневная культура из мускулатуры 5-дневного кролика. Увеличение 900х. Рисунок из работ Н.Г. Хлопина [3]

ткани в культуральную среду. В дальнейшем более широкое распространение получил метод ферментативной диссоциации мышцы, позволяющий получить отдельные клетки.

Для получения культур Н. Г. Хлопин использовал метод эксплантации, который заключается в помещении фрагментов ткани в культуральную среду. В дальнейшем более широкое распространение получил метод ферментативной диссоциации мышцы, позволяющий получить отдельные клетки.

Первичные культуры

Скелетная мышечная ткань состоит из двух дифферонов: клеточного и симпластического, которые взаимодействуют между собой и развиваются параллельно в ходе дивергентной дифференцировки клеток миотома [1]. Симпластический дифферон представлен миосимпластами или мышечными волокнами, клеточный – малодифференцированными клетками: миосателлитоцитами, которые в определенных условиях способны активироваться с образованием миобластов, которые в дальнейшем пролиферируют и подвергаются слиянию с поврежденными мышечными волокнами, либо друг с другом [1]. Два дифферона взаимодействуют совместно и составляют функционально единую систему.

Разработаны методы культивирования миосателлитоцитов и миобластов *in vitro* и индукции их дифференцировки с

образованием мышечных трубочек, а также протоколы получения миобластов из немuscularных тканевых источников. Помимо первичных линий, получены иммортализованные линии клеток, наиболее широко используемой из которых является линия мышечных миобластов C2C12, реже применяются клетки L6, полученные из тканей крысы. Ещё реже используется линия MM14, полученная из неидентифицированной эпителиальной опухоли яичника мыши [4,5].

Для выделения первичной культуры миобластов из скелетной мышцы применяют метод ферментативной обработки (рис. 2). Он заключается в механическом разрушении мышцы на фрагменты, размером 1-1,5 мм, и в их последующей ферментативной обработке протеолитическими ферментами [6]. После обработки следует очистка и посев изолированных клеток на среду. Недостатком этого способа является получение небольшого количества миогенных клеток на единицу массы исходного материала.

Выделенные клетки культивируются на среде DMEM F12 с добавлением 20% FBS, фактора роста фибробластов и 2 мкмоль глутамин. Условия культивирования должны быть приближены к условиям организма, для чего применяются CO₂-инкубаторы, в которых поддерживается постоянная температура 37 °С, а концентрация углекислого газа – 5%.

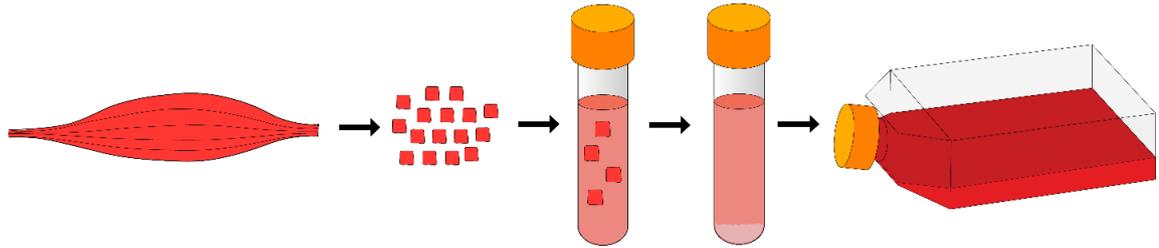


Рис. 2. Схема выделения первичной культуры миобластов ферментативным методом.
Пояснения в тексте

При снижении концентрации FBS до 2% миобласты способны дифференцироваться в миотубы [7]. Маркерами миогенной дифференцировки *in vitro* являются белки MyoD, Mef2C, миогенин, тропонин T первого типа и тяжелые цепи миозина (табл. 1). Образовавшиеся миотубы могут быть использованы как модельный объект для изучения процессов атрофии и гипертрофии. В качестве индукторов атрофии используются дексаметазон или миостатин, гипертрофия моделируется с помощью добавления инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) [4].

Выделение культур, обогащенных клетками-сателлитами проводится с использованием методики селективной адгезии, основанной на невозможности адгезии миосателлитов к необработанному пластику. После измельчения мышечной ткани и её ферментативной обработки, полученный клеточный осадок переносят в необработанную посуду, где культивируют в среде DMEM F12 с добавлением 20% FBS, 1% куриного эмбрионального экстракта и 1% антибиотика (например, смесь пенициллин + стрептомицин). Неприкрепившаяся фракция содержит большое количество клеток-сателлитов, которые переносят в посуду, обработанную Geltrex Matrix и содержащую питательную среду, идентичную описанной выше. Маркерами миосателлитов являются белки Myf5, MyoD, Mfr4 и миогенин. После 12 часов культивирования в дифференцировочной среде миосателлиты способны формировать сократимые миотубы. Следует отметить, что описанная выше методика не

позволяет получить полностью однородную культуру миосателлитов, поэтому в полученной культуре возможны взаимодействия между сателлитами и другими видами клеток, что влияет на ход процессов дифференцировки [8]. Несмотря на это, первичная культура сателлитных клеток является одной из наиболее простых моделей для изучения мышечной ткани, так как эти клетки легко поддаются генетической модификации с помощью лентивирусов и быстро подвергаются дифференцировке [9].

Другой метод выделения миосателлитов заключается в эксплантации отдельных мышечных волокон и их культивировании (рис. 3). Спустя некоторое время (от 12 до 24 часов) сателлитные клетки начинают мигрировать от миофибриллы в питательную среду [4]. Этот метод позволяет выделить до 300 клеток из единичного волокна, однако его недостатком является большая трудоёмкость и ресурсозатратность по сравнению с ферментативным методом [10].

Прямое перепрограммирование в миобласты

Один из возможных способов получения миобластов – трансфекция немускульных клеток миогенными регуляторными факторами (myogenic regulatory factors, MRF), белками, которые участвуют в регуляции миогистогенеза, например, MyoD. Многочисленные исследования показали, что экспрессия MyoD в немускульных клетках приводит к инициации процессов миогенеза [15]. Лентивирусная трансфекция фибробластов MyoD приводит к их трансформации в миобласты.

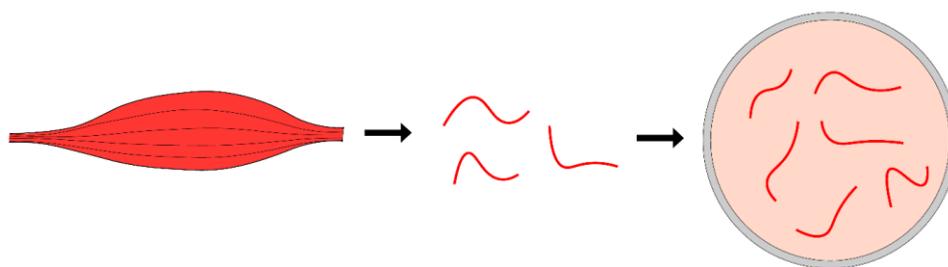


Рис. 3. Получение миобластов методом эксплантации мышечных волокон.
Пояснения в тексте

Таблица 1

Некоторые молекулярные маркеры мышечной ткани

Структура	Маркеры	Ссылки
Промиобласты	Rax3, Rax7, Myf5, MyoD	[11,12]
Миобласты	MyoD, eMyHC, MRF4, десмин	[12,13]
Ранние миотубы	MyoD, миогенин, MyHC, MCK, тропонин-T	[11,12]
Зрелые миотубы	MRF-4, MyHC, MCK, альфа-саркомерный актин	[13,14]
Мышечные волокна	MyHC, MCK, альфа-саркомерный актин	[13,14]

Также MyoD способен индуцировать миогенную дифференцировку в жировых ММСК человека. Полученные таким путём клетки имеют вытянутую веретеноподобную форму, сходную с формой миобластов, способны сливаться с миобластами мышей, и восстанавливать в них экспрессию отсутствующих белков [16]. Сходный результат наблюдается при трансфекции фибробластов генетическими конструкциями, содержащими другой MRF, белок Myf5. Однако, трансфекция Myf5 приводит к формированию несколько иного фенотипа: перепрограммированные клетки экспрессируют MyoD, тяжёлые цепи миозина, десмин, но не Mrf4. Кроме того, такая трансфекция приводит к получению миобластов с более долгим периодом дифференцировки [17].

Получение миобластов из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) были впервые обнаружены в 1969 в культуре костного мозга [18]. Одним из важнейших свойств ММСК является способность к дифференцировке в мезенхимальных направлениях: в остециты, хондроциты и адипоциты [19]. Это позволяет рассматривать ММСК как

источник мышечных клеток.

Возможно выделение ММСК из различных тканей: белая жировая ткань, костный мозг, волосяные фолликулы, роговица, пупочный канатик, плацента [20], тимус [21]. Последние исследования доказывают, что одним из возможных источников ММСК для дальнейшего получения миобластов является слизистая оболочка десны. Преимущества данного источника заключаются в малоинвазивности процедуры взятия биоптата и в высокой скорости восстановления без образования рубцов [22].

Для индукции миогенной дифференцировки ММСК использует среду DMEM/F12 с содержанием 20% FBS, которую впоследствии заменяют на DMEM с низким содержанием глюкозы с добавлением 2% лошадиной сыворотки. Спустя 4-8 суток в культуре формируются мышечные трубочки, имеющие поперечную исчерченность и экспрессирующие маркеры поперечнополосатых мышц: MyoD, скелетный актин, скелетный миозин [23].

Получение миобластов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК)

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) способны дифференцироваться в клетки эктодермально-

го, мезодермального и энтодермального происхождения, полученные путем перепрограммирования соматических клеток. Впервые ИПСК были получены японскими учеными К. Takahashi и S. Yamanaka в 2006 году из фибробластов мыши [24].

К настоящему времени разработано несколько принципиально различных подходов к получению культуры мышечных клеток из ИПСК (рис. 4). Первый подход заключается в прямом перепрограммировании ИПСК с использованием факторов транскрипции, характерных для мышечной ткани, таких как MyoD, или Pax7. Однако, в связи с тем, что для перепрограммирования используются лентивирусные векторы, интегрирующиеся в случайные участки генома, этот метод применяется лишь для исследований *in vitro* и считается менее перспективным для получения мышечной ткани в целях тканевой инженерии в сравнении с другими методами [15].

Второй подход заключается в пошаговой активации или ингибировании сигнальных путей, принимающих участие в миогистогенезе, при помощи цитокинов и малых молекул. На первом этапе на

ИПСК воздействуют ингибитором белка GSK3, а затем ингибитором BMP4, что приводит к дифференцировке ИПСК в премиогенные предшественники [15]. Затем на полученные предшественники воздействуют факторами роста IGF-1, FGF-2 или HGF, в результате чего клетки дифференцируются в «эмбриональные миобласты». Формирование фетальных и дифференцированных миобластов из «эмбриональных» происходит спонтанно, без дополнительных воздействий [15].

Третья методика – использование свободно плавающих сфероидов (free-floating spherical culture) или EZ-сфер [25]. Эмбриональные или индуцированные плюрипотентные клетки помещаются в культуральный флакон, покрытый poly-НЭМА [поли(2)-гидроксиэтилметакрилат] – веществом, предотвращающим адгезию клеток к поверхности. Спустя неделю клетки формируют сферические скопления – EZ-сферы. Затем сферы изолируют и помещают в среду, обогащенную факторами роста FGF2 и EGF. В течение 6 недель плюрипотентные клетки дифференцируются в миогенные предшественники [25].

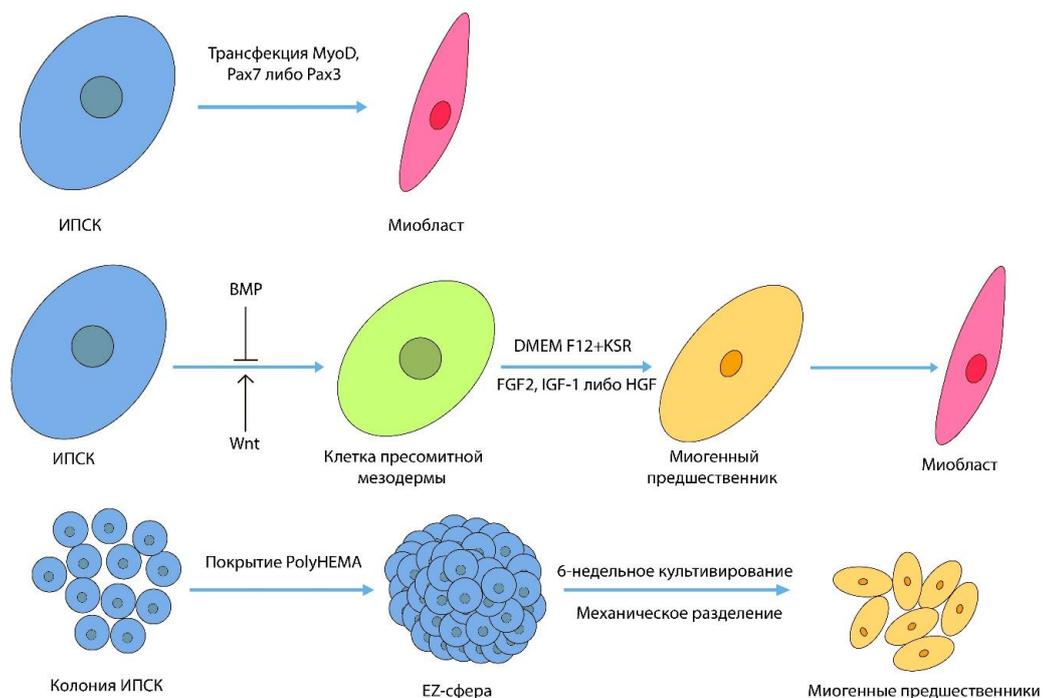


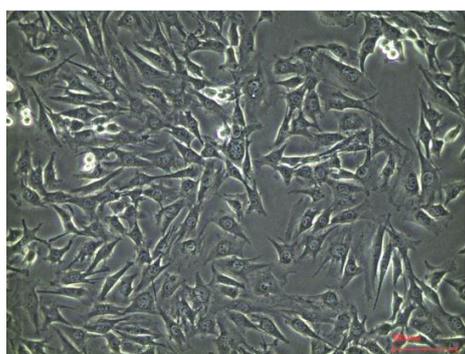
Рис. 4. Способы получения миогенных клеток из ИПСК. Пояснения в тексте

Иммортализованные линии миобластов

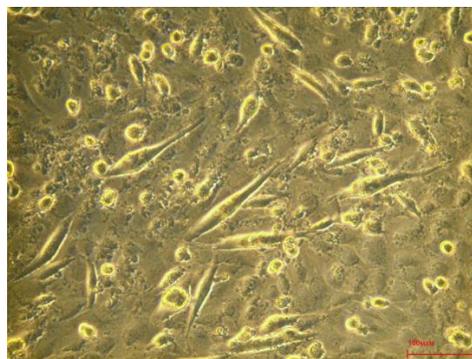
Среди иммортализованных линий мышечных клеток наиболее часто используется линия мышечных миобластов C2C12. Эти клетки были получены из миосателлитов и являются потомками миобластов, выделенных D. Yaffe и O. Saxel в институте имени Вейцмана в Израиле от мышцей с мутацией в гене *dy*, кодирующего М-цепь ламинина [26]. Следует отметить, что клетки C2C12 являются мутантными иммортализованными клетками, поэтому не до конца ясно, насколько процессы, протекающие в данных клетках, соответствуют процессам в

нормальных миобластах.

Морфология клеток C2C12 зависит от времени культивирования и от стадии дифференцировки, в которой находится эта культура. Недифференцированные клетки прочно прикреплены к субстрату, имеют размер 20-80 мкм, отростчатую или веретенообразную форму с многочисленными филоподиями, в единственном ядре находятся несколько ядрышек. При электронной микроскопии в цитоплазме обнаруживается гладкая ЭПС и пучки т.н. стрессовых волокон, состоящих из актина. Актин диффузно распределен по цитоплазме, миозин сконцентрирован в областях, близких к ядру.



5А



5Б



5В

Рис. 5. Клетки C2C12 в культуре. А: 2 день культивирования, х200. Б: Миосимпласты. 3 сутки на дифференцировочной среде, х200 В: Крупная миотуба, выделенная из мышцы мышцы с мутацией в гене дисферлина. 9 сутки культивирования. х400. Фазово-контрастная микроскопия. Фото автора. ЦНИЛ РязГМУ

На промежуточных стадиях дифференцировки клетки принимают более вытянутую форму, при этом занимая практически всю свободную поверхность субстрата. При ультраструктурном анализе видны начальные признаки формирования актиновых и миозиновых нитей – Z-тельца, представляющие собой примитивные актин-связывающие структуры [27].

В ходе дальнейшей дифференцировки, путем слияния отдельных миобластов, формируются миотубы. Они представляют собой веретенообразные структуры длиной 100-600 мкм, шириной 30-50 мкм, содержащие большое количество ядер. В них присутствуют саркомеры и миофибриллы, по строению сходные с аналогичными образованиями скелетных мышц; цитоплазма

содержит большое количество актина и миозин. На некоторых мембранах обнаруживаются пузырьвидные выпячивания (blebbing), которые могут свидетельствовать об электрофизиологической активности мембраны [27]. Помимо миотуб, присутствуют одноядерные миобласты, которые не подверглись дифференцировке. Их количество составляет около 50% от первоначального количества клеток [28].

На всех стадиях дифференцировки в культуре C2C12 присутствуют крупные клетки, содержащие актин и миозин. Они имеют более округлую форму, чем миобласты, содержат одно очень крупное полиплоидное ядро. По мнению некоторых авторов, эти клетки являются дедифференцировавшимися миотубами [29].

Другая широко распространённая линия миобластов, L6, морфологически не отличается от C2C12, однако отличается профилем экспрессии генов. Одним из важнейших отличий является высокий уровень экспрессии глюкозного транспортера GLUT-4, поэтому клетки L6 используются для изучения сигнальных путей инсулина [30], процессов обмена глюкозы [31] в мышцах, а также как модель для исследований сахарного диабета [32].

Клетки линии MM14 являются мышечными миозин-негативными миобластами, стабильными при наличии в питательной среде FGF2 и дифференцирующимися в мышечные трубочки при его отсутствии. В ходе дифференцировки *in vitro* происходит диссоциация фенотипов: большая часть клеток быстро (6-7 часов) начинает экспрессировать мышечно-специфические белки, меньшая часть дифференцируется со значительной задержкой [33].

Заключение

В настоящее время культуральный

метод широко используется при исследовании процессов слияния миобластов и регенерации скелетной мышечной ткани в норме и патологии. Исследования позволяют в режиме реального времени наблюдать ответ клеток на различные воздействия, проводить манипуляции с геномом, например, трансфекцию, используя меньшие усилия и материальные затраты, по сравнению с подобными экспериментами *in vivo*. При помощи клеточных культур проводятся исследования, направленные на изучение патофизиологии и поисков подходов к лечению наследственных заболеваний мышц, таких как спинальная мышечная атрофия и мышечная дистрофия Дюшенна [34], а также в экспериментах по восстановлению скелетной мышечной ткани с помощью методов тканевой инженерии [35]. Миобласты также находят своё применение за пределами изучения скелетной мышечной ткани. К примеру, существует возможность индуцировать скелетные миобласты к дифференцировке *in vitro* в кардиомиогенном направлении для терапии ишемической болезни сердца [36]. Кроме того, предложены способы культивирования миобластов в крупных масштабах с целью получения из них биомассы, которая может быть использована для изготовления пищевых продуктов [37]. Таким образом, роль культивирования элементов мышечной ткани довольно значительна.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Даниилу Игоревичу Проскунову (Военно-медицинская Академия имени С. М. Кирова) за поиск оригинальных иллюстраций Н. Г. Хлопина.

Литература

1. Данилов Р.К. Руководство по гистологии. 2 изд. СПб.: СпецЛит; 2011.
2. Frontera W.R., Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function // *Calcified Tissue International*. 2015. Vol. 96, №3. P. 183-195. doi: 10.1007/s00223-014-9915-y
3. Хлопин Н.Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Л.: Печатный двор; 1946.
4. Palmer D.K., Angello J.C., Margolis R.L. 2-Aminopurine Induces Spindle Cell Morphology in MM14 Myoblasts in the Absence of Differentiation Signals // *Experimental Cell Research*. 1997.

- Vol. 230, №2. P. 262-274.
5. Hindi L., McMillan J.D., Dil A., et al. Isolation, Culturing, and Differentiation of Primary Myoblasts from Skeletal Muscle of Adult Mice // *Bio-protocol*. 2017. Vol. 7, №9. P.e2248. doi:10.21769/BioProtoc.2248
 6. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed. Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons, Inc; 2010.
 7. Yamamoto D.L., Csikasz R.I., Li Y. Myotube Formation on Micro-patterned Glass: Intracellular Organization and Protein Distribution in C2C12 Skeletal Muscle Cells // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008. Vol. 56, №10. P. 881-892. doi:10.1369/jhc.2008.951228
 8. Давыдова А.Я., Смолина Н.А., Костарева А.А., и др. Разработка экспериментальных клеточных моделей исследования механизмов регенерации и дегенерации мышечной ткани *in vitro* // *Biological Communications*. 2014. №4. С. 108-119.
 9. Смолина Н.А., Давыдова А.Я., Щукина И.А., и др. Сравнительная оценка методов получения функционально активных дифференцированных мышечных клеток // *Цитология*. 2014. Т. 56, №4. С. 291-299.
 10. Pasut A., Jones A.E., Rudnicki M.A. Isolation and Culture of Individual Myofibers and their Satellite Cells from Adult Skeletal Muscle // *Journal of Visualized Experiments*. 2013. №73. P. e50074. doi:10.3791/50074
 11. Owens J., Moreira K., Bain G. Characterization of primary human skeletal muscle cells from multiple commercial sources // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2013. Vol. 49, №9. P. 695-705. doi:10.1007/s11626-013-9655-8
 12. Hindu S.M., Tajrishi M.M., Kumar A. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion // *Science Signaling*. 2013. Vol. 6, №272:re2. doi:10.1126/scisignal.2003832
 13. Stern-Straeter J., Bran G., Riedel F., et al. Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering // *International Journal of Molecular Medicine*. 2008. Vol. 21, №1. P. 49-56.
 14. Cheng C.S., El-Abd Y., Bui K., et al. Conditions that promote primary human skeletal myoblast culture and muscle differentiation *in vitro* // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2014. Vol. 306, №4. P. 385-395. doi:10.1152/ajpcell.00179.2013
 15. Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S. Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells – induction and application // *World Journal of Stem Cells*. 2017. Vol. 9, №6. P. 89-97. doi: 10.4252/wjsc.v9.i6.89
 16. Zhongmin L., Huimin F., Yang L., et al. Experimental Studies on the Differentiation of Fibroblasts into Myoblasts induced by MyoD Genes *in vitro* // *International Journal of Biomedical Science*. 2008. Vol. 4, №1. P. 14-19.
 17. Копанцева Е.Е., Белявский А.В. Регуляторы скелетно-мышечного миогенеза // *Молекулярная биология*. 2016. Vol. 50, №2. P. 195-222. doi: 10.7868/S0026898416010079
 18. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки // *Доклады АН СССР*. 1969. Т. 187, №2. С. 473-479.
 19. Зорин В.Л., Зорина А.И., Еремин И.И., и др. Десна, как источник стромальных клеток с высоким дифференцировочным и репаративным потенциалом // *Гены & Клетки*. 2017. Т. 12, №2. С. 37-51. doi:10.23868/201707014
 20. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues // *Cell Proliferation*. 2017. Vol. 50, №2. doi:10.1111/cpr.12334
 21. Iacobazzi D., Swim M.M., Albertario A., et al. Thymus-Derived Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Clinical-Grade Cardiovascular // *Tissue Engineering. Part A*. 2018. Vol. 24, №9-10. P. 794-808. doi:10.1089/ten.TEA.2017.0290
 22. Fournier B., Ferre F., Couty L., et al. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue // *Tissue Engineering. Part A*. 2010. №16. P. 2891-2899. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0796
 23. Зорин В.Л., Еремин И.И., Рыбко В.А., и др. Слизистая оболочка полости рта – новый источник получения миобластов // *Гены & Клетки*. 2014. Т. 9, №3. С. 76-84.
 24. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126, №4. P. 663-676.
 25. Hosoyama T., McGivern J.V., Van Dyke J.M., et al. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture // *The Stem Cells Translational Medicine*. 2014. Vol. 3, №5. P. 564-574. doi: 10.5966/sctm.2013-0143
 26. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle // *Nature*. 1977. Vol. 270, №5639. P. 725-727.
 27. Burattini S., Ferri P., Battistelli M. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization // *European Journal of Histochemistry*. 2004. Vol. 48, №3. P. 223-233.
 28. Yoshida N., Yoshida S., Koishi K.J. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells' // *Journal of Cell science*. 1998. Vol. 111, №6. P. 769-779.
 29. McGann C.J., Odelberg S.J., Keating M. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract // *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences. 2001. Vol. 98, №24. P. 13699-13704.
30. Engl J., Laimer M., Niederwanger A., et al. Olanzapine impairs glycogen synthesis and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells // *Molecular Psychiatry*. 2005. Vol. 10, №12. P. 1089-1096.
 31. Al-Zoairy R., Pedrini T.R., Khan M.I., et al. Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells // *Diabetes & Metabolic Syndrome*. 2017. Vol. 9, №1. doi:10.1186/s13098-016-0201-1
 32. Honardoost M., Keramati F., Arefian E., et al. Network of three specific microRNAs influence type 2 diabetes through inducing insulin resistance in muscle cell lines // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018. doi:10.1002/jcb.27381
 33. Palmer D.K., Angello J.C., Margolis R. 2-Aminopurine Induces Spindle Cell Morphology in MM14 Myoblasts in the Absence of Differentiation Signals // *Experimental Cell Research*. 1997. Vol. 230, №2. P. 262-274.
 34. Nguyen Q., Yokota T. Immortalized Muscle Cell Model to Test the Exon Skipping Efficacy for Duchenne Muscular Dystrophy // *Journal of Personalized Medicine*. 2017. Vol. 7, №4. doi:10.3390/jpm7040013
 35. Ostrovidov S., Hosseini V., Ahadian S., et al. Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications // *Tissue engineering. Part B, reviews*. 2014. Vol. 20, №5. P. 403-436. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0534
 36. Чепелева Е.В., Павлова С.В., Малахова А.А., и др. Получение культуры клеток из скелетной мускулатуры крысы для применения в клеточной терапии ишемических поражений сердца // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2015. Т. 19, №4-2. С. 28-32.
 37. Федорова Е.А. Способ культивирования миоцитов in vitro для получения биомассы миоцитов для пищевых целей. Патент РФ на изобретение №2506309. 10.02.2014. Бюл. №4. Доступно по: <http://www.freepatent.ru/images/patents/504/2506309/patent-2506309.pdf>. Ссылка активна на 18.09.2019.
- References**
1. Danilov RK. *Rukovodstvo po gistologii*. 2nd ed. Saint-Petersburg: SpetsLit; 2011. (In Russ).
 2. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*. 2015;96(3):183-95. doi:10.1007/s00223-014-9915-y
 3. Chlopin NG. *Obshchebiologicheskiye i eksperimentalniye osnovy histologii*. Leningrad: Pechatnyy dvor; 1946. (In Russ).
 4. Palmer DK, Angello JC, Margolis RL. 2-Aminopurine Induces Spindle Cell Morphology in MM14 Myoblasts in the Absence of Differentiation Signals. *Experimental Cell Research*. 1997; 230(2):262-74.
 5. Hindi L, McMillan JD, Dil A, et al. Isolation, Culturing, and Differentiation of Primary Myoblasts from Skeletal Muscle of Adult Mice. *Bio-protocol*. 2017;7(9):e2248. doi:10.21769/BioProtoc.2248
 6. Freshney R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed. Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons, Inc; 2010.
 7. Yamamoto DL, Csikasz RI, Li Y. Myotube Formation on Micro-patterned Glass: Intracellular Organization and Protein Distribution in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008;56(10):881-92. doi:10.1369/jhc.2008.951228
 8. Davydova AYa, Smolina NA, Kostareva AA, et al. Development and evaluation of mouse cell culture models to study mechanisms of muscle regeneration and degeneration in vitro. *Biological Communications*. 2014;(4):108-19. (In Russ).
 9. Smolina NA, Davydova NA, Schukina IA, et al. Comparative assessment of different approaches for obtaining terminally differentiated cell lines. *Cell and Tissue Biology*. 2014;8(4):321-9. (In Russ).
 10. Pasut A, Jones AE, Rudnicki MA. Isolation and Culture of Individual Myofibers and their Satellite Cells from Adult Skeletal Muscle. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(73):e50074. doi:10.3791/50074
 11. Owens J, Moreira K, Bain G. Characterization of primary human skeletal muscle cells from multiple commercial sources. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2013;49(9):695-705. doi:10.1007/s11626-013-9655-8
 12. Hindu SM, Tajrishi MM, Kumar A. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. *Science Signaling*. 2013;6(272):re2. doi:10.1126/scisignal.2003832
 13. Stern-Straeter J, Bran G, Riedel F, et al. Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering. *International Journal of Molecular Medicine*. 2008;21(1):49-56.
 14. Cheng CS, El-Abd Y, Bui K, et al. Conditions that promote primary human skeletal myoblast culture and muscle differentiation in vitro. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2014;306(4):385-95. doi:10.1152/ajpcell.00179.2013
 15. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells – induction and application. *World Journal of Stem Cells*. 2017;9(6):89-97. doi:10.4252/wjsc.v9.i6.89
 16. Zhongmin L, Huimin F, Yang L, et al. Experimental Studies on the Differentiation of Fibroblasts into Myoblasts induced by MyoD Genes in vitro. *International Journal of Biomedical Science*. 2008;4(1):14-9.
 17. Kopantseva EE, Belyavsky AV. Key regulators of skeletal myogenesis. *Molecular Biology*. 2016;50(2):195-222. (In Russ). doi:10.7868/S0026898416010079
 18. Chaylachyan RK, Lalykyna KS. Spontannaya i inducirivanaya differencirovka kostnoy tkani v po-

- pulyacii fibroblastobodobnyh kletok, poluchen-nuch iz dlitelnykh mnogoslounuch kultur kostnogo mozga i selezyonki. *USSR Academy of Science Reports*. 1969;187(2):473-9. (In Russ).
19. Zorin VL, Zorina AI, Eremin II, et al. Gingiva as a source of stromal cells with high differentiating and reparative potential. *Genes & Cells*. 2017; 12(2):37-51. (In Russ). doi:10.23868/201707014
 20. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Proliferation*. 2017;50(2). doi:10.1111/cpr.12334
 21. Iacobazzi D, Swim MM, Albertario A, et al. Thy-mus-Derived Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Clinical-Grade Cardiovascular. *Tissue Engineering. Part A*. 2018;24(9-10):794-808. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0290
 22. Fournier B, Ferre F, Couty L, et al. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tis-sue Engeneering. Part A*. 2010;(16):2891-9. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0796
 23. Zorin VL, Eremin II, Rybco VA, et al. Oral mucosais a new source for myoblast derivation. *Genes & Cells*. 2014;9(3):76-84. (In Russ).
 24. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripo-tent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4):663-76.
 25. Hosoyama T, McGivern JV, Van Dyke JM, et al. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture. *The Stem Cells Translational Medicine*. 2014;3(5):564-74. doi:10.5966/sctm.2013-0143
 26. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentia-tion of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977;270(5639):725-7.
 27. Burattini S, Ferri P, Battistelli M. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle develop-ment: morpho-functional characterization. *Europe-an Journal of Histochemistry*. 2004;48(3):223-33.
 28. Yoshida N, Yoshida S, Koishi KJ. Cell heteroge-neity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *Journal of Cell Science*. 1998;111(6):769-79.
 29. McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT. Mammali-an myotube dedifferentiation induced by newt re-generation extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(24):13699-704.
 30. Engl J, Laimer M, Niederwanger A, et al. Olan-zapine impairs glycogen synthesis and insulin sig-naling in L6 skeletal muscle cells. *Molecular Psy-chiatry*. 2005;10(12):1089-96.
 31. Al-Zoairy R, Pedrini TR, Khan MI, et al. Seroto-nin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. *Diabetes & Metabolic Syndrome*. 2017;9(1). doi:10.1186/s13098-016-0201-1
 32. Honardoost M, Keramati F, Arefian E, et al. Net-work of three specific microRNAs influence type 2 diabetes through inducing insulin resistance in muscle cell lines. *Journal of Cellular Biochemis-try*. 2018. doi:10.1002/jcb.27381
 33. Palmer DK, Angello JC, Margolis R. 2-Amino-purine Induces Spindle Cell Morphology in MM14 Myoblasts in the Absence of Differentiation Signals. *Experimental Cell Research*. 1997;230(2): 262-74.
 34. Nguyen Q, Yokota T. Immortalized Muscle Cell Model to Test the Exon Skipping Efficacy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Personal-ized Medicine*. 2017;7(4). doi:10.3390/jpm7040013
 35. Ostrovidov S, Hosseini V, Ahadian S, et al. Skele-tal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications. *Tissue engineering. Part B, reviews*. 2014;2(5):403-36. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0534
 36. Chepeleva EV, Pavlova SV, Malakhova AA, et al. Cell culture from rat skeletal muscles to be used for cellular therapy of ischemic heart disease. *Patologiya Krovoobrashcheniya i Kardiokhirur-giya*. 2015;19(S4-2):28-32. (In Russ).
 37. Fedorova EA. *Sposob kultivirovaniya myoblastov in vitro dlya polucheniya byomassy myocitow dlya pishceyuch tseley*. Ratent RUS №2506309. 10.02.2014. B. №4. Available at: <http://www.free-patent.ru/images/patents/504/2506309/patent-2506309.pdf>. Accessed: 2019 September 18. (In Russ).

Информация об авторах [Authors Info]

Був Денис Олегович – студент лечебного факультета, Рязанский государственный университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Рос-сийская Федерация.

SPIN: 9956-9294, ORCID ID: 0000-0003-3016-5378.

Denis O. Buev – Student of the Medical Faculty, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

SPIN: 9956-9294, ORCID ID: 0000-0003-3016-5378.

Емелин Алексей Михайлович – студент лечебного факультета, Рязанский государственный университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

SPIN: 5605-1140, ORCID ID: 0000-0003-4109-0105.

Alexey M. Emelin – Student of the Medical Faculty, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

SPIN: 5605-1140, ORCID ID: 0000-0003-4109-0105.

Яковлев Иван Антонович – н.с., Институт стволовых клеток человека, Москва, Российская Федерация; аспирант, Казанский (При-волжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация.

SPIN: 8222-2234, ORCID ID: 0000-0001-8389-3841, Researcher ID: L-1658-2015.

Ivan A. Yakovlev – Research Associate, Institute of Human Stem Cells, Moscow, Russian Federation; PhD-Student, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation.

SPIN: 8222-2234, ORCID ID: 0000-0001-8389-3841, Researcher ID: L-1658-2015.

Деев Роман Вадимович – к.м.н., доц., Институт стволовых клеток человека, Москва, Российская Федерация.

SPIN: 2957-1687, ORCID ID: 0000-0001-8389-3841, Researcher ID: L-1658-2015.

Roman V. Deev – MD, PhD, Associate Professor, Institute of Human Stem Cells, Moscow, Russian Federation.

SPIN: 2957-1687, ORCID ID: 0000-0001-8389-3841, Researcher ID: L-1658-2015.

Цитировать: Бувев Д.О., Емелин А.М., Яковлев И.А., Деев Р.В. Культивирование миобластов и миосателлитцитов *in vitro* // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2020. Т. 8, №1. С. 86-97. doi:10.23888/HMJ20208186-97

To cite this article: Buev DO, Emelin AM, Yakovlev IA, Deev RV. Cultivation of myoblasts and myosatellitocytes *in vitro*. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(1):86-97. doi:10.23888/HMJ20208186-97

Поступила / **Received:** 14.11.2019
Принята в печать / **Accepted:** 02.03.2020