УДК 57.085.23.576.5
DOI: 10.7868/S3034606126020070

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МИОМЕЙКЕРА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МИОБЛАСТОВ КРЫСЫ

А. Р. Токмакова[1], О. И. Парфирова[1], А. И. Маломуж[1, 2], Г. В. Сибгатуллина[1, *]

*[1] Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН
Казань, 420111, Российская Федерация*

*[2] Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева – КАИ
Казань, 420111, Российская Федерация*

** E-mail: kam-guz@yandex.ru*

Аннотация. **Обоснование и цель.** Слияние миобластов — многоступенчатый процесс, требующий тесного взаимодействия между клетками, объединения их мембран и сопровождающейся перестройкой актинового цитоскелета. Белок миомейкер (myomaker, Mymk) играет одну из важных ролей в реакции слияния мембран миобластов. Белок был обнаружен относительно недавно, и многие аспекты его участия в процессах миогенеза остаются недостаточно изученными. **Цель** нашего исследования заключалась в анализе экспрессии миомейкера в первичных культурах миобластов крысы в норме и после действия гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в культуре. **Метод:** полимеразная цепная реакция. **Результаты.** Были подобраны праймеры к генам, участвующим в регуляции миогенеза,— *Mymk, MyoD* и *MyoG*. Показана экспрессия гена *Mymk* в клетках уже через 1 сут после высевания культуры, и в дальнейшем уровень его экспрессии увеличивается по мере роста количества миотуб в культуре. Добавление 0.1 нМоль ГАМК значительно увеличивает уровень экспрессии *Mymk*, однако роста индекса слияния миобластов при этом не происходит. **Заключение.** Впервые охарактеризована динамика экспрессии миомейкера в культивируемых миобластах крыс. Показано, что увеличение уровня экспрессии миомейкера под действием ГАМК не является триггером слияния миобластов.

Ключевые слова: миогенез, миобласты, миотубы, первичная культура, *Mymk*, *MyoD*, *MyoG*, ГАМК

Принятые сокращения: ГАМК — гамма-аминомасляная кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-24-00201).

Соблюдение этических стандартов. Все эксперименты с животными выполнены с соблюдением требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными (2013), директив Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС о защите животных, использующихся для научных целей, и одобрены комиссией по биоэтике Казанского научного центра РАН (экспертное заключение № 22/6 от 09.06.2022 и № 23/7 от 28.02.2023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о вкладе авторов. ТАР — дизайн праймеров, проведение экспериментов, анализ экспериментальных данных; ПОИ — консультирование и помощь в проведении ПЦР; МАИ — консультации при анализе экспериментальных данных, редактирование статьи; СГВ — руководство, разработка дизайна исследования, анализ экспериментальных данных, написание текста и редактирование статьи.

Для цитирования: Токмакова А. Р., Парфирова О. И., Маломуж А. И., Сибгатуллина Г. В. *Цитология / Cell and Tissue Biology*. 2026. Т. 68. № 2. С. 180—190. https://doi.org/10.7868/S3034606126020070

Поступила в редакцию 03.12.2025
После доработки 26.02.2026
Принята к публикации 27.02.2026

© Токмакова А. Р., Парфирова О. И., Маломуж А. И., Сибгатуллина Г. В., 2026

ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 2, с.180—190

DOI: 10.7868/S3034606126020070

Features of Myomaker Expression in Primary Rat Myoblast Cultures

A. R. Tokmakova[a], O. I. Parfirova[a], A. I. Malomouzh[a, b], G. V. Sibgatullina[a, *]

[a] *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences Kazan, 420111, Russian Federation*

[b] *Kazan National Research Technical University (KAI), Kazan, 420111, Russian Federation*

** E-mail: kam-guz@yandex.ru*

Abstract. **Objective:** Myoblast fusion is a multistep process requiring close interactions between cells, membrane fusion, and the accompanying reorganization of the actin cytoskeleton. The myomaker protein (Mymk) plays one of the important roles in myoblast membrane fusion. This protein was discovered relatively recently, and many aspects of its involvement in myogenesis remain poorly understood. The aim of this study was to analyze myomaker expression in primary rat myoblast cultures under normal conditions and after incubation with gamma-aminobutyric acid (GABA). **Method:** Polymerase chain reaction. **Results:** Primers for genes involved in the regulation of myogenesis (*Mymk*, *MyoD*, and *MyoG*) were constructed. *Mymk* expression was observed in cells as early as 24 h after culture seeding, and its expression level subsequently increased together with the number of myotubes in the culture. The addition of GABA at a concentration of 0.1 nM causes a significant increase in *Mymk* expression, but does not result in an increase in the fusion index. **Conclusions:** For the first time, the dynamics of myomaker expression in cultured rat myoblasts was characterized. It has been shown that an increase in myomaker expression under the influence of GABA does not trigger myoblast fusion.

Keywords: myogenesis, myoblasts, myotubes, primary culture, *Mymk*, *MyoD*, *MyoG,* GABA

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project ID:25-24-00201).

Ethics approval and consent to participate. All animal experiments were carried out in compliance with the requirements of the Helsinki Declaration on the humane treatment of animals (2013), Directives of the European Parliament and of the Council of the European Union 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, and were approved by the Bioethics Commission of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (protocol no. 22/6 dated September 06, 2022 and no. 23/7 dated February 28, 2023).

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Author contribution. TAR — primer design, investigation, experimental data analysis; POI — consulting and assistance in conducting PCR; MAI — consultations in experimental data analysis, draft editing; SGV — project administration, investigation, experimental data analysis, original draft preparation and editing.

For citation. Tokmakova A. R., Parfirova O. I., Malomouzh A. I., Sibgatullina G. V**.** Myomaker expression in primary rat myoblast cultures. *Tsitologiya / Cell and Tiss. Biol.* 2026. V. 68. No. 2. P. 180—190. https://doi.org/10.7868/S3034606126020070

Received December 3, 2025
Revised February 26, 2026
Accepted February 27, 2026

© Tokmakova A. R., Parfirova O. I., Malomouzh A. I., Sibgatullina G. V., 2026

Миогенез является одним из основополагающих процессов формирования тела высших животных и человека, а также лежит в основе подвижности организма. Несмотря на давнюю историю исследований миогенеза, некоторые аспекты формирования мышечной ткани все еще остаются неизвестными. В частности, в последнее время стали появляться данные о том, что такие сигнальные молекулы, как нейромедиаторы, могут участвовать в регуляции миогенеза. Было показано, что ацетилхолин может оказывать стимулирующий эффект на рост эксплантов скелетной мышцы цыпленка (Лопатина и др., 2023), а гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) повышает уровень пролиферации и экспрессии *MyoD* клеточной линии C2C12 (Uehara, Hokazono, 2022). В то же время на первичной культуре миобластов крысы нами была обнаружена угнетающая способность ГАМК в отношении слияния миобластов в миотубы (Токмакова и др., 2023).

Относительно недавно был открыт новый белок, принимающий участие в формировании мышечной ткани — миомейкер (myomaker, Mymk) (Millay et al., 2013). Было показано, что Mymk является мембранным белком и его роль заключается в катализе слияния мембран миобластов. Этот белок появляется уже на ранних этапах дифференцировки, и его содержание увеличивается в миотубах (Gamage et al., 2017). Однако механизмы его регуляции еще не до конца изучены.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе динамики экспрессии миомейкера в первичной культуре миобластов крысы в норме и при добавлении в культуральную среду нейромедиатора — ГАМК. Кроме того, анализировали согласованность экспрессии миомейкера с другими генами, регулирующими миогенез, такими как гены миогенных регуляторных факторов *MyoD*, кодирующий белок миогенной дифференцировки и *MyoG*, кодирующий белок миогенин.

Для проведения исследований был осуществлен подбор эффективно работающих праймеров. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является неотъемлемой частью подавляющего большинства современных исследований, касающихся развития организма, поскольку позволяет охарактеризовать изменение экспрессии генов, участвующих в реализации программ онтогенеза. Ключевым моментом при использовании ПЦР является подбор праймеров — коротких олигонуклеотидов, которые необходимы для работы ДНК-полимеразы и являются специфичными к фрагментам исследуемого гена. В настоящее время общая база праймеров отсутствует, так же, как и не существует «стандартного» праймера для большинства генов. При этом не во всех статьях авторы приводят последовательности праймеров. Кроме того, анализ представленных в литературе праймеров к одному и тому же гену показал наличие существенных различий. В нашей работе уделено значительное внимание процедуре подбора праймеров к генам миогенных регуляторных факторов, таким как *MyoD*, *MyoG* и мембранному активатору слияния миобластов *Mymk*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение первичной культуры. Исследование проводили на первичных культурах миобластов, полученных из крысят постнатального развития (П3–П5) согласно описанному ранее протоколу (Sibgatullina et al., 2024). Изолированную мышечную ткань задних конечностей промывали в физиологическом растворе и помещали в 0.05%-ный раствор коллагеназы (Gibco, США) в термостат при 37 °C на 30—40 мин, ресуспендируя каждые 10 мин. Затем суспензию центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин и промывали раствором Дульбекко («ПанЭко», Россия), процедуру повторяли трижды. После последнего центрифугирования жидкость отбирали, осадок ресуспендировали в среде культивирования. Клетки высаживали в 12-луночные планшеты. Начальная плотность составляла 2×10^5 кл./мл. Клетки культивировали в модернизированном CO_2-инкубаторе (Суслов и др., 2022) при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. На стадии роста клетки культивировали на среде ДМЕМ/F-12 («ПанЭко», Россия), содержащей 1% L-глутамина («ПанЭко», Россия), 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific GmbH, Германия). На третьи сутки культивирования проводили замену среды на среду дифференцировки, которая отличалась от среды роста замещением 10% фетальной бычьей сыворотки на 2% лошадиной сыворотки (Gibco, США).

Определение ростовых параметров культуры. Для определения плотности культуры ее фотографировали в фазовом контрасте и анализировали в программе ImageJ. Для подсчета митотического индекса и количества образующихся миотуб клетки окрашивали 2%-ным раствором орсеина (Fluka, Испания). Митотический индекс определяли в процентах, считая делящиеся клетки и определяя их долю от общего числа клеток в поле зрения (Lee et al., 2015). Количество миотуб определяли прямым подсчетом образующихся миотуб в поле зрения. Фазово-контрастную микроскопию проводили с использованием инвертированного микроскопа Leica DMIL LED (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Конструирование праймеров. Для проведения анализа экспрессии интересующих нас генов были выбраны последовательности, представленные в литературных источниках, а также сконструированы собственные. Важно отметить, что при поиске праймеров в литературных источниках мы, в первую очередь, ориентировались на работы, выполненные на клеточных линиях крыс, а также на самих животных, но таких работ оказалось не очень много. Кроме того, авторы не всегда приводят в статье используемые генетические последовательности (Ribas et al., 2014; Trajano et al., 2017; Awad et al., 2021). В некоторых случаях в литературе были обнаружены последовательности, которые, при проверке с помощью Primer Blast, оказывались неспецифичными. После первичной проверки последовательностей с помощью Primer Blast часть праймеров была отсеяна, включая некоторые последовательности, приведенные в литературе.

Для составления праймеров был использован онлайн-ресурс Primer-BLAST, интегрированный в базу данных NCBI. Информацию по нуклеотидной последовательности генов интереса и референсных генов получали из базы данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). При конструировании руководствовались стандартными требованиями к праймерам (Козырева и др., 2021). Для предварительной проверки специфичности праймеров был использован также Primer-BLAST, при этом в разделе Primer Parameters в графы Use my own forward primer и Use my own reverse primer вводили прямой и обратный праймеры соответственно. Также выбирали базу данных Genomes for selected organisms (primary assembly only), указывали организм — *Rattus norvegicus*. Поиск с установленными параметрами выдает все возможные ПЦР-продукты для анализируемой пары праймеров. При идеально подобранных праймерах программа выдаст только один целевой ПЦР-продукт (Козырева и др., 2021).

Выделение РНК и проведение ПЦР. Для выделения РНК клетки инкубировали в 1 мл ExtractRNA Reagent («Евроген», Россия), дальнейшие процедуры выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Количественную ПЦР проводили с использованием мастер-микса 5X qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Праймеры для целевых и референсных генов синтезированы фирмой «Евроген» (Россия), а также фирмой «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). ПЦР проводили в следующих условиях: 95 °C в течение 2 мин, затем 45 циклов при 94 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 15 с и 72 °C в течение 30 с. После этого анализировали кривую плавления в диапазоне температур от 60 до 95 °C. Реакции и изменения флуоресцентного излучения регистрировали с помощью системы количественной ПЦР CFX96 (Bio-Rad, США). Эффективность амплификации E для всех праймеров определяли с помощью серии разведений пула кДНК. Дополнительные контрольные образцы включали как отсутствие обратной транскриптазы для измерения степени остаточного загрязнения геномной ДНК, так и отсутствие матрицы, кодирующей ДНК. Относительный уровень экспрессии каждого гена определяли как соотношение между количеством кДНК, соответствующим целевому гену, и значением коэффициента нормализациии, рассчитанного для каждого образца с помощью программного обеспечения Excel (Microsoft Office 2013, США) на основе уровня транскрипции референсного гена.

Статистический анализ. Формирование базы данных осуществляли с помощью пакета программ Excel (Microsoft Office 2013, США). Полученные данные анализировали с использованием программы OriginPro 2021 (OriginLab Corp., США). Анализ параметрических групп выполнен с использованием *t*-критерия Стьюдента с представлением результата в виде среднего арифметического M и его стандартного отклонения SD, непараметрических групп — с использованием U-критерия Манна–Уитни. Использовали поправку Бонферрони при множественном сравнении. Отличия считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ростовые характеристики первичной культуры миобластов крысы. Для первичных культур миобластов, получаемых нами из новорожденных крысят, характерен следующий культуральный цикл, представленный на рис. 1.

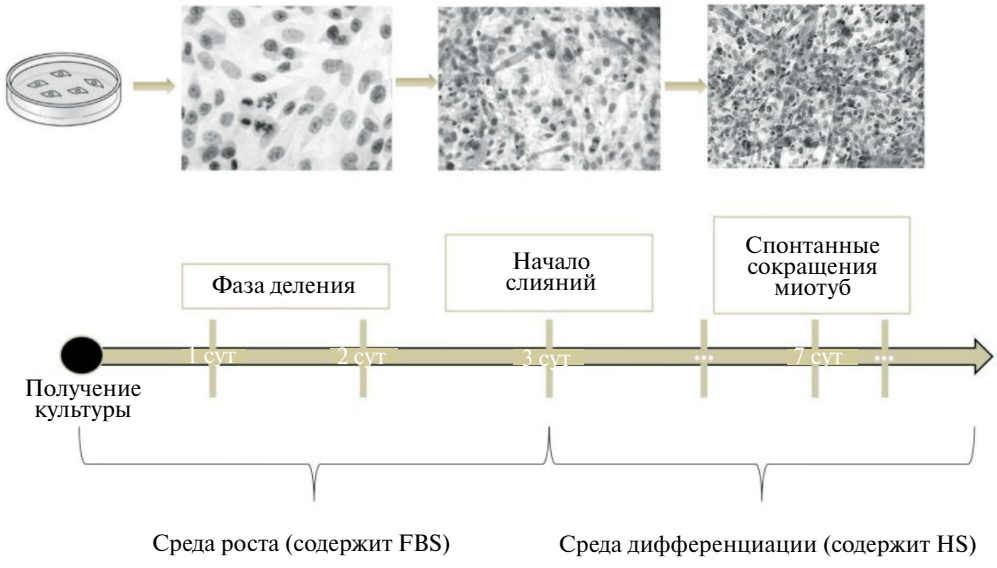


Рис. 1. Схема культурального цикла первичной культуры миобластов крысы. FBS – фетальная бычья сыворотка, HS – лошадиная сыворотка.

В течение первых двух суток после высевания наблюдается стадия активного деления клеток на среде роста, содержащей фетальную бычью сыворотку (рис. 2*а*).

К третьим суткам культивирования плотность клеток достигает практически 100 % (рис. 2*б*). В это же время наблюдается появление миотуб — клеточных элементов с тремя и более ядрами (рис. 2*в*). В это время для активации дифференцировки клеток производится замена среды на среду, содержащую лошадиную сыворотку. В дальнейшем наблюдается увеличение количества многоядерных миотуб, которые к седьмым суткам приобретают способность к спонтанным сокращениям.

Динамика экспрессии *Mymk*, *MyoD* и *MyoG* в течение культурального цикла. Для оценки динамики экспрессии генов интереса после первичного отбора последовательностей из представленных в литературе и собственного дизайна были выбраны 4 праймерные последовательности для *Mymk*, 4 из 6 последовательностей для *MyoD* и 3 из 4 — для *Myo*G, а для *GAPDH* — 5 из 6 (табл. 1). Далее были проведены контрольные ПЦР для проверки работоспособности праймеров. По их результатам были отобраны праймеры, показавшие наибольшую эффективность (табл. 2). В конечном итоге, для дальнейшей работы использовали по одному варианту праймера для каждого гена.

Исходя из культурального цикла, характерного для наших культур, мы выбрали для анализа экспрессии генов следующие временны́е точки: 1 сут — время начала процесса деления в клетках, 2 сут — время максимального митотического индекса и 7 сут — время, когда наблюдается большое количество миотуб.

В первую очередь был проверен референсный ген *GAPDH*. Гены дегидрогеназы GAPDH и β-тубулина наиболее часто используют в качестве классических референсных генов. Эти гены хорошо себя проявляют, когда исследование проводится на взрослых животных

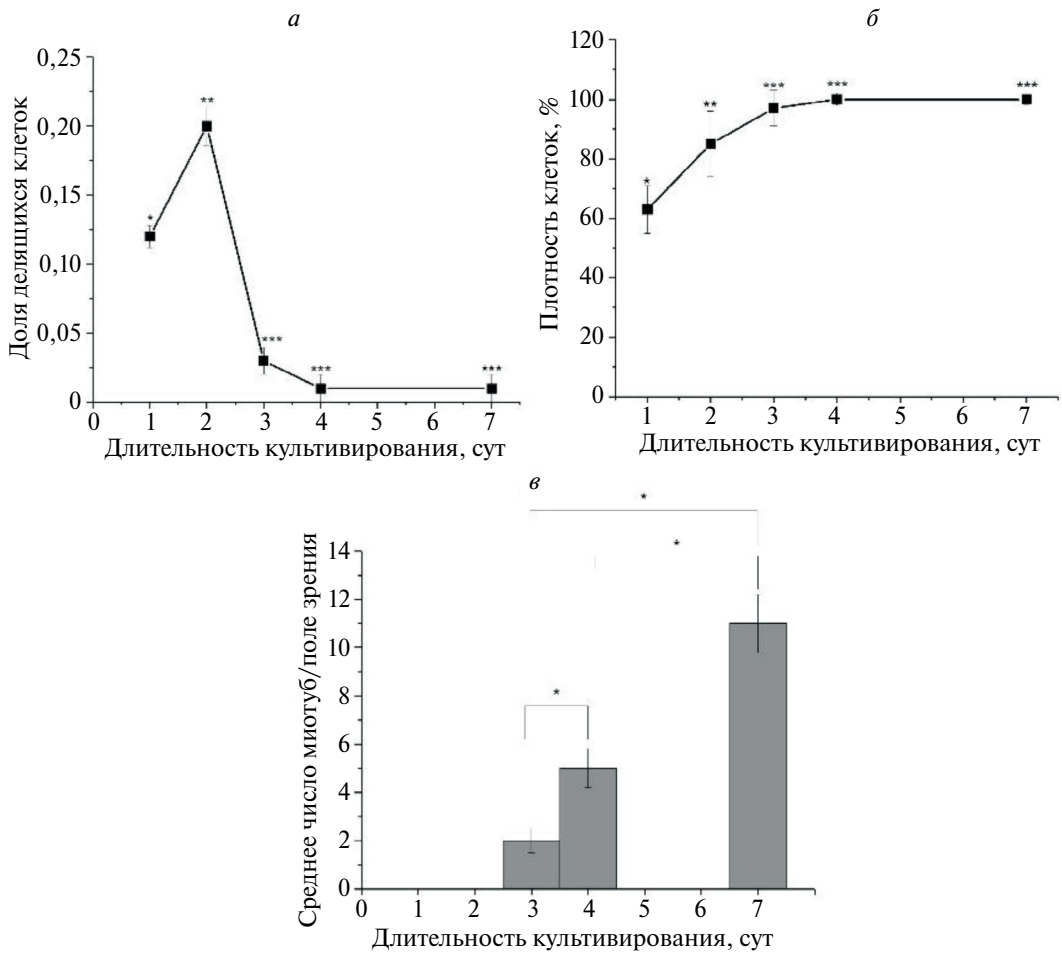


Рис. 2. Ростовые характеристики первичной культуры миобластов крысы: *а* — динамика клеточных делений, *б* — изменение плотности культуры, *в* — динамика образования миотуб. Показаны средние значения и их стандартные отклонения; (*) — различия достоверны при $P < 0.05$ (*t*-критерий Стьюдента)

Таблица 1. Праймеры к генам миогенеза *MyoD*, *MyoG, Mymk* и к референсному гену GAPDH и их характеристики

Последовательность прямая (F) и обратная (R)	*T* отжига, °C	ГЦ, %	СК	Объект	Источник
		MyoD			
F: CGACTGCCTGTCCAGCATAG R: GGACACTGAGGGGTGGAGTC	60.53 61.55	60.00 65.00	5.00 3.00	Взрослые крысы	Hyatt et al., 2010
F: AATCCGATTTACCAGGTGCTC R: GGCTTTGAAAGGACAATTGGG	58.08 57.96	47.62 47.62	7.00 7.00	Взрослые крысы	Tian et al., 2023
F: TAGTAGGCGGTGTCGTAGCC R: TACAGTGGCGACTCAGATGC	61.10 59.83	60.00 55.00	3.00 6.00	Взрослые мыши	Der Vartanian et al., 2019
F: TCCGTGTTTCGACTCACCAG R: CGTTAGTGGTCTTGCGCTTG	59.97 59.84	55.0 55.00	6.0 4.0	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: TCTGCTCCTTTGCGACACG R: GCACCGTAGTGGGGAAGTGT	64.50 66.00	57.90 60.00	2.0 3.0	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: ACAGTCCCTAGCACAGGGTG R: GTCCTGAACATGGGAAGGGAG	65.30 63.90	60.00 57.10	4.0 4.0	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
		MyoG			
F: AGTGCCATCCAGTACATTGAG R: TGTGGGAGTTGCATTCACTG	57.73 58.38	47.62 50.00	4.00 4.00	Взрослые крысы	Tian et al., 2023
F: CCTTGCTCAGCTCCCTCA R: TGGGAGTTGCATTCACTGG	58.60 57.66	61.11 52.63	5.00 4.00	ПК мышечных клеток-предшественников из крыс	Yamanouchi et al., 2021
F: TCCCAACCCAGGAGATCATTTG R: GTCCACGATGGACGTAAGGG	64.10 63.80	50.00 60.00	4.00 8.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: CTTGCTCAGCTCCCTCAACC R: GCCGCGAGCAAATGATCTCC	64.50 65.50	60.00 60.00	5.00 4.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
		Mymk			
F: GATGCTTCGCTTCTTCTTTGA R: AGCCTTCTTGTTGACCTTGG	56.91 58.01	42.86 50.00	4.00 3.00	ПК мышечных клеток-предшественников из крыс	Yamanouchi et al., 2021
F: TTCTTTGTGGCGTTCTCCCA R: GTGGTCATGGTAAGTCCGCA	59.82 60.04	50.00 55.00	3.00 4.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: GTCAGTCATGGGCAAAGGTTTCT R: GACGCCAAGCATTGTGAAGG	65.10 63.80	47.80 55.00	4.00 4.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: GTCAGTCATGGGCAAAGGTTTCTC R: GGACGCCAAGCATTGTGAAG	65.40 63.80	50.00 55.00	4.00 4.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
		GAPDH			
F: CATCTCCCTCACAATTCCATCC R: GAGGGTGCAGCGAACTTTAT	58.52 58.26	50.00 50.00	4.00 4.00	Взрослые крысы	Tian et al., 2023
F: CCGTGTTCCTACCCCCAATG R: CTCTCCCCCTACGTACAGGTT	64.30 64.30	60.00 57.10	3.00 6.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: TTCCGTGTTCCTACCCCCAA R: CTCCCCCTACGTACAGGTTTC	65.20 63.30	55.00 57.10	2.00 6.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: ATAGGAACTGGATGGTGGGGG R: AAAACGAGGCGGGTCCAAA	65.20 64.60	57.10 52.60	2.00 3.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: TATAGGAACTGGATGGTGGGGG R: GAGAGAGGCCCAGCTACTCG	64.80 65.00	54.50 65.00	4.00 4.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция
F: GACTCTACCCACGGCAAGTT R: GAAGGGGCGGAGATGATGAC	60.19 60.76	55.00 60.00	4.00 4.00	ПК миоцитов крысы	Новая конструкция

Примечание. T — температура, ГЦ — пара гуанин-цитозин, СК — самокомплементарность, ПК — первичная культура, новая конструкция — праймерная последовательность, сконструированная для данного исследования.

Таблица 2. Результаты оценочной полимеразной цепной реакции

	Последовательность	Пороговый цикл (Cq)	Пороговый цикл для воды	Температура плавления, ˚С	Температура плавления для воды, ˚С
		MyoD			
1	AATCCGATTTACCAGGTGCTC	0	43.83	0	74.5
2	**TCCGTGTTTCGACTCACCAG**	35.6	41.35	85.5	0
3	TCTGCTCCTTTGCGACACG	0			
4	ACAGTCCCTAGCACAGGGTG				
		MyoG			
1	AGTGCCATCCAGTACATTGAG	0	44.31	0	0
2	**TCCCAACCCAGGAGATCATTTG**	24.23	0	82.5	
3	CTTGCTCAGCTCCCTCAACC	26.77		88.5	
		Mymk			
1	GATGCTTCGCTTCTTCTTTGA	0	0	0	0
2	GTCAGTCATGGGCAAAGGTTTCT				
3	GTCAGTCATGGGCAAAGGTTTCTC	43.00		84.00	
4	**TTCTTTGTGGCGTTCTCCCA**	25.96		87.00	
		GAPDH			
1	**CCGTGTTCCTACCCCCAATG**	28.28	0	79.5	0
2	TTCCGTGTTCCTACCCCCAA	0		0	
3	ATAGGAACTGGATGGTGGGGG	35.9		84.5	
4	GACTCTACCCACGGCAAGTT	31.41	35.48	0	
5	TATAGGAACTGGATGGTGGGGG	0	45.3		

Примечание: жирным шрифтом выделены праймерные последовательности, которые были использованы для оценки динамики экспрессии генов интереса.

или когда работа построена на сравнении контрольного и экспериментального вариантов, получаемых в одной временной точке (Mastroyiannopoulos et al., 2012; Furukawa et al., 2018). Поскольку наше исследование касается работы с клетками, находящимися на разных фазах роста, необходимо было удостовериться в его конститутивной экспрессии в течение культурального цикла. По результатам ПЦР в реальном времени было установлено, что экспрессия данного гена стабильна между временными точками, и он может быть использован в дальнейших исследованиях для нормализации данных (рис. 3*а*).

При исследовании динамики уровня экспрессии генов, участвующих в регуляции миогенеза, обнаружено, что профили экспрессии изучаемых генов в течение культурального цикла различаются (рис. 3*б*).

Экспрессия *Mymk* начиналась уже с первых суток культивирования и в дальнейшем уровень экспрессии увеличивался. Уровень экспрессии *MyoD* в первичной культуре миобластов крысы оставался примерно на одном уровне в течение культурального цикла. Нами было обнаружено значительное увеличение уровня экспрессии *MyoG* на 2-е сутки культивирования. К 7-м суткам происходило снижение уровня экспрессии *MyoG*, тогда как уровень экспрессии *Mymk* продолжал увеличиваться.

Влияние ГАМК на уровень экспрессии *Mymk*. ГАМК в различных концентрациях вносили в среду культивирования через 1 сут после посадки клеток. Анализ экспрессии проводили через 24 ч после внесения. Установлено, что ГАМК оказывает дозозависимое влияние на уровень экспрессии *Mymk*. При этом наибольший стимулирующий эффект ГАМК оказывала в наименьшей концентрации (0.1 нМоль), тогда как в концентрации 1 мкМоль вызывала менее выраженное увеличение уровня экспрессии, а в концентрации 10 мМоль не вызывала достоверного возрастания уровня экспрессии (рис. 4). При этом увеличения числа формируемых в культуре миотуб не происходило: как в контрольной культуре, так и в культуре, подвергнутой воздействию ГАМК, миотубы обнаружены не были.

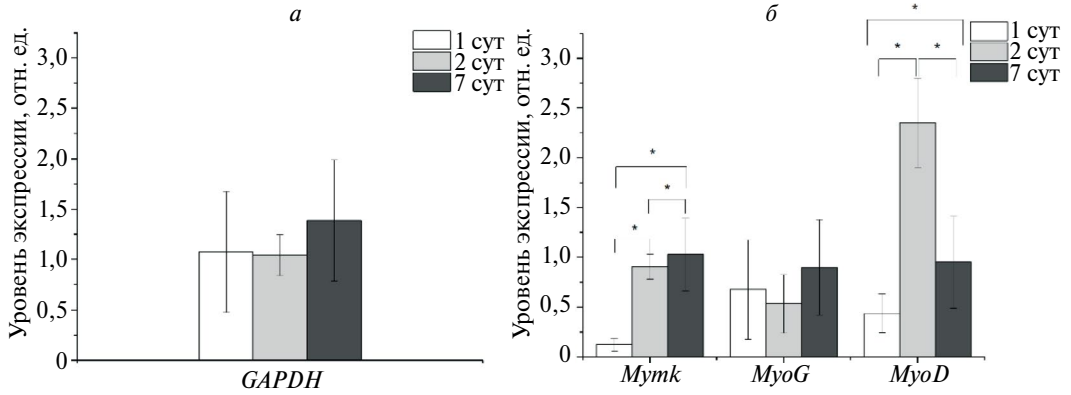


Рис. 3. Экспрессия генов миогенеза в первичной культуре миобластов крысы: *а* — динамика экспрессии референсного гена; *б* — динамика экспрессии *Mymk*, *MyoD*, *MyoG* в течение культурального цикла. Показаны средние значения и их стандартные отклонения; (*) — различия достоверны при $P < 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни)

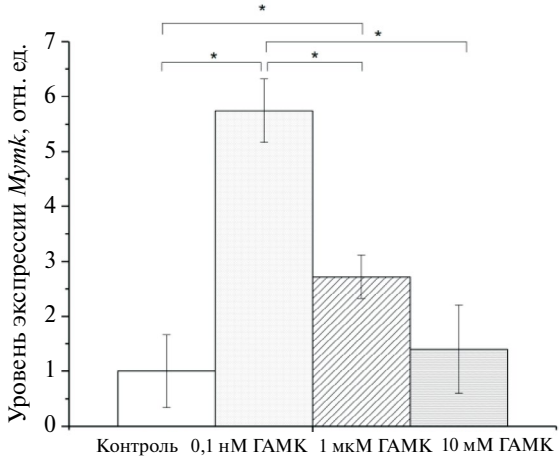


Рис. 4. Влияние экзогенной ГАМК на уровень экспрессия *Mymk* в первичной культуре миобластов крысы. Показаны средние значения и их стандартные отклонения; (*) — различия достоверны при $P < 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни)

ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе ростовых параметров получаемой нами первичной культуры миобластов крыс были обнаружены некоторые отличия от широко применяемой в исследованиях иммортализованной линии C2C12. Так, клетки C2C12 входят в логарифмическую фазу роста через 2 сут после высевания, а снижение уровня пролиферации наблюдается через 5 сут (Liu et al., 2012), тогда как в наших культурах мы наблюдаем пик митотического индекса тоже на вторые сутки, но далее темп пролиферации значительно снижается и к третьим суткам кривая плотности выходит на плато. Таким образом, полученные нами первичные культуры характеризуются более короткой фазой деления по сравнению с иммортализованной линией. Кроме того, клетки линии C2C12 начинают сливаться в миотубы через 2 сут после замены среды на индукционную для дифференцировки, на 3—5-е сутки авторы отмечали активное слияние и на 7—10-е — значительное количество многоядерных миотуб (Ferri et al., 2009).

В получаемой нами культуре запуск процесса дифференциации индуцируется уже на среде роста и многочисленные многоядерные клетки обнаруживаются уже на 5-е сутки. В целом характеристики получаемой нами первичной культуры близки к культуре, получаемой из эмбрионов крыс (Балан и Озернюк, 2011), для которой отмечено появление двуядерных клеток на 3-и сутки культивирования на среде для дифференцировки, а формирование многоядерных миотуб — на 5-е. При этом для культур, получаемых из крыс постнатального развития, двуядерные клетки авторы обнаруживали лишь на 7-е сути, а многоядерные миотубы — только на 10-е (Балан и Озернюк, 2011). Вероятно, такое различие характеристик с полученными нами связано с некоторыми особенностями процесса выделения клеток. Например, мы добавляем лошадиную сыворотку в среду дифференцировки, тогда как Балан и Озернюк (2011) используют фетальную бычью сыворотку, а она, как известно, имеет критическое значение для дифференцировки миоцитов (Lawson, Purslow, 2000; Sibgatullina et al., 2024).

Полученные нами данные об экспрессии *MyoD* и *MyoG* соответствуют ростовым характеристикам культуры и согласуются с данными литературы. Так, для наших культур, как и для первичных культур миогенных клеток, полученных из крыс разного возраста, транскрипты *MyoD* были выявлены на всех этапах дифференцировки и уровень их экспрессии существенно не различался в разные сроки (Балан, Озернюк, 2011). Как известно, экспрессия *MyoD* проходит на ранних стадиях миогенеза, и с ее началом клетки окончательно становятся на путь миогенной дифференцировки. Этот ген совместно с *Myf5* отвечает за спецификацию миобластов для терминальной дифференцировки, тогда как *MyoG* и *MRF4* вовлечены

в процесс дифференцировки и отвечают за экспрессию генов, специфичных для миотуб (Bentzinger et al., 2012). Соответственно, *MyoG* начинает экспрессироваться уже в ходе дальнейшей дифференцировки клеток после активации *MyoD*. Именно такую картину мы и наблюдаем в наших культурах: значительное увеличение уровня экспрессии *MyoG* наблюдается на вторые сутки культивирования накануне появления первых миотуб. Известно, что *MyoG* принимает участие в регуляции экспрессии *Mymk*, отвечающего за процесс слияния миоцитов, и их экспрессия происходит синхронно (Millay et al., 2013; Chen et al., 2020).

Как показали наши исследования, активация *Mymk* так же, как и *MyoG* отмечается на вторые сутки (рис. 3*б*). Однако если для *MyoG* мы видим пик уровня экспрессии, а затем снижение, то для *Mymk* наблюдается постепенное увеличение уровня экспрессии, коррелирующее с увеличением числа миотуб в культуре. Следует отметить, что участие *Mymk* в процессе дифференцировки было обнаружено относительно недавно (Millay et al., 2013), поэтому в литературе сложно найти данные по особенностям профиля его экспрессии в различных культурах. Тем не менее есть данные, что, с одной стороны, в культуре C2C12 экспрессия *Mymk* имеет выраженный пик на третьи сутки, и ее уровень выше по сравнению с уровнем экспрессии *MyoD* и *MyoG* (Millay et al., 2013). С другой стороны, на культуре миобластов цыпленка показано постепенное увеличение уровня экспрессии *Mymk* (Luo et al., 2015), сходное с профилем экспрессии, обнаруженным нами. В работе Комаровой с соавторами (Komarova et al., 2022) на миобластах крыс, полученных из взрослых животных, уровень экспрессии *Mymk* через 1 сут после высаживания культуры тоже находится на относительно низком уровне. Можно предположить, что обнаруженные отличия обусловлены особенностями роста первичной и иммортализированной культур.

В последнее время интерес исследователей вызывает влияние нейротрансмиттеров на процесс формирования мышечной ткани. Так, показано (Uehara, Hokazono, 2022), что внесение ГАМК в среду культивирования линии C2C12 в концентрации 1 или 10 мМоль вызывает увеличение уровня экспрессии *MyoD* и усиливает пролиферацию. В настоящей работе нами впервые показано влияние ГАМК на уровень экспрессии *Mymk*. При этом ГАМК в концентрации 10 мМоль не оказывала статистически значимого влияния на уровень экспрессии *Mymk*. При этом обнаруженная нами стимуляция экспрессии *Mymk* наномолярными концентрациями ГАМК не приводит к активации процесса слияния. Процесс формирования миотуб включает в себя большое число событий, таких как миграция миобластов, распознавание и адгезия, реорганизация актинового цитоскелета (Abmayr, Pavlath, 2012; Sampath, Millay, 2018; Koubek, Santy, 2022). В реализацию этих событий вовлечено большое количество разнообразных сигнальных и регуляторных молекул. Например, важными являются такие белки как м-кадгерин и NCAM (Шевелева и др., 2012). Следовательно, можно предположить, что добавление ГАМК в среду культивирования не приводит к активации достаточного количества факторов, запускающих процесс слияния, а ГАМК-индуцированное увеличение экспрессии только *Mymk* не является достаточным условием для формирования миотуб. В связи с этим представляет интерес проведение дальнейших исследований влияния ГАМК на экспрессию генов, принимающих участие в миогенезе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Балан О. В., Озернюк Н. Д.* 2011. Экспрессия генов MyoD и м-кадгерина в культурах миогенных клеток-предшественников, выделенных из мышц крыс на разных стадиях онтогенеза. Известия Российской академии наук. Серия биологическая. Т. 2. С. 145 (*Balan O. V., Ozernuk N. D.* 2011. Expression of the gene MyoD and m-cadherin in the myogenic precursor cell culture isolated from muscles of rats at different stages of ontogenesis. Biology Bulletin. V. 38. № 2. P. 109).
https://doi.org/10.1007/s10525-008-2005-9
2. *Козырева А. А., Злотина А. М., Головкин А. С., Калинина О. В., Костарева А. А.* 2021. Конструирование праймеров для ПЦР в программе Primer-BLAST. Трансляционная медицина. Т. 8. № 3. С. 37 (*Kozyreva A. A., Zlotina A. M., Golovkin A. S., Kalinina O. V., Kostareva A. A.* 2021. Primer designing in Primer-Blast. Translational Med. V. 8. No. 3. P. 37).
https://doi.org/10.18705/2311-4495-2021-8-3-37-52
3. *Лопатина Е. В., Гавриченко А. В., Пасатецкая Н. А.* 2023. Участие ацетилхолина и Na^+, K^+-АТФазы в регуляции роста скелетных мышц куриного эмбриона. Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. Т. 109. № 2. С. 229 (*Lopatina E. V., Gavrichenko A. V., Pasatetckaia N. A.* The involvement of acetylcholine and Na^+, K^+-ATPase in the regulation of skeletal muscle growth. 2023. Rus. J. Physiol. V. 109. No. 2. P. 229).
https://doi.org/10.31857/S0869813923020073
4. *Суслов М. А., Сибгатуллина Г. В., Самигуллин Д. В.* 2022. Простой регулятор подачи CO_2 для лабораторного инкубатора клеток из доступных компонентов. Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. Т. 108. № 12. С. 1725 (*Suslov M. A., Sibgatullina G. V., Samigullin D. V.* 2022. Simple CO_2 regulator for laboratory cell incubator from available components. Russ. J. Physiol. V. 108. No. 12. P. 1725).
https://doi.org/10.31857/S0869813922120135

5. *Токмакова А. Р., Сибгатуллина Г. В., Гилиждинова К. Р., Маломуж А.* И. 2023. Исследование механизма угнетающего действия гамма-аминомасляной кислоты на процесс образования миотрубок в культуре. Биологические мембраны. Т. 40. № 5. С. 388 (*Tokmakova A. R., Sibgatullina G. V., Gilizhdinova K. R., Malomouzh A. I.* 2023. The Study of the mechanism of gamma-aminobutyric acid inhibitory effect on the myotube formation process in cell culture. Membrane Cell Biol. V. 40. No. 5. P. 388).
https://doi.org/10.31857/S0233475523050134

6. *Шевелева О. Н., Паюшина О. В., Старостин В. И.* 2012. Клеточные и молекулярные основы гистогенеза скелетных мышц. Известия РАН. Серия биологическая. № 6. С. 579 (*Sheveleva O. N., Payushina O. V., Starostin V. I.* 2012. Cellular and molecular basis of skeletal muscle hystogenesis. Biology Bull. V. 39. No. 6. P. 495).

7. *Abmayr S. M., Pavlath G. K.* 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. Development. V. 139. P. 641.
https://doi.org/10.1242/dev.068353

8. *Awad K., Ahuja N., Fiedler M., Peper S., Wang Z., Aswath P., Brotto M., Varanasi V.* 2021. Ionic silicon protects oxidative damage and promotes skeletal muscle cell regeneration. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 497.
https://doi.org/10.3390/ijms22020497

9. *Bentzinger C. F., Wang Y. X., Rudnicki M. A.* 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 4. No. 2. Art. ID: a008342.
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342

10. *Chen B., You W., Wang Y., Shan T.* 2020. The regulatory role of myomaker and myomixer–myomerger–minion in muscle development and regeneration. Cell. Mol. Life Sci. V. 77. P. 1551.
https://doi.org/10.1007/s00018-019-03341-9

11. *Der Vartanian A., Quétin M., Michineau S., Auradé F., Hayashi S., Dubois C., Rocancourt D., Drayton-Libotte B., Szegedi A., Buckingham M., Conway S. J.* 2019. PAX3 confers functional heterogeneity in skeletal muscle stem cell responses to environmental stress. Cell Stem Cell. V. 24. P. 958.
https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.019

12. *Ferri P., Barbieri E., Burattini S., Guescini M., D'Emilio A., Biagiotti L., Del Grande P., De Luca A., Stocchi V., Falcieri E.* 2009. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. J. Cell. Biochem. V. 108. P. 1302.
https://doi.org/10.1002/jcb.22360

13. *Furukawa T., Tanimoto K., Fukazawa T., Imura T., Kawahara Y., Yuge L.* 2018. Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations. NPJ Microgravity. V. 4. P. 11.
https://doi.org/10.1038/s41526-018-0045-0

14. *Gamage D. G., Leikina E., Quinn M. E., Ratinov A., Chernomordik L. V., Millay D. P.* 2017. Insights into the localization and function of myomaker during myoblast fusion. J. Biol. Chem. V. 292. P. 17272.
https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811372

15. *Hyatt J. P., McCall G.E., Kander E. M., Zhong H., Roy R. R., Huey K. A.* 2008. PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. Muscle Nerve. V. 38. P. 861.
https://doi.org/10.1002/mus.21006

16. *Koubek E. J., Santy L. C.* 2022. Actin Up: an overview of the Rac GEF Dock1/Dock180 and its role in cytoskeleton rearrangement. Cells. V. 11. № 11. P. 3565.
https://doi.org/10.3390/cells11223565

17. *Komarova M. Y., Rozhkov S. V., Ivanova O.A, Turtikova O. V., Mirzoev T. M., Dmitrieva R. I., Shenkman B. S., Vilchinskaya N. A.* 2022. Cultured myoblasts derived from rat soleus muscle show altered regulation of proliferation and myogenesis during the course of mechanical unloading. Int J. Mol. Sci. V. 23. Art. ID: 9150.
https://doi.org/10.3390/ijms23169150

18. *Lawson M. A., Purslow P. P.* 2000. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. Cells Tissues Organs. V. 167. № 2-3. P. 130.
https://doi.org/10.1159/000016776

19. *Lee I. J., Lee C. W., Lee J. H.* 2015. CaMKKβ-AMPKα2 signaling contributes to mitotic Golgi fragmentation and the G_2/M transition in mammalian cells. Cell Cycle. V. 16. P. 598.
https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991557

20. *Liu Y., Chen S., Li W., Du H., Zhu W.* 2012. Isolation and characterization of primary skeletal muscle satellite cells from rats. Toxicol. Mech. Methods. V. 22. P. 721.
https://doi.org/10.3109/15376516.2012.720302

21. *Luo W., Li E., Nie Q., Zhang X.* 2015. Myomaker, regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, promotes chicken myoblast fusion. Int. J. Mol. Sci. V. 2. P. 26186.
https://doi.org/10.3390/ijms161125946

22. *Mastroyiannopoulos N. P., Nicolaou P., Anayasa M., Uney J. B., Phylactou L. A.* 2012. Down-regulation of myogenin can reverse terminal muscle cell differentiation. PloS ONE. V. 7. № 1. Art. ID: e29896.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029896

23. *Millay D. P., O'Rourke J.R., Sutherland L. B., Bezprozvannaya S., Shelton J. M., Bassel-Duby R., Olson E. N.* 2013. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. Nature. V. 499. P. 301.
https://doi.org/10.1038/nature12343

24. *Ribas F., Villarroya J., Hondares E., Giralt M., Villarroya F.* 2014. FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. Biochem. J. V. 463. P. 191.
https://doi.org/10.1042/BJ20140403

25. *Sampath S. C., Sampath S. C., Millay D. P.* 2018. Myoblast fusion confusion: the resolution begins. Skeletal Muscle. V. 31. P. 3.
https://doi.org/10.1186/s13395-017-0149-3

26. *Sibgatullina G., Al Ebrahim R., Gilizhdinova K., Tokmakova A. R., Malomouzh A. I.* 2024. Differentiation of myoblasts in culture: focus on serum and gamma-aminobutyric acid. Cells Tissues Organs. V. 213. P. 203.
https://doi.org/10.1159/000529839

27. *Tian Z. L., Wang R. L., Yang Q. F., Qin Z. Q., Dong H. W., Zou D. H., Li Z. D., Wang J. M., Guan D. W., Zhang J. H., Liu N. G.* 2023. Detection of multiple biomarkers associated with satellite cell fate in the contused skeletal muscle of rats for wound age estimation. Int. J. Legal Med. V. 137. P. 875.
https://doi.org/10.1007/s00414-023-02971-w

28. *Trajano L. A.S.N., Trajano E. T.L., Thomé A. M.C., Sergio L. P.S., Mencalha A. L., Stumbo A. C., Fonseca A. S.* 2017. Pulsed low-level infrared laser alters mRNA levels from muscle repair genes dependent on power output in Wistar rats. Laser Phys. Letters. V. 14. P. 105603.
https://doi.org/10.1088/1612-202X/aa829f

29. *Uehara E., Hokazono H.* 2022. GABA (γ-aminobutyric acid) promotes cell proliferation, increases MyoD and PGC-1α expression, and decreases myostatin expression in C2C12 myoblasts. Int. J. Food Sci. Nutr. V. 7. P. 8.

30. *Yamanouchi K., Nakamura K., Takeuchi S., Hosoyama T., Matsuwaki T., Nishihara M.* 2021. Suppression of MyoD induces spontaneous adipogenesis in skeletal muscle progenitor cell culture. Animal Sci. J. V. 92.Art. ID: e13573.
https://doi.org/10.1111/asj.13573