

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Исаева Мария Олеговна

**Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки
клеток линии С2С12**

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Абаленихина Юлия Владимировна

Рязань – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Миогенез – понятие, этапы, маркерные белки и регуляторные факторы.....	15
1.1.1. Участие транскрипционных факторов в регуляции миогенеза.....	16
1.1.2. Сигнальные пути миогенеза.....	23
1.1.3. Клеточные линии, используемые для изучения.....	26
структурно-функциональных особенностей скелетной мышечной ткани.....	26
1.2. Сукцинатный рецептор: структура, реализация эффектов, функции.....	30
1.2.1. Структура и локализация сукцинатных рецепторов.....	30
1.2.2. Механизм функционирования сукцинатных рецепторов через G-белки....	35
1.2.3. Pertussis toxin как модулятор передачи сигналов через G-белки.....	37
1.3. Участие клеточных метаболитов, биологически активных веществ и лекарственных препаратов в регуляции миогенеза.....	38
1.3.1 Роль метаболитов обменных процессов в регуляции миогенеза.....	39
1.3.2. Янтарная кислота – эндогенный регулятор метаболизма и компонент лекарственных средств.....	43
1.3.3. Влияние янтарной кислоты на миогенез.....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
2.1. Объект экспериментальных исследований.....	51
2.2. Культивирование клеток линии C2C12.....	51
2.3. Дизайн исследования.....	53
2.4. Исследование цитотоксического действия тестируемых веществ на клеточную линию C2C12.....	57
2.5. Оценка морфологии клеток и индекса миогенеза.....	57
2.6. Определение относительного количества миозина, α -актина, MyoD, MyoG, NIF-1 α , PXR, SUCNR1 методом вестерн-блот.....	58
2.7. Оценка концентрации сукцината и инозитол-3-фосфата внутри клеток методом ВЭЖХ-МС/МС.....	61
2.8. Статистический анализ.....	62

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	63
3.1. Изучение этапов дифференцировки клеточной линии C2C12.....	63
3.2. Исследование действия янтарной кислоты на этапы миогенеза клеточной линии C2C12	68
3.2.1. Изучения цитотоксического действия янтарной кислоты на клетки линии C2C12	68
3.2.2. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12 и индекса миогенеза при воздействии янтарной кислоты	69
3.2.3. Определение относительного количества транскрипционных факторов и специфических белков скелетной мышечной ткани при воздействии янтарной кислоты.....	76
3.2.4. Изучение механизма действия янтарной кислоты на миогенез.....	79
3.3. Исследование действия ЭМГПС на этапы миогенеза клеточной линии C2C12.....	83
3.3.1. Изучения цитотоксического действия ЭМГПС на клетки линии C2C12....	83
3.3.2. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12 и индекса миогенеза при воздействии ЭМГПС	84
3.3.3. Определение относительного количества транскрипционных факторов и специфических белков скелетной мышечной ткани при воздействии ЭМГПС ...	91
3.3.4. Изучение механизма действия ЭМГПС на миогенез.....	94
3.4. Изучение механизмов влияния янтарной кислоты и ЭМГПС на миогенез через SUCNR1	97
3.4.1. Определение цитотоксического действия pertussis toxin на клетки линии C2C12	97
3.4.2. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12, индекса миогенеза и показателей миогенеза при самостоятельном действии Pertussis toxin и в сочетании с янтарной кислотой	97
3.4.3. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12, индекса миогенеза и показателей миогенеза при самостоятельном действии Pertussis toxin и в сочетании с ЭМГПС.....	110

3.5. Влияние янтарной кислоты на концентрацию эндогенного сукцината в клетках C2C12 на этапах миогенной дифференцировки.....	123
3.6. Влияние Pertussis toxin на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой.....	125
3.7. Возможность стимуляции миогенной дифференцировки в клетках C2C12 янтарной кислотой.....	126
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ВЫВОДЫ.....	138
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	139
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Скелетная мышечная ткань обладает способностью регенерировать в ответ на действия внешних и внутренних повреждающих факторов. Восстановление миофибрилл происходит за счет активации клеток-сателлитов, располагающихся между базальной мембраной и сарколеммой [198]. Миогенез – сложный процесс эмбрионального и постэмбрионального образования мышечной ткани, включающий в себя несколько стадий: пролиферация, дифференцировка и формирование миотрубочек с созреванием в миофибриллы [11,45].

Одними из главных факторов, участвующих в развитии и восстановлении мышечной ткани являются факторы семейства миогенных регуляторных факторов (MRF, *англ.: myogenic regulation factors*), которые включают в себя белок детерминации миобластов 1 (MyoD, *англ.: Myogenic determination protein 1*), миогенный фактор 5 (Myf5, *англ.: myogenic factor 5*), геркулин (MRF4, *англ.: herculin*) и миогенин (MyoG; *англ.: myogenin*). Согласно литературным данным MyoD экспрессируется на раннем этапе миогенеза, что указывает на его участие в дифференцировке миобластов [107,171]. Экспрессия Myf5 идет в миосателлитах, следовательно данный фактор регулирует пролиферацию миобластов [27]. MRF4 экспрессируется в зрелом миофибрилле, контролируя рост мышечной ткани [73]. А экспрессия MyoG происходит на позднем этапе, данный фактор регулирует терминальную дифференцировку и формирование миотрубочек [131].

Янтарная кислота – метаболит цикла трикарбоновых кислот, а также источник протонов водорода для II комплекса дыхательной цепи (сукцинатдегидрогеназы). В настоящее время имеются свидетельства того, что метаболиты цикла Кребса играют важную роль и за пределами цикла. Так, янтарная кислота является внеклеточным лигандом, сопряженного с G-белком рецептора, известного как рецептор сукцината 1 (SUCNR1, GPR91, *англ. Succinate receptor 1*), который экспрессирован в почках, печени, сердце, клетках сетчатки и, вероятно,

во многих других тканях [85,157]. Кроме этого, показано, что янтарная кислота проявляет свое действие через HIF-1 α [163], что может иметь особенное значение при гипоксии мышечной ткани.

В настоящее время появляются работы, демонстрирующие участие янтарной кислоты в регуляции ремоделирования мышц в ответ на физическую нагрузку [129,142], при этом подчеркивается роль сукцинатных рецепторов в этом процессе [52]. В условиях функциональной разгрузки отмечается взаимосвязь сфингомиелиназного пути образования церамида и продукции АФК в скелетной мышце [3]. Предлагается гипотеза о механизме регуляции активности SERCA и IP3-рецепторов при функциональной разгрузке мышц и их вкладе в избыточное накопление ионов кальция в миоплазме в данных условиях [19]. Тем не менее вопрос изучения механизмов молекулярного воздействия янтарной кислоты на миогенез мышечных клеток требует дальнейшего изучения. Янтарная кислота входит в состав различных биологически активных добавок и лекарственных средств. Одним из таких примеров является этилметилгидроксипиридина сукцинат, который используется как антиоксидантное и нейропротекторное средство, улучшает метаболизм и кровоснабжение мозга, стабилизирует клеточные мембраны [6].

Таким образом, механизмы воздействия янтарной кислоты на миогенез клеток линии C2C12 на данный момент не изучались, поэтому заявленная тема диссертационного исследования является актуальной. Полученные результаты работы по механизмам регуляции миогенеза, в том числе транскрипционным факторам, участвующим в данном процессе, могут быть использованы в качестве инструмента запуска регенерации скелетной мышечной ткани в клетках линии C2C12. Определение ключевой роли SUCNR1 в биохимическом механизме действия янтарной кислоты, позволит рассматривать их в качестве фармакологической мишени, что дополнит представления о возможностях терапевтического применения янтарной кислоты для улучшения функций и восстановления мышечной ткани.

Степень разработанности проблемы

Иммортализованная клеточная линия мышечных миобластов C2C12 активно применяется в качестве экспериментальных моделей ряда патологий *in vitro*: старения, сахарного диабета, ожирения, гиперлипидемии, роста мышц, стеатоза печени и нарушения роста [70,141,194]. Из-за наличия биохимических особенностей, характерных мышечных белков клеточная линия C2C12 часто используется в биомедицинских исследованиях для изучения метаболизма и дифференцировки скелетных мышц [48,76]. Янтарная кислота является важным метаболитом цикла Кребса, который оказывает энергетическое и регуляторное действие, именно поэтому разрабатываются лекарственные препараты на ее основе.

В настоящее время продемонстрировано, что введение янтарной кислоты в рацион повышает выносливость, стимулирует синтез МУН I, активизирует аэробные ферменты, увеличивает потребление кислорода и способствует образованию митохондрий в скелетных мышцах мышей. Однако сукцинат также подавляет активность лактатдегидрогеназы, уменьшает производство лактата и влияет на снижение экспрессии МУН II [161]. Добавление диметилсукцината (аналог янтарной кислоты) в концентрации 8 мМ и сроком 48 часов к клеткам C2C12 вызывает снижение синтеза белка в миобластах, угнетение MyoD, MyoG, МУН1 и дальнейшее нарушение формирования многоядерных структур [179].

На базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на протяжении нескольких лет разными научными группами ведутся исследования, посвященные миогенезу, функциям янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината. В лаборатории клеточных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России осуществлялось культивирование клеточной линии C2C12 [2,13]. На кафедре фармакологии проводятся исследования по изучению антиоксидантного и антигипоксанта действия этилметилгидроксипиридина сукцината [4], также на кафедре

биологической химии выполнялись работы, посвященные корректирующему действию сукцината в условиях гипоксии [15].

Янтарная кислота, выступая в качестве сигнальной молекулы, может реализовывать свои эффекты через SUCNR1 в мышечной ткани [52,140]. Стоит отметить, что острое воздействие янтарной кислоты увеличивает окислительное фосфорилирование и взрывную силу скелетных мышц по SUCNR1-зависимому пути [31].

На данный момент показано, что изменение условий среды влияет на миогенез клеток C2C12. Следовательно, необходимо охарактеризовать этапы миогенеза мышечных клеток C2C12 в стандартных условиях культивирования, чтобы избежать получения недостоверных данных при планировании экспериментов. Доказано, что в клетке активируется экспрессия более 30 генов мышечных белков, среди которых – тяжелые и легкие цепи миозина, α -актин, тропонины, десмин и др. [99]. Несмотря на имеющиеся научные данные, точные механизмы воздействия янтарной кислоты на миогенез и участие в нем сукцинатных рецепторов не описаны.

Цель исследования

Изучить механизмы действия янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12 и определить роль сукцинатных рецепторов (SUCNR1) в данном процессе.

Задачи исследования

1. Оценить влияние экзогенной янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12.
2. Проанализировать влияние лекарственного средства, содержащего янтарную кислоту – этилметилгидроксипиридина сукцината, на процесс дифференцировки клеток линии C2C12.

3. Изучить участие SUCNR1, HIF-1 α и PXR в процессе дифференцировки клеток линии C2C12 под действием янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината.
4. Оценить внутриклеточную концентрацию сукцината при экзогенном воздействии янтарной кислоты.
5. Выявить механизм влияния янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината через SUCNR1 посредством G α i-белка.

Научная новизна

В ходе выполнения работы на клетках линии C2C12 *in vitro* впервые:

1. Показана роль янтарной кислоты в процессе миогенеза клеточной линии C2C12: повышение уровня специфических белков мышечной ткани – α -актина, MYH; транскрипционных факторов – MyoD, MyoG; индекса миогенеза; снижение относительного количества сукцинатных рецепторов (SUCNR1) и ускоренное превращение миобластов в миотубулы;
2. Установлено, что механизм воздействия янтарной кислоты на SUCNR1 реализуется посредством G α i-белка;
3. Выявлено, что HIF-1 α и PXR не принимают участия в процессе миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты;
4. Доказано стимулирующее действие этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез клеточной линии C2C12, реализующиеся через SUCNR1 – G α i – сигнальный путь, предположительно за счет молекулы янтарной кислоты, входящей в его состав.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование влияния янтарной кислоты на мышечную ткань представляет собой важный вклад в понимание биохимических и физиологических процессов, происходящих в организме. Работа помогает раскрыть новые биохимические пути

и молекулярные механизмы, через которые янтарная кислота влияет на функциональное состояние мышечной ткани, включая процессы регенерации, роста и восстановления.

При дальнейшем проведении дополнительных исследований полученные результаты работы могут быть использованы для создания новых препаратов и методов лечения заболеваний, связанных с нарушениями функций мышечной ткани, таких как миопатии, саркопения, а также при реабилитации после травм. Янтарная кислота может быть интегрирована в программы спортивного питания и восстановления, что позволит улучшить результаты тренировок, ускорить восстановление мышц после нагрузок и повысить общую спортивную продуктивность. Этилметилгидроксипиридина сукцинат уже применяется для лечения заболеваний, связанных с неврологическими и сердечно-сосудистыми патологиями. За счет того, что препарат стимулирует миогенез, это открывает новые перспективы его применения в терапии мышечных заболеваний, таких как мышечные дистрофии, миозиты, травмы и возрастная атрофия мышц. Изучение в клинической практике позволит использовать этилметилгидроксипиридина сукцинат для реабилитационных программ, направленных на восстановление двигательной активности и мышечной силы у пациентов с неврологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Результаты заявленного исследования демонстрируют возможное использование клеточной линии C2C12 *in vitro* в качестве экспериментальной модели мышечных патологий, а SUCNR1 можно рассматривать как терапевтическую мишень для действия янтарной кислоты и стимуляции миогенеза.

Методология и методы исследования

Исследование проведено на клетках линии C2C12. Клетки культивировали в 96-луночных и 6-луночных планшетах при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Scienc, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-

глутамин (4 мМ), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно (все компоненты Sigma-Aldrich, США). Для стимуляции дифференцировки использовали 2% лошадиную сыворотку (Sigma-Aldrich, США) [197].

В ходе работы были выполнены следующие серии экспериментов: изучение характерных этапов миогенеза клеток C2C12; исследование действия янтарной кислоты на этапы миогенеза клеточной линии C2C12 в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза (1, 4, 7 дни дифференцировки); исследование действия этилметилгидроксипиридина сукцината на этапы миогенеза клеточной линии C2C12 в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза (1, 4, 7 дни дифференцировки); изучение механизма влияния янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез (через HIF-1 α , PXR, SUCNR1).

Механизм действия янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината через SUCNR1 оценивали с помощью экспериментов с ингибитором SUCNR1 - Pertussis Toxin (Cayman Chemical Company, США). Индекс миогенеза и его изменения при добавлении янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината оценивали микроскопическим методом с добавлением раствора Романовского-Гимзе для окрашивания ядер. Цитотоксичность янтарной кислоты, этилметилгидроксипиридина сукцината, Pertussis Toxin оценивали по результатам МТТ-теста. Концентрации сукцината внутри клетки определяли методом ВЭЖХ МС/МС.

Относительное количество транскрипционных факторов MyoD, MyoG, HIF-1 α , PXR, SUCNR1 и мышечных специфических белков α -актина и тяжелых цепей миозина (MYH) оценивали методом вестерн-блот. Активность SUCNR1 определяли по концентрации инозитол-3-фосфата в цитоплазме клеток методом ВЭЖХ МС/МС. Полученные результаты обрабатывали статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Янтарная кислота в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ ускоряет процесс миогенной дифференцировки клеток C2C12, стимулируя увеличение индекса миогенеза и повышение уровней MyoD, MyoG, MYH и α -актина.
2. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ стимулирует миогенную дифференцировку клеточной линии C2C12 за счет сукцината, о чем свидетельствуют морфологические изменения клеток и повышение уровня специфических мышечных белков α -актина, MYH и факторов миогенной дифференцировки – MyoD и миогенина.
3. Транскрипционные факторы HIF-1 α и PXR не участвуют в регуляции миогенеза клеток C2C12 янтарной кислотой в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ.
4. Экзогенное воздействие янтарной кислоты не вызывает повышение внутриклеточной концентрации сукцината и увеличивает уровень инозитолмонофосфата.
5. Янтарная кислота и этилметилгидроксипиридина сукцинат стимулируют процесс миогенной дифференцировки в клетках миобластов C2C12, действуя через SUCNR1-G α i – сигнальный путь.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные результаты обладают достоверностью благодаря обширному объёму экспериментальных данных, собранных с применением высокотехнологичного оборудования и адекватных методов исследования, а также их систематизации и статистической обработке. Ключевые положения диссертации были изложены, обсуждены и включены в материалы конференций: VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); V Национального конгресса по регенеративной

медицине (Москва, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022); научно-практической конференции «Наука и здоровье» посвященная 80-летию юбилею профессора, д.м.н., члена-корреспондента академии медицинских наук РК Каражановой Л. К. (Семей, 2023); IV Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию РязГМУ «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2023); XXIV Съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. (Санкт-Петербург, 2023), 2-й Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2023); IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2023); Международного медицинского форума «Вузовская наука. Инновации» (Москва, 2024); III Международной научно-практической конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (Курск, 2024), Всероссийской научной конференции с международным участием «Биохимия человека 2024» (Москва, 2024); VI Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024).

Исследование выполнено при финансовой поддержке внутривузовского гранта молодых ученых Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова на 2023 (Договор №3/23).

Внедрение результатов исследования в практику

Ключевые результаты диссертации успешно интегрированы и применяются в учебном процессе на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, а также в научно-исследовательской деятельности ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно составил обзор литературы по рассматриваемой проблеме, разработал программу исследования, выполнил эксперименты *in vitro*, биохимические исследования, а также обработал и интерпретировал полученные данные, подготовив публикации по материалам диссертации. Вклад автора в проведенное исследование составляет более 90%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 4 статьи в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 3 публикации в журналах, входящих в цитатно-аналитическую базу данных Scopus, получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 165 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 72 рисунками и 18 таблицами. Список литературы представлен 199 источниками, из них 26 отечественных и 173 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Миогенез – понятие, этапы, маркерные белки и регуляторные факторы

Миогенез – многоступенчатый процесс образования мышечной ткани, протекающий в эмбриональном и в постэмбриональном периоде. Он включает в себя несколько стадий, в ходе которых миобласты пролиферируются, перепрограммируются на дифференцировку, выходя из клеточного цикла. Далее запускается процесс слияния миобластов для формирования миотуб, которые затем дифференцируются в зрелые мышечные волокна [1,100]. Эмбриональный миогенез большей частью связан с возникновением и развитием сомитов, из которых образуются эпителиальные дермомиотомы и деэпителизированные склеротомы.

Экспрессия миогенных регуляторных факторов (MRF, *англ.: myogenic regulation factors*) индуцируется нервной трубкой, дорсальной эктодермой и нотохордом [64].

На границе дермомиотома клетки-предшественники миобластов мигрируют вниз, формируя каркас миотома. Далее из центральной части дермомиотома мигрируют пролиферирующие миогенные предшественники, которые в последующем при окончательной дифференцировке образуют мышечные волокна, а также из них возникает пул миосателлитоцитов [1,48].

Сателлитные клетки – гетерогенная популяция мышечных стволовых клеток, которые локализуются под базальной мембраной мышечных волокон. Они обеспечивают рост мышечной массы, а также способность мышцы к восстановлению после повреждений [11,14]. Клетки-сателлиты сохраняются в покоящемся недифференцированном состоянии, однако быстро возобновляют свой клеточный цикл после травм или сигналов роста [117].

Активированные клетки-сателлиты интенсивно мигрируют, пролиферируют, дифференцируются и сливаются, образуя регенерирующие миоволокна. Только подмножество самообновляющихся клеток способно противостоять дифференцировке во время повреждения мышц и возвращаться в состояние покоя

после завершения их регенерации, чтобы пополнить пул клеток-сателлитов и подготовить ткань к последующему восстановлению после повреждения. Важно отметить, что на состояние клеток-сателлитов большое влияние оказывают внутренние и внешние факторы. Динамические взаимодействия с клетками воспаления, стромальными клетками, трофическими сигналами и компонентами внеклеточного матрикса регулируют клетки-сателлиты в процессе регенерации. Однако многие патологические состояния, такие как мышечная дистрофия или атрофия мышц, дают неправильные сигналы клеткам-сателлитам и, таким образом, снижают их регенеративный потенциал [18,84,128].

Таким образом, миогенез представляет собой важный многоступенчатый процесс, в регуляции которого участвуют как внутренние, так и внешние факторы, что следует учитывать при изучении физиологических и патологических состояний, а также воздействии экзогенных веществ. Внутренние факторы, играющие ключевую роль в миогенезе, включают транскрипционные факторы, молекулы сигнальных путей и факторы роста [1,14,61]. К внешним факторам – относятся витамины, минеральные вещества, некоторые аминокислоты, лекарственные препараты [98,169,161].

1.1.1. Участие транскрипционных факторов в регуляции миогенеза

Парный бокс-ген (*Pax*, англ.: *Paired box gene*, например, *Pax3*, *Pax7*) является маркером мышечных стволовых клеток [38]. *Pax7* экспрессируется всеми миосателлитами в постнатальном периоде, *Pax3* - в пренатальном периоде. *Pax3* взаимодействует с генами-мишенями, которые регулируют эмбриональный этап и сохраняют пул недефинированных клеток-сателлитов. *Pax7* регулирует гены, влияющие на клеточный цикл, а именно стимулирующие пролиферацию и снижающие дифференцировку.

Основными и наиболее изученными являются специфические транскрипционные факторы MRF, играющие важную роль в дифференцировке миобластов. В семейство MRF входит несколько групп белков: белок

детерминации миобластов 1 (MyoD, *англ.: Myogenic determination protein 1*), миогенный фактор 5 (Myf5, *англ.: myogenic factor 5*), геркулин (MRF4, *англ.: herculin*) и миогенин (MyoG; *англ.: myogenin*). Каждый из них состоит из трех доменов, где первый представляет собой домен, связанный с областью спираль-петля-спираль (HLH; *англ.: helix-loop-helix*) – основной базовый домен (bHLH; *англ.: basic helix-loop-helix*), он имеет в своем составе аланин, треонин, лизин, что помогает формировать структуру MRF, благодаря чему инициируется транскрипция мышечных генов, улучшается связывание MRF и миоцитарного энхансерного фактора 2 (MEF2, *англ.: myocyte enhancer factor 2*). Цистеин/гистидиновый домен располагается близко к основному домену, а домен, содержащий в большом количестве серин и треонин, находится рядом с С-концом [138]. HLH представляет собой две α -спирали, соединенные между собой петлей. Белки bHLH связываются с согласованной последовательностью CANNTG (N-любой нуклеотид) энхансерного бокса (E-box; *англ.: Enhancer Box*), расположенного в промоторных и энхансерных областях генов [155] (Рисунок 1).

На Рисунке 1 показано линейное представление каждого миогенного регуляторного фактора. Область гомологии, охватывающая базовый (+ + +) и HLH домены, отмечена пунктиром. Соответствующая область ДНК, достаточная для миогенеза, указана внизу. Область гомологии, богатая серином/треонином (ОН), обозначена желтым прямоугольником с полосами. Количество аминокислот в каждом полипептиде указано в конце каждой строки и составляет для MyoD – 318, MyoG – 224, Myf5 – 255, MRF4 – 242. Важно отметить, что размер миогенина равен у мыши и человека, поэтому клеточные линии мышечных миобластов используются для изучения механизмов миогенеза мышечной ткани.

Транскрипционные факторы, объединенные в семейство MRF, оказывают разное влияние на развитие мышечной ткани. Согласованное действие каждого из этих белков нужно для экспрессии специфических мышечных генов. Также известно, что MRF могут оказывать влияние на строение и функционирование нервно-мышечных синапсов, активировать клетки мышечной ткани в ответ на стрессовые ситуации [190]. Однако из-за похожей конфигурации bHLH позволяет

взаимозаменять друг друга в случае генетического дефекта, инактивирующего один из них. Различия в других структурных областях могут определять специфические функции белков MRF. Myf5 и MyoD влияют не только на транскрипцию, но и на конфигурацию третичной структуры ДНК в характерных для мышц генах, помогая в дальнейшем эффективно передавать информацию с ДНК на РНК [78]. MyoG способствует транскрипции специфичных для мышц генов-мишеней и играет роль в дифференцировке мышц, завершении клеточного цикла и мышечной атрофии [133]. Широкий генетический анализ показал, что Myf5 и MyoD необходимы для начальных этапов миогенеза, тогда как MyoG и MRF4 играют роль в терминальной дифференцировке [34].

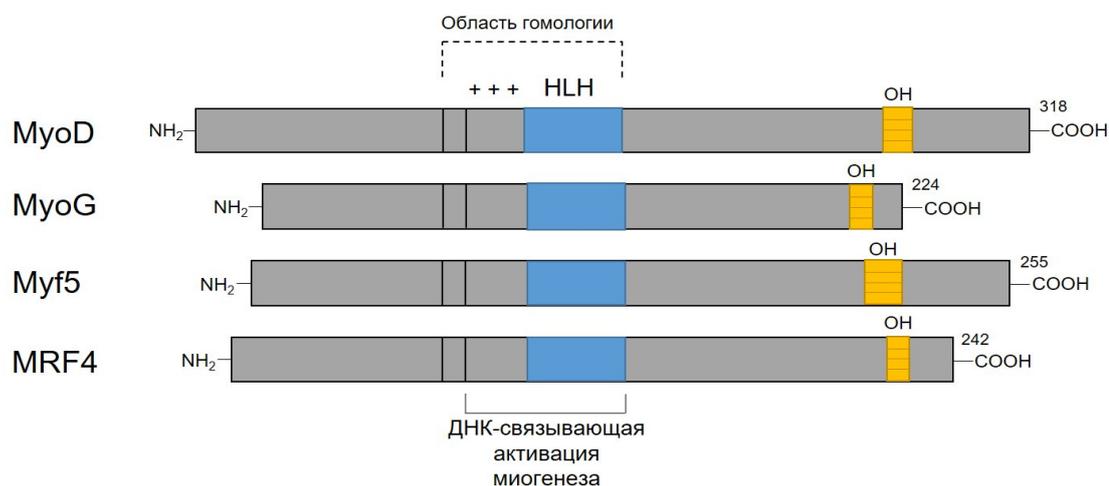


Рисунок 1 – Структурное сравнение миогенных регуляторных факторов (Цит. по Копанцева Е. Е., 2016) [14]

Первым был открыт MyoD в США группой ученых Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B. в 1987 г. как фактор, регулирующий перепрограммирование в скелетные мышечные клетки небольшую долю фибробластов [64]. MyoD является одним из наиболее важных регуляторов миогенеза, так как запускает и контролирует дифференцировку мышечных клеток. Под его действием происходит индукция характерных для мышц белков – М-кадгерина, тяжелых цепей миозина (MYH, *англ. Myosin heavy chain*) и легких цепей миозина (MLC, *англ. myosin light chain*), креатинкиназы (изоформы MM); транскрипционного фактора – MyoG;

регуляторов клеточного цикла - микроРНК и ингибитора клеточного цикла (p21, *англ. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) [11,41,171].

MyoD может вступать в связь с комплексами ремоделирования хроматина (SWI/SNF, *англ. SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) и с ацетилазами гистонов на уровне эпигенетической модификации. Помимо этого, он контактирует с регуляторами клеточного цикла, например, с циклинзависимой киназой 4 [65], а также инактивирует сигналы цитокинов и пролиферативный этап. MyoD может регулировать самообновление сателлитных клеток. Одним из механизмов такой регуляции является активация гена, кодирующего белок p21, который ингибирует циклинзависимую киназу (CDK, *англ. cyclin-dependent kinase*). Существуют регуляторные белки, активирующие или тормозящие связывание MyoD с ДНК. Так, например, богатый цистеином белок 3 связывается с MyoD и усиливает его взаимодействие с ДНК, а ингибиторы ДНК-связывания и клеточной дифференцировки белков нарушают эту связь, образуя нефункциональные гетеродимеры с другими транскрипционными факторами bHLH [99].

Известными регуляторными сайтами для фосфорилирования MyoD являются серин 200 (Ser200) и серин 5 (Ser5) [62]. При фосфорилировании Ser200 CDK1, CDK2 происходит снижение активности MyoD [50]. Однако при использовании фосфомутантного MyoD фосфорилирование Ser200 и дополнительных сайтов приводит к усилению миогенеза [89]. Во время миогенеза MyoD фосфорилируется в нескольких участках, при этом важно не только их количество, но и сайт воздействия. Существует мнение, что регуляторные фосфо-участки локализованы на С-конце белка MyoD, и они не фосфорилируются CDK в пролиферирующих клетках, но могут быть мишенями для других пролин-направленных киназ, действующих вблизи дифференцирующего миотома, например, митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК, *англ. mitogen-activated protein kinase*) [89]. На этапе дифференцировки MyoD подвергается дефосфорилированию специфическими фосфатазами, что способствует его активации.

Увеличение экспрессии MyoD может происходить в первые 24 часа после физической нагрузки в результате мышечного стресса [181]. MyoD регулирует

экспрессию множества генов на этапах дифференцировки развития мышечной ткани. Также установлено, что MyoD способен связываться по всему геному, где он стимулирует модификацию гистонов [81]. Таким образом, MyoD - один из основных транскрипционных факторов, относящихся к семейству MRF. Действие MyoD направлено на активацию экспрессии генов, необходимых для образования и функционирования мышц. Он взаимодействует со специфическими участками ДНК и регулирует транскрипцию различных генов, среди которых гены, определяющие структуру и функцию мышечных клеток.

В эмбриональном миогенезе в мезодерме краткосрочно активируется экспрессия Myf5, позже уже в миотоме он с остальными MRF снова включается в работу. При отсутствии у мышей гена Myf5 не развиваются ребра дистальной части, что приводит к летальному исходу после рождения. Аномалий в развитии мышечной ткани выявлено не было, что сопровождалось высокими уровнями MyoD, MRF4 и MyoG, но появление миотома задерживалось на несколько дней. Данный факт указывает на то, что у Myf5 второстепенная роль в развитии мышц [172]. В постнатальном развитии Myf5 экспрессируется в покоящихся сателлитных клетках, это демонстрирует его основную функцию – участие в пролиферации миобластов, поддержание миогенного пула клеток.

MRF4 отличается от других членов семейства MRF на эмбриональном этапе миогенеза тем, что имеет двухфазный паттерн. MRF4 временно экспрессируется вместе с Myf5 на ранних стадиях миогенеза, это показывает его роль в определении клеток-предшественников. Поздняя его экспрессия происходит во время внутриутробного развития и в постэмбриональном периоде уже в зрелых скелетных мышцах [125]. Дифференцировочная функция MRF4 может компенсироваться другими миогенными факторами: MyoD, MyoG во время дифференцировки клеток-сателлитоцитов [100]. В мышцах взрослых этот фактор ингибирует рост мышечной ткани как из миосателлитоцитов, так и из зрелых миосимпластов. Данный эффект опосредован подавлением транскрипционной активности MEF2 [124].

Транскрипционный фактор MyoG играет важную роль в формировании мышечного волокна, регулируя слияние миоцитов в эмбриональном периоде. Отсутствие гена MyoG у мышей приводит к сильному дефициту мышц и гибели особей после рождения. Как в эмбриональном, так и в постэмбриональном развитии экспрессия MyoG согласована с Pax7 и увеличивается в пролиферирующих клетках, переключающихся на дифференцировку [78]. Основная функция MyoG - это участие в слиянии миоцитов. Отсутствие у мышей MyoG не ингибирует накопление маркеров дифференцировки *in vitro* [132], а проявляется в образовании моонуклеарных миофибрилл, а на эмбриональном этапе уменьшается рост миотома [130]. В случае нокаута MyoG у мышей при интенсивной физической нагрузке увеличивается использование метаболитов (глюкоза, лактат, гликоген) и потребление кислорода для получения энергии, что замедляет развитие ацидоза. У таких мышей в ответ на продолжительную физическую нагрузку повышается доля медленно сокращающихся волокон пропорционально быстро сокращающимся [133]. Эти данные показывают важную роль MyoG в регуляции гомеостаза мышечной ткани. Отсутствие MyoG активирует путь механистической мишени рапамицина (mTOR, *англ. mechanistic target of rapamycin*) в миосателлитах, который в свою очередь обеспечивает переход из состояния покоя в псевдоактивное состояние, при котором клетки готовы к активации и последующему увеличению количества мышечных стволовых клеток [130]. У мышей, лишенных миогенина наблюдается уменьшение мРНК MRF4, который в свою очередь влияет на рост миофибрилл [105]. Таким образом MyoG оказывает влияние не только на клетки-сателлиты, но и на мышечные волокна, управляя тканевым гомеостазом.

Другой группой транскрипционных факторов, влияющих на миогенез, являются белки семейства факторов транскрипции MEF2 - MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D, которые экспрессируются во всех типах мышечных клеток. MEF2 рассматривается как активатор транскрипции, но для экспрессии его генов необходимо соединение с другими факторами. Его действие координируется сложными транскрипционными, трансляционными и посттрансляционными

механизмами. Представители семейства MEF2 экспрессируются в натальном и постнатальном периоде в большей степени в скелетных мышцах и головном мозге [113]. В клетках-мишенях экспрессия MEF2 происходит в то же время, что и включение программы дифференцировки. Их белки на постэмбриональном этапе действуют как связующее звено между реакцией на стрессовый раздражитель и программой регенерации мышечных волокон, также они участвуют в пролиферации и апоптозе клеток [175].

MRF вместе с MEF2 и сигнальными путями, регулирующими их активность, влияют на развитие мышечной ткани (Рисунок 2). Свободный MEF2 не может оказывать положительное действие на миогенез, но при связывании с факторами семейства MRF наблюдается активация дифференцировочной программы миобластов [195].

Так, MyoD и MEF2 активно взаимодействуют во время регенерации скелетных мышц, при этом активация MyoD временная, он способствует перепрограммированию клеток-сателлитов на путь дифференцировки, а MEF2 участвует в активации миогенных генов, стимулирующих завершение клеточного цикла и образование многоядерных миотубул [28]. В пролиферирующих клетках не происходит экспрессия MyoD и MEF2, что объясняется действием в этих клетках гистоновой метилтрансферазы (G9a) инактивирующей оба фактора (Рисунок 2) [108,121].

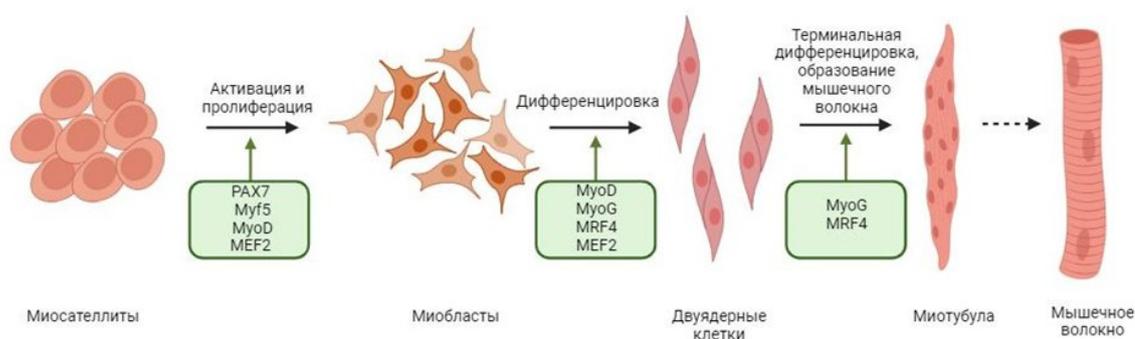


Рисунок 2 – Общая схема работы транскрипционных факторов во время миогенеза (выполнено с помощью программного обеспечения «BioRender»)

MEF2 влияют на экспрессию белков семейства MRF и других транскрипционных факторов, регулирующих миогенез [114]. MEF2C может активировать собственную экспрессию на этапе эмбрионального миогенеза [175].

Таким образом, транскрипционные факторы являются центральными элементами в регуляции миогенеза, обеспечивая необходимую транскрипционную активность для развития и функционирования мышечной ткани. Они участвуют в сложных биохимических каскадах, которые контролируют экспрессию миогенных генов и определяют специфичность развития мышечных клеток.

Исследования последних лет показали, что транскрипционные факторы MyoD, MyoG, MEF2 играют наиболее важную роль в инициации и поддержании миогенного дифференцирования. Факторы транскрипции взаимодействуют с различными коактиваторами и корепрессорами, формируя регуляторные комплексы, которые могут активировать или подавлять транскрипцию целевых генов.

Нарушения в работе транскрипционных факторов приводят к серьезным заболеваниям, включая мышечные дистрофии и атрофии, поэтому понимание механизмов их действия открывает новые перспективы для разработки стратегий лечения патологий скелетных мышц.

1.1.2. Сигнальные пути миогенеза

В скелетной мышечной ткани встречаются различные типы мышечных волокон, различающихся как структурно, так и функционально. Поэтому для поддержания жизнедеятельности мышечной ткани необходимо взаимодействие нескольких сигнальных путей. Благодаря взаимосвязи сигналов происходят такие процессы как синтез и протеолиз белков мышечной ткани, рост и дифференцировка миобластов.

Регуляторные пути используются для передачи сигнала от различных внешних и внутренних стимулов к молекулам-мишеням внутри клетки. В качестве примеров можно рассмотреть следующие сигнальные пути: инсулиноподобный

фактор роста 1 (IGF1, *англ. Insulin-like growth factor 1*) стимулирует фосфотидилинозитол-3-киназу/протеинкиназу В (PI3K/АКТ, *англ. Phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein kinase B*), митоген-активируемые протеинкиназы p38 (МАРК p38, *англ. p38 mitogen-activated protein kinase*) и внеклеточную сигнал-регулируемую киназу (ЕРК, *англ.: extracellular signal-regulated kinase*), другой пример - МАРК p38, который активируется цитокинами, окислительным стрессом, физической нагрузкой, различными факторами роста и гормонами [61,153]. IGF1 за счет активации сигнальных путей стимулирует как пролиферацию, так и дифференцировку миобластов, активирует механизмы, способствующие синтезу миофибриллярных белков (актина и миозина), улучшает использование глюкозы и липидов миобластами, что способствует энергетическому обмену и метаболизму (Таблица 1) [29,75,137].

Также в регуляции пролиферации, дифференцировки, выживаемости клеток принимают участие N-концевые (терминальные) киназы c-Jun (JNK, *англ.: c-Jun N-terminal kinases*) [94,96,153]. Сигнальная система трансмембранных белков Notch важна для поддержания стволовых клеток и регуляции их дифференцировки [106]. Внутриклеточный сигнальный путь Wnt активирует транскрипцию генов, ответственных за миогенез, принимает участие как на начальных этапах миогенеза (Wnt5a, Wnt5b и Wnt7a), так и на поздних (Wnt3a и Wnt7b) [44,49,83].

Сложное взаимодействие этих сигнальных путей обеспечивает строгое регулирование миогенеза, позволяя организму развиваться, восстанавливать и поддерживать мышечную ткань в ответ на различные физиологические и патофизиологические стимулы. Более подробная информация о сигнальных путях, участвующих в регуляции миогенеза представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика сигнальных путей, участвующих в миогенезе

Сигнальный путь	Биологическая роль	Регулируемые процессы		Источник
		Активация	Ингибирование	
MAPK p38	Регуляция клеточного цикла, апоптоза, миогенеза: перепрограммирование пролиферирующих клеток на путь дифференцировки.	Дифференцировка, экспрессия специфических миогенных факторов (MEF2 и образование димера MyoD/E47)	Пролиферация, экспрессия Pax7	[61,153]
JNK	Влияние на пролиферацию, дифференцировку, выживание клеток, ответ на стресс, воспалительные реакции, УФ-облучение.	Рост мышечных волокон, увеличение мышечной массы	Дифференцировка, экспрессия MyoD, MyoG	[94,96,153]
ERK	Участие в синтезе нуклеотидов, стимулирование образования белка, регуляция клеточного цикла.	Пролиферация, миогенез	Образования миоцитов	[75,137]
PI3K/AKT	Регуляция клеточного цикла, миогенеза и поддержания массы мышц, защиты от апоптоза в дифференцирующихся миобластах, клеточного роста.	Дифференцировка, синтез белков мышечной ткани	Экспрессия E3 убиквитин-лигазы MAFbx и MuRF1, Bad, Bax, Bim, Caspase 9	[29]
Notch	Влияние на рост мышц, пролиферацию и дифференцировку клеток.	Самообновление миосателлитов	Пролиферация миосателлитов, MyoD, MyoG	[106]
Wnt	На начальных этапах миогенеза - Wnt5a, Wnt5b и Wnt7a. На поздних этапах - Wnt3a, Wnt7b. Модулятор канонического пути R-спондин участвует в дифференцировке миосателлитных клеток .	Wnt1, Wnt3a и Wnt5a, способствуют делению, увеличивая его скорость	Пролиферация клеток-сателлитов через Wnt4 и Wnt6	[44,49,83]

1.1.3. Клеточные линии, используемые для изучения структурно-функциональных особенностей скелетной мышечной ткани

Существует несколько вариантов клеточных линий скелетной мышечной ткани, которые используются в научных исследованиях (Рисунок 3). Основные представители:

- иммортализованная клеточная линия скелетных мышц крысы (L6, *англ. rat muscle cell lines*),
- первичная линия клеток скелетных мышц человека (HSkMC, *англ. human skeletal muscle cells*),
- иммортализованная клеточная линия миобластов мыши (C2C12, *англ. immortalized mouse myoblast cell line*).

Перечисленные клеточные линии предоставляют ценные модели для изучения множества вопросов, связанных со скелетными мышцами, включая регенерацию тканей, гипертрофию, атрофию и различные мышечные заболевания [72,139].

Клеточная линия L6 была выделена из мышечных клеток крыс и широко используется в исследованиях скелетной мышцы. Она была получена в результате иммортализации первичных миобластов крыс, что позволило клеткам сохранять способность к дифференцировке в миотубулы при сохранении контроля над клеточным циклом [143].

Данная клеточная линия особенно ценится за использование в исследованиях, направленных на изучение метаболических процессов, в том числе инсулинозависимых, что делает её важным инструментом для изучения диабета и других нарушений [67]. L6 также используется для тестирования различных фармакологических агентов и изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе мышечной функции и адаптации. Клетки L6 подходят для изучения мышечной гипертрофии и атрофии, а также оценки сигнальных путей, регулирующих дифференцировку и рост мышечных клеток [35,139].

L6 обладают уникальной способностью дифференцироваться в миотубулы, что делает их удобными для изучения процессов, связанных с развитием и функционированием мышечных волокон. Однако, как и любая клеточная линия, L6 имеет свои ограничения, например, изменения в свойствах клеток при длительном культивировании [196].

Клеточная линия HSkMC, или первичные человеческие скелетные мышечные клетки, которые происходят непосредственно от тканей скелетных мышц человека. Эти клетки обычно извлекаются из биопсий мышечной ткани и используются в исследованиях благодаря их физиологической релевантности для человека [40].

HSkMC представляют собой важный инструмент для изучения: они позволяют исследовать функции и метаболизм мышц человека в норме. Данная клеточная линия используется для моделирования различных мышечных дистрофий и других заболеваний, изучения процессов регенерации мышечной ткани, тестирования новых лекарственных средств, направленных на лечение мышечных расстройств [72,32,151].

HSkMC обладают высокой релевантностью для человеческой биологии, благодаря своему происхождению, что делает их особенно ценными для клинических исследований. Однако они требуют более сложных условий культивирования по сравнению с иммортализованными клеточными линиями и имеют ограниченный срок жизни в культуре, что может представлять определенные трудности при проведении длительных экспериментов [152].

Клеточная линия C2C12 была выделена из мышечных клеток мышей и является одной из наиболее часто используемых клеточных линий для исследования дифференцировки скелетных мышц. Клеточная культура является субклоном популяции миобластов C2 [197].

Недифференцированные клетки одноядерные, имеющие отростчатую, веретенообразную форму. При переводе клеточной культуры C2C12 на питательную среду, содержащую 2% лошадиную сыворотку [90] запускается процесс дифференцировки миобластов. В первый день дифференцировки, который

принимается за ранний этап миогенеза, происходит объединение клеток и образование двоядерных структур [48,76]. На среднем этапе дифференцировки (инкубация клеток в дифференцировочной среде 4 дня) увеличивается количество многоядерных клеток, происходит их удлинение [76].

Седьмой день дифференцировки принимается за поздний этап, он характеризуется образованием длинных полиядерных миотрубок. Они имеют удлиненную структуру с более чем 20 ядрами и иногда имеют Y-образную форму. Поперечные сечения в многоядерных структурах показывают взаимоотношения между тонкими и толстыми нитями, которые схожи с мышечной тканью взрослого человека [48].

Клеточная линия C2C12 используется в качестве модельной системы для изучения этапов миогенеза и влияния на него различных биологических веществ, для изучения экспрессии специфических и неспецифических белков мышечной ткани, а также для исследования различных биохимических путей. На данной клеточной линии активно изучают различные типы мышечных дистрофий (Дюшенна, Эмери-Дрейфуса и т.д.) *in vitro* [70,141], сократительную активность с применением системы мышечная трубка C2C12/фибриновый гель [116], а также формирование актиновых нитей после образования миотрубок с использованием двумерных мышечных синцитий на стекле [134].

Клеточная линия C2C12 удобна для изучения фундаментальных процессов мышечной ткани благодаря простоте культивирования и способности к дифференцировке. Однако, как и в случае с любой клеточной линией, при работе с C2C12 необходимо учитывать потенциальные ограничения, такие как изменения в клеточных свойствах, которые могут происходить в результате длительного культивирования.

Клеточные линии



Рисунок 3 – Сравнительная характеристика миогенных клеточных линий

Примечание – «+» – преимущества клеточной линии; «-» – недостатки клеточной линии; C2C12 – immortalized клеточная линия миобластов мышцы; L6 – immortalized клеточная линия скелетных мышц крысы; HSkMC – первичная линия клеток скелетных мышц человека

1.2. Сукцинатный рецептор: структура, реализация эффектов, функции

Рецептор сукцината 1 (SUCNR1, GPR91, *англ. Succinate receptor 1*) относится к большому семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR, *англ. G protein-coupled receptors*), который имеет такое название за счет связывания с гуаниновыми нуклеотидами. GPCR разделяется на разные группы по сходству аминокислотной последовательности или виду лиганда. SUCNR1 принадлежит к родопсин-подобным GPCR тип δ [174].

1.2.1. Структура и локализация сукцинатных рецепторов

Трансмембранные домены SUCNR1 связаны гидрофильными внеклеточными петлями (ECL, *англ. extracellular loops*). Вершины 2 и 3 петли (ECL2 и ECL3) соединены дисульфидным мостиком из остатков цистеина. Вторая дисульфидная связь образована между N-концом рецептора и концом ECL3, образуя псевдопетлю «ECL4» [170] (Рисунок 4). Также в структуре SUCNR1 присутствуют два сайта гликозилирования: N⁸, находящийся на N-конце и N¹⁶⁸ - на ECL2. На C-конце находится сайт фосфорилирования S³²⁶ [102,193].

SUCNR1 имеет 7 трансмембранных доменов (TM1-7). При этом TM1 и TM2 соединены между собой водородной связью по N^{1.50} и L^{2.46}XXXD^{2.50} соответственно [122]. Консервативный мотив E/DR^{3.50}Y участвует в контроле стимуляции GPCR за счет R^{3.50}, создающего «ионный замок» с глутаматом в TM6. При его нарушении TM6 перемещается, тем самым облегчая связь с G-белком, одновременно Y^{7.53} (E/DR^{3.50}Y) переходит внутрь пучка TM, блокируя открытую конформацию TM6 [37]. Однако SUCNR1 содержит V^{6.42}, который может устранить взаимодействие TM6 с консервативным мотивом DRY. Иной путь может идти по мотиву HRY, который имеется у SUCNR1 и у P2Y (пуринергические рецепторы, с которыми GPR91 имеет схожие особенности), H^{3.49} отталкивает R^{3.50}, что приводит к стабилизации C-конца за счет образование водородной связи между R^{3.50} и A^{7.55} [199].

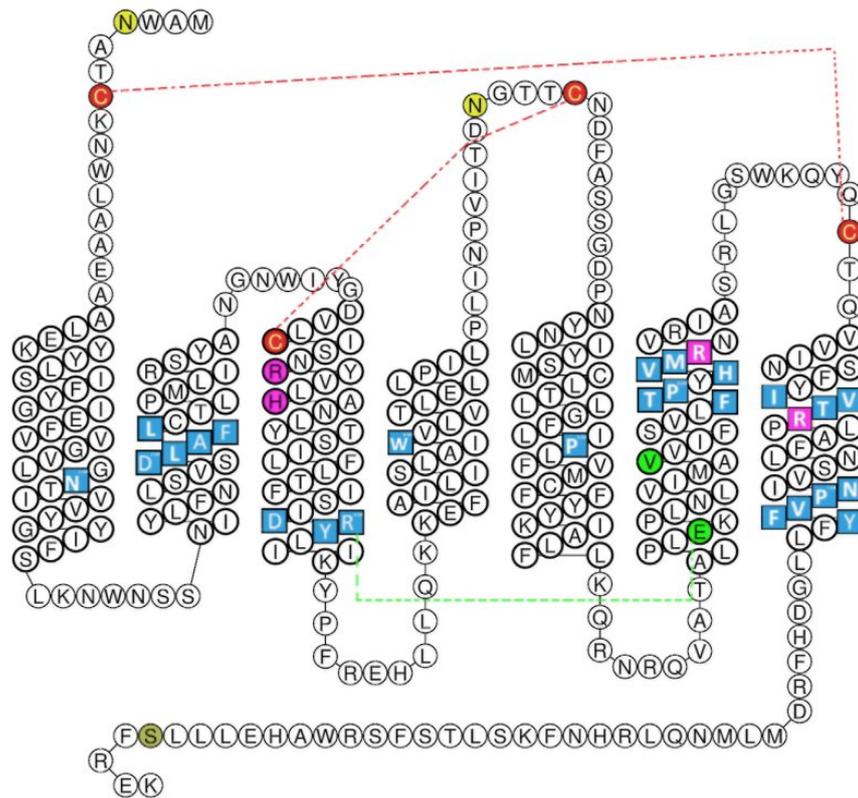


Рисунок 4 – Структура мембранного белка SUCNR1 (Цит. по Gilissen J. et al., 2016) [93]

Примечание – Синий – аминокислота консервативная семейству родопсинов; красный – предполагаемый дисульфидный мостик; зеленый – V^{6.42} может исключить образование ионного замка между E^{6.32} и мотивом DRY; желтый – потенциальный сайт гликозилирования; коричневый – возможный сайт фосфорилирования; фиолетовый – аминокислоты, участвующие во взаимодействии SUCNR1-янтарная кислота

SUCNR1 локализован во многих тканях и органах, например, в почках [30,102,165], сердце [164,185], печени [159], головном мозге [86], сетчатке глаза [66,178], клетках крови – тромбоцитах [57,160,167,186].

В мышечной ткани SUCNR1 также локализован и отмечена его роль в процессах адаптации при выполнении физической нагрузки. Так, например, в экспериментах на мышцах было доказано, что нокаут SUCNR1 приводил к торможению ремоделирования скелетных мышц при экзогенном воздействии сукцината [142]. В работах Wang T. et al (2019), было доказано, участие SUCNR1 в ремоделирование скелетных мышц, что было опосредовано нисходящим сигнальным путем через кальций/ядерный фактор активированных Т-клеток [161] (Рисунок 5). Однако, имеются литературные данные, демонстрирующие роль SUCNR1 в адаптивном ответе скелетных мышц на физическую нагрузку,

опосредованную паракринными механизмами, включающими M2-подобные макрофаги внутри мышцы [161].

В клетках линии C2C12 было показано наличие сукцинатных рецепторов, концентрирующихся на мембране мышечных волокон. Янтарная кислота воздействует SUCNR1, активируя Gq-белок, влияет на внутриклеточный уровень Ca^{2+} , который контролирует выработку АТФ в митохондриях. Через данный механизм янтарная кислота может стимулировать III комплекс дыхательной цепи и АТФ-синтазу, ускоряя окислительное фосфорилирование. Кратковременное введение янтарной кислоты способствовало снижению продукции активных форм кислорода и лактата в скелетных мышцах мышей и клетках линии C2C12 [31].

SUCNR1 обладает высокой специфичностью к янтарной кислоте, структурно-родственные аналоги и метаболиты цикла Кребса не могут активировать SUCNR1, только малеат и метилмалонат способны вызвать слабый ответ [56] (Таблица 2). Сигнал с GPCR передается на G-белок и запускает его конформационные изменения. После активации янтарной кислотой рецептор, связывается с гетеротримерным G-белком. G-белок состоит из трех субъединиц: α , β и γ , где α -субъединица связывает и гидролизует ГТФ, в свою очередь β , γ - находятся в виде тесно связанного димера.

Существует несколько изоформ α -субъединицы: α_s (стимулирующая), α_i (ингибирующая), α_q (активирующая фосфолипазу C). Механизм передачи сигнала зависит от типа G-белка: G_i , G_s регулируют аденилатциклазу (АЦ), катализирующую образование цАМФ, G_q активирует фосфолипазу C и высвобождения ионов Ca^{2+} внутри клетки, $G_{12/13}$ - регулируют организацию цитоскелета клеток. SUCNR1 действует через белки G_i и G_q , имеющих α_i - и α_q -субъединицы, соответственно [166] (Рисунок 5).

SUCNR1 играет ключевую роль в контроле энергетического метаболизма, реагируя на повышенные уровни сукцината, которые могут накапливаться при гипоксии или дисфункции митохондрий [85]. Активация SUCNR1 ведет к увеличению уровня реактивных форм кислорода и стимулирует различные метаболические пути [31].

При связывании с янтарной кислотой SUCNR1 стимулирует внутриклеточные сигнальные каскады, такие как пути MAPK, PI3K/ AKT, и ядерный фактор «каппа-би» (NF-κB, *англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) что ведет к разнообразным клеточным реакциям, включая пролиферацию, выживание клеток и воспаление [93]. За счет того, что данный рецептор расположен в почках, он может участвовать в регуляции артериального давления, способствуя высвобождению ренина [30] (Таблица 2).

Возможные и предполагаемые механизмы действия SUCNR1 в мышечной ткани представлены на Рисунке 5.

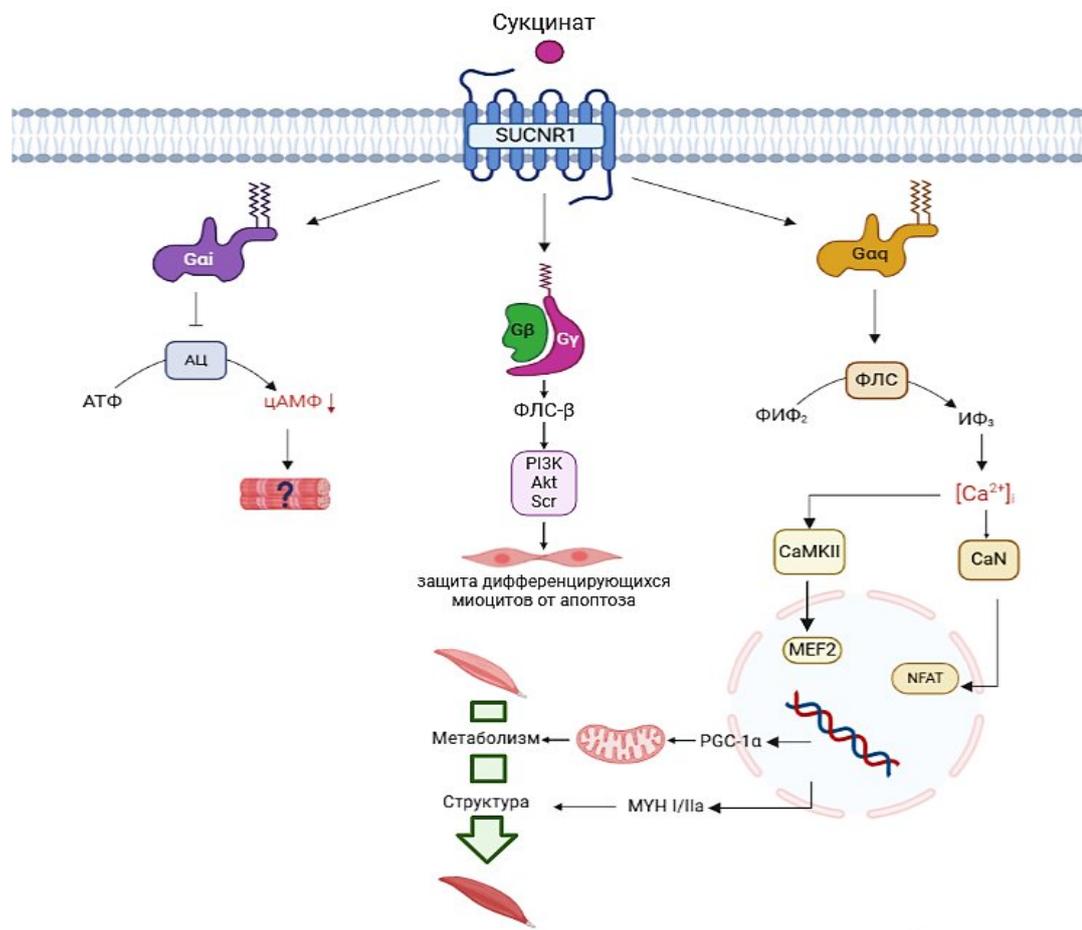


Рисунок 5 - Сигнальные пути, активирующиеся после связывания янтарной кислоты с рецептором SUCNR1 в мышечной ткани (Цит. по Gilissen J. et al., 2016, Wang T. et al., 2019) [93,161]

Таблица 2 – Действие SUCNR1 в различных клетках и органах

Ткань/ орган	Клеточные линии/ клеточные подтипы	Сигнальные пути и эффекты	Патофизиологические эффекты	Источник
Почки	Клетки почек и плотного пятна, MDCK, GENC	Фосфорилирование p38, ERK1/2, высвобождение ренина через COX-2, PGE2, NO, \uparrow Ca ²⁺	Почечные осложнения, гипертензия	[30,102,165]
Мозг	RGC-5 и RPA	\uparrow VEGF через PGE ₂ и EP ₄	Реваскуляризация мозга	[86]
Сердце	Сарколемная мембрана, Т-трубочки кардиомиоцитов	\uparrow Ca ²⁺ , фосфорилирование PLN, RyR2, фосфорилирование ERK1/2, экспрессия CaMKII δ , транслокация HDAC5, передача сигналов PI3K/Akt	Сердечная гипертрофия, гибель миоцитов, гипертрофия правого желудочка	[164,185]
Сетчатка	RGC-5	ERK1/2, JNK, \uparrow VEGF/клеточной пролиферации через COX-2 и PGE2	Диабетическая ретинопатия, слепота	[66,178]
Печень	Звездчатые клетки печени	\uparrow α -SMA, \uparrow трансдифференцировки	Фиброз печени	[159]
Белый жир		G _i	Ингибирование липолиза	[149]
Костный мозг	Эритроиды, TF-1	G _i , \uparrow IP, ERK1/2	Стимуляция иммунитета, защита от апоптоза	[177]
Кровь	iDCandU937	\uparrow Ca ²⁺ , ERK1/2, \uparrow TNF- α , IL-1 β и цитокинов, миграция iDC, G _i \downarrow цАМФ, АКТ, перекрестные взаимодействия с другими GPCR (ADP, TXA2), \downarrow агрегации тромбоцитов	Усиление агрегации тромбоцитов и иммунитета при отторжении трансплантата; \downarrow антитромбоцитарной активности	[57,160,167, 186]
Скелетные мышцы	C2C12	\uparrow MYH I, \downarrow MYH IIb, \uparrow активности СДГ, \downarrow ЛДГ и лактата в миотрубочках		[161]

1.2.2. Механизм функционирования сукцинатных рецепторов через G-белки

Связывание рецептора с лигандом приводит к активации G-белка, α -субъединица которого диссоциирует от β , γ -димера и активирует фосфолипазу C. Данный фермент играет ключевую роль во внутриклеточной сигнализации, гидролизуя фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ2) на две молекулы вторичных мессенджеров: диацилглицерол (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ3) [93].

ИФ3 связывается со своим рецептором на мембране эндоплазматического ретикулума, что приводит к высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ [166].

Существуют противоречивые данные, что повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме может как вызывать стимуляцию клеточного роста и синтеза белков, активацию различных кальций-зависимых ферментов (кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII), MAPK, PI3K и др.), так и наоборот оказывать отрицательный эффект на развитие мышечной ткани [136].

Кальмодулин-зависимая протеинкиназа II участвует в регуляции различных клеточных процессов, таких как рост, дифференцировка и апоптоз. Активация CaMKII приводит к фосфорилированию факторов транскрипции белка, связывающего элемент ответа цАМФ (CREB, *англ. cAMP response element-binding protein*) и NF- κ B [164].

CREB стимулирует экспрессию генов, кодирующих белки, которые участвуют в таких процессах, как клеточная пролиферация, дифференцировка и выживаемость. NF- κ B является транскрипционным фактором, участвующим в регуляции экспрессии генов, связанных с воспалением, иммунитетом, апоптозом и клеточным циклом [93,164].

В мышечной ткани CaMKII стимулирует экспрессию MEF2, что способствует образованию MYH I/IIa [161].

Другим кальций-зависимым ферментом является кальциневрин. Активация фермента способствует дефосфорилированию ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) и его переходу в ядро, при этом перемещении NFAT регулирует кальций-зависимые гены-мишени, которые способствуют образованию МҮН I [19,183].

ДАГ – второй посредник липидной природы, образовавшийся при гидролизе ФИФ2. Он активирует протеинкиназу С, которая в свою очередь фосфорилирует различные белки, такие как факторы транскрипции (АКТ, JNK, ERK, CREB и др.), ионные каналы (например, Ca^{2+} - каналы) и рецепторы (гистаминовые, мускариновые, β -адренергические и др.) [85,161].

Кроме описанного выше действия через Gq, механизм действия SUCNR1 может осуществляться через Gi. После связывания янтарной кислоты, SUCNR1 активирует белок Gi, который является ингибиторным G-белком. Активированный Gi подавляет активность аденилатциклазы, фермента, который катализирует превращение АТФ в циклический АМФ (цАМФ). Уменьшение активности аденилатциклазы приводит к снижению уровня цАМФ в клетке, который влияет на различные клеточные функции, такие как секреция гормонов, мобилизация кальция и другие важные процессы. Также вследствие снижения цАМФ не происходит активации протеинкиназы А, которая катализирует различные ферменты (ацетил-КоА-карбоксилазу и пируватдегидрогеназу), белки и транскрипционные факторы [85].

SUCNR1 активирует Gi при более низком содержании янтарной кислоты, чем для активации Gq [77]. Изучено, что передача сигналов SUCNR1 через Gi ответственна за его острые эффекты, например, за миграцию иммунных клеток [168] и ингибирование липолиза в адипоцитах [149].

Таким образом, актуальным и важным аспектом изучения является биохимический механизм действия SUCNR1 через G-белки.

1.2.3. Pertussis toxin как модулятор передачи сигналов через G-белки

Коклюшный токсин (РТ, англ. pertussis toxin) – это белок с молекулярной массой 105 кДа, использующийся для изучения передачи сигналов через гетеродимерные G-белки. РТ секретируется возбудителем коклюша *Bordetella pertussis*.

Структуру РТ образуют пять субъединиц: S1, S2, S3, S4, S5. Субъединица S1 (протомер А) обладает наибольшей ферментативной активностью, а субъединицы с S2 по S5, образующие гетеромультимерный комплекс (В-олигомер), отвечают за связывание РТ с рецептором на поверхности клеток [46].

Коклюшный токсин катализирует АДФ-рибозилирование по остаткам цистеина (Cys351) на С-конце специфических α -субъединиц тримерных G-белков семейства $G_{i/o}$ (G_i/G_o).

В качестве донорного субстрата для этой реакции используется никотинамидадениндинуклеотид ($НАД^+$), гидролизующийся на никотинамид и АДФ-рибозу, которая присоединяется к субстрату - $G_{i/o}$. Акцептор связывается с С-концевой областью РТ субъединицы S1, его 180 – 219 остатки обеспечивают высокоаффинное связывание с G-белком. При удалении этих остатков нарушается реакция АДФ-рибозилирования и соединения с G-белком [103].

Тиол активирует РТ за счет восстановления дисульфидной связи для высвобождения протомера А из В-олигомера и для открытия активного сайта S1 субъединицы. Другим активатором является молекула АТФ, которая диссоциирует протомер А от холотоксина.

Аминокислотный остаток Arg-9 РТ участвует в связывании $НАД^+$ [156]. Glu-129 и His-35 являются аминокислотными остатками РТ, участвующими в ферментативном катализе.

Glu-129 восстанавливает протон рибозы 2'-ОН $НАД$, создавая дестабилизацию никотинамид-рибозильной связи.

Роль His-35 заключается в активации акцепторного остатка цистеина в G-белке, для облегчения нуклеофильной атаки, ослабленной N-гликозидной связи.

Это приводит к высвобождению никотинамида и переносу АДФ-рибозила на G-белок [104].

Следовательно, благодаря своим биохимическим свойствам РТ используется для изучения механизмов действия веществ через рецепторы, связанные с G-белками, особенно ингибирующими Gi-белками. За счет АДФ-рибозилирования α -субъединицы Gi-белков РТ блокирует их функцию, что приводит к изменению клеточной сигнальной передачи и вызывает эффекты, такие как повышение уровня цАМФ.

1.3. Участие клеточных метаболитов, биологически активных веществ и лекарственных препаратов в регуляции миогенеза

Клеточные метаболиты, биологически активные вещества и лекарственные средства играют ключевую роль в регуляции миогенеза скелетной мышечной ткани, обеспечивая как стимуляцию, так и ингибирование процессов, связанных с развитием и восстановлением мышечных клеток.

Метаболиты, такие как молочная кислота, могут также сигнализировать о необходимости адаптации и регенерации мышечной ткани после физической нагрузки.

Гормоны (например, тестостерон и инсулин), факторы роста (например, IGF1) и цитокины могут активировать сигнальные пути, такие как mTOR, которые отвечают за синтез белка и клеточную пролиферацию, способствуя увеличению мышечной массы и силы.

Некоторые препараты, такие как анаболические стероиды, могут значительно усиливать синтез белка и способствовать гипертрофии мышц. Другие препараты, такие как миорелаксанты или противовоспалительные средства, могут влиять на восстановление мышечной ткани после травм или нагрузок, регулируя воспалительные процессы и улучшая регенерацию.

1.3.1 Роль метаболитов обменных процессов в регуляции миогенеза

На данный момент широко исследуется влияние различных веществ при их экзогенном введении на поддержание жизнедеятельности организма. Скелетная мышечная ткань может подвергаться гипертрофии и атрофии, что опосредовано дисбалансом белкового обмена [191]. Активно изучается действие питательных веществ, основанное на их биохимических свойствах и участии в обменных процессах.

Одним из таких веществ является аминокислота L-карнитин. Ацетилирование β -гидроксильной группы позволяет ей играть важную роль в энергетическом метаболизме. Также карнитин принимает участие в связывании длинноцепочечных жирных кислот и транспорте их в матрикс митохондрий, где они используются в β -окислении [69]. Было изучено, что карнитин способствует активации миогенных регуляторных факторов: MyoD, Myf5, из-за чего тормозится процесс пролиферации и запускается дифференцировка миобластов. Также карнитин стимулирует экспрессию миогенина, участвуя в терминальной дифференцировке [98].

Помимо карнитина положительное влияние на развитие скелетных мышц оказывает условно незаменимая аминокислота аргинин. Она стимулирует синтез белка путем активации сигнального пути mTOR, влияет на миогенез за счет повышения концентрации цитозольного Ca^{2+} , ускоряя дифференцировку миобластов и образование миотруб [33].

Известно, что рост клеток мышечной ткани регулируется сигналами гормонов и компонентами питания [169], позже было доказано, что физические упражнения способствуют снижению проявления атрофии. Тренировки различной интенсивности и кратности повышали содержание метаболитов окисления жирных кислот (октаноилкарнитина) и цикла трикарбоновых кислот (α -кетоглутарата, сукцината) [119].

Сукцинат – это анион янтарной кислоты, который в физиологических условиях содержится в матриксе митохондрий. Он является метаболитом

цитратного цикла, где окисляется до фумарата, выступая донором протонов и электронов для сукцинатдегидрогеназы (II комплекс дыхательной цепи) [150]. В цепи переноса электронов сукцинатдегидрогеназа участвует в восстановлении убихинона до убихинола путем передачи электронов через железосерные белки, тем самым вносит свой вклад в образование аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях.

Таурин, как антиоксидант, помогает защищать мышцы от окислительного стресса, который может возникнуть при интенсивных физических нагрузках или заболеваниях мышечной ткани. Таурин повышает активность внутриклеточных антиоксидантов, способствует экспрессии MyoD, MyoG и MHC, повышает соотношение фосфорилированного АКТ1 к нефосфолированному, тем самым положительно влияет на дифференцировку миобластов. Также таурин способствует синтезу восстановленной формы глутатиона, повышает использование клетками глюкозы, пополнение цитратного цикла, за счет этого облегчая протекание миогенеза [173].

Глюкоза является основным источником энергии в мышечной ткани, в миобластах она транспортируется при помощи специальных переносчиков: транспортеров глюкозы (GLUT, *англ. Glucose transporter 1*, например, GLUT1, GLUT4).

GLUT1 встречается во всех тканях организма и обеспечивает базальный транспорт глюкозы в клетках. GLUT4 является инсулин-зависимым и в больших количествах образуется в миобластах.

При стимуляции инсулином GLUT4 перемещается к цитоплазматической мембране, обеспечивая усиленный транспорт глюкозы. Высокий уровень глюкозы в два раза снижает экспрессию MyoD, MyoG, MHC и повышает уровень внутриклеточного миостатина. Однако высокий уровень глюкозы и инсулина способствуют этапу дифференцировки, стимулируя экспрессию MyoG, увеличивая индекс миогенеза и вызывая снижение концентрации миостатина внутри клетки [24,90].

Одним из важных микроэлементов, необходимых для жизнедеятельности организма, является селен. Известно, что он повышает экспрессию MyoD, MyoG, а его добавление при тепловом стрессе сглаживает негативное воздействие высоких температур на мышечную ткань [154].

Таким образом, исследования воздействия экзогенных химических веществ показывают, что они могут модулировать активность транскрипционных факторов и сигнальных путей, важных для миогенеза. Однако потенциальные токсические эффекты и долгосрочные последствия их применения требуют дополнительного изучения.

Важно отметить, что взаимодействие экзогенных веществ с эндогенными регуляторами миогенеза может быть сложным и многогранным, поэтому дальнейшие исследования должны быть направлены на полное понимание механизмов их действия и определение оптимальных условий для их применения в клинической практике.

В Таблице 3 представлены результаты экспериментов с клеточной линией C2C12, которая широко используется в качестве модели для изучения дифференцировки миобластов в миотубулы. Эти данные демонстрируют потенциал определенных соединений для стимуляции миогенеза и представляют основу для дальнейшего анализа их терапевтического использования.

Накопленные знания по механизмам регуляции миогенеза, в том числе воздействию экзогенных веществ с представлениями о механизмах действия через транскрипционные факторы, могут быть использованы для запуска скелетно-мышечной программы в стволовых и дифференцированных соматических клетках [15].

Таблица 3 – Влияния лекарственных препаратов и биологически активных веществ на клетки линии C2C12

Вещества	Влияние на клетки C2C12	Источник
Лекарственные препараты		
Аторвастатин Симвастатин	↓ связывание Rac1-GTP, нарушают усвоение глюкозы и транслокацию GLUT-4.	[36,112]
Дексаметазон, кортизон	Ингибируют миогенез, ↓ экспрессию MyoD и MyoG, ↑ экспрессию генов мышечной атрофии	[58]
Кверцетин	↑ фосфорилирование АКТ, подавляет миостатин	[146]
N 6 - м е т и л - 2 0 - дезоксаденозин	Индукцирует дифференцировку, ↑ MyoG, синтез mTOR, p21 и MYH	[135]
Теафлавин	Индукцирует экспрессию MyoD, MyoG и MYH, ускоряя дифференцировку.	[180]
Хемерин	Ингибирует миогенез, перепрограммирует клетки на адипогенез, ↑ ТАГ, активные формы кислорода (АФК)	[54]
Ранолазин	↑ MRF, ингибирует фактор клеточной прогрессии, ↓ АФК и поддерживает митохондриальный гомеостаз.	[147]
Биологически активные вещества		
Витамин Д	Ингибирует пролиферацию и дифференцировку, MRF, ↑ размер мышечных волокон	[192]
Витамин С	↑ экспрессию MyoG и MYH 1	[123]
Коллаген 1 типа	↑ экспрессию MyoG, MyoD, MYH	[188]
Креатин	Активирует MEF2, MyoD, экспрессию генов MYH II, тропонина Т, титина (через p38 MAPK), ↑ рост миотрубочек (через ERK1/2), повышает синтез белка (через Р13К/АКТ).	[59]
Наночастицы ZnO	↑ MyoD, MyoG, MYH, ↑ дифференцировку миобластов	[42]
Янтарная кислота	↑ аэробный метаболизм, ↑ экспрессию MYH I/IIa	[161]
Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), Докозагексаеновая кислота (ДГК)	Ингибируют пролиферацию и дифференцировку миобластов C2C12 и снижают уровни фосфорилирования ERK1/2 и АКТ	[74]

1.3.2. Янтарная кислота – эндогенный регулятор метаболизма и компонент лекарственных средств

Янтарная кислота – органическое соединение, которое является промежуточным продуктом обмена веществ, участвующим в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). В цикле Кребса янтарная кислота образуется из макроэргического соединения сукцинил-КоА, также в этой реакции синтезируется молекула АТФ. Янтарная кислота может накапливаться в цитоплазме при стрессе, ишемии, опухолевом росте, активации иммунных клеток в результате нарушения регуляции метаболизма в митохондриях, анаэробного гликолиза, глутаминзависимого анаплероза [87]. Янтарная кислота и её производные участвуют в синтезе гема, ГАМК-шунте, окислении кетоновых тел, метаболизме разветвленных аминокислот, регуляции превращений активных форм кислорода [184]. Также янтарная кислота по остаткам лизина сукцинирует белок и отвечает за его посттрансляционную модификацию в митохондриях и в других органоидах клетки.

Янтарная кислота играет важную роль в работе дыхательной цепи митохондрий – основном процессе получения энергии в клетках. Она является субстратом для II комплекса цепи переноса электронов (сукцинатдегидрогеназа, СДГ), который катализирует окисление янтарной кислоты до фумаровой кислоты с образованием восстановленного флавинадениндинуклеотида (ФАДН₂). Благодаря данному коферменту при сопряжении окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания синтезируется 2 молекулы АТФ.

Янтарная кислота играет ключевую роль в адаптации клетки к гипоксии, стимулируя гипоксия-индуцибельный фактор 1α (HIF-1α, *англ. Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) [162]. При активации HIF-1α, происходит его связывание с определенными участками ДНК и стимуляция транскрипции генов, которые отвечают за адаптацию клетки к условиям гипоксии и увеличение продолжительности ее жизни. Примерами таких генов могут быть гены, отвечающие за ангиогенез (образование новых кровеносных сосудов), метаболизм глюкозы и дифференцировку клеток [91,92] В ряде исследований было показано,

что этот фактор может запускать процесс миогенной дифференцировки, а янтарная кислота стимулирует экспрессию HIF-1 α [92162].

В условиях гипоксии янтарная кислота действует на HIF-1 α через несколько механизмов:

1. Ингибирование пролилгидроксилазы. Повышенное содержание янтарной кислоты действует как внутриклеточный мессенджер путем ингибирования 2-оксоглутаратзависимых диоксигеназ. Так подавляется активность пролилгидроксилазы - фермента, который участвует в деградации HIF-1 α путем гидроксилирования пролина. Это приводит к накоплению активной формы HIF-1 α и увеличению его транскрипционной активности [163].
2. Увеличение экспрессии фермента сукцинатдегидрогеназы (СДГ). СДГ катализирует превращение янтарной кислоты в фумаровую кислоту. Повышение экспрессии СДГ приводит к увеличению концентрации янтарной кислоты и её воздействию на HIF-1 α [158].

Янтарная кислота является эндогенным метаболитом, однако может поступать и экзогенно, поэтому можно предположить, что также влияет на активность прегнан X рецептора (PXR, *англ. pregnane X receptor*) посредством изменения внутриклеточной концентрации веществ или через сигнальные пути, связанные с обменными процессами. PXR – это ядерный рецептор, который играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов, ответственных за метаболизм и транспорт различных эндогенных и экзогенных соединений в организме. PXR активируется при воздействии на него стероидов, лекарственных средств, а также других химических веществ, которые поступают в организм [55]. В исследовании на клетках линии C2C12 было показано, что флаваноид (-)-эпикатехин (выполняющий антиоксидантную функцию в растениях) индуцировал миогенную дифференцировку клеток линии C2C12 за счет индукции прегнан X рецептора [145].

PXR функционирует как сенсор для чужеродных соединений, обнаруживая их присутствие и инициируя ответный метаболический путь для их элиминации из организма. Это позволяет организму адаптироваться к различным внешним

факторам и поддерживать гомеостаз в условиях изменяющейся среды. Активация PXR приводит к изменениям в метаболизме лекарственных препаратов, что может влиять на их эффективность и безопасность [80].

Диффундируя в межклеточный интерстиций, а затем в кровотоки янтарная кислота может связываться со своими рецепторами на мембране клеток и оказывать гормоноподобное действие, регулируя физиологические и патологические процессы. Для выхода из цитоплазмы янтарная кислота подвергается протонированию, превращаясь в монокарбоновую кислоту, в такой форме она может соединиться с транспортером монокарбоксилатов 1 (MTC1, *англ. monocarboxylate transporter 1*) и проникать во внеклеточное пространство [111]. MTC1 является представителем семейства переносчиков растворенных веществ. Помимо янтарной кислоты MTC1 транспортирует через плазматическую мембрану L-лактат, пируват, кетоновые тела [88].

На данный момент существует небольшое количество лекарственных препаратов, содержащих янтарную кислоту: Инозин + Никотинамид + Рибофлавин + Янтарная кислота, Меглюмина натрия сукцинат, Инозин + Меглюмин + Метионин + Никотинамид + Янтарная кислота, Этилметилгидроксипиридина сукцинат. В таких препаратах янтарная кислота рассматривается, как биологически активное вещество, оказывающее антигипоксантажное действие [12].

Инозин + Никотинамид + Рибофлавин + Янтарная кислота (торговое название – цитофлавин) - оригинальный отечественный препарат, обладающий антигипоксантажным и антиоксидантным действиями, применяющийся для лечения ишемического инсульта и дисциркуляторной энцефалопатии. Компоненты, входящие в состав лекарственного вещества, могут оказывать как самостоятельный эффект, так и потенцировать действие друг друга. Благодаря коферментным формам рибофлавина улучшаются антигипоксантажные свойства янтарной кислоты за счет повышения активности СДГ, нормализации отношения восстановленного и окисленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Коферментные формы никотинамида (НАД⁺ и никотинамидадениндинуклеотид фосфат, НАДФ⁺) принимают участие во многих метаболических процессах: цикл Кребса, распад и

синтез жирных кислот, гликолиз и т.д. Также НАДФ⁺ является компонентом антиоксидантной системы клетки, так как входит в состав фермента глутатионредуктазы, катализирующего восстановление окисленного в процессе обезвреживания перекиси водорода глутатиона. Инозин – метаболит пуринового обмена, благодаря которому происходит увеличение содержания АТФ, гуанозинтрифосфата (ГТФ), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), а также снижение активности ксантиноксидазы [8]. На данный момент не имеется данных о влиянии цитофлавина на скелетную мышечную ткань.

Меглюмина натрия сукцинат (торговое название – реамберин) – отечественный лекарственный препарат, применяющийся при острых интоксикациях (например, острых кишечных инфекциях), имеющий антиоксидантное и антигипоксантное действие [16]. Снижает продукцию АФК, улучшает аэробные процессы, стимулирует ферменты ЦТК, окисление жирных кислот и глюкозы, тем самым играет роль восстановителя энергии клетки. При дизентерии применение меглюмина натрия сукцината способствует устранению дисбаланса между окислительной и неокислительной системами организма. Препарат обладает слабощелочными свойствами и умеренной осмолярностью, поэтому он также применяется для восстановления кислотно-основного равновесия при интоксикационном синдроме [12].

Инозин + Меглюмин + Метионин + Никотинамид + Янтарная кислота (торговое название - ремаксол) – российский метаболический лекарственный препарат, применяемый при поражениях печени, обладающий гепатопротекторным действием. Активные компоненты препарата направлены на восстановление гомеостаза и жизнеспособности клеток печени [22]. Ремаксол способствует снижению гиперхолестеринемии, гипергликемии и понижению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Заболевания печени вызывают перекисное окисление липидов гепатоцитов из-за увеличенной продукции свободных радикалов, применение ремаксола сопровождается уменьшением уровня средних

молекул, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, повышением активности супероксиддисмутазы, каталазы, уровня витамина Е [12].

В последние годы ведется активное исследование производных 3-гидроксипиридина. Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, торговое название – мексидол) – двухкомпонентный отечественный препарат, использующийся как нейропротектор, например, при ишемическом инсульте, нарушении мозгового кровообращения, вегетососудистой дистонии, неврозоподобных расстройствах и для лечения заболевания сердца. 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат относится к группе водорастворимых азотистых гетероциклов (Рисунок 6). 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин является производным 3-оксипиридина, который относится к простейшим гетероциклическим аналогам ароматических фенолов, проявляющим антиоксидантное действие. В структуре ЭМГП имеется гидроксильная группа с подвижным атомом водорода, что способствует нейтрализации продуктов перекисного окисления липидов [6].

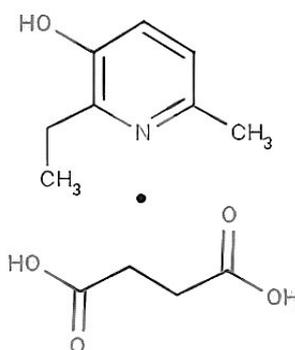


Рисунок 6 – Химическая структура этилметилгидроксипиридина сукцината

Имеются данные, что ЭМГПС защищает железосерные центры, компоненты дыхательной цепи в клетках головного мозга и миокарде, а также способствует функционированию НАДН-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, что показывает энергосинтезирующую роль препарата [6]. Благодаря ЭМГПС увеличивается продукция индуцибельной изоформы NO-синтазы и повышается степень оксигенации гемоглобина [7].

При длительном применении у крыс улучшается двигательная активность и память. Изучено, что ЭМГПС может увеличивать уровень ферментов митохондрий (НАДН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, субъединицы А, цитохрома b, цитохром с оксидазы I), АТФ-синтазы, а также VEGF и повышать скорость потребления кислорода [25]. Кроме этого, показано, что ЭМГПС способен индуцировать антиоксидантные ферменты и экспрессию транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α [4].

Возможные эффекты ЭМГПС на скелетные мышцы:

1. Антиоксидантное действие: ЭМГПС обладает выраженным антиоксидантным эффектом, нейтрализуя свободные радикалы и уменьшая оксидативный стресс в клетках [6]. В скелетных мышцах это может способствовать защите миоцитов (мышечных клеток) от повреждений, вызванных интенсивными физическими нагрузками или воспалительными процессами, такими как миозит.
2. Улучшение энергетического метаболизма: ЭМГПС может улучшать энергетический метаболизм за счет нормализации митохондриальной функции [25], что будет приводить к повышению работоспособности мышц при физической нагрузке.
3. Мембраностабилизирующее действие: ЭМГПС стабилизирует клеточные мембраны, уменьшая их проницаемость и защищая мышцы от повреждений [7]. Это особенно важно при мышечных дистрофиях или других заболеваниях, связанных с нарушением целостности клеточных мембран.

Действие этилметилгидроксипиридина сукцината на скелетные мышцы не является широко изученным, но его антиоксидантные, мембраностабилизирующие и метаболические эффекты могут потенциально оказывать положительное влияние на состояние мышц, улучшая их функцию, устойчивость к стрессу и скорость восстановления после физических нагрузок [5].

Таким образом, янтарная кислота является важным клеточным метаболитом, обладающим спектром действия, что позволяет рассматривать его в качестве терапевтического агента.

1.3.3. Влияние янтарной кислоты на миогенез

Янтарная кислота оказывает многогранное влияние на процесс миогенеза. В качестве ключевого компонента цикла Кребса, она не только способствует энергетическому обмену в митохондриях, но и выполняет роль сигнальной молекулы, влияя на различные клеточные функции. Добавление янтарной кислоты в концентрациях 0,5 и 2 мМ в рацион мышей C57BL/6J способствует повышению эффективности тренировок на выносливость и уменьшает усталость скелетных мышц. Это сопровождается повышением уровня аэробного метаболизма, сукцинат повышает активность СДГ и гексокиназы, увеличением экспрессии MYH I и II, но снижением активности лактатдегидрогеназы [161].

В литературе имеются противоречивые данные, что при добавлении к клеткам C2C12 диметилсукцината – аналога янтарной кислоты, проникаемого для клеток, в концентрации 8 мМ в течение 48 ч наблюдается снижение синтеза белка в пролиферирующих миобластах C2C12. Добавление диметилсукцината (8 мМ) в дифференцировочную питательную среду клеток C2C12 приводило к подавлению MyoD, MyoG и MYH1 (особенно на ранних этапах миогенеза), нарушению способности образовывать зрелые многоядерные структуры [179]. Поэтому необходимо исследовать оптимальные концентрации янтарной кислоты, оказывающие положительное влияние на мышечную ткань, а также установить механизм воздействия данного метаболита.

Основные механизмы влияния янтарной кислоты на миогенез:

1. Энергетический обмен: янтарная кислота является промежуточным продуктом в цикле Кребса, который играет центральную роль в производстве АТФ. Энергия, высвобождаемая в этом процессе, критически важна для синтеза белков и роста мышечных волокон [31,68].
2. Регуляция транскрипции: янтарная кислота накапливается в тканях, может действовать как сигнальная молекула, связываясь с SUCNR1 на мембране клеток, что запускает каскад сигнальных путей внутри клетки, включая фосфолипазу C, протеинкиназу C и MAPK. Активация сигнальных путей

приводит к изменениям в транскрипции генов, которые регулируют дифференцировку и рост мышечных клеток. Например, активация сигнального пути ERK может способствовать клеточному росту, пролиферации и выживанию клеток [31,56,79].

3. Влияние на дифференцировку: янтарная кислота может регулировать дифференцировку миобластов в зрелые мышечные волокна, что является ключевым этапом миогенеза [142].
4. Антиоксидантная защита: в процессе миогенеза АФК наносят повреждения клеткам. Янтарная кислота регулирует образование АФК, что помогает защитить клетки от окислительного стресса [95,118].
5. Антигипоксанта роль: в условиях высокой концентрации янтарная кислота может непосредственно активировать HIF-1 α , позволяя ему накапливаться, даже при нормальном уровне кислорода. В ряде исследований было показано, что HIF-1 α может запускать процесс миогенной дифференцировки [92].

Механизм действия янтарной кислоты, в том числе на мышечную ткань, в настоящее время активно изучается. Одним из возможных механизмов может выступать взаимодействие с SUCNR1. Однако, детально данный аспект не изучен. Одним из важных механизмов рассматривается механизм через G-белки, вследствие чего Pertussis toxin будет выступать в качестве удобного инструмента для изучения механизмов.

Таким образом, янтарная кислота играет важную роль в миогенезе, и ее механизмы действия представляют значительный интерес для научных исследований, направленных на разработку новых методов лечения заболеваний и повреждений скелетной мышечной ткани.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект экспериментальных исследований

Исследование выполнялось на клеточной линии иммортализованных миобластов мыши (C2C12), предоставленной ФГБУН ИБГ РАН, г. Москва.

Данная клеточная линия является прототипом для исследования мышечной ткани, благодаря спонтанной дифференцировке при культивировании в специальных условиях. Поэтому клетки C2C12 используются для изучения миогенеза и влияния на него различных биологических веществ, для анализа экспрессии специфических и регуляторных белков и действия сигнальных путей.

2.2. Культивирование клеток линии C2C12

Культивирование клеток проводили по следующей схеме (Рисунок 7): клеточная культура хранилась в криохранилище, размораживали клетки и высевали на флаконы площадью 25 см². Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все компоненты Sigma-Aldrich, США) соответственно. После достижения 70–90% конфлюентности клетки снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, США), высевали в 6-луночные планшеты (Corning, США) (Рисунок 7). После формирования монослоя инициировалась миогенная дифференцировка путем перевода клеток на дифференцировочную среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки (Sigma-Aldrich, США).

Для выполнения экспериментов были использованы следующие тестируемые вещества: янтарная кислота, этилметилгидроксипиридина сукцинат, коклюшный токсин (Таблица 4).

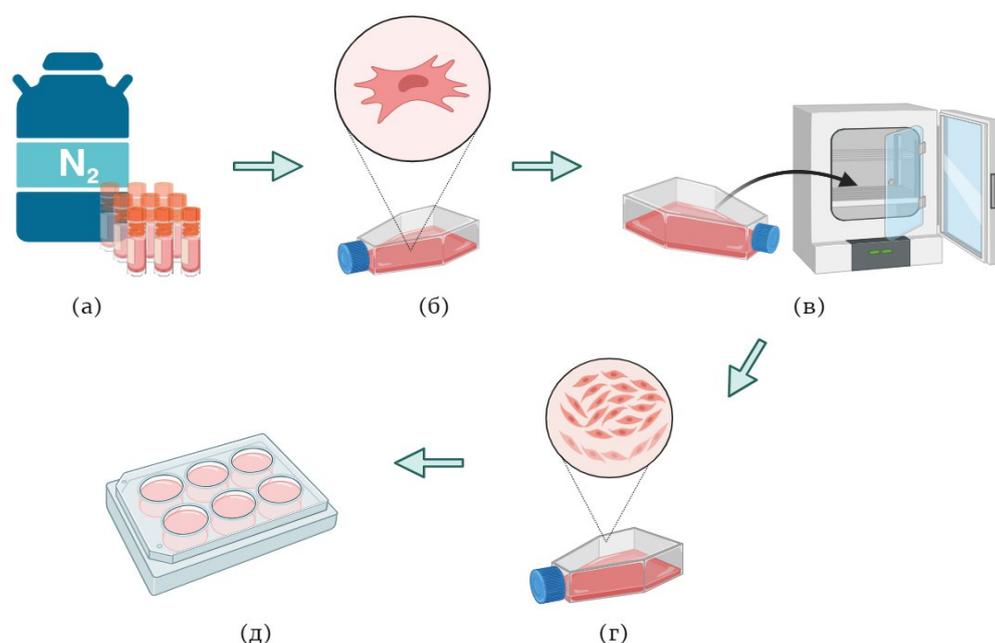


Рисунок 7 – Схема культивирования клеточной линии C2C12

Примечание – а – хранение клеток в криохранилище; б – разморозка и высевание на флаконы 25 см²; в – культивирование клеток в питательной среде при определенных условиях; г – образование монослоя и перенос клеток; д – высевание клеток на 6-луночном планшете.

Таблица 4 – Физико-химические характеристики янтарной кислоты, этилметилгидроксипиридина сукцината, коклюшного токсина

Название	Производитель	Условия хранения	Физико-химические свойства
Янтарная кислота	Shandong feiyang chemical co., КНР	Не выше 25°C	Белый кристаллический порошок, чистота 99,7%
Этилметил-гидрокси-пиридина сукцинат	ООО «БИОН», Россия	Не выше 25°C	От белого до светло-серого с желтоватым оттенком, микрокристаллический порошок, гигроскопичный, чистота 99,8%
Коклюшный токсин (Pertussis toxin)	Cayman Chemical Company, США	2-8°C	Чистота > 90 %, установленная SDS-PAGE, каждая виала после растворения в 500 мкл воды содержит 50 мкг коклюшного токсина в 0,01 М натрия фосфата, 0,05 М натрия хлорида, pH 7,0

2.3. Дизайн исследования

В ходе работы сформировано 4 серии экспериментальных групп (Рисунок 8).

Для каждой группы экспериментов было выполнено по 3 повторения. Клетки культивировались в одинаковых условиях (ежедневно проводился мониторинг условий), замена питательной среды осуществлялась раз в два дня, а замена питательной среды с тестируемым веществом проводилась ежедневно.

I. Первая серия – изучение характерных этапов миогенеза клеток

C2C12

Первая группа – клетки до дифференцировки – инкубация 7 дней с питательной средой, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (n=3);

Вторая группа – анализ изменений морфологии клеток и индекса миогенеза на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза (1, 4, 7 дней дифференцировки соответственно) (n=3);

Третья группа – оценка относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α -актина, MYH), транскрипционных факторов - MyoD, MyoG (n=3) и сукцинатных рецепторов (SUCNR1) на 1, 4, 7 дни дифференцировки;

II. Вторая серия – исследование действия янтарной кислоты на этапы миогенеза клеточной линии C2C12:

1. *Первая группа* – изучение цитотоксического действия янтарной кислоты в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мкМ на клетки линии C2C12 (n=3);

2. *Вторая группа* – оценка изменения морфологии клеток и индекса миогенеза при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мкМ на 1, 4, 7 дни дифференцировки (n=3);

3. *Третья группа* – определение относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α -актина, MYH) и транскрипционных факторов - MyoD, MyoG при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 1, 4, 7 дни дифференцировки (n=3);

4. *Четвертая группа* – определение относительного количества транскрипционных факторов HIF-1 α , PXR при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки (n=3).
5. *Пятая группа* - определение относительного количества SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки (n=3).
6. *Шестая группа* – определение концентрации сукцината внутри клеток при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ (n=3).

III. Третья серия – исследование действия ЭМГПС на этапы миогенеза клеточной линии C2C12:

1. *Первая группа* – изучения цитотоксического действия ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на клетки линии C2C12 - концентрацию ЭМГПС выбирали на основе концентраций янтарной кислоты, чтобы клетки подвергались воздействию эквимольного количества янтарной кислоты, входящего в состав лекарственного вещества (n=3);
2. *Вторая группа* – оценка изменения морфологии клеток и индекса миогенеза при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки (n=3);
3. *Третья группа* – определение относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α -актина, MYH) и транскрипционных факторов - MyoD, MyoG при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки (n=3);
4. *Четвертая группа* – определение относительного количества транскрипционных факторов HIF-1 α , PXR при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки (n=3).

5. *Пятая группа* – определение относительного количества SUCNR1 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки (n=3).

IV. Четвертая серия – изучение механизмов влияния янтарной кислоты и ЭМГПС на миогенез через SUCNR1:

1. *Первая группа* – определение цитотоксического действия Pertussis toxin (ингибитор SUCNR1-Gαi сигнального пути) в концентрации 100 нг/мл [166] на клетки линии C2C12 (n=3);
2. *Вторая группа* - оценка изменения морфологии клеток и индекса миогенеза при самостоятельном действии Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл и в сочетании с янтарной кислотой или ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки (n=3)
3. *Третья группа* – определение относительного количества специфических белков скелетной мышечной ткани (α-актина, MYH), транскрипционных факторов - MyoD, MyoG и SUCNR1 при самостоятельном действии Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл и в сочетании с янтарной кислотой или ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1, 4, 7 дней дифференцировки (n=3).
4. *Четвертая группа* – изучение самостоятельного действия янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ на миобласты в недифференцировочной среде в течение 7 дней дифференцировки (n=3).
5. *Пятая группа* – оценка влияния Pertussis toxin на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой в концентрации 100 мкМ (n=3).

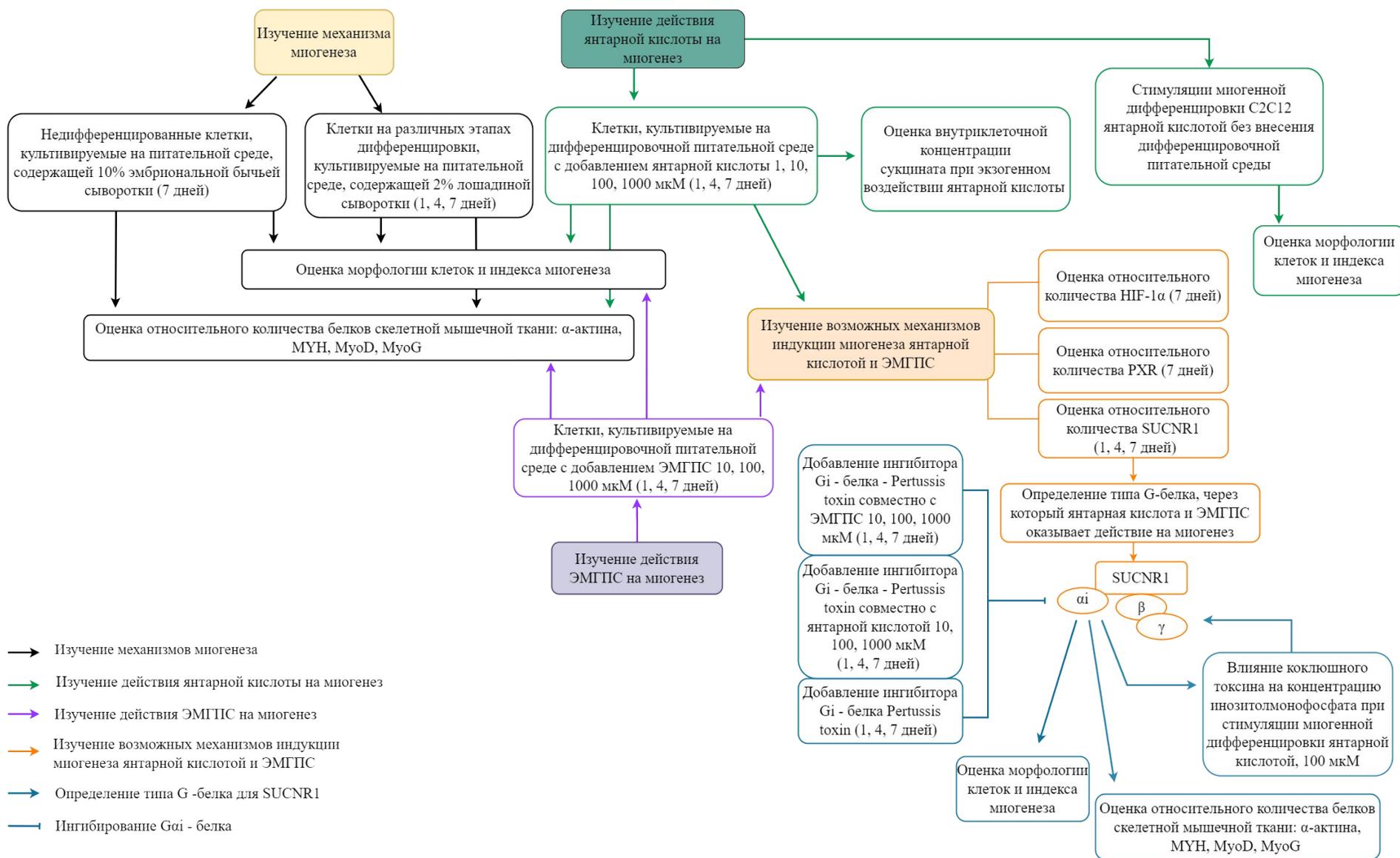


Рисунок 8 – Дизайн исследования

2.4. Исследование цитотоксического действия тестируемых веществ на клеточную линию C2C12

Цитотоксическое действие исследуемых веществ определяли с помощью МТТ-теста. Клетки выращивали в 96-луночном планшете, далее добавляли питательную среду с тестируемыми веществами. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) [176,182]. Оптическую плотность измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для микропланшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США). Жизнеспособность клеток C2C12 в присутствии янтарной кислоты, ЭМГПС и Pertussis toxin рассчитывали по формуле и выражали в %. Контроль принимали за 100%.

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\% \quad (1)$$

где ОП – оптическая плотность.

2.5. Оценка морфологии клеток и индекса миогенеза

Клеточную линию C2C12 инкубировали в течение 1, 4, 7 дней после инициации дифференцировки в питательной среде, содержащей 2% лошадиной сыворотки (Sigma-Aldrich, США), что соответствует раннему, среднему и позднему этапам миогенеза [76,120]. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 (Olympus, Япония) с цифровой цветной камерой (CCD 5 МПикс) на персональном компьютере DeltaPix InSight.

На каждом этапе дифференцировки оценивали индекс миогенеза (индекс клеточного слияния). Предварительно клетки фиксировали 95% этанолом (5 мин), затем для окрашивания ядер миобласты покрывали раствором Романовского-Гимзе (Медикс, Россия) и выдерживали при комнатной температуре 20-25 минут.

Удаляли краситель, клетки промывали фосфатным буфером (ПанЭко, Россия) и микроскопировали (Рисунок 9).

Индекс миогенеза представляет собой долю ядер, находящихся в миотрубках, содержащих два или более ядра по отношению к общему количеству ядер. Для анализа выбирали пять полей зрения на 6-луночном планшете, площадь 1 лунки – 9,6 см² (n=3) при увеличении ×200, и общее количество проанализированных ядер составляло 90-120 на поле. Индекс клеточного слияния рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМ} = \frac{A - B}{C - 1} \quad (2)$$

где ИМ – индекс миогенеза, А – количество ядер в многоядерных клеточных структурах, В – количество многоядерных клеточных структур, С – количество ядер в поле зрения (п.з.) [13,60].

Оценку изображений осуществляли с помощью медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ (США).

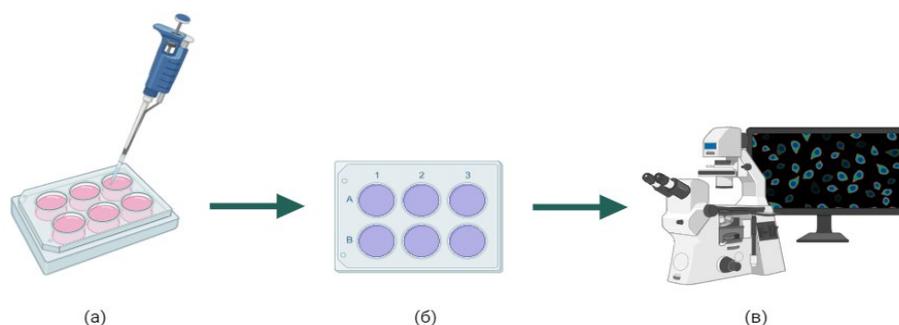


Рисунок 9 – Схема окрашивания ядер клеточной линии C2C12

Примечание – а – удаление среды и фиксация клеток; б – добавление красителя по Романовскому-Гимзе; в – визуализация клеток на инвертированном микроскопе

2.6. Определение относительного количества миозина, α-актина, MyoD, MyoG, HIF-1α, PXR, SUCNR1 методом вестерн-блот

После окончания сроков культивирования клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), трижды промывали раствором фосфатного

буфера (Bio-Rad, США) [10] и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) для α -актина, MYH, MyoD, MyoG и SUCNR1 с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Для PXR и HIF-1 α выделяли ядерную фракцию гомогената с помощью набора Protein Extraction Kit (Cytoplasmic Nuclear), (Bio-Rad, США). Полученный лизат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут (AvantiJXN-3, BeckmanCoulter, США).

Концентрации белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, Thermo Fisher, США) [43]. Белки (20 мкг/образец) разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, приготовленном с использованием 10% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad, США), и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью системы полусухого переноса (Transblot, Bio-Rad, США). Затем мембраны блокировали в течение 1 часа с помощью TBS 1% Casein Blocker (Bio-Rad, США) с добавлением 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, США), далее инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами:

- sc-53092, MYH1/2/3 (N3.36) Monoclonal Antibody, Santa cruz biotechnology,inc, США;
- sc-53142, Smooth Muscle Actin (B4), Monoclonal Antibody, Santa cruz biotechnology,inc, США;
- sc-377460 MyoD (G-1) Monoclonal Antibody, Santa cruz biotechnology,inc, США;
- sc-12732 myogenin (F5D) Monoclonal Antibody, Santa cruz biotechnology,inc, США;
- HIF1A / HIF1 Alpha, aa432-528, Unconjugated, H1alpha67, LifeSpan LS-B110, США;
- MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody (1D12G1), Invitrogen, США;
- A08485 Anti-SUCNR1/GPR91 Antibody, boster, Китай.

Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США) в разведении 1:4000.

Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (Bio-Rad, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США). Схема вестерн-блот анализа представлена на Рисунке 10.

Количество белков оценивали относительно содержания белка глицеральдегид-3-фосфата (GAPDH, *англ. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, Invitrogen, США, разведение 1:1000, вторичные антитела - вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH - Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США, разведение 1:4000).

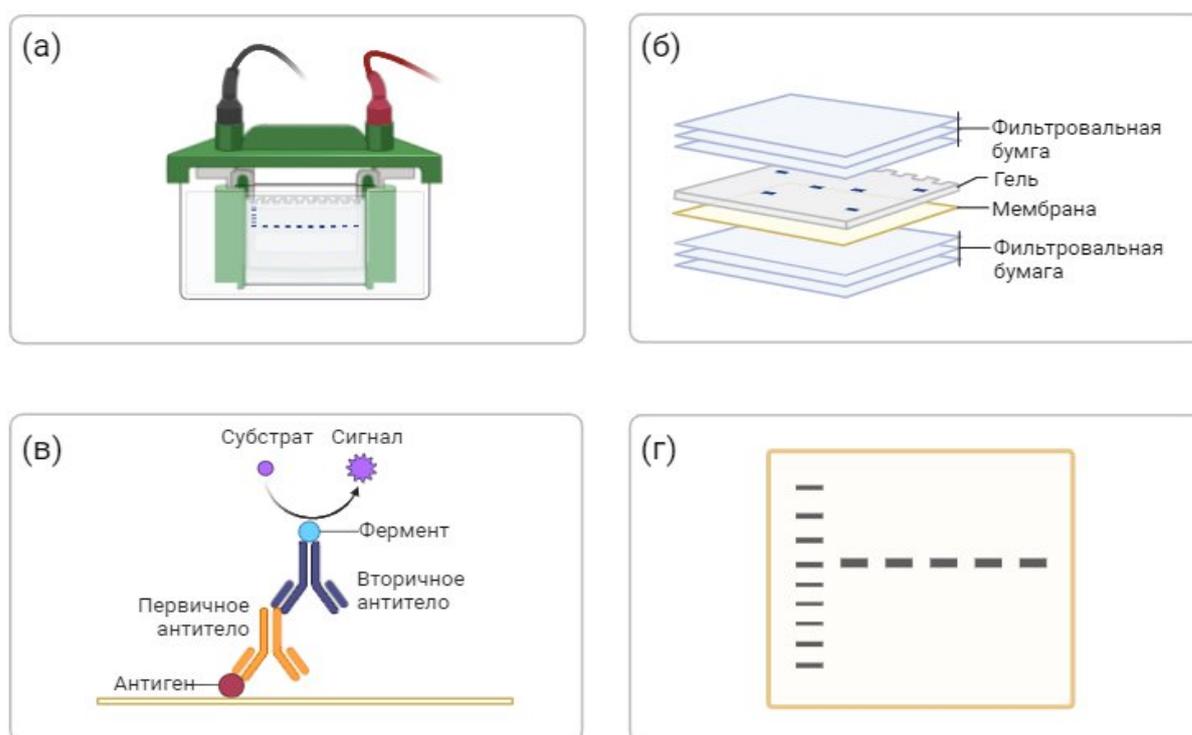


Рисунок 10 – Этапы иммуноблоттинга

Примечание – а – разделение белков при помощи электрофореза; б – перенос с геля на мембрану; в – блокировка, обработка первичными и вторичными антителами; г – визуализация

2.7. Оценка концентрации сукцината и инозитол-3-фосфата внутри клеток методом ВЭЖХ-МС/МС

Анализ концентрации сукцината в лизате клеток

Концентрации сукцината в клеточном лизате анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС (жидкостный хроматограф Ultimate 3000 и тройной квадрупольный масс-спектрометр TSQ Fortis, Thermo Fisher Scientific, США). Белки осаждали добавлением к образцу метанола в соотношении 1:1. Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм, 5 мкм, 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM, температура разделения 40°C, скорость потока 0,5 мл/мин с использованием раствора муравьиной кислоты 0,1% в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б [143]. Программа градиента подвижной фазы была следующей А/Б: 0,0 мин – 90%/10%; 0,01 мин – 70%/30%; 3,5 мин – 50%/50%; 5 мин – 10%/90%; 7,5 мин – 90%/10%. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Время анализа – 7,5 мин. В данных условиях время удерживания сукцината составило 3,76-3,82 мин. Ионизацию молекул сукцината проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 2500 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM) со следующими параметрами: 117 m/z → 98,7 m/z, энергия столкновения 10 В, напряжение линз 25 В, 117 m/z → 73,11 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения 10 В. Полученные результаты выражали в нг/мг белка.

Анализ концентрации инозитолмонофосфата в лизате клеток

Концентрацию инозитолмонофосфата в клеточном лизате также анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Белки осаждали добавлением к образцу ацетонитрила в соотношении 1:1. Хроматографическое разделение проводили на

колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм, 5 мкм, 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM с использованием раствора 10 мМ формиата аммония в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б. Программа градиента подвижной фазы А/Б: 0,0 мин – 80%/20%; 2,5 мин – 30%/70%; 2,5 мин – 80%/20%. Объем вводимой пробы – 30 мкл. Время анализа – 8 мин. В данных условиях время удерживания инозитолмонофосфата составило 2,2-2,23 мин.

Ионизацию молекул инозитолмонофосфата проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 3000 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM) со следующими параметрами: 259 m/z → 79 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения 20 В; 259 m/z → 97,1 m/z, энергия столкновения 20 В. Полученные результаты выражали в нг/мг белка.

2.8. Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0», Microsoft Excel 2016 и GraphPad Prism 10.

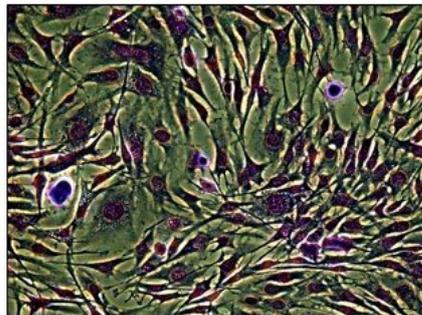
Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), множественные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта в тексте указано точное значение критерия Фишера (F), критический уровень значимости принимали при $p < 0,05$.

Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и графиках представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) при нормальном распределении данных.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Изучение этапов дифференцировки клеточной линии C2C12

Миобласты до дифференцировки представляют собой одноядерные клетки со средней длиной $71,65 \pm 15,97$ мкм и шириной - $26,42 \pm 7,16$ мкм, имеющие звездчатую или веретенообразную форму. В недифференцированных клетках отсутствуют многоядерные структуры, среднее количество ядер составляет 75 в одном поле зрения. Замена питательной среды на дифференцировочную стимулирует переход миобластов на программу дифференцировки: постепенное удлинение миобластов и формирование многоядерных структур – миотрубочек (Рисунок 11).



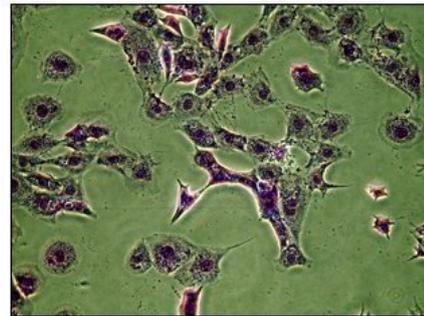
Контроль до дифференцировки



1 день дифференцировки



4 день дифференцировки



7 день дифференцировки

Масштабная линейка:  100 мкм

Рисунок 11 – Клетки линии C2C12 до и на разных этапах дифференцировки

Примечание – Окраска ядер по Романовскому-Гимзе. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 400$

Индекс миогенеза в клетках до дифференцировки был равен 0 (Рисунок 12). Активация миогенеза приводила к увеличению индекса слияния клеток, на первый день он составил $15,4 \pm 5,2\%$ ($p=0,0543$). Можно было наблюдать образование двуядерных структур и удлинение клеток. Размер клеток в длину составил $122,52 \pm 54,64$ мкм, а в ширину - $15,35 \pm 6,79$ мкм. Количество двуядерных структур на первые сутки дифференцировки было равно 6 в одном поле зрения.

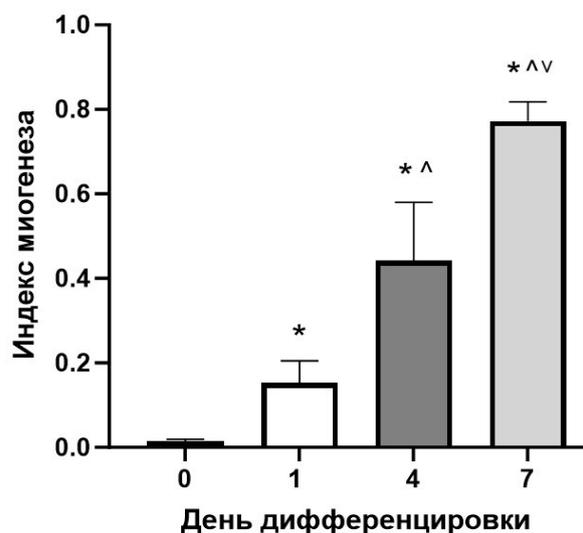


Рисунок 12 – Значения индекса миогенеза в зависимости от срока дифференцировки клеток линии C2C12

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток до дифференцировки, $p \leq 0,05$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 1 день дифференцировки, $p=0,0001$; v – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 4 день дифференцировки, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа – $F=94,08$; $p < 0,0001$

На 4 день дифференцировки наблюдали дальнейшее увеличение индекса миогенеза на 193% ($p=0,0001$) относительно 1 дня дифференцировки и на 77% ($p < 0,0001$) относительно клеток до дифференцировки. На среднем этапе дифференцировки возрастало количество двуядерных и появлялись редкие клетки, содержащие три ядра и более, что свидетельствовало об интенсивном слиянии миобластов. Среднее количество многоядерных структур на 4 сутки – 10 в поле зрения, а количество ядер в многоядерных структурах – 3 в одном поле зрения. Длина многоядерных структур составила $128,11 \pm 58,02$ мкм, а ширина – $16,01 \pm 5,61$ мкм (Рисунок 11).

На позднем этапе миогенеза многоядерные структуры имели три и более ядер и их количество составило 12 в одном поле зрения, а количество ядер в многоядерных структурах – 8.

Также наблюдался рост индекса миогенеза на 75% ($p < 0,0001$) в сравнении с 4 днем дифференцировки и на 413% ($p < 0,0001$) по сравнению с 1 днем дифференцировки. Длина многоядерных структур составила $185,24 \pm 68,75$ мкм, а ширина – $21,39 \pm 4,98$ мкм (Рисунок 12).

Полученные морфологические результаты (Рисунки 11, 12), сопровождались изменениями относительного количества MyoD, MyoG, α -актина, MYH на разных этапах миогенеза (Рисунки 13, 14, 15, 16).

Результаты вестерн-блот анализа показывали, что содержание MyoD, который является ключевым регулятором миогенеза, в клетках линии C2C12 на раннем и среднем этапах дифференцировки возрастало на 35,3% ($p = 0,0087$) и 53,3% ($p = 0,0007$), соответственно, и не отличалось на позднем этапе дифференцировки по сравнению с количеством до дифференцировки ($p > 0,05$). Уровень MyoD на 7 день дифференцировки снижался на 27,5% ($p = 0,0036$) относительно среднего этапа дифференцировки.

Относительное количество регуляторного белка миогенеза, необходимого для терминальной дифференцировки миобластов MyoG, статистически значимо возрастало в клетках на 7 день дифференцировки на 44,3% ($p < 0,0001$) и не изменялось на 1 и 4 дни дифференцировки по сравнению со значениями до дифференцировки, $p > 0,05$.

Уровень MyoG на позднем этапе дифференцировки возрастал на 43,7% ($p < 0,0001$) и на 39,6% ($p < 0,0001$) относительно раннего и среднего этапов, соответственно (Рисунок 14).

Уровень α -актина в клетках C2C12 статистически значимо возрастал на среднем этапе дифференцировки на 27,7% ($p = 0,018$) и не отличался на раннем и позднем этапах дифференцировки по сравнению с показателями до дифференцировки ($p > 0,05$). На 4 день дифференцировки количество α -актина

возрастало на 15,1% по сравнению с 1 днем дифференцировки ($p=0,05$) (Рисунок 15).

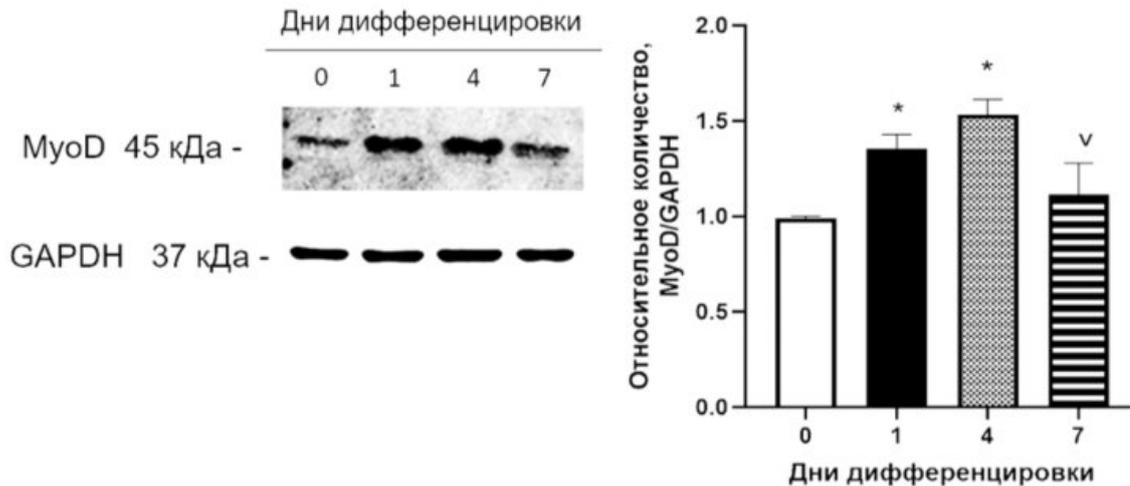


Рисунок 13 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 на разных этапах дифференцировки

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток до дифференцировки, $p<0,01$; ^v – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 4 день дифференцировки, $p<0,05$. Результат дисперсионного анализа: $F=18,08$; $p=0,0006$

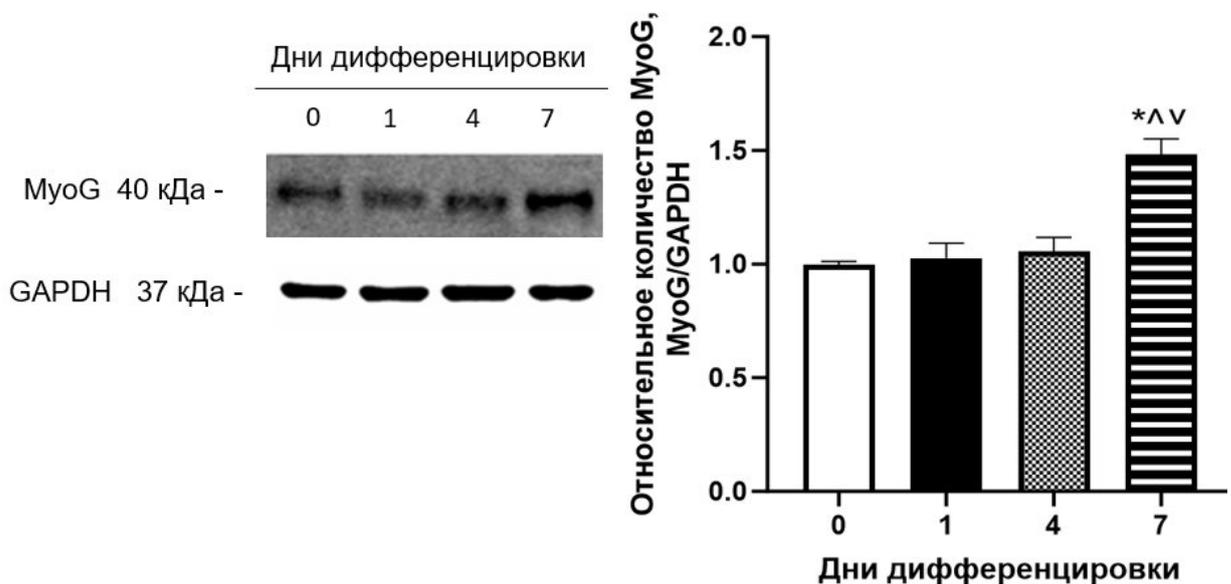


Рисунок 14 – Относительное количество MyoG в клетках линии C2C12 на разных этапах дифференцировки

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток до дифференцировки, $p<0,0001$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 1 день дифференцировки, $p<0,0001$; ^v – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 4 день дифференцировки, $p<0,0001$. Результат дисперсионного анализа: $F=50,90$; $p<0,0001$

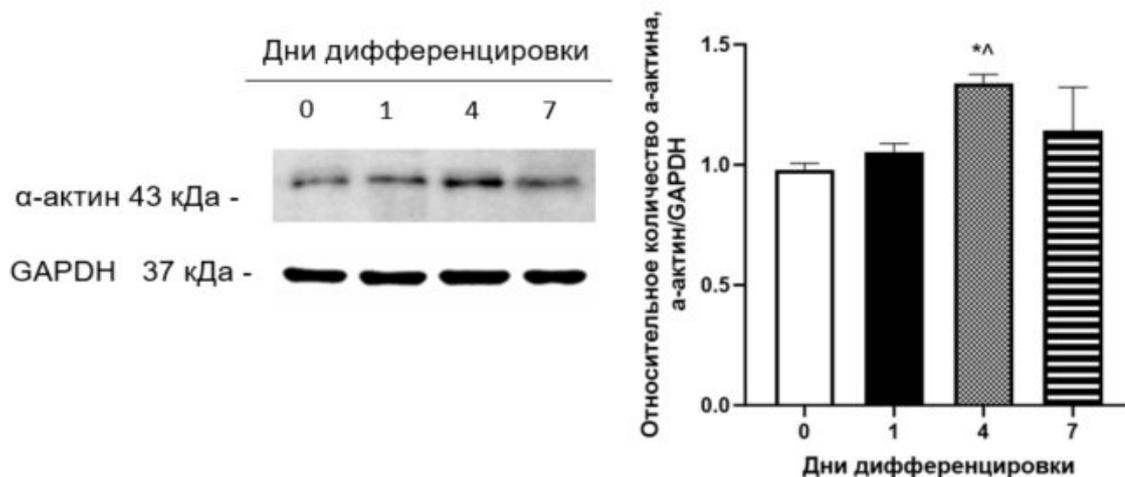


Рисунок 15 – Относительное количество α -актина в клетках линии C2C12 на разных этапах дифференцировки

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток до дифференцировки, $p < 0,05$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 1 день дифференцировки, $p = 0,05$. Результат дисперсионного анализа: $F = 4,7$; $p = 0,035$

Относительное количество тяжелых цепей миозина в клетках линии C2C12 не изменялось на 1 и 4 дни дифференцировки, а на 7 день эксперимента статистически значимо увеличивалось на 35,6% ($p = 0,0001$) по сравнению с показателями клеток до дифференцировки. Уровень MYH на позднем этапе дифференцировки возрастал на 37,3% ($p = 0,0002$) и на 29,6% ($p = 0,0008$) относительно раннего и среднего этапов соответственно (Рисунок 16).

Таким образом, было выявлено, что на 1 день культивирования клеток линии C2C12 в дифференцировочной среде наблюдалось формирование миотуб, на 4 – слияние миобластов с образованием двуядерных клеток, что сопровождалось повышением количества MyoD и белка α -актина.

К 7 дню дифференцировки усиливалось слияние клеток с образованием миотрубочек, содержащих более двух ядер, относительное количество MyoD и актина не изменялось, а MyoG и миозина увеличивалось. На каждом этапе миогенеза отмечалось увеличение индекса миогенеза. На разных этапах миогенеза происходило увеличение размера (длины и ширины) мышечных клеток, что связано с накоплением миофибрилл и образованием многоядерных миотубул.

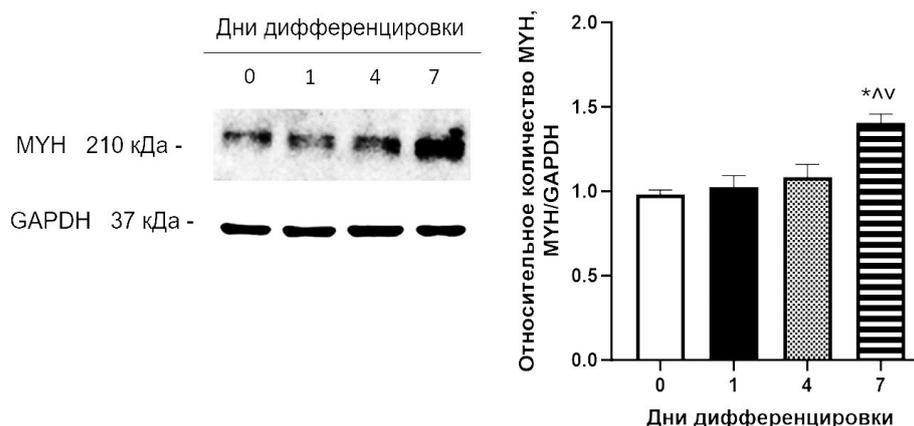


Рисунок 16 – Относительное количество тяжелых цепей миозина в клетках линии C2C12 на разных этапах дифференцировки

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток до дифференцировки, $p=0,0001$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 1 день дифференцировки, $p<0,001$; v – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток на 4 день дифференцировки, $p<0,001$. Результат дисперсионного анализа: $F=31,14$; $p<0,0001$

3.2. Исследование действия янтарной кислоты на этапы миогенеза клеточной линии C2C12

3.2.1. Изучения цитотоксического действия янтарной кислоты на клетки линии C2C12

На начальном этапе исследования оценивали цитотоксичность янтарной кислоты в концентрациях 1, 10, 100, 1000 мкМ при сроке инкубации 24 ч (Таблица 5). В ходе работы было выявлено, что жизнеспособность клеток при добавлении янтарной кислоты в питательную среду не изменялась по сравнению с контролем, принятым за 100%.

Таблица 5 - Цитотоксичность янтарной кислоты в клетках линии C2C12

	Жизнеспособность клеток, %
Контроль	100
Янтарная кислота, 1 мкМ	96,12±11,29
Янтарная кислота, 10 мкМ	83,41±15,6
Янтарная кислота, 100 мкМ	94,29±19,2
Янтарная кислота, 1000 мкМ	84,24±13,8

3.2.2. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12 и индекса миогенеза при воздействии янтарной кислоты

При добавлении янтарной кислоты в концентрации 1 мкМ индекс миогенеза статистически значимо не отличался от значений на раннем, среднем и поздних этапах миогенеза, что свидетельствовало о том, что данная концентрация янтарной кислоты не оказывает дифференцировочного воздействия на клетки C2C12.

На раннем этапе дифференцировки при внесении янтарной кислоты в питательную среду в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ индекс миогенеза возрастал на 286,7%, 420% и 446,7% соответственно относительно группы клеток 1 дня дифференцировки ($p < 0,0001$), изменения носили дозозависимый характер (Рисунки 17, 20). При добавлении янтарной кислоты в концентрациях 100 и 1000 мкМ индекс миогенеза выше на 34,5% ($p < 0,0001$) и 41,4% ($p < 0,0001$) соответственно относительно янтарной кислоты (10 мкМ).

Ширина многоядерных структур при культивировании с янтарной кислотой в концентрациях 10 и 100 мкМ увеличивалась на 226,3% ($p = 0,0287$) и 267,9% ($p = 0,0080$) соответственно относительно клеток 1 дня дифференцировки. Количество многоядерных структур в одном поле зрения при добавлении янтарной кислоты (10, 100 и 1000 мкМ) увеличивалось на 296,4%, 353,6% и 282,1%, соответственно относительно 1 дня дифференцировки ($p < 0,0001$) (Таблица 6).

Также при действии янтарной кислоты (10, 100 и 1000 мкМ) увеличивалось количество ядер в многоядерных структурах на 66,2% ($p = 0,0026$), 355,0% ($p < 0,0001$) и 334,5% ($p < 0,0001$) соответственно относительно группы клеток 1 дня дифференцировки. При добавлении янтарной кислоты в концентрациях 100 и 1000 мкМ количество ядер в многоядерных структурах выше на 121,9% ($p < 0,0001$) и 111,9% ($p < 0,0001$) соответственно относительно янтарной кислоты (10 мкМ) (Таблица 6).

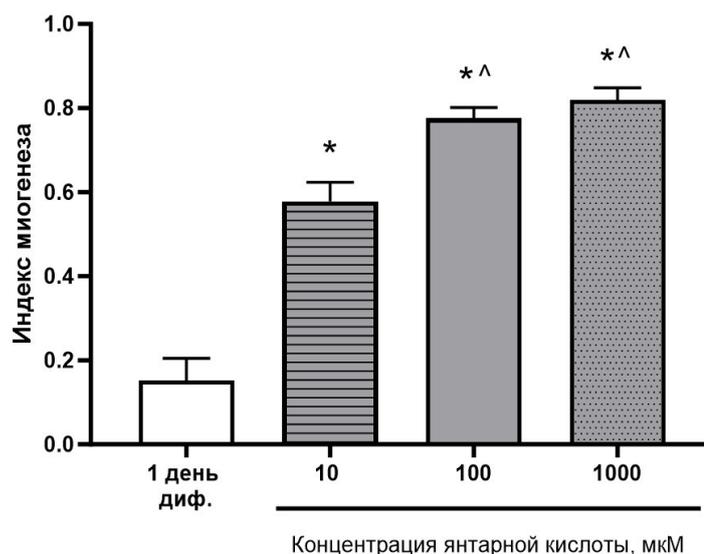


Рисунок 17 – Значения индекса миогенеза в клетках линии С2С12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,0001$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток, культивируемых с добавлением янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа $F=295,5$; $p < 0,0001$

Таблица 6 – Морфологические изменения в клетках С2С12 на 1 день дифференцировки и при добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
1 день дифференцировки	122,52±54,64	15,35±6,79	5,60±1,14	2,00±0,82
Янтарная кислота 10 мкМ	226,43±124,26	50,09±35,03* * $p=0,0287$	22,20±2,77* * $p < 0,0001$	4,10±0,42* * $p=0,0026$
Янтарная кислота 100 мкМ	183,80±61,02	56,47±15,84* * $p=0,0080$	25,40±3,85* * $p < 0,0001$	9,10±0,96* * $p < 0,0001$ ^ $p < 0,0001$
Янтарная кислота 1000 мкМ	175,19±49,27	39,81±17,31	21,40±1,52* * $p < 0,0001$	8,69±0,79* * $p < 0,0001$ ^ $p < 0,0001$

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,0001$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток, культивируемых с добавлением янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,0001$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F=2,054$, $p=0,1331$; ширина многоядерных структур $F=4,981$, $p=0,0079$; количество многоядерных структур $F=60,29$, $p < 0,0001$; количество ядер в многоядерных структурах $F=120,6$, $p < 0,0001$

На 4 день дифференцировки (средний этап) индекс миогенеза при добавлении янтарной кислоты (10, 100 и 1000 мкМ) возрастал относительно клеток, культивируемых 4 дня на дифференцировочной питательной среде, на 36,4% ($p=0,02$), 93,2% ($p<0,0001$) и 70,5% ($p<0,0001$), изменения носили дозозависимый характер. По отношению к данным серии янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ наблюдалось увеличение индекса миогенеза для серий янтарной кислоты 100 мкМ на 41,7% ($p=0,0004$), а для янтарной кислоты 1000 мкМ на 25,6% ($p=0,03$) (Рисунки 18, 20).

Длина многоядерных структур при внесении янтарной кислоты (10, 100 и 1000 мкМ) увеличивалась на 83,5% ($p=0,0254$), 91,5% ($p=0,0075$) и 94,7% ($p=0,0078$) соответственно относительно группы клеток 4 дня дифференцировки.

Ширина многоядерных структур при добавлении янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ увеличивалась на 180,5% ($p=0,0009$) относительно клеток 4 дня дифференцировки и на 68,8% ($p=0,0227$) относительно янтарной кислоты (1000 мкМ).

Количество многоядерных структур при добавлении янтарной кислоты (10 и 100 мкМ) увеличивалось на 119,4% ($p=0,0028$) и 159,2% ($p=0,0001$) соответственно относительно клеток 4 дня дифференцировки. При внесении янтарной кислоты в концентрации 1000 мкМ количество многоядерных структур было ниже по сравнению с янтарной кислотой (10 и 100 мкМ) на 45,3% ($p=0,0068$) и 53,7% ($p=0,0003$) соответственно.

Наблюдалось возрастание количества ядер в многоядерных структурах при действии янтарной кислоты (100 и 1000 мкМ) на 207,9% и 245,9% относительно 4 дня дифференцировки ($p<0,0001$) соответственно. При внесении янтарной кислоты в концентрациях 100, 1000 мкМ количество многоядерных структур увеличивалось на 85,3% ($p=0,0036$) и 108,1% ($p=0,0002$) соответственно относительно янтарной кислоты (10 мкМ) (Таблица 7).

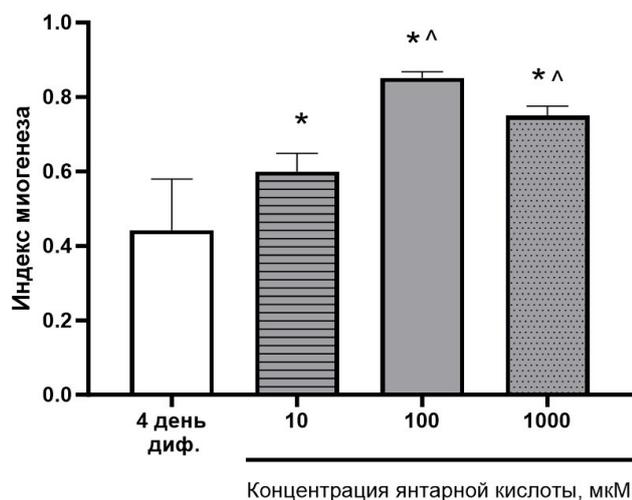


Рисунок 18 – Значения индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,05$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток, культивируемых с добавлением янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа $F=28,64$; $p < 0,0001$

Таблица 7 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 4 день дифференцировки и при добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

	Длина многоядерных структур, мкМ	Ширина многоядерных структур, мкМ	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
4 день дифференцировки	128,11±58,02	16,01±5,61	9,80±2,17	3,40±0,89
Янтарная кислота 10 мкМ	235,09±49,29* * $p=0,0254$	34,24±15,76	21,50±4,43* * $p=0,0028$	5,65±0,88
Янтарная кислота 100 мкМ	245,34±80,03* * $p=0,0075$	44,91±20,38* * $p=0,0009$	25,40±3,13* * $p=0,0001$	10,47±2,17*^ * $p < 0,0001$ ^ $p=0,0036$
Янтарная кислота 1000 мкМ	249,48±63,49* * $p=0,0078$	26,61±9,79^ ^ $p=0,0227$	11,75±3,40^ \vee ^ $p=0,0068$ $\vee p=0,0003$	11,76±0,99*^ * $p < 0,0001$ ^ $p=0,0002$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,0001$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,01$; \vee - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты 100 мкМ, $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа длина многоядерных структур $F=6,654$, $p=0,0040$; ширина многоядерных структур $F=8,293$, $p=0,0015$; количество многоядерных структур $F=20,22$, $p < 0,0001$; количество ядер в многоядерных структурах $F=32,61$, $p < 0,0001$

Поздний этап дифференцировки характеризовался увеличением индекса миогенеза на 14,3% ($p=0,0006$), 20,8% ($p<0,0001$) и 10,4% ($p=0,0017$) для клеток, культивируемых с янтарной кислотой в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ соответственно по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки (Рисунки 19, 20).

При воздействии янтарной кислоты (100 мкМ) длина многоядерных структур увеличивалась на 62,6% ($p=0,0197$) относительно клеток, культивируемых 7 дней на дифференцировочной питательной среде. Ширина многоядерных структур при добавлении янтарной кислоты (10 и 100 мкМ) в питательную среду увеличивалась на 134,5% ($p=0,0002$) и 105,9% ($p=0,0029$) соответственно относительно клеток 7 дня дифференцировки. При воздействии янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ ширина многоядерных структур была выше на 52,8% ($p=0,0086$) по сравнению с янтарной кислотой (1000 мкМ). При действии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ количество многоядерных структур возрастало на 231,6% ($p<0,0001$), 139,5% ($p=0,0055$) и 113,2% ($p=0,0249$) соответственно относительно клеток позднего этапа миогенеза. При культивировании с янтарной кислотой в концентрации 10 мкМ количество многоядерных структур увеличивалось на 61,0% ($p=0,0184$) по сравнению с янтарной кислотой (1000 мкМ). Количество ядер в многоядерных структурах увеличивалось при добавлении янтарной кислоты (10, 100, 1000 мкМ) на 106,6% ($p=0,0416$), 107,6% ($p=0,0375$), 112,2% ($p=0,0291$) соответственно относительно клеток 7 дня дифференцировки (Таблица 8).

Таким образом, концентрации янтарной кислоты 1, 10, 100 и 1000 мкМ не оказывают токсического действия на клетки линии С2С12, что позволяет их использовать в эксперименте. Важно отметить, что янтарная кислота в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ оказывает стимулирующее воздействие на миогенез клеток С2С12, что характеризуется изменением следующих показателей: индекс миогенеза, количество многоядерных структур, длина и ширина многоядерных структур. Изменения носили дозозависимый характер. Янтарная кислота в концентрации 1 мкМ не оказывала эффекта на миогенез клеток С2С12.

Полученные результаты являются предпосылками для изучения механизма стимулирующего действия янтарной кислоты на миогенез.

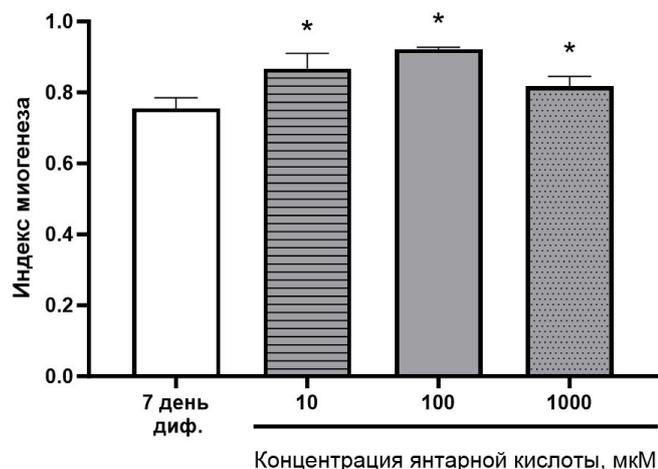


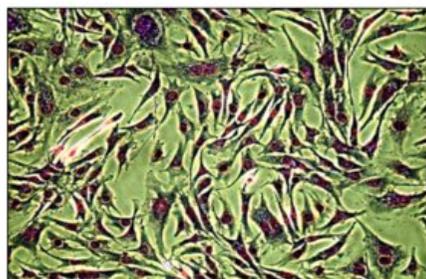
Рисунок 19 – Значения индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки, $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа $F=23,25$; $p < 0,0001$

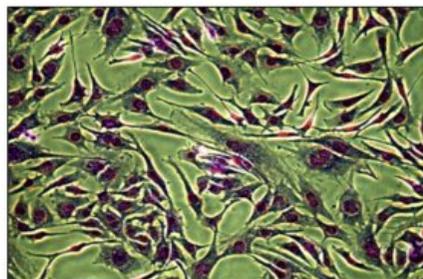
Таблица 8 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 7 день дифференцировки и при добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
7 день дифференцировки	185,24±68,75	21,39±4,98	7,60±1,82	8,20±1,48
Янтарная кислота 10 мкМ	229,28±69,61	50,16±15,39* * $p=0,0002$	25,20±7,98* * $p < 0,0001$	16,86±8,85* * $p=0,0416$
Янтарная кислота 100 мкМ	301,21±90,03* * $p=0,0197$	44,06±14,67* * $p=0,0029$	18,20±1,64* * $p=0,0055$	17,02±2,01* * $p=0,0375$
Янтарная кислота 1000 мкМ	222,23±64,08	32,82±15,49^ ^ $p=0,0086$	15,65±3,30*^ * $p=0,0249$ ^ $p=0,0184$	17,35± 3,84* * $p=0,0291$

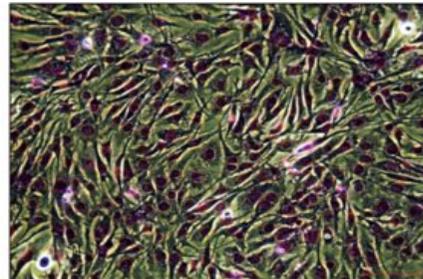
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,05$; ^ – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток, культивируемых с добавлением янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F=4,402$, $p=0,0194$; ширина многоядерных структур $F=12,32$, $p=0,0002$; количество многоядерных структур $F=14,71$, $p < 0,0001$; количество ядер в многоядерных структурах $F=4,616$, $p=0,0164$



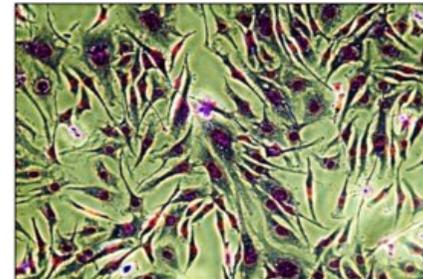
1 день дифференцировки



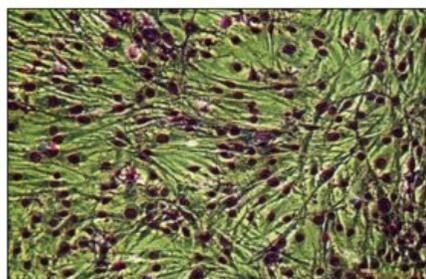
Янтарная кислота 10 мкМ
1 день дифференцировки



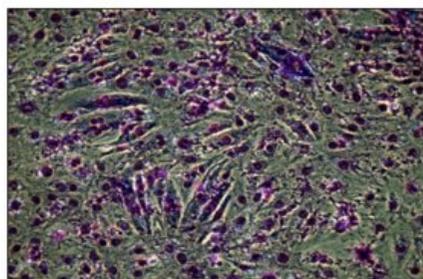
Янтарная кислота 100 мкМ
1 день дифференцировки



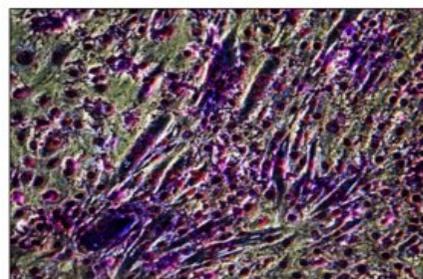
Янтарная кислота 1000 мкМ
1 день дифференцировки



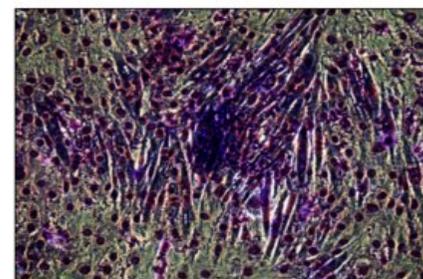
4 день дифференцировки



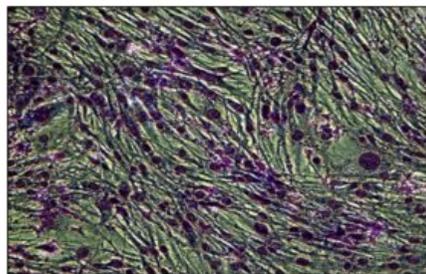
Янтарная кислота 10 мкМ
4 день дифференцировки



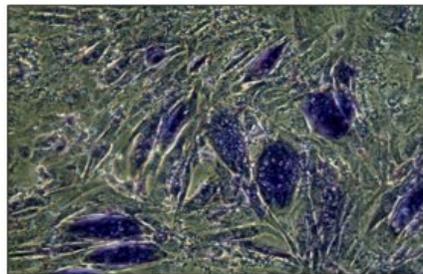
Янтарная кислота 100 мкМ
4 день дифференцировки



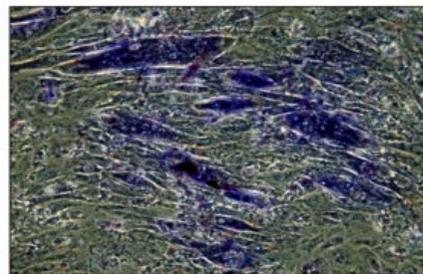
Янтарная кислота 1000 мкМ
4 день дифференцировки



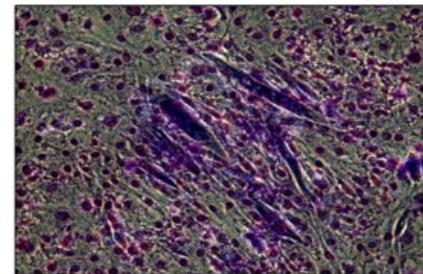
7 день дифференцировки



Янтарная кислота 10 мкМ
7 день дифференцировки



Янтарная кислота 100 мкМ
7 день дифференцировки



Янтарная кислота 1000 мкМ
7 день дифференцировки

Масштабная линейка:  100 мкМ

Рисунок 20 – Влияние янтарной кислоты на дифференцировку клеток линии C2C12
Примечание – Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$. Окраска ядер по Романовскому-Гимзе

3.2.3. Определение относительного количества транскрипционных факторов и специфических белков скелетной мышечной ткани при воздействии янтарной кислоты

На раннем и среднем этапе миогенеза оценивали содержание MyoD и α -актина. При воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ относительное количество MyoD возрастало на 14,2% ($p=0,0004$), 21,0% ($p=0,0003$) и на 36,4% ($p<0,0001$) соответственно относительно значений на 1 день дифференцировки (Рисунок 21).

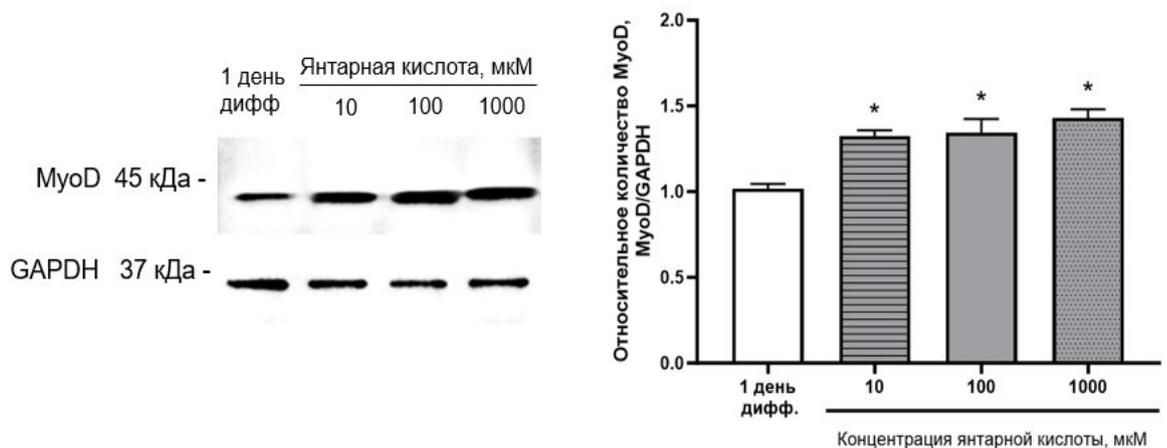


Рисунок 21 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p<0,001$. Результат дисперсионного анализа $F=35,54$; $p<0,0001$

На 4 день дифференцировки относительное количество MyoD возрастало при добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 601,0%, 395,8% и 169,8% ($p<0,0001$) соответственно относительно значений 4 дня дифференцировки, изменения носили дозозависимый характер. Относительное количество MyoD при добавлении янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ было выше на 44,3% ($p=0,0001$) и 165,3% ($p<0,0001$) относительно действия янтарной кислоты 100 и 1000 мкМ соответственно. Уровень MyoD при внесении янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ был выше на 83,8% ($p=0,0001$) относительно действия янтарной кислоты в концентрации 1000 мкМ (Рисунок 22).

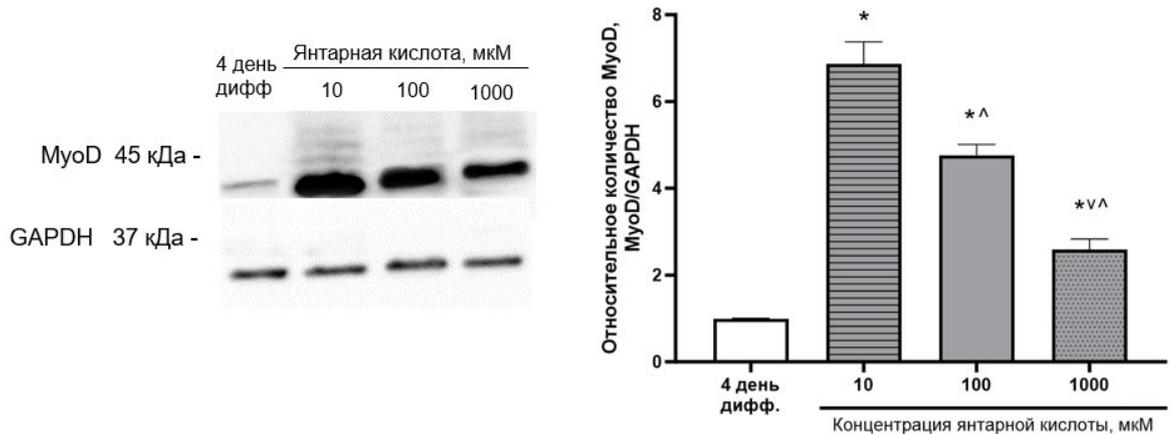


Рисунок 22 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,0001$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,05$; v - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты 100 мкМ, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=211,3$; $p < 0,0001$

Относительное количество α -актина возросло под действием янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 244,4%, 405,8% и 136,1% соответственно относительно клеток 4 дня дифференцировки ($p < 0,0001$) (Рисунок 23).

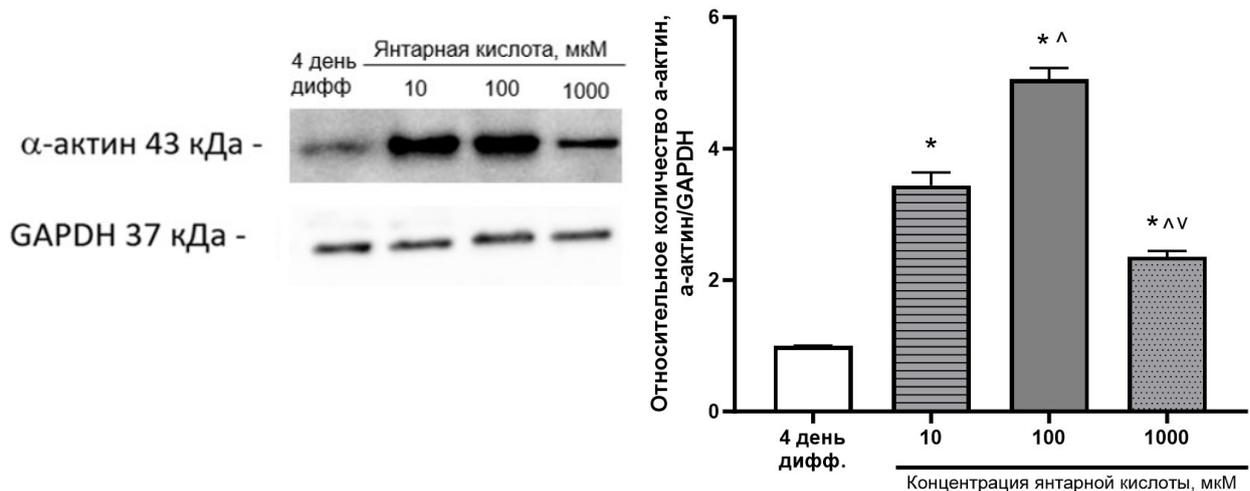


Рисунок 23 – Относительное количество α -актина в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,0001$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,0001$; v - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты 100 мкМ, $p < 0,001$. Результат дисперсионного анализа $F=254$; $p < 0,0001$

При этом изменения носили дозозависимый характер: при действии янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ значения возросли на 46,8% ($p < 0,0001$) относительно концентрации 10 мкМ, при действии янтарной кислоты в концентрации 1000 мкМ снижались на 31,5% ($p = 0,0003$) и 53,3% ($p < 0,0001$) относительно концентраций янтарной кислоты 10 и 100 мкМ соответственно (Рисунок 23).

На 7 день дифференцировки оценивали изменения уровня транскрипционного фактора MyoG и тяжелых цепей миозина (MYH).

Относительное количество MyoG при добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ статистически значимо возросло на 38,8% ($p < 0,0001$), 40,2% ($p = 0,0003$) и 62,0% ($p = 0,0007$) соответственно по сравнению со значениями клеток группы 7 дня дифференцировки (Рисунок 24).

Относительное количество тяжелых цепей миозина возросло при действии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 33,7% ($p = 0,0187$), 34,6% ($p = 0,0161$) и 36,9% ($p = 0,0115$) соответственно по сравнению со значениями группы клеток 7 дня дифференцировки (Рисунок 25).

Изменения относительного количества MyoG и MYH не зависели от концентрации янтарной кислоты.

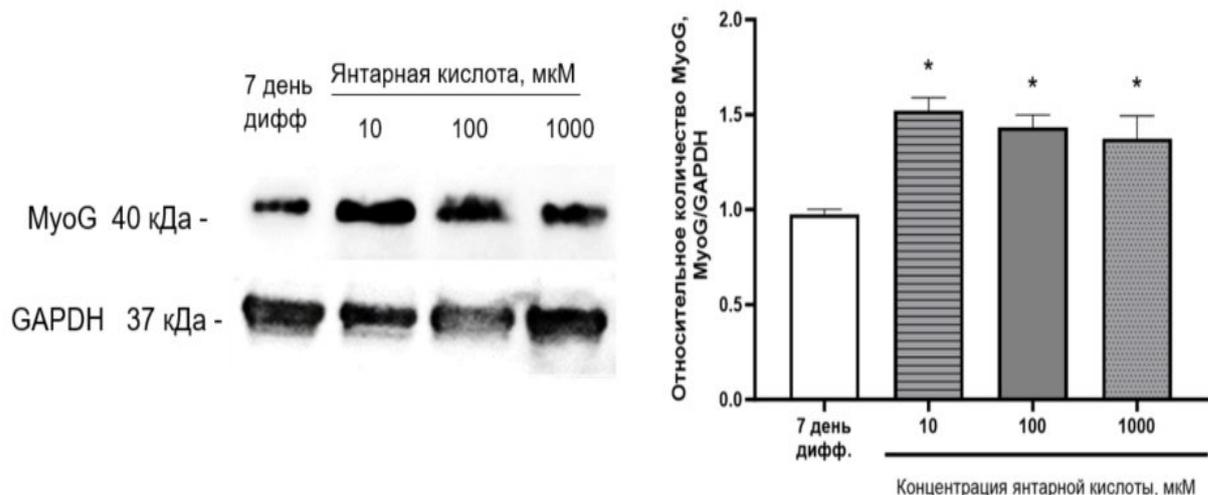


Рисунок 24 – Относительное количество MyoG в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки, $p < 0,001$. Результат дисперсионного анализа $F = 28,43$; $p = 0,0001$

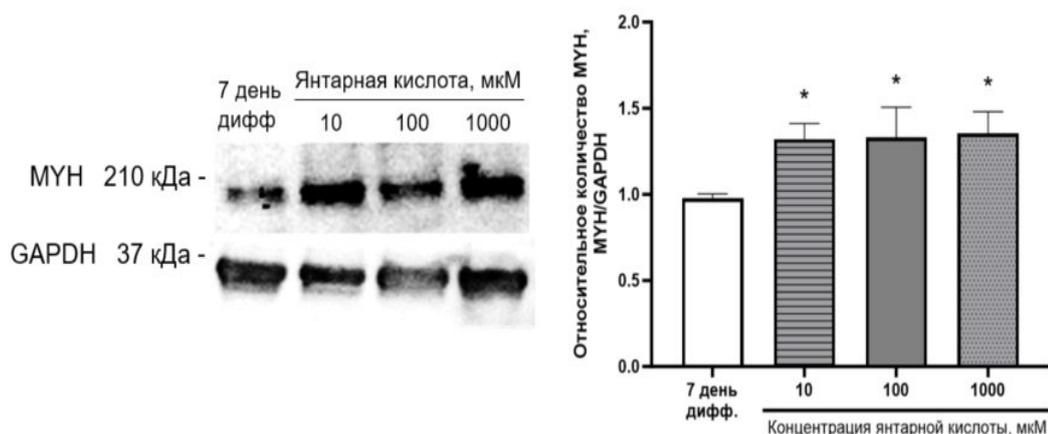


Рисунок 25 – Относительное количество MYH в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=6,903$; $p=0,0131$

Таким образом, янтарная кислота в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ стимулирует миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, что проявляется увеличением индекса миогенеза, морфологическими изменениями и повышением уровня маркерных белков α -актина, MYH и факторов миогенной дифференцировки – MyoD и MyoG.

3.2.4. Изучение механизма действия янтарной кислоты на миогенез

Для изучения возможных механизмов индукции миогенеза янтарной кислотой было оценено влияние вещества на количество транскрипционных факторов: α субъединицы фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α) и прегнан X рецептора при 7 дневной экспозиции. В ходе исследования было показано, что содержание данных транскрипционных факторов не изменялось при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ (Рисунок 26).

В ходе настоящего исследования было выявлено, что транскрипционные факторы HIF-1 α и PXR не участвуют в стимуляции миогенеза янтарной кислотой.

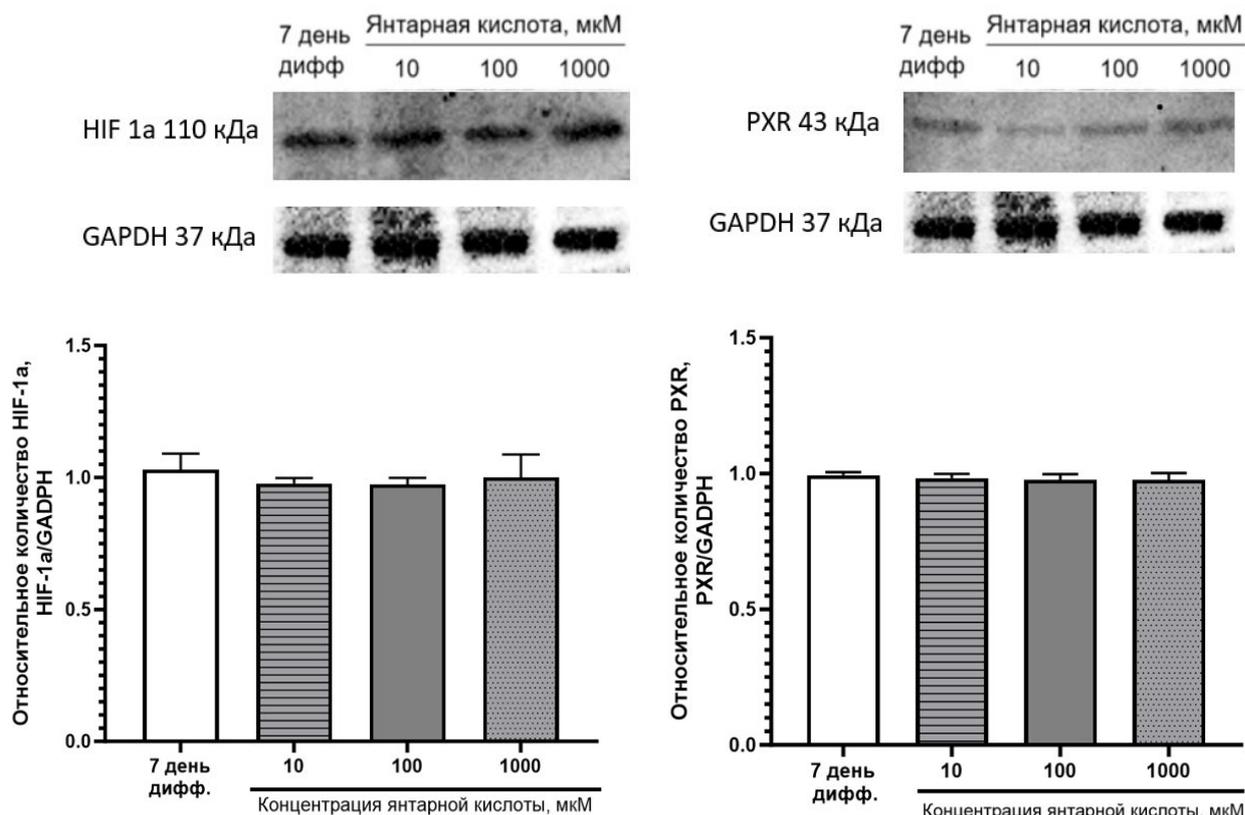


Рисунок 26 – Относительное количество HIF-1 α и PXR в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней

Примечание - Результат дисперсионного анализа $F=0,06492$; $p=0,9770$

Янтарная кислота может стимулировать родственный рецептор SUCNR1 на плазматической мембране, который сопряжён с G-белками. Относительное количество сукцинатных рецепторов в клетках линии C2C12 снижалось в зависимости от дня дифференцировки на 17,8% ($p=0,0002$) на 1 день дифференцировки, на 32,9% ($p<0,0001$) на 4 день дифференцировки, на 30,1% ($p<0,0001$) на 7 день дифференцировки по сравнению со значениями контрольной группы (клетки до дифференцировки) (Рисунок 27).

При сравнении количества SUCNR1 в зависимости от срока культивирования было получено, что на 4 и 7 дни данный показатель снижался на 19,5% ($p=0,001$) и на 15,9% ($p=0,004$) по сравнению с показателями 1 дня культивирования (Рисунок 27).

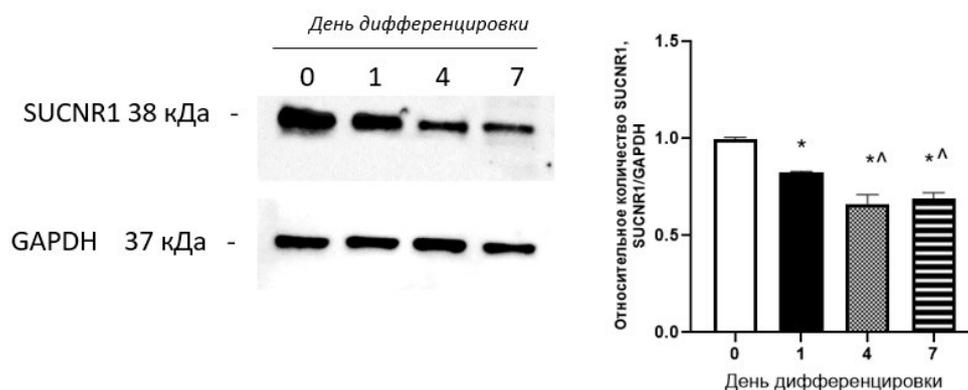


Рисунок 27 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12

Примечание – * - статистически значимые отличия по сравнению с контролем до дифференцировки, $p < 0,05$; ^ - статистически значимые отличия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=22,3$; $p=0,0017$

Воздействие янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на клетки линии C2C12 на раннем этапе миогенеза способствовало снижению относительного количества SUCNR1 на 18,7% ($p < 0,0001$), 22,5% ($p < 0,0001$) и 22,1% ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, изменения не носили дозозависимый характер (Рисунок 28).

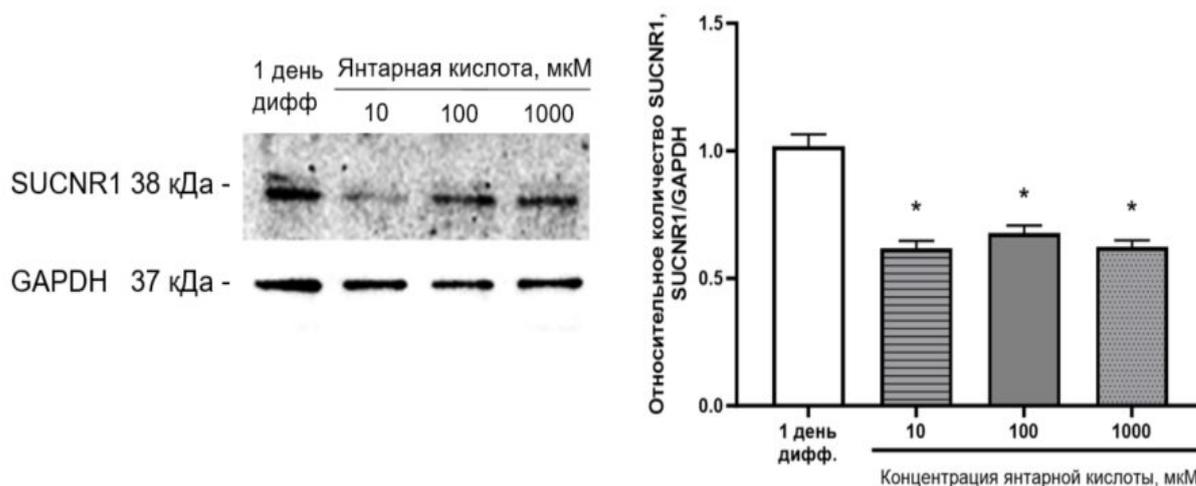


Рисунок 28 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые отличия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=92,28$; $p < 0,0001$

Относительное количество сукцинатных рецепторов при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ статистически значимо снижалось на 44,9% ($p < 0,0001$), 32,7% ($p = 0,0002$) и 26,5% ($p = 0,0007$) соответственно относительно значений группы сравнения 4 дня дифференцировки (Рисунок 29).

При действии янтарной кислоты в концентрации 1000 мкМ уровень сукцинатных рецепторов был выше на 33,3% ($p = 0,0080$) по сравнению с концентрацией 10 мкМ (Рисунок 29).

Относительное количество SUCNR1 снижалось при действии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 16,2% ($p < 0,0001$), 11,1% ($p = 0,0006$) и 19,2% ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению со значениями группы 7 дня дифференцировки. Изменения не зависели от дозы янтарной кислоты (Рисунок 30).

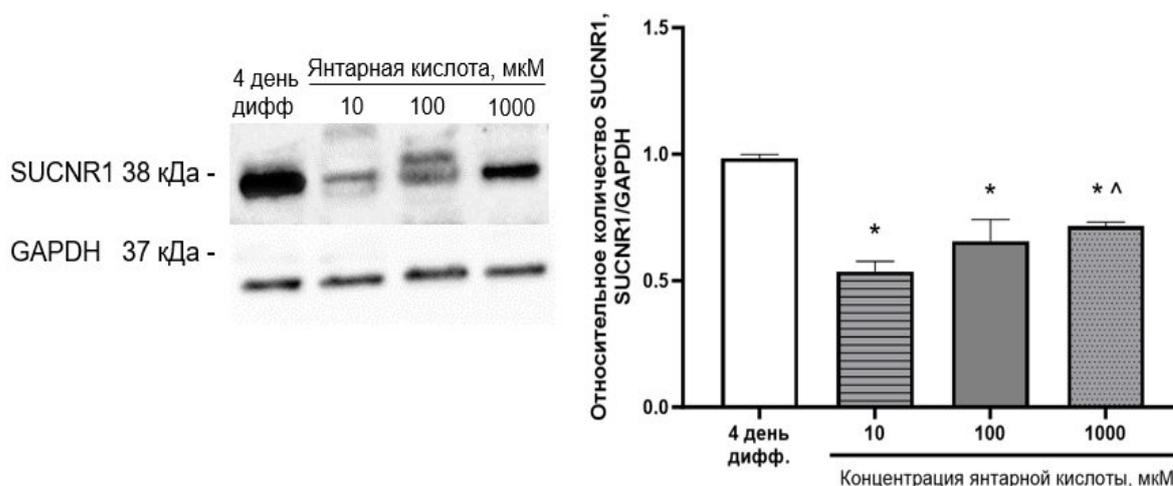


Рисунок 29 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые отличия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,05$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты 10 мкМ, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F = 45,83$; $p < 0,0001$

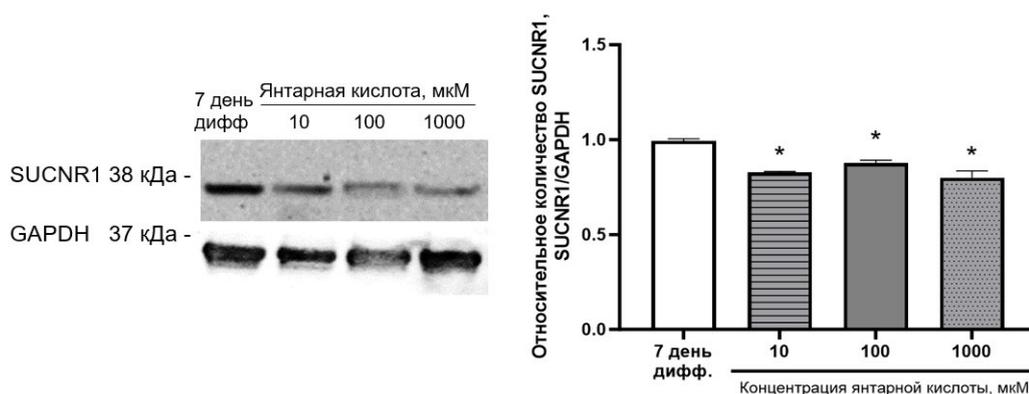


Рисунок 30 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые отличия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=51,68$; $p < 0,0001$

Таким образом, при воздействии янтарной кислоты на клетки линии C2C12 относительное количество рецепторов HIF-1 α и PXR не изменялось. Относительное количество SUCNR1 – снижалось как, в процессе миогенеза, так и при экзогенном воздействии янтарной кислоты, что указывает на их вовлеченность в регуляции миогенеза с помощью янтарной кислоты.

3.3. Исследование действия ЭМГПС на этапы миогенеза клеточной линии C2C12

3.3.1. Изучения цитотоксического действия ЭМГПС на клетки линии C2C12

На начальном этапе исследования оценивали цитотоксичность ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ. В ходе работы было выявлено, что жизнеспособность клеток при добавлении ЭМГПС в питательную среду не изменяется по сравнению с контролем, принятым за 100% (Таблица 9).

Таблица 9 – Цитотоксичность ЭМГПС в клетках линии C2C12

	Жизнеспособность клеток, %
Контроль	100
ЭМГПС, 10 мкМ	104,61 \pm 15,5
ЭМГПС, 100 мкМ	96,76 \pm 18,7
ЭМГПС, 1000 мкМ	86,15 \pm 16,5

3.3.2. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12 и индекса миогенеза при воздействии ЭМГПС

Добавление ЭМГПС вызывало стимуляцию миогенной дифференцировки и возрастание индекса миогенеза на раннем этапе миогенеза на 293,3%, 420,0% и 413,3% ($p < 0,0001$) относительно клеток 1 дня дифференцировки соответственно; изменения носили дозозависимый характер.

При этом индекс миогенеза в 1 день дифференцировки под действием ЭМГПС в концентрациях 100 мкМ и 1000 мкМ по сравнению ЭМГПС (10 мкМ) возрастал на 32,2% и 30,5% ($p < 0,0001$) соответственно (Рисунок 31).

Ширина многоядерных структур увеличивалась при добавлении ЭМГПС 100 мкМ на 85,8% ($p = 0,0265$) относительно клеток в 1 день дифференцировки (Таблица 10).

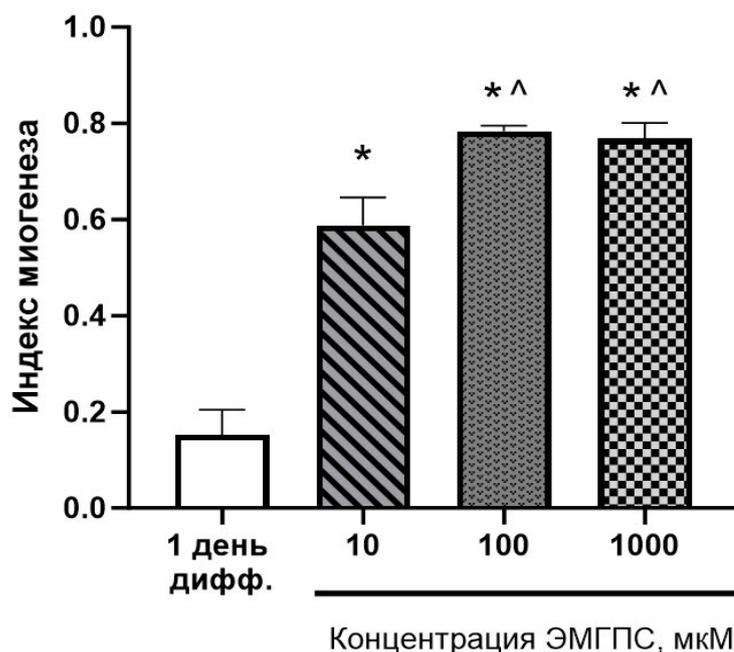


Рисунок 31 – Значения индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,0001$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=236,2$; $p < 0,0001$

При добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ возрастало количество многоядерных структур на 357,1%, 278,6%, 300,0% соответственно относительно клеток 1 дня дифференцировки ($p < 0,0001$) (Таблица 10).

Количество ядер в многоядерных структурах при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ увеличивалось на 149,5% ($p = 0,0129$) 360,5% ($p < 0,0001$) и 319,0% ($p < 0,0001$) соответственно относительно клеток 1 дня дифференцировки.

При внесении ЭМГПС в концентрациях 100 и 1000 мкМ количество ядер в многоядерных структурах возрастало на 84,6% ($p = 0,0003$) и 67,9% ($p = 0,0028$) соответственно относительно ЭМГПС (10 мкМ) (Таблица 10).

Таблица 10 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 1 день дифференцировки и при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

	Длина многоядерных структур, мкМ	Ширина многоядерных структур, мкМ	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
1 день дифференцировки	122,52± 54,64	15,35±6,79	5,60±1,14	2,00±0,82
ЭМГПС 10 мкМ	124,96±20,69	23,26±4,27	25,6±1,95* * $p < 0,0001$	4,99±1,42* * $p = 0,0129$
ЭМГПС 100 мкМ	187,22±76,68	28,52±12,72* * $p = 0,0265$	21,20±4,44* * $p < 0,0001$	9,21±1,09* [^] * $p < 0,0001$ [^] $p = 0,0003$
ЭМГПС 1000 мкМ	157,45±40,52	22,87±12,27	22,40±5,08* * $p < 0,0001$	8,38±1,67* [^] * $p < 0,0001$ [^] $p = 0,0028$
Примечание - * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,05$; [^] – статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ, $p < 0,01$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F = 2,497$, $p = 0,0968$; ширина многоядерных структур $F = 3,536$, $p = 0,0389$; количество многоядерных структур $F = 31,51$, $p < 0,0001$; количество ядер в многоядерных структурах $F = 33,69$, $p < 0,0001$				

На 4 день дифференцировки также наблюдалось возрастание индекса миогенеза при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на 38,0% ($p = 0,02$), 81,8% ($p < 0,0001$) и 90,9% ($p < 0,0001$) соответственно. По сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ возрастал индекс миогенеза для групп ЭМГПС 100 мкМ

и 1000 мкМ на 31,1% ($p=0,0145$) и 37,7% ($p=0,0379$) соответственно (Рисунки 32, 34).

Длина многоядерных структур увеличивалась при внесении ЭМГПС в концентрациях 100, 1000 мкМ на 134,9% ($p=0,0145$) и 103,7% ($p=0,0379$) соответственно по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки.

Ширина многоядерных структур при добавлении ЭМГПС в концентрациях 100 и 1000 мкМ возрастала на 154,4% ($p=0,0038$) и 148,8% ($p=0,0008$) соответственно относительно клеток среднего этапа миогенеза (Таблица 11).

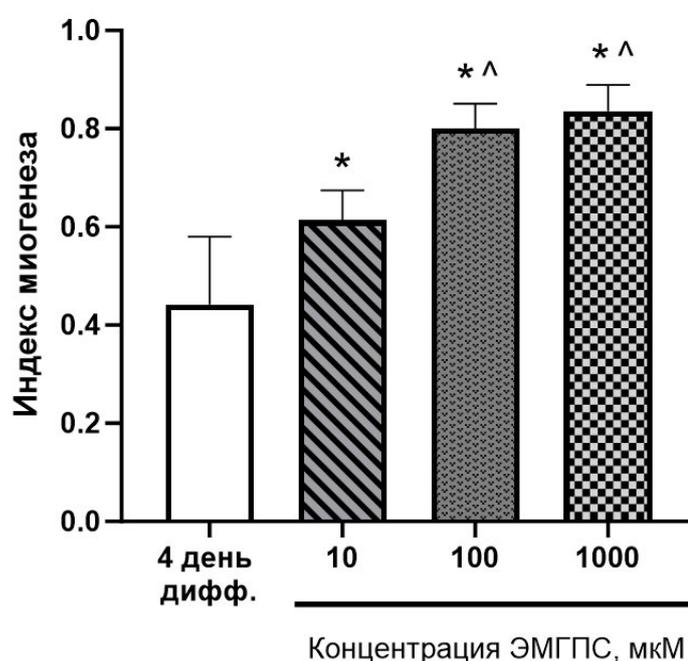


Рисунок 32 – Значения индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p<0,0001$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ, $p\leq 0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=23,59$; $p<0,0001$

На 4 день дифференцировки при внесении ЭМГПС в концентрациях 100 и 1000 мкМ ширина многоядерных структур возрастала на 72,5% ($p=0,0489$) и 68,7% ($p=0,0110$) соответственно относительно ЭМГПС (10 мкМ).

Количество многоядерных структур в поле зрения при добавлении ЭМГПС (10, 100, 1000 мкМ) увеличивалось на 112,4% ($p=0,0072$), 157,1% ($p=0,0005$),

102,0% ($p=0,0156$) соответственно относительно клеток 4 дня дифференцировки (Таблица 11).

При внесении ЭМГПС (100 и 1000 мкМ) количество ядер в многоядерных структурах увеличивалось на 179,1% ($p=0,0033$) и 192,9% ($p=0,0031$) соответственно относительно клеток среднего этапа миогенеза (Таблица 11).

Таблица 11 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 4 день дифференцировки и при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
4 день дифференцировки	128,11±58,02	16,01±5,61	9,80±2,17	3,40±0,89
ЭМГПС 10 мкМ	181,55±38,79	23,61±4,46	20,80±5,45* * $p=0,0072$	5,95±1,83
ЭМГПС 100 мкМ	301,03±99,64* * $p=0,0145$	40,73±9,72* [^] * $p=0,0038$ [^] $p=0,0489$	25,20±4,32* * $p=0,0005$	9,49±1,85* * $p=0,0033$
ЭМГПС 1000 мкМ	260,94±74,96* * $p=0,0379$	39,83±18,48* [^] * $p=0,0008$ [^] $p=0,0110$	19,80±4,15* * $p=0,0156$	9,96±2,78* * $p=0,0031$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p<0,05$; [^] – статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ, $p<0,05$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F=5,351$, $p=0,0096$; ширина многоядерных структур $F=10,80$, $p=0,0004$; количество многоядерных структур $F=11,50$, $p=0,0008$; количество ядер в многоядерных структурах $F=8,161$, $p=0,0031$				

Таким образом, на 4 день дифференцировки наблюдался дозозависимый эффект: добавление ЭМГПС в концентрациях 100 и 1000 мкМ увеличивало все исследуемые морфологические показатели.

Возрастанием индекса миогенеза характеризовался и поздний этап миогенеза при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ относительно группы 7 дня дифференцировки на 14,3% ($p=0,0017$), 13,0% ($p=0,002$) и 11,7% ($p=0,0098$) соответственно (Рисунки 33, 34).

Длина многоядерных структур при внесении ЭМГПС 100 мкМ увеличивалась на 48,5% ($p=0,0356$) относительно клеток 7 дня дифференцировки.

При добавлении ЭМГПС (10 и 100 мкМ) ширина многоядерных структур увеличивается на 143,9% ($p=0,0102$) и 124,1% ($p=0,0098$) соответственно по сравнению с клетками позднего этапа миогенеза.

Количество многоядерных структур при добавлении ЭМГПС (10, 100, 1000 мкМ) возрастало на 147,4% ($p<0,0001$), 178,9% ($p<0,0001$), 117,1% ($p=0,0068$), количество ядер - на 58,0% ($p=0,0373$), 77,1% ($p=0,0051$) и 88,8% ($p=0,0015$) соответственно относительно клеток 7 дня дифференцировки (Таблица 12).

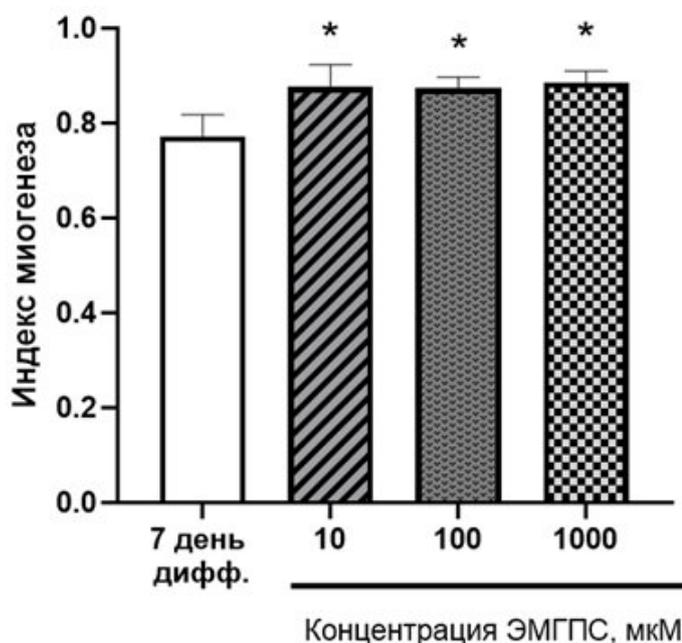


Рисунок 33 – Значения индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p<0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=10,52$; $p=0,0005$

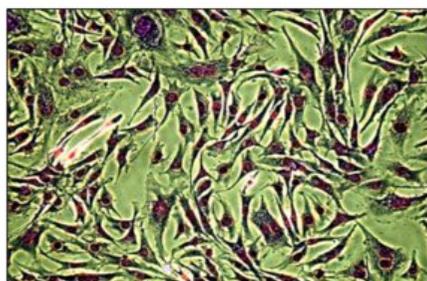
Добавление к клеткам ЭМГПС (10, 100, 1000 мкМ) на протяжении 1, 4, 7 дней дифференцировки вызывало увеличение количества многоядерных структур и ядер в них относительно клеток, культивируемых в дифференцировочной среде. На среднем этапе миогенеза ЭМГПС (100, 1000 мкМ) стимулировал рост мышечных клеток в длину и ширину относительно группы клеток 4 дня дифференцировки. Аналогичный эффект ЭМГПС в концентрации 100 мкМ наблюдался на позднем этапе миогенеза, при внесении ЭМГПС (10 мкМ) ширина

миотубул возрастала относительно группы клеток 7 дня дифференцировки. Количество многоядерных структур в п.з. статистически значимо возрастало на всех этапах миогенеза при введении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ относительно клеток, культивируемых на дифференцировочной среде без добавления препарата.

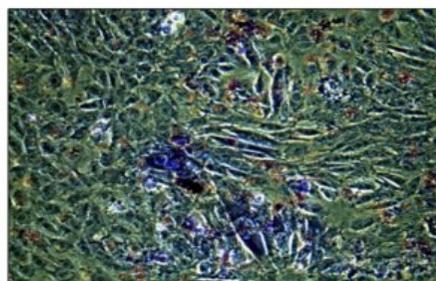
Таблица 12 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 7 день дифференцировки и при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

	Длина многоядерных структур, мкМ	Ширина многоядерных структур, мкМ	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
7 день дифференцировки	185,24±68,75	21,39±4,98	7,60±1,82	8,20±1,48
ЭМГПС 10 мкМ	251,46±60,03	52,17±23,08* *p=0,0102	18,80±2,17* *p<0,0001	12,96±3,81* *p=0,0373
ЭМГПС 100 мкМ	275,07±88,35* *p=0,0356	47,94±14,66* *p=0,0098	21,20±3,42* *p<0,0001	14,52±2,78* *p=0,0051
ЭМГПС 1000 мкМ	220,12±56,08	34,00±12,14	16,50±2,12* ^v *p=0,0068 ^v p=0,0068	15,70±1,39* *p=0,0015
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, p<0,01; ^v – статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 100 мкМ, p<0,01. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур F=3,583, p=0,0374; ширина многоядерных структур F=6,749, p=0,0037; количество многоядерных структур F=23,01, p<0,0001; количество ядер в многоядерных структурах F=8,377, p=0,0014				

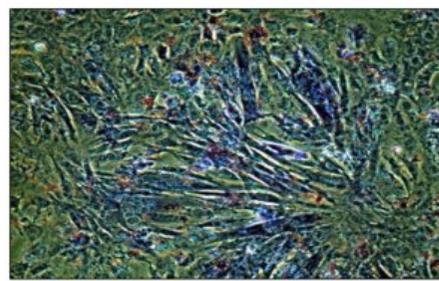
Таким образом, морфологические изменения показали, что ЭМГПС стимулирует миогенную дифференцировку клеток линии C2C12. Наблюдалось возрастание индекса миогенеза в 1 и 4 дни дифференцировки при добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ носит дозозависимый характер. Индекс миогенеза при концентрации тестируемого вещества 10 мкМ был ниже по сравнению с добавлением 100 и 1000 мкМ. На позднем этапе миогенеза ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ увеличивала индекс миогенеза не зависимо от дозы.



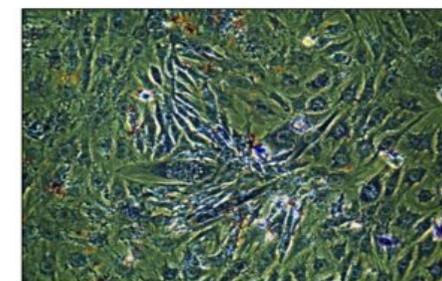
1 день дифференцировки



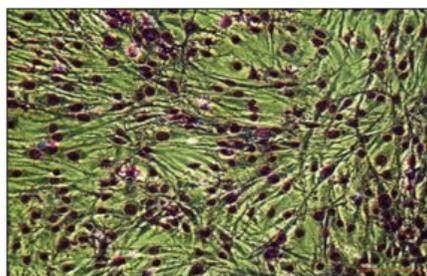
ЭМГПС 10 мкМ
1 день дифференцировки



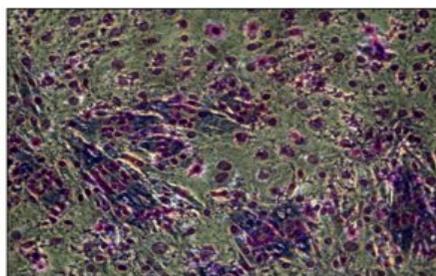
ЭМГПС 100 мкМ
1 день дифференцировки



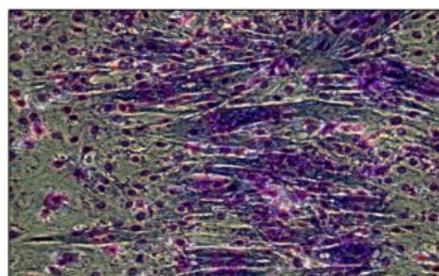
ЭМГПС 1000 мкМ
1 день дифференцировки



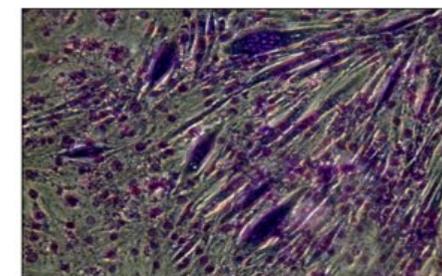
4 день дифференцировки



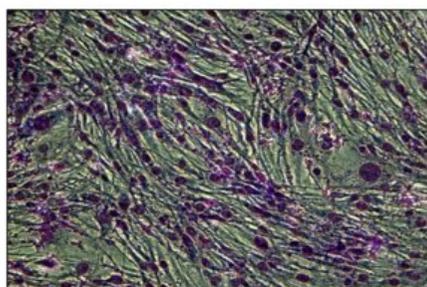
ЭМГПС 10 мкМ
4 день дифференцировки



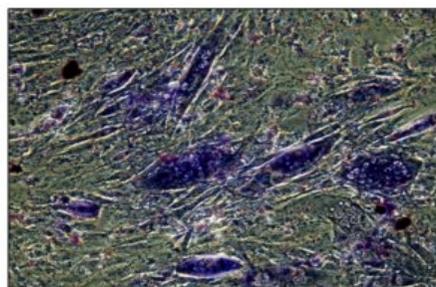
ЭМГПС 100 мкМ
4 день дифференцировки



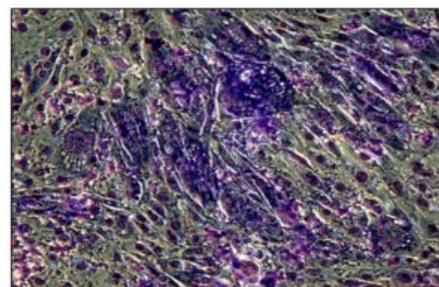
ЭМГПС 1000 мкМ
4 день дифференцировки



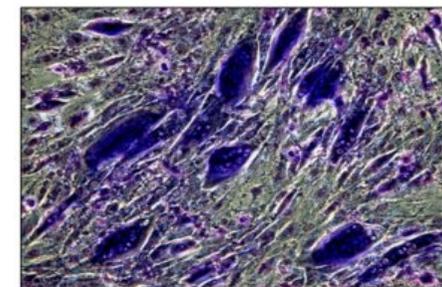
7 день дифференцировки



ЭМГПС 10 мкМ
7 день дифференцировки



ЭМГПС 100 мкМ
7 день дифференцировки



ЭМГПС 1000 мкМ
7 день дифференцировки

Масштабная линейка:  100 мкМ

Рисунок 34 – Влияние ЭМГПС на дифференцировку клеток линии C2C12
Примечание – Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$. Окраска ядер по Романовскому-Гимзе

3.3.3. Определение относительного количества транскрипционных факторов и специфических белков скелетной мышечной ткани при воздействии ЭМГПС

На раннем этапе дифференцировки относительное количество MyoD при действии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ возрастало на 30,7% ($p=0,0009$), 32,0% ($p=0,0006$) и 29,5% ($p=0,0013$) соответственно относительно значений клеток 1 дня дифференцировки (Рисунок 35).

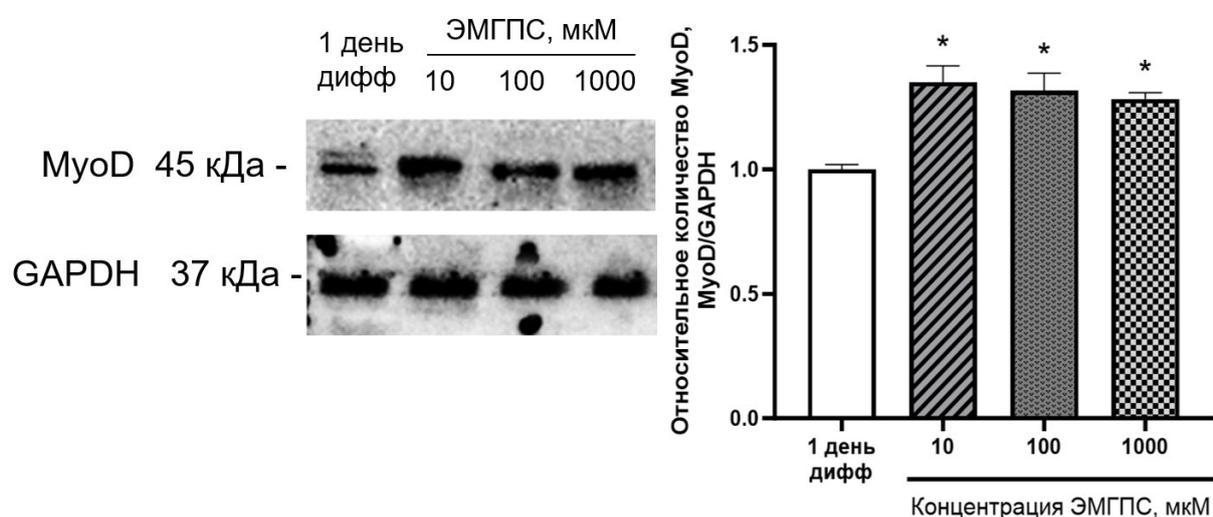


Рисунок 35 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p<0,001$. Результат дисперсионного анализа $F=30,17$; $p=0,0001$

На 4 день дифференцировки под действием ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ относительное количество данного транскрипционного фактора повышалось на 48,3% ($p<0,0001$), 32,6% ($p<0,0001$) и 18,8% ($p=0,007$) соответственно по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки (Рисунок 36).

Относительное количество MyoD при внесении ЭМГПС (10 мкМ и 100 мкМ) повышалось на 24,6% ($p<0,0001$) и 11,9% ($p=0,0017$) соответственно относительно серии ЭМГПС 1000 мкМ (Рисунок 36).

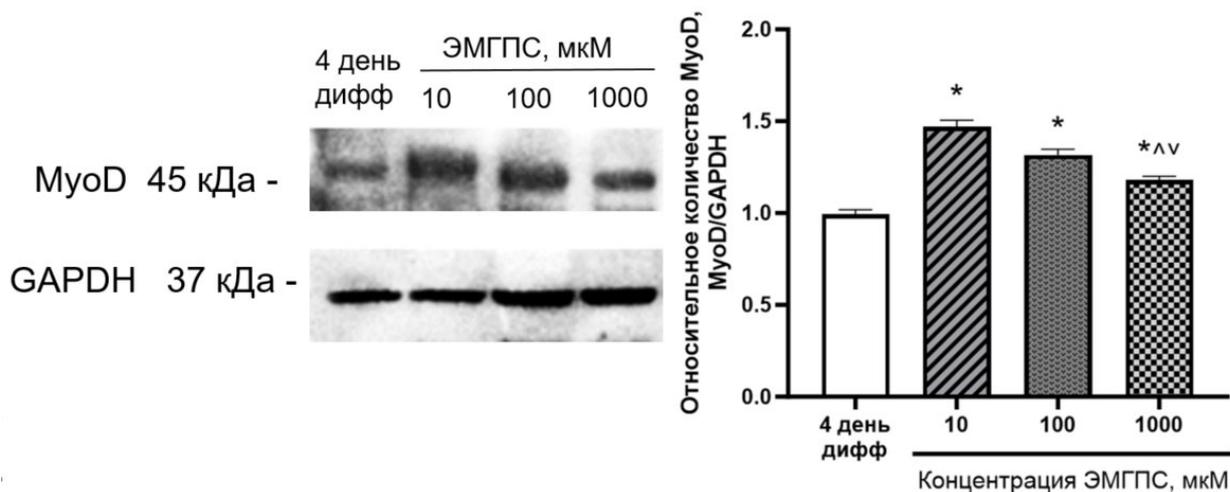


Рисунок 36 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,001$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ, $p < 0,00015$; v - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 100 мкМ, $p < 0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=150,9$; $p < 0,0001$

Относительное количество α -актина возросло на 4 день дифференцировки при внесении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на 47,0% ($p=0,0016$), 64,0% ($p=0,0002$), 38% ($p=0,0058$) соответственно по сравнению с клетками среднего этапа миогенеза.

Уровень α -актина при добавлении ЭМГПС в концентрации 100 мкМ возрос на 18,8% ($p=0,0420$) относительно группы ЭМГПС (1000 мкМ) в течение 4 дней дифференцировки (Рисунок 37).

На 7 день дифференцировки уровень MyoG при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ возрос на 53,5%, 45,6% и 52,7% ($p < 0,0001$ для всех групп) соответственно по сравнению с группой 7 дня дифференцировки (Рисунок 38). Не наблюдалась зависимость относительного количества MyoG от концентрации ЭМГПС. При добавлении в питательную среду ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 7 дней уровень тяжелых цепей миозина возрос на 41,1%, 38,9% и 42,5% ($p < 0,0001$ для всех групп) соответственно по сравнению со значениями группы 7 дня дифференцировки (Рисунок 39).

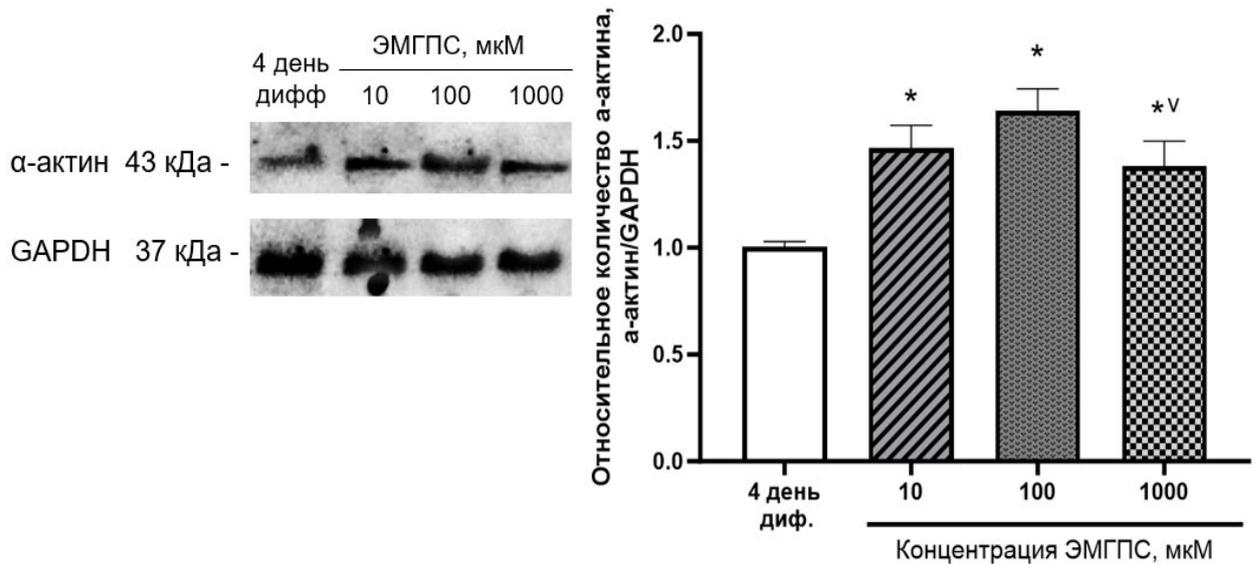


Рисунок 37 – Относительное количество α-актина в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,01$. V - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 100 мкМ, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=23,65$; $p=0,0002$

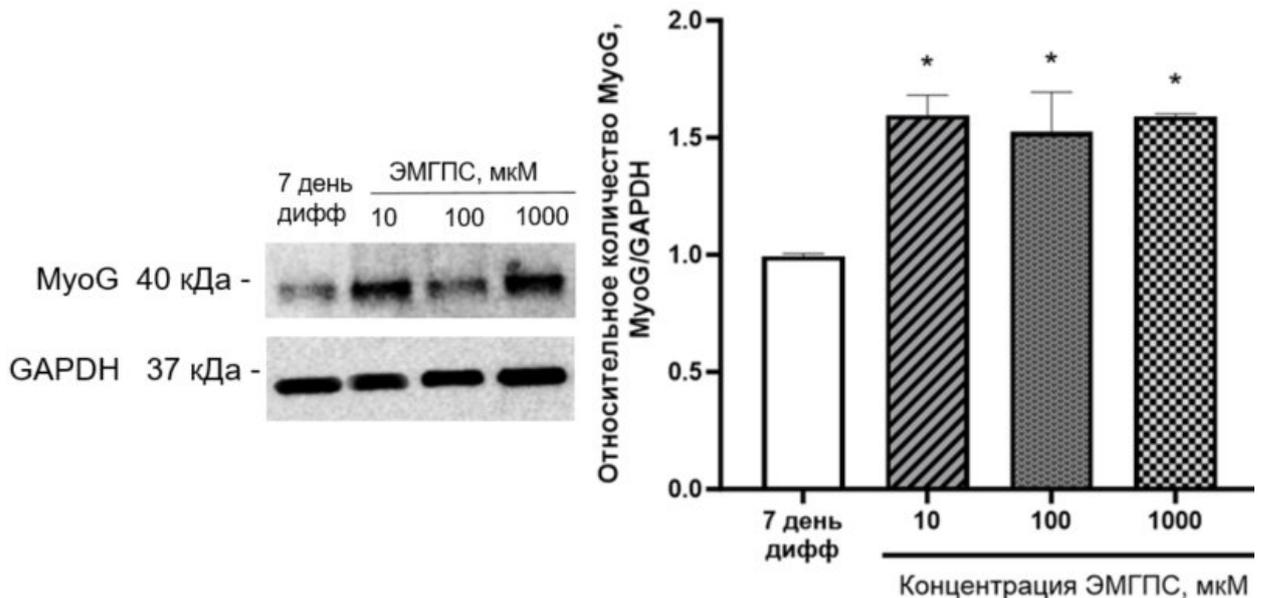


Рисунок 38 – Относительное количество MyoG в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=175$; $p < 0,0001$

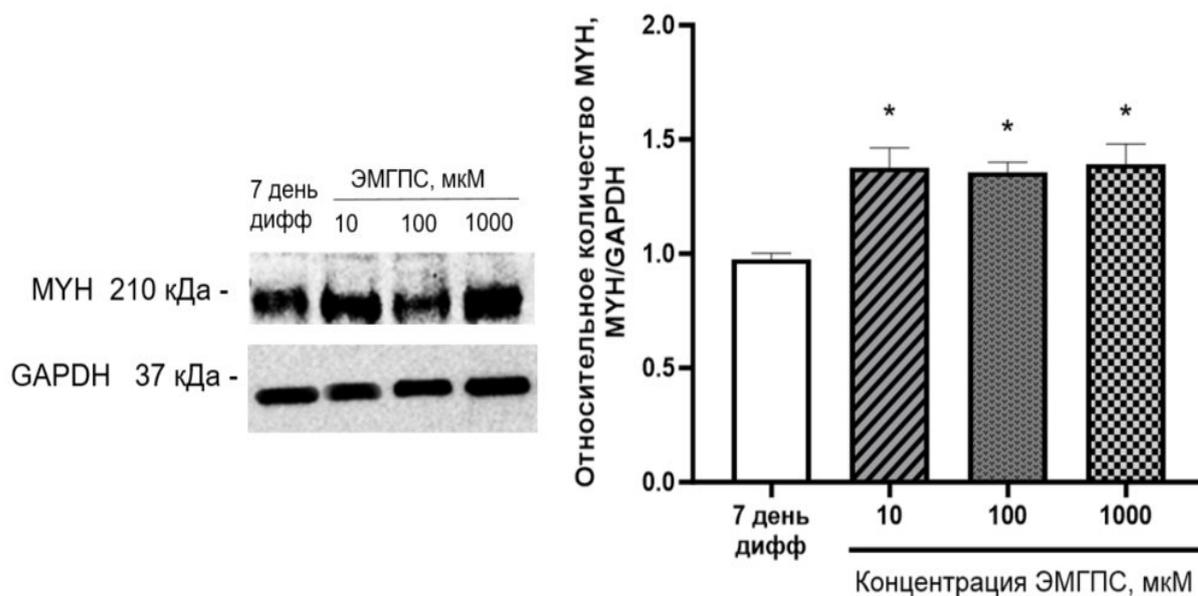


Рисунок 39 – Относительное количество MYH в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=27,30$; $p=0,0001$

Таким образом выявлено, что ЭМГПС ускоряет процесс миогенной дифференцировки клеток линии C2C12, о чем свидетельствуют морфологические изменения, возрастание индекса миогенеза и повышение уровня специфических маркеров мышечной ткани - α -актина, MYH, MyoD и MyoG.

3.3.4. Изучение механизма действия ЭМГПС на миогенез

Для изучения возможных механизмов индукции миогенеза ЭМГПС было оценено его влияние на количество транскрипционных факторов: HIF-1 α и PXR. В ходе исследования было показано, что содержание данных транскрипционных факторов не изменялось на 7 день при культивировании клеток в дифференцировочной питательной среде, ЭМГПС также не влиял на их уровень на указанном этапе миогенеза (Рисунок 40). В ходе исследования было выявлено, что транскрипционные факторы HIF-1 α и PXR не участвуют в стимуляции миогенеза ЭМГПС.

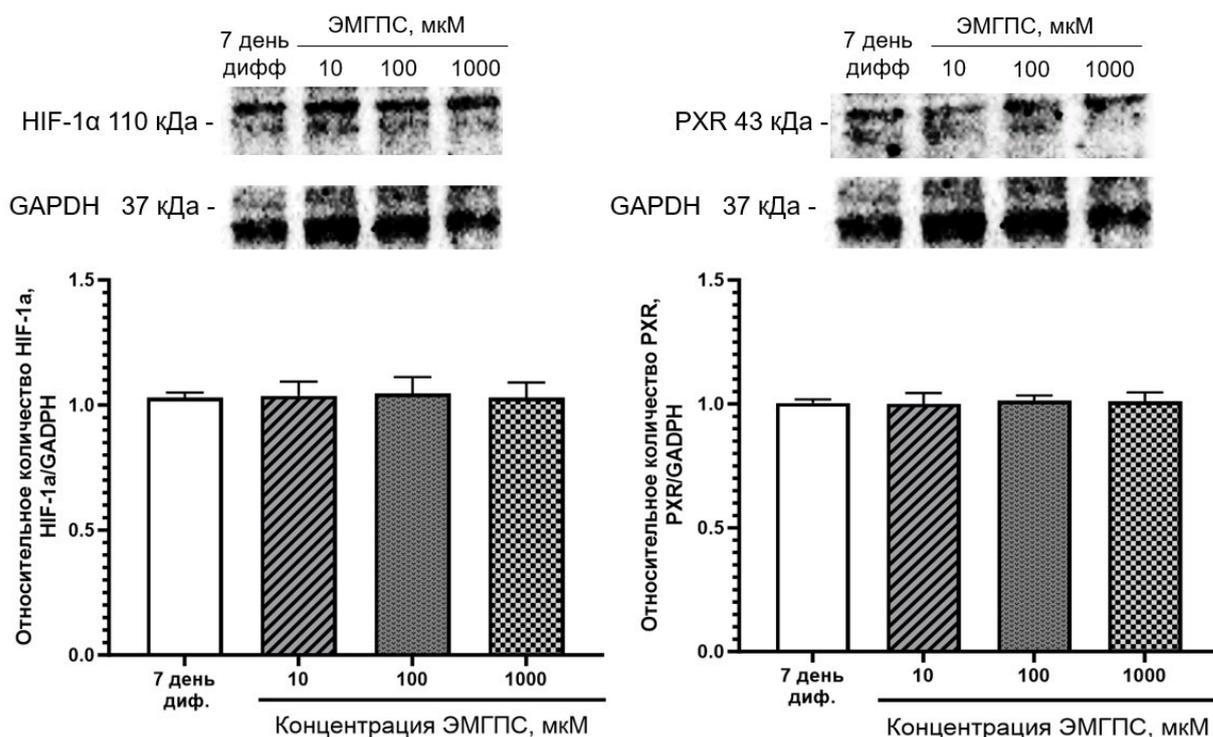


Рисунок 40 – Относительное количество HIF-1α и PXR в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней
Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=0,1149$; $p=0,9489$

При добавлении в питательную среду ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в течение 24 ч уровень сукцинатных рецепторов снижался на 35,0%, 31,6% и 28,3% ($p<0,0001$ для всех групп) соответственно относительно значений 1 дня дифференцировки (Рисунок 41).

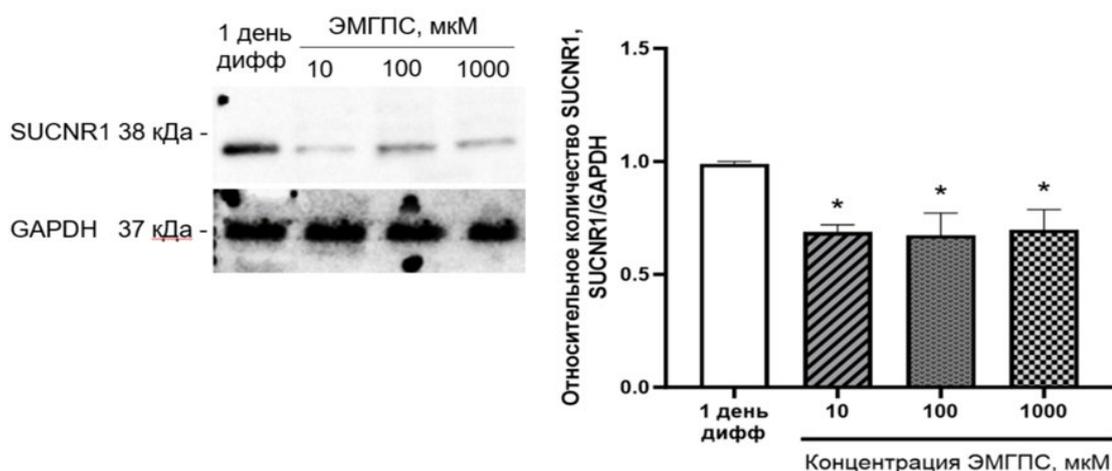


Рисунок 41 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 1 дня
Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p<0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=14,84$; $p=0,0012$

Относительное количество сукцинатных рецепторов при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ снижалось на 32,3% ($p < 0,0001$), 26,3% ($p < 0,0001$) и 17,2% ($p = 0,0013$) соответственно относительно группы сравнения – 4 день дифференцировки. Уровень SUCNR1 при внесении ЭМГПС (1000 мкМ) возрастал на 22,4% ($p = 0,0041$) относительно группы ЭМГПС 10 мкМ в течение 4 дней дифференцировки (Рисунок 42).

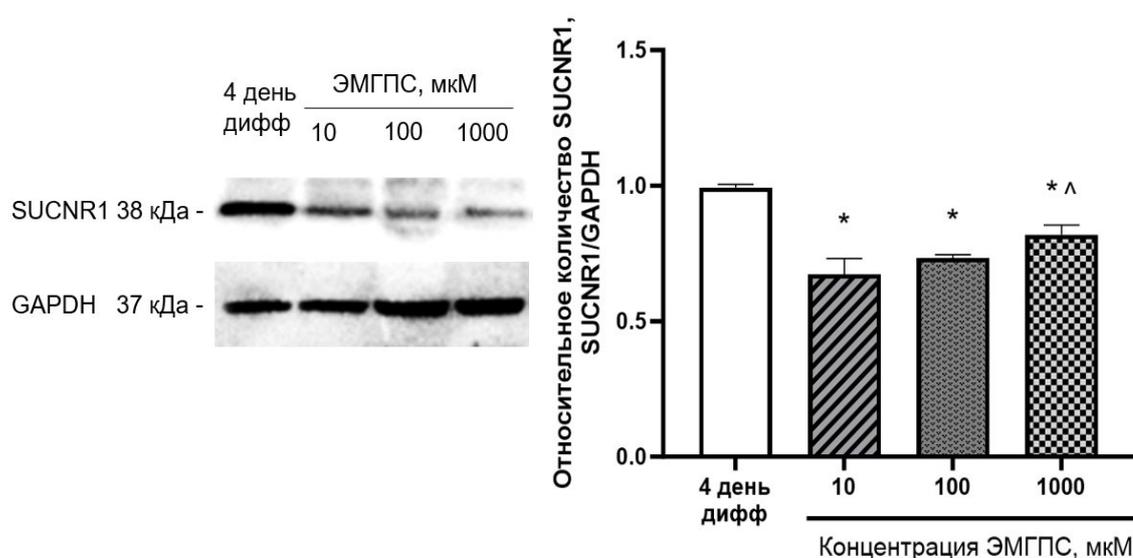


Рисунок 42 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 4 дней

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,05$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=14,84$; $p=0,0012$

Относительное количество SUCNR1 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ снижалось на 17,1% ($p < 0,0001$), 11,1% ($p = 0,0009$), 19,2% ($p < 0,0001$) соответственно относительно значений на 7 день дифференцировки (Рисунок 43).

Таким образом, при воздействии ЭМГПС на клетки линии C2C12 относительное количество рецепторов NIF-1 α и PXR не изменялось. Относительное количество SUCNR1 снижалось как, в клетках на дифференцировочной среде без добавления ЭМГПС, так и при экзогенном воздействии препарата, что указывает на вовлеченность рецептора в регуляции миогенеза с помощью ЭМГПС.

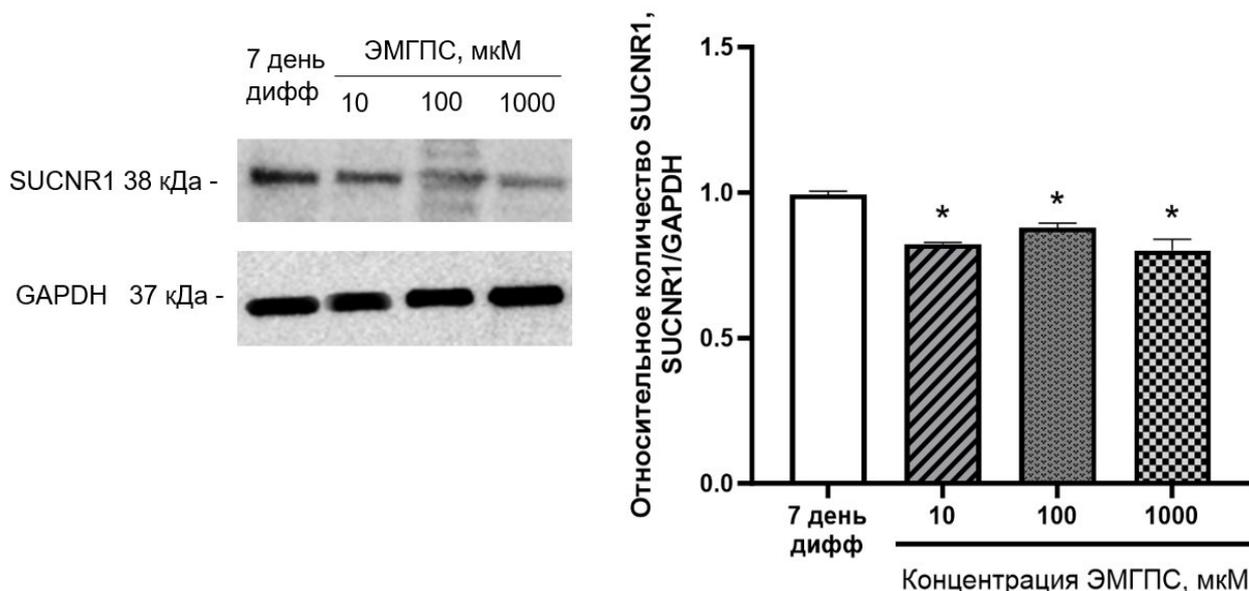


Рисунок 43 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ в течение 7 дней

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=47,44$; $p < 0,0001$

3.4. Изучение механизмов влияния янтарной кислоты и ЭМГПС на миогенез через SUCNR1

3.4.1. Определение цитотоксического действия pertussis toxin на клетки линии C2C12

На начальном этапе исследования оценивали цитотоксичность Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл [166]. Контроль принимали за 100%. Было выявлено, что при добавлении Pertussis toxin в питательную среду жизнеспособность клеток не изменяется по сравнению с контролем и составляет $96,73 \pm 25,10\%$.

3.4.2. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12, индекса миогенеза и показателей миогенеза при самостоятельном действии Pertussis toxin и в сочетании с янтарной кислотой

При совместном добавлении в питательную среду PT (100 нг/мл) и янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на раннем этапе наблюдалось

возрастание индекса миогенеза на 53,3% ($p=0,05$), 213,3% ($p<0,0001$) и 240% ($p<0,0001$) соответственно относительно 1 дня дифференцировки, изменения носили дозозависимый характер (Рисунки 44, 47). При этом индекс миогенеза совместно внесенных РТ (100 нг/мл) и янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ на 60,3% ($p<0,0001$), 39,7% ($p<0,0001$) и 37,8% ($p<0,0001$) соответственно был ниже, чем индекс миогенеза серии янтарной кислоты (10, 100 и 1000 мкМ) без добавления Pertussis toxin (Рисунок 17).

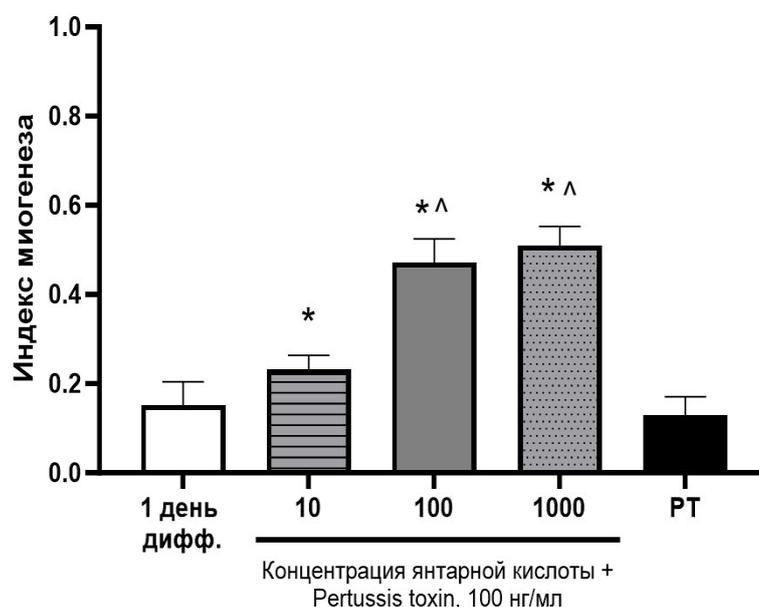


Рисунок 44 – Значения индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p\leq 0,05$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ + Pertussis toxin 100 нг/мл, $p<0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=80,61$; $p<0,0001$

Ширина многоядерных структур при самостоятельном действии РТ повышалась на 77,4% ($p=0,0223$) по сравнению с клетками раннего этапа дифференцировки. Количество многоядерных структур при совместном внесении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ увеличивалось на 121,4% ($p=0,0113$), 178,6% ($p=0,0002$), 248,2% ($p<0,0001$) соответственно относительно клеток 1 дня дифференцировки.

Таблица 13 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 1 день дифференцировки и при совместном добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
1 день дифференцировки	122,52± 54,64	15,35±6,79	5,60±1,14	2,00±0,82
Янтарная кислота 10 мкМ + РТ 100 нг/мл	93,78±21,21	18,10±5,09	12,40±2,30* *p=0,0113	2,60±0,22
Янтарная кислота 100 мкМ+ РТ 100 нг/мл	118,13±37,71	15,78±4,76	15,60±2,30* *p=0,0002	2,90±0,42* * p=0,0370
Янтарная кислота 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл	85,37±18,14	10,81±2,21	19,50±5,45* *p<0,0001	3,38±0,25* *p=0,0003
РТ 100 нг/мл	98,83±20,67	27,23±11,94* *p=0,0223	7,40±2,88	2,77±0,38
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, p<0,05. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур F=2,678, p=0,0550; ширина многоядерных структур F=5,821, p=0,0019; количество многоядерных структур F=19,11, p<0,0001; количество ядер в многоядерных структурах F=7,938, p=0,0005				

При совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 мкМ и РТ количество многоядерных структур было ниже на 40,5% (p=0,0002) и 39,4% (p=0,0002) соответственно относительно янтарной кислоты (10, 100 мкМ) без добавления РТ (Таблицы 6, 13).

Количество ядер в многоядерных структурах при добавлении янтарной кислоты (100, 1000 мкМ) с РТ увеличивалось на 45,0% (p=0,0370) и 69% (p=0,0003) соответственно относительно клеток раннего этапа дифференцировки. При совместном внесении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и РТ

в питательную среду количество ядер в многоядерных структурах снижалось на 36,6% ($p=0,0027$), 68,1% ($p<0,0001$) и 61,1% ($p<0,0001$) соответственно относительно самостоятельного воздействия янтарной кислоты 10, 100, 1000 мкМ (Таблицы 6, 13).

Самостоятельное действие РТ способствовало снижению индекса миогенеза на 63,6% ($p<0,0001$) относительно 4 дня дифференцировки (Рисунки 45, 47).

Индекс миогенеза при внесении янтарной кислоты в концентрациях 100 и 1000 мкМ с совместным добавлением Pertussis toxin возрастал на 45,5% ($p=0,004$) и на 65,9% ($p=0,0002$) соответственно относительно 4 дня дифференцировки. Изменения не зависели от концентрации янтарной кислоты, но были статистически ниже по сравнению с самостоятельным действием янтарной кислоты (Рисунок 18).

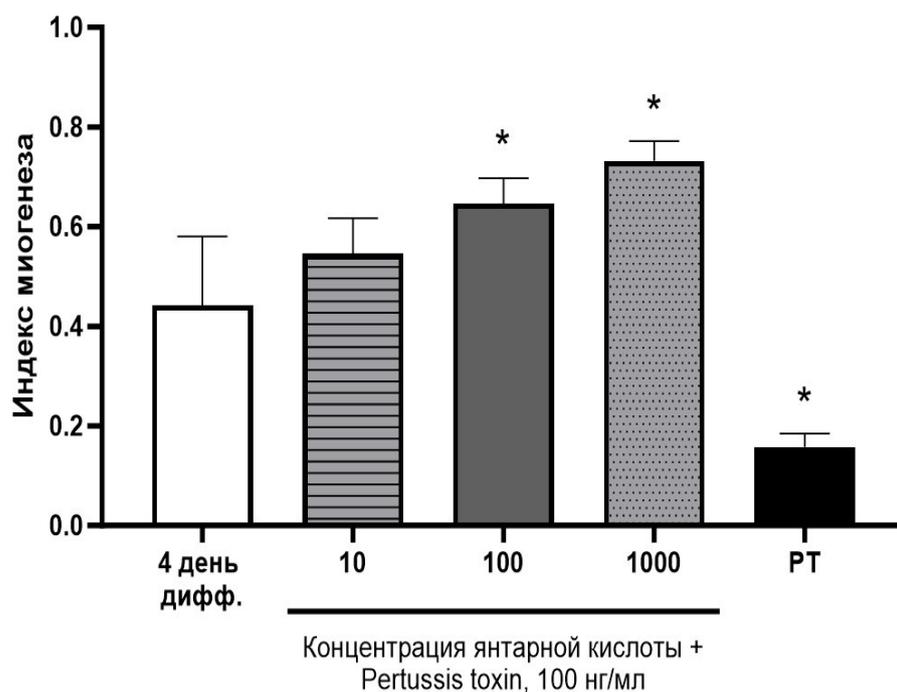


Рисунок 45 – Значение индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p<0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=42,60$; $p<0,0001$

Длина многоядерных структур увеличивалась при добавлении янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ с РТ на 109,7% ($p=0,0002$) по сравнению с клетками 4 дня дифференцировки (Таблица 14).

Таблица 14 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 4 день дифференцировки и при совместном добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
4 день дифференцировки	128,11±58,02	16,01±5,61	9,80±2,17	3,40±0,89
Янтарная кислота 10 мкМ + РТ 100 нг/мл	157,78±29,21	32,27±12,39* *p=0,0493	13,20±5,71	6,50±2,63
Янтарная кислота 100 мкМ+ РТ 100 нг/мл	268,62±70,84* *p=0,0002	31,94±15,31* *p=0,0266	15,40±2,97	7,32±2,83
Янтарная кислота 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл	209,17±46,45	30,10±4,94	13,00±2,00	7,57±2,65* *p=0,0328
РТ 100 нг/мл	97,49±29,13	20,29±6,91	9,67±2,52	2,94±0,42

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F=12,27$, $p < 0,0001$; ширина многоядерных структур $F=3,830$, $p=0,0181$; количество многоядерных структур $F=2,383$, $p=0,0877$; количество ядер в многоядерных структурах $F=6,190$, $p=0,0038$

Ширина многоядерных структур увеличивалась при добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 мкМ с РТ на 101,6% ($p=0,0493$) и 99,5 % ($p=0,0266$) соответственно относительно клеток 4 дня дифференцировки. Количество ядер при внесении янтарной кислоты в концентрации 1000 мкМ с РТ увеличивалось на 122,6% ($p=0,0328$) по сравнению с клетками 4 дня дифференцировки (Таблица 14).

Значения индекса миогенеза при концентрациях янтарной кислоты 10 мкМ и 1000 мкМ при совместном введении с Pertussis toxin снижались на 48,1% ($p < 0,0001$) и 18,2% ($p = 0,01$) соответственно относительно группы 7 дня дифференцировки. Самостоятельное действие РТ приводило к снижению индекса миогенеза на 70,1% ($p < 0,0001$) (Рисунки 46, 47). Также значение индекса миогенеза снижалось при совместном внесении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ на 54,5%, 29,0%, 24,1% соответственно ($p < 0,0001$ для всех групп) относительно самостоятельного действия янтарной кислоты (Рисунок 19).

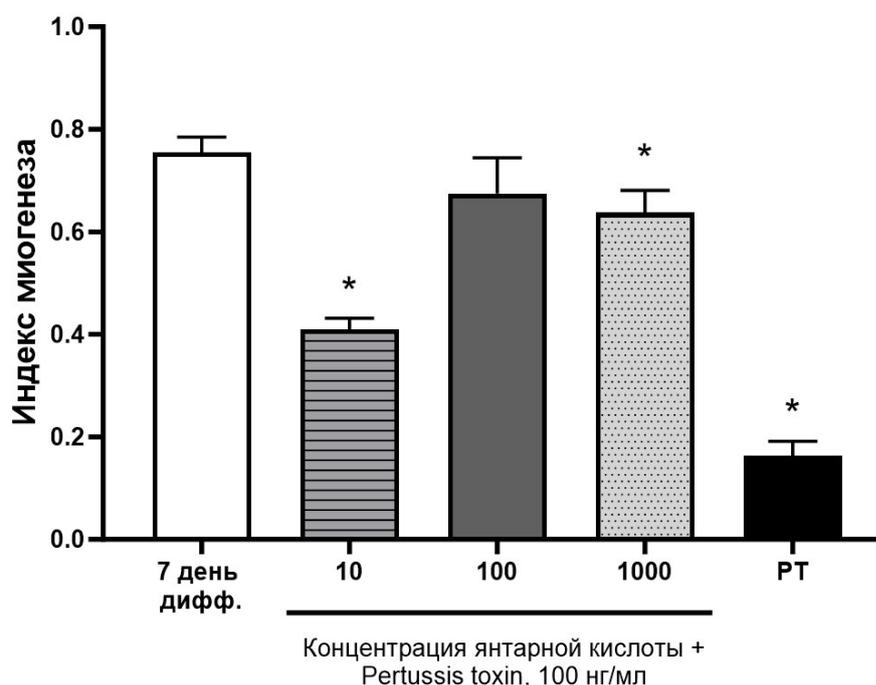


Рисунок 46 – Значение индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F = 130,5$; $p < 0,0001$

Самостоятельное действие РТ приводило к снижению длины и ширины клеток на 33,8% ($p = 0,0012$) и 27,2% ($p = 0,0340$) соответственно и снижению количества ядер в многоядерных структурах на 53,3% ($p < 0,0001$) относительно группы 7 дня дифференцировки.

Таблица 15 – Морфологические изменения в клетках C2C12 на 7 день дифференцировки и при совместном добавлении янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin, 100 нг/мл

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
7 день дифференцировки	185,24±68,75	21,39±4,98	7,60±1,82	8,20±1,48
Янтарная кислота 10 мкМ + РТ 100 нг/мл	146,66±48,58* *p=0,0385	18,81±6,36	12,40±1,52	6,60±1,47
Янтарная кислота 100 мкМ+ РТ 100 нг/мл	168,48±33,46	20,61±4,82	24,40±8,44* *p=0,0001	7,40±0,93
Янтарная кислота 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл	179,17±16,45	27,10±3,54	17,00±2,45* *p=0,0233	7,78±1,89
РТ 100 нг/мл	122,64±21,89* *p=0,0012	15,58±4,87* *p=0,0340	12,33±7,77	3,83±0,29* *p<0,0001

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,05$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F=5,825$, $p=0,0028$; ширина многоядерных структур $F=5,919$, $p=0,0026$; количество многоядерных структур $F=9,219$, $p=0,0002$; количество ядер в многоядерных структурах $F=12,96$, $p<0,0001$

Длина многоядерных структур при внесении янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ с РТ снижалась на 20,8% ($p=0,0385$) и 36,0% ($p=0,0432$) соответственно относительно клеток 7 дня дифференцировки и самостоятельного воздействия янтарной кислоты (10 мкМ). (Таблицы 8, 15).

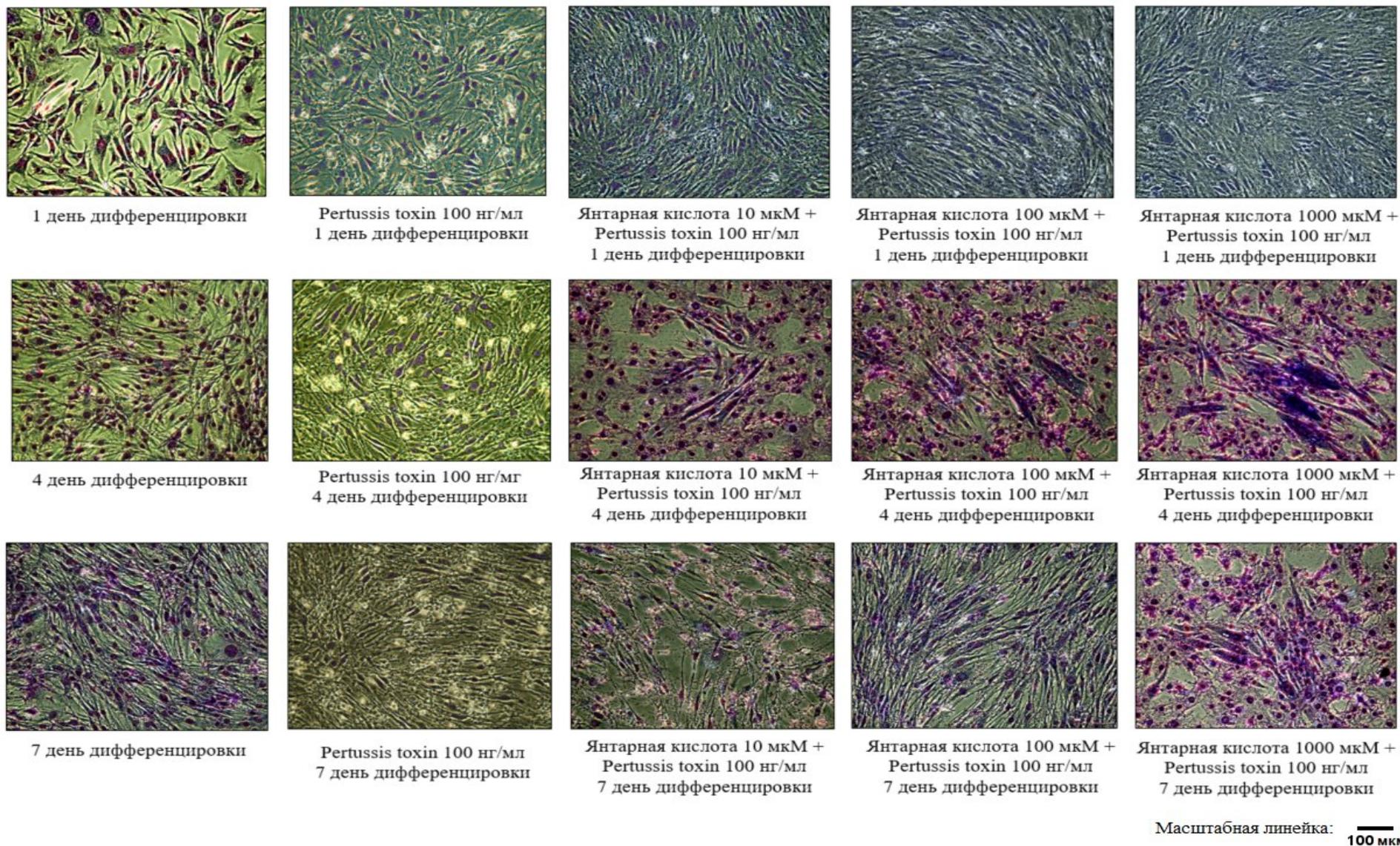


Рисунок 47 – Изолированное влияние Pertussis toxin, 100 нг/мл и при совместном воздействии с янтарной кислотой в концентрациях 10,100, 1000 мкМ на дифференцировку клеток линии C2C12
Примечание – Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$. Окраска ядер по Романовскому-Гимзе

Количество многоядерных структур увеличивалось при добавлении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 100, 1000 мкМ с РТ на 221,1% ($p=0,0001$) и 123,7% ($p=0,0233$) соответственно относительно группы 7 дня дифференцировки. Воздействие янтарной кислоты в концентрации 10 мкМ и РТ приводило к снижению количества многоядерных структур на 50,8% ($p=0,0035$) относительно самостоятельного действия янтарной кислоты 10 мкМ (Таблицы 8, 15).

На раннем этапе дифференцировки применение Pertussis toxin препятствовало изменению уровня MyoD под действием янтарной кислоты, данный показатель достоверно не отличался от значений клеток, культивируемых в дифференцировочной среде (без янтарной кислоты) (Рисунок 48).

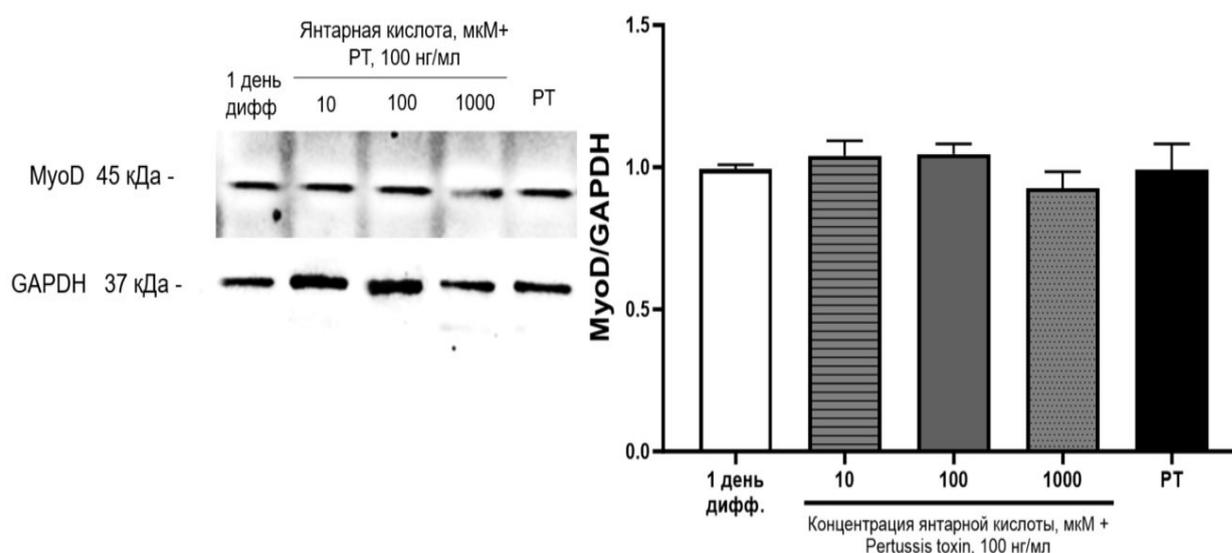


Рисунок 48 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 дня дифференцировки
Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=2,179$; $p=0,1449$

Относительное количество MyoD возрастало на 54,9% ($p<0,001$) при сочетанном применении янтарной кислоты 10 мкМ и Pertussis toxin по сравнению с группой сравнения – 4 день дифференцировки, но было ниже, чем самостоятельное действие янтарной кислоты в аналогичной концентрации (Рисунок 22). Самостоятельное действие Pertussis toxin приводило к снижению

количества MyoD на 26,5% ($p=0,0045$) относительно группы клеток 4 дня дифференцировки (Рисунок 49).

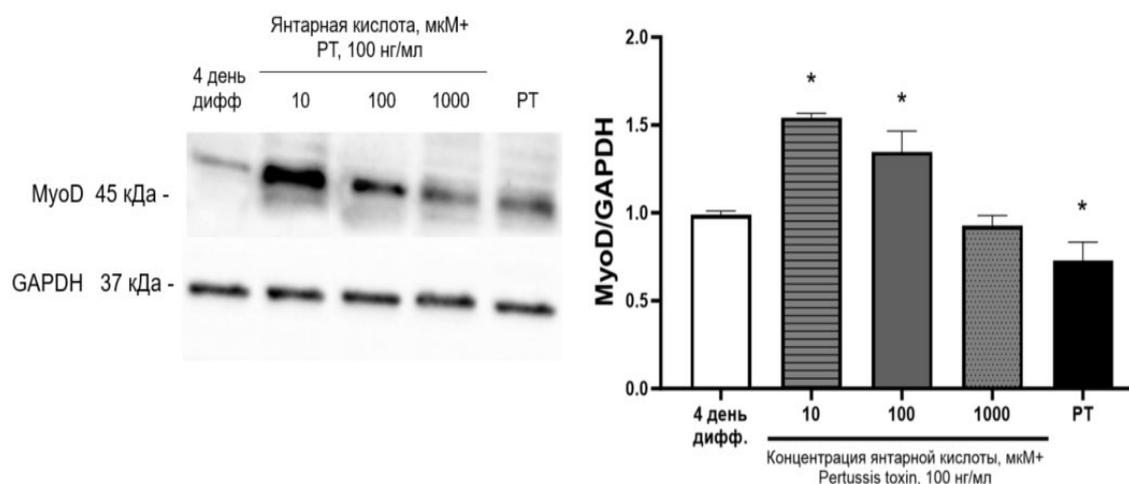


Рисунок 49 – Относительное количество MyoD в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дней дифференцировки, $p<0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=55,82$; $p<0,0001$

Относительное количество α -актина возросло при действии янтарной кислоты в концентрациях 10 и 100 мкМ при сочетанном применении с PT на 160,1% ($p=0,0002$) и 188,9% ($p<0,0001$) соответственно относительно группы сравнения 4 дня дифференцировки (Рисунок 50).

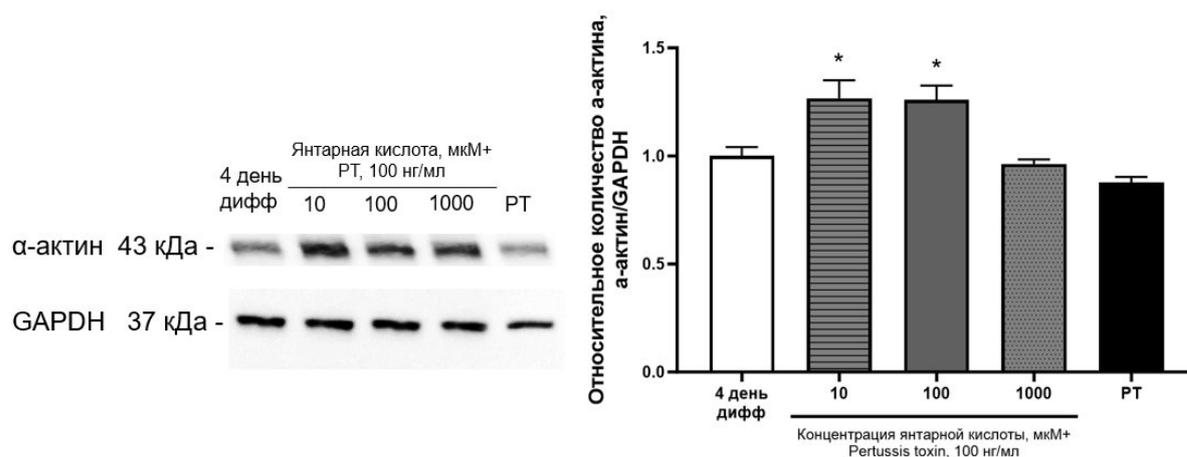


Рисунок 50 – Относительное количество α -актина в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дней дифференцировки, $p<0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=34,51$; $p<0,0001$

При этом уровень α -актина при совместном добавлении янтарной кислоты (10, 100 мкМ) и РТ снижался на 74,8% и 63,2% соответственно по сравнению с самостоятельным действием янтарной кислоты в концентрациях 10 и 100 мкМ ($p < 0,0001$) (Рисунок 23).

На 7 день дифференцировки Pertussis toxin нивелировал все изменения, вызванные добавлением янтарной кислоты в питательную среду: относительное количество MyoG и MYH достоверно не отличалось от значений клеток на 7 день дифференцировки без добавления янтарной кислоты (Рисунки 51, 52).

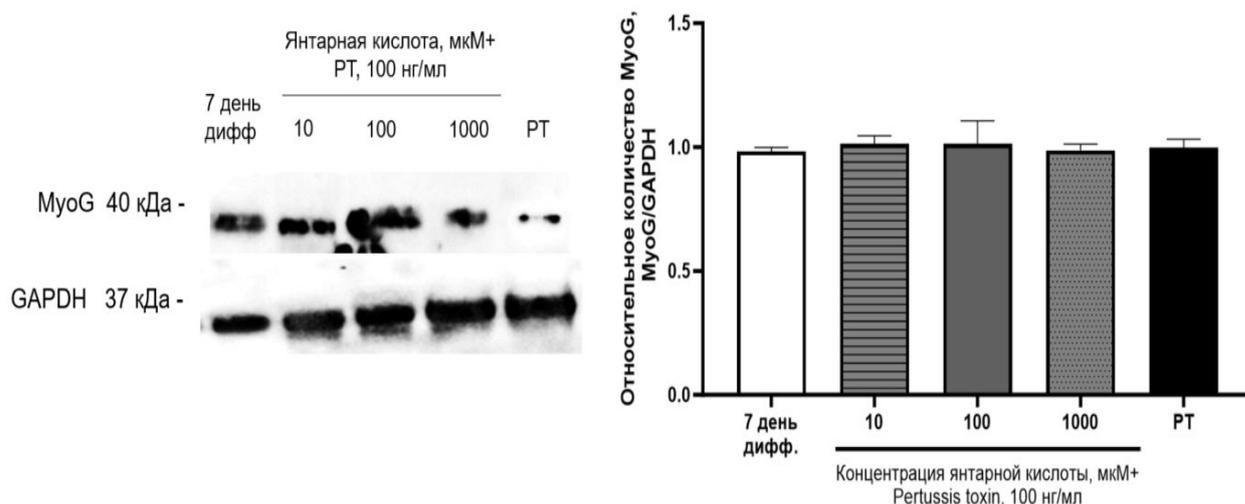


Рисунок 51 – Относительное количество MyoG в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=0,2592$; $p=0,8975$

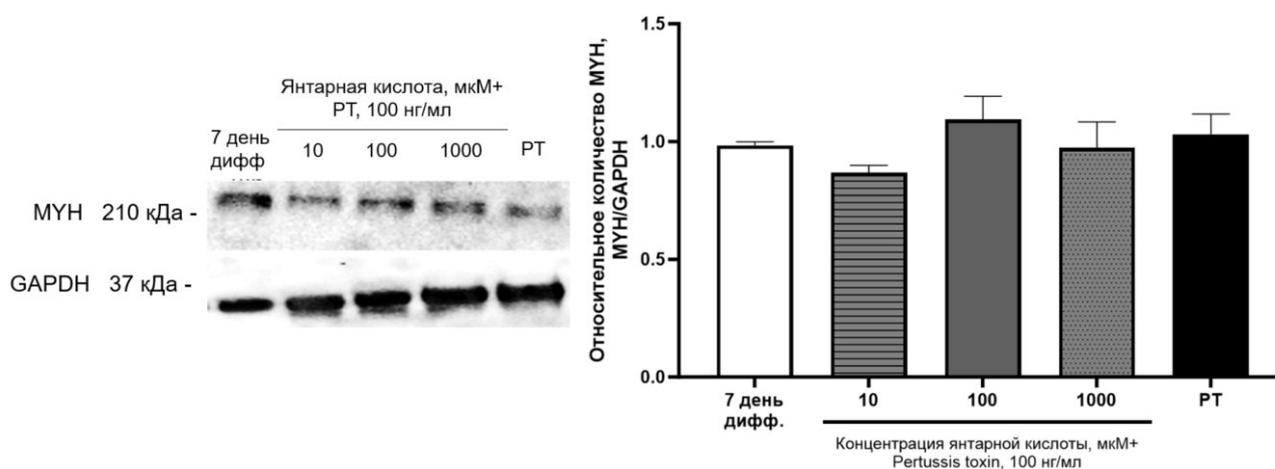


Рисунок 52 – Относительное количество MYH в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=3,404$; $p=0,0528$

На раннем этапе дифференцировки применение коклюшного токсина препятствовало изменению уровня сукцинатных рецепторов под действием янтарной кислоты, данные показатели достоверно не отличались от значений клеток, культивируемых в дифференцировочной среде (без янтарной кислоты) (Рисунок 53).

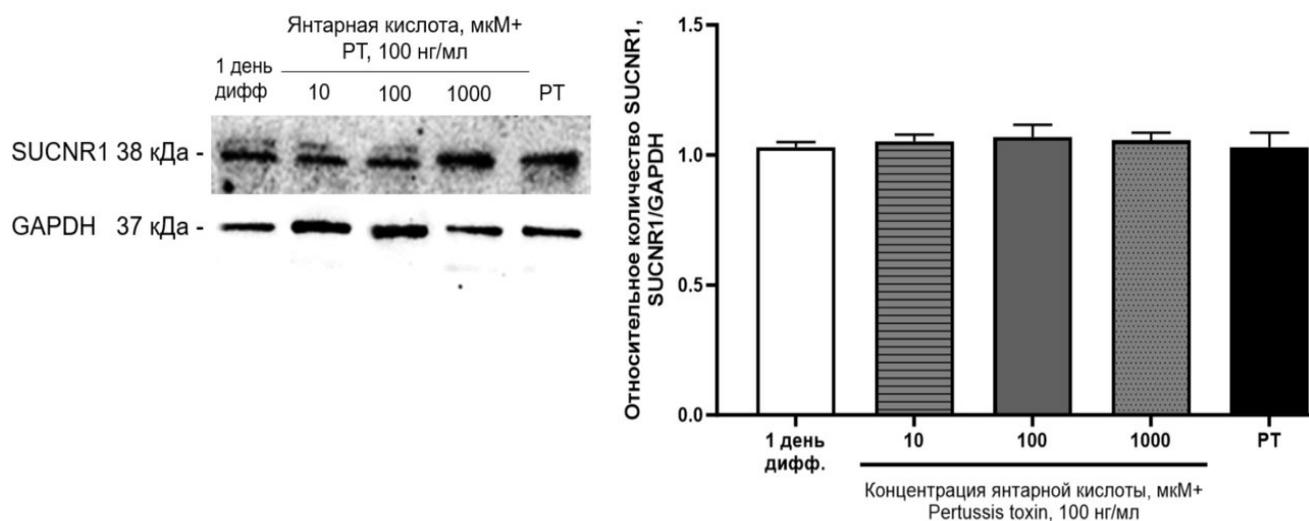


Рисунок 53 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 дня дифференцировки
Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=0,6557$; $p=0,6363$

На 4 день дифференцировки уровень SUCNR1 снижался на 17,0% ($p=0,0374$) и 20,0% ($p=0,0191$) соответственно при воздействии PT с янтарной кислотой в концентрациях 10 и 100 мкМ относительно применения дифференцировочной среды без янтарной кислоты, а в концентрации 1000 мкМ достоверно не изменялся (Рисунок 54).

Уровень SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в присутствии коклюшного токсина на позднем этапе дифференцировки статистически значимо не отличался от показателей клеток, культивируемых в дифференцировочной среде (без янтарной кислоты) (Рисунок 55).

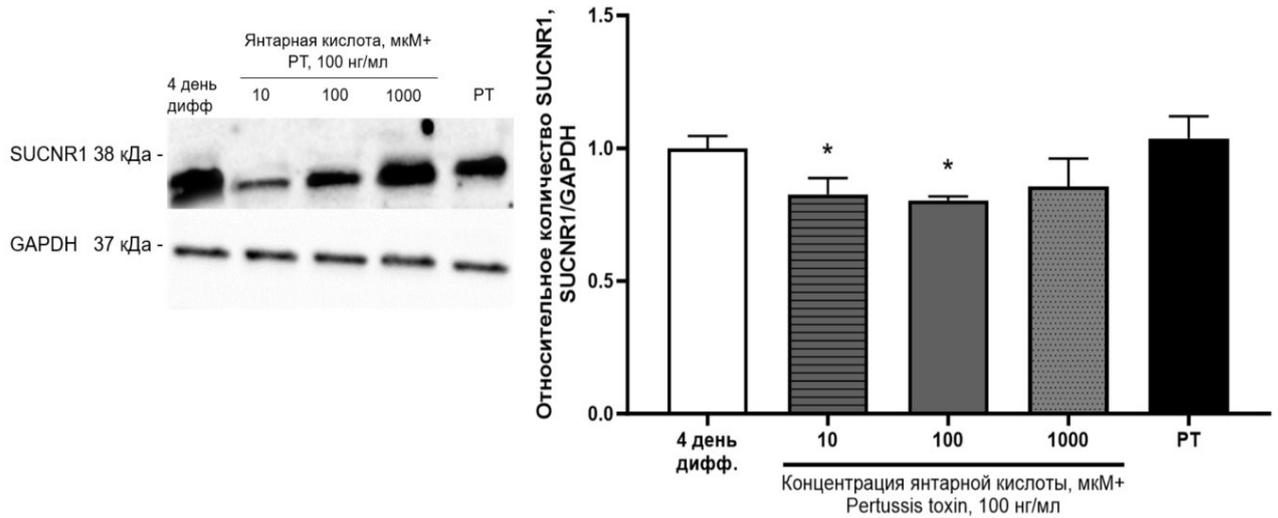


Рисунок 54 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дней дифференцировки, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=7,077$; $p=0,0057$

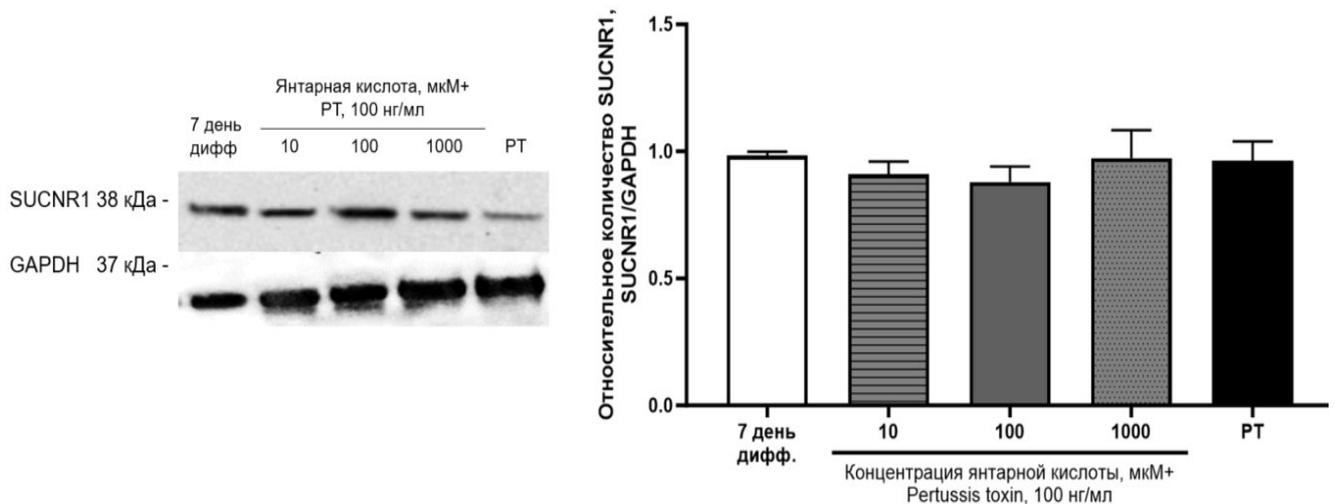


Рисунок 55 – Относительное количество SUCNR1 в клетках линии C2C12 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание - Результат дисперсионного анализа $F=1,237$; $p=0,3559$

Таким образом, Pertussis toxin – ингибитор SUCNR1-Gαi сигнального пути, в концентрации 100 нг/мл не оказывал самостоятельного влияния на индекс миогенеза на раннем этапе дифференцировки, уменьшал индекс миогенеза на 4 и 7 дни дифференцировки. PT снижал относительное количество MyoD, MyoG и MYH.

Совместное воздействие янтарной кислоты с РТ приводило к повышению индекса миогенеза во все дни дифференцировки, но эти изменения были ниже по сравнению с самостоятельным действием янтарной кислоты. На среднем этапе действие янтарной кислоты с РТ стимулировали повышение относительного количества MyoD, но по сравнению с самостоятельным действием тестируемого вещества уровень MyoD был ниже. Аналогичным образом относительное количество α -актина возрастало при сочетанном действии янтарной кислоты (10, 100 мкМ) с РТ, но уровень белка был ниже по сравнению с самостоятельным действием вещества.

На 7 день дифференцировки РТ подавлял индуцирующее действие янтарной кислоты на MyoG и MYH. Совместное внесение янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ в питательную среду не изменяет уровень SUCNR1 на раннем и позднем этапах миогенеза. На среднем этапе снижается относительное количество SUCNR1 при совместном воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 мкМ с РТ.

3.4.3. Оценка изменения морфологии клеток линии C2C12, индекса миогенеза и показателей миогенеза при самостоятельном действии Pertussis toxin и в сочетании с ЭМГПС

При совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ наблюдалось увеличение индекса миогенеза на 326,7%, 313,3%, 420,0% соответственно относительно клеток 1 дня дифференцировки ($p < 0,0001$). Pertussis toxin подавлял индуцирующее действие ЭМГПС на миогенную дифференцировку клеток линии C2C12 (Рисунки 56, 59).

В частности, по сравнению с изолированным применением ЭМГПС добавление токсина совместно с ЭМГПС приводило к снижению индекса миогенеза на 1 день дифференцировки в концентрации ЭМГПС 100 мкМ на 20,5% ($p < 0,0001$) (Рисунок 31).

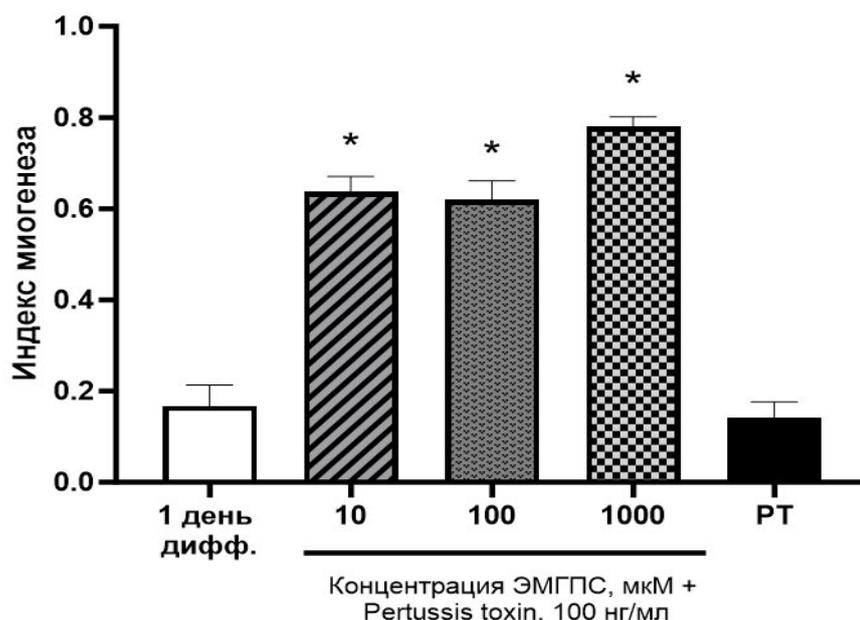


Рисунок 56 – Значение индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=229,4$; $p < 0,0001$

При самостоятельном действии РТ увеличивалась ширина многоядерных структур на 77,4% ($p=0,0122$) относительно 1 дня дифференцировки. Совместное внесение ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ увеличивало относительное количество многоядерных структур на 529,5%, 275,0%, 337,5% соответственно по сравнению с клетками раннего этапа миогенеза ($p < 0,0001$) (Таблица 16).

Количество ядер в многоядерных структурах при внесении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ в питательную среду увеличивалось на 139,5% ($p=0,0003$), 113,5% ($p=0,0026$), 289,0% ($p < 0,0001$) соответственно относительно группы клеток 1 дня дифференцировки. При совместном внесении ЭМГПС в концентрации 100 мкМ и РТ в питательную среду количество ядер в многоядерных структурах снижалось на 53,6% ($p < 0,0001$) относительно самостоятельного действия ЭМГПС (100 мкМ) (Таблицы 10, 16).

Таблица 16 – Морфологические изменения в клетках линии С2С12 на 1 день дифференцировки и при совместном добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
1 день дифференцировки	122,52± 54,64	15,35±6,79	5,60±1,14	2,00±0,82
ЭМГПС 10 мкМ + РТ 100 нг/мл	80,69±19,02	20,27±7,13	35,25±2,22* *p<0,0001	4,79±0,73* *p=0,0003
ЭМГПС 100 мкМ + РТ 100 нг/мл	121,63±55,23	16,85±3,63	21,00±4,69* *p<0,0001	4,27±0,52* *p=0,0026
ЭМГПС 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл	106,05±34,46	16,84±4,09	24,50±4,04* *p<0,0001	7,78±0,81* *p<0,0001
РТ 100 нг/мл	98,83±20,67	27,23±11,94* *p=0,0122	7,40±2,88	2,77±0,38
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 1 дня дифференцировки, p<0,01. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур F=1,834, p=0,1619; ширина многоядерных структур F=3,755, p=0,0195; количество многоядерных структур F=58,09, p<0,0001; количество ядер в многоядерных структурах F=50,32, p<0,0001				

На 4 день при воздействии коклюшного токсина и ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ индекс слияния клеток возрастал на 54,5% (p=0,0016), 59,1% (p=0,0006) и 70,5% (p=0,0001) соответственно по сравнению с 4 днем дифференцировки (Рисунок 57, 59). Изменения не зависели от концентрации ЭМГПС, но были статистически ниже по сравнению с изолированным влиянием ЭМГПС (Рисунок 32). Самостоятельное действие РТ способствовало снижению индекса миогенеза на 63,6% (p<0,0001) относительно 4 дня дифференцировки (Рисунки 57, 59).

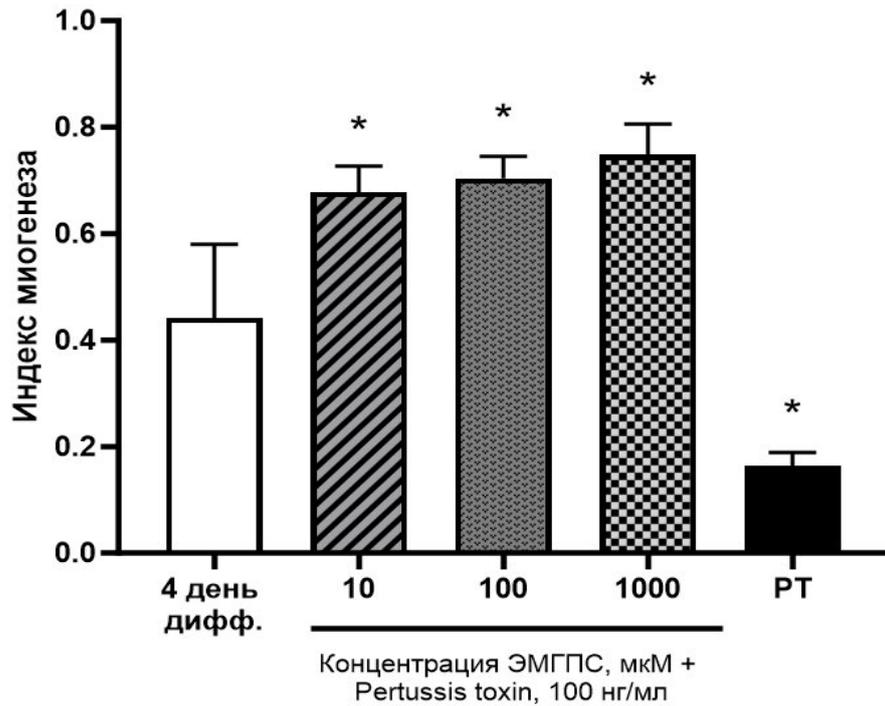


Рисунок 57 – Значение индекса миогенеза в клетках линии C2C12 при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, $p < 0,05$. Результат дисперсионного анализа $F=54,56$; $p < 0,0001$

Длина многоядерных структур при совместном внесении PT и ЭМГПС в концентрациях 100, 1000 мкМ повышалась на 43,2% ($p=0,0295$) и 60,7% ($p=0,0077$) относительно клеток, культивируемых 4 дня на дифференцировочной среде.

При внесении ЭМГПС 10, 100 мкМ с PT увеличивалась ширина многоядерных структур на 94,5% ($p=0,0121$), 90,3% ($p=0,0317$) относительно клеток 4 дня дифференцировки (Таблица 17).

Количество многоядерных структур повышалось при добавлении ЭМГПС 10, 100, 1000 мкМ с PT на 114,2% ($p=0,0020$), 79,6% ($p=0,0398$), 138,8% ($p=0,0002$) относительно клеток среднего этапа миогенеза.

Также увеличивалось количество ядер в многоядерных структурах при действии ЭМГПС 10, 100, 1000 мкМ с PT на 125,9% ($p=0,0064$), 102,6% ($p=0,0316$), 123,2% ($p=0,0076$) относительно клеток 4 дня дифференцировки (Таблица 17).

Таблица 17 – Морфологические изменения в клетках линии С2С12 на 4 день дифференцировки и при совместном добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл

	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
4 день дифференцировки	128,11±58,02	16,01±5,61	9,80±2,17	3,40±0,89
ЭМГПС 10 мкМ + РТ 100 нг/мл	139,43±32,45	31,14±13,76* *p=0,0121	21,00±6,78* *p=0,0020	7,68±2,08* *p=0,0064
ЭМГПС 100 мкМ+ РТ 100 нг/мл	183,44±37,47* *p=0,0295	30,57±10,12* *p=0,0317	17,60±4,04* *p=0,0398	6,89±1,75* *p=0,0316
ЭМГПС 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл	205,88±39,46* *p=0,0077	16,84±4,09	23,40±2,88* *p=0,0002	7,59±2,40* *p=0,0076
РТ 100 нг/мл	97,49±29,13	20,29±6,91	9,67±2,52	2,94±0,42
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки, p<0,05. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур F=8,588, p=0,0003; ширина многоядерных структур F=4,515, p=0,0092; количество многоядерных структур F=12,55, p<0,0001; количество ядер в многоядерных структурах F=10,10, p=0,0001				

На позднем этапе при действии ЭМГПС (10 и 1000 мкМ) и коклюшного токсина индекс миогенеза снижался на 14,3% (p=0,04) и 11,7% (p=0,008) относительно 7 дня дифференцировки (Рисунки 58, 59).

Также индекс миогенеза снижался при совместном действии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и РТ на 25% (p<0,0001), 14,9% (p<0,0001), 20,9% (p<0,0001) относительно ЭМГПС (10, 100, 1000 мкМ) на 7 день дифференцировки (Рисунок 33).

Самостоятельное действие РТ способствовало снижению индекса миогенеза на 70,1% (p<0,0001) относительно 7 дня дифференцировки (Рисунки 58, 59).

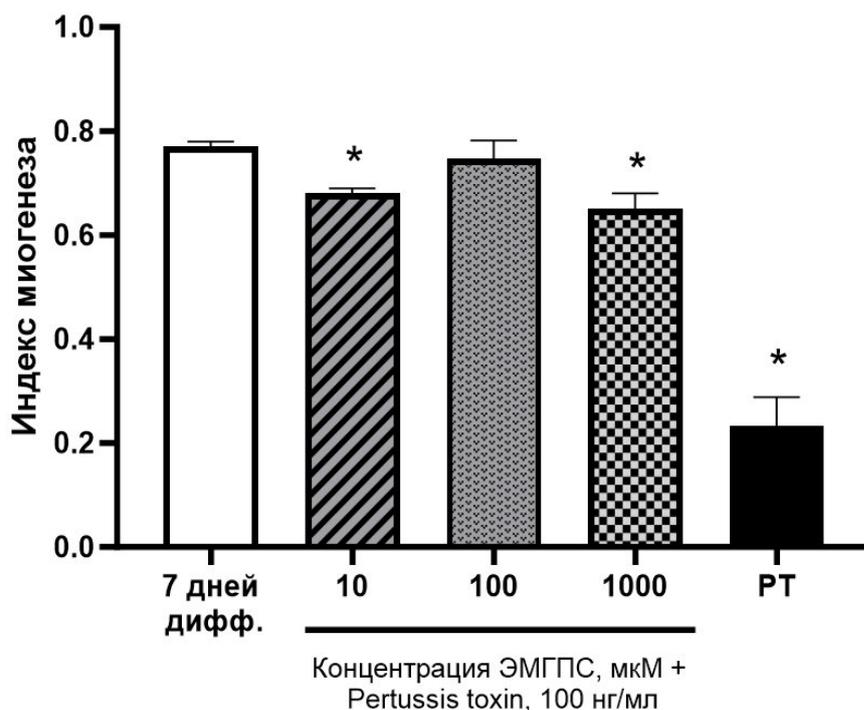


Рисунок 58 – Индекс миогенеза в клетках линии C2C12 при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=134,5$; $p < 0,0001$

Длина многоядерных структур при совместном действии PT и ЭМГПС (10 мкМ) снижалась на 32,9% ($p=0,0028$) относительно клеток, культивируемых 7 дней на дифференцировочной среде. Внесение ЭМГПС в концентрациях 10, 100 мкМ и PT в питательную среду приводило к снижению длины многоядерных структур на 50,6% ($p=0,0006$) и 41,6% ($p=0,0001$) соответственно относительно самостоятельного воздействия ЭМГПС (10,100 мкМ). При совместном внесении ЭМГПС в концентрации 1000 мкМ и PT ширина многоядерных структур увеличивалась на 41,5% ($p=0,0361$) относительно ЭМГПС (100 мкМ) с PT. Ширина многоядерных структур при воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100 мкМ с PT снижалась на 60,9% ($p=0,0002$) и 62,7% ($p < 0,0001$) соответственно относительно самостоятельного действия ЭМГПС (10, 100 мкМ) (Таблицы 12, 18).

Количество многоядерных структур увеличивалось при внесении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с PT на 355,2% ($p < 0,0001$), 289,5% ($p < 0,0001$),

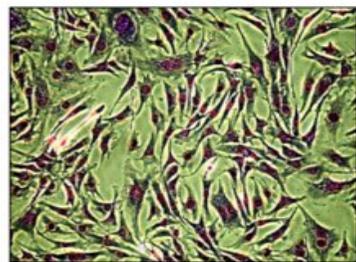
137,1% ($p=0,0186$) относительно клеток позднего этапа миогенеза, но было ниже по сравнению с самостоятельным действием ЭМГПС (Таблица 18).

Таблица 18 – Морфологические изменения в клетках линии C2C12 на 7 день дифференцировки и при совместном добавлении ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл

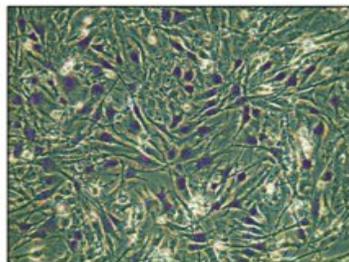
	Длина многоядерных структур, мкм	Ширина многоядерных структур, мкм	Количество многоядерных структур в п.з.	Количество ядер в многоядерных структурах
7 день дифференцировки	185,24±68,75	21,39±4,98	7,60±1,82	8,20±1,48
ЭМГПС 10 мкМ + РТ 100 нг/мл	124,22±36,24* * $p=0,0028$	20,37±4,06	34,60±6,84* * $p<0,0001$	7,71±0,80
ЭМГПС 100 мкМ+ РТ 100 нг/мл	160,60±41,23	17,89±5,86	29,60±4,51* * $p<0,0001$	6,95±0,78
ЭМГПС 1000 мкМ + РТ 100 нг/мл	176,17±16,41	25,32±3,28	18,02±2,32* * $p=0,0186$	7,68±1,03
РТ 100 нг/мл	122,64±21,89* * $p=0,0005$	15,58±4,87* * $p=0,0434$	12,33±7,77	3,83±0,29* * $p<0,0001$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p<0,01$. Результаты дисперсионного анализа: длина многоядерных структур $F=7,976$, $p=0,0005$; ширина многоядерных структур $F=5,737$, $p=0,0030$; количество многоядерных структур $F=31,30$, $p<0,0001$; количество ядер в многоядерных структурах $F=20,06$, $p<0,0001$

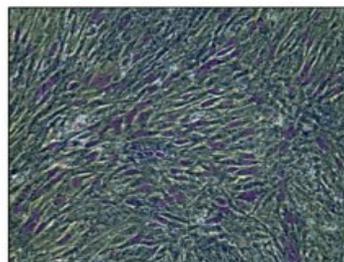
Таким образом, на раннем и среднем этапах миогенеза воздействие ЭМГПС (10, 100, 1000 мкМ) с РТ приводило к повышению индекса миогенеза на 1, 4, 7 дни дифференцировки, но эти изменения были ниже по сравнению с самостоятельным действием препарата. На позднем этапе ЭМГПС в концентрациях 10 и 1000 мкМ с РТ стимулировал снижение индекса миогенеза относительно клеток 7 дня дифференцировки и самостоятельного действия ЭМГПС.



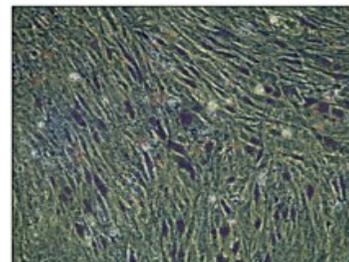
1 день дифференцировки



Pertussis toxin 100 нг/мл
1 день дифференцировки



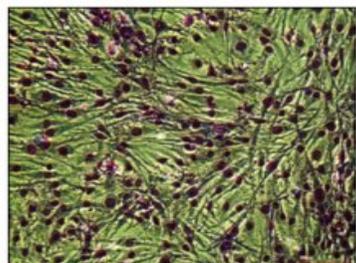
ЭМГПС 10 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
1 день дифференцировки



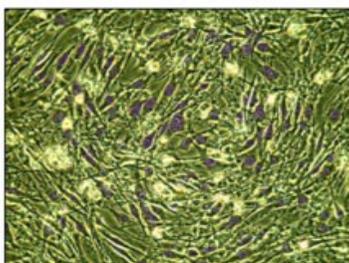
ЭМГПС 100 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
1 день дифференцировки



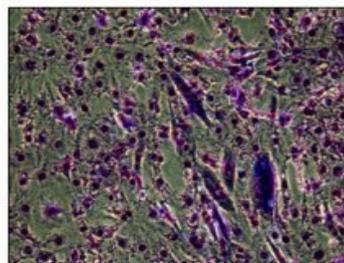
ЭМГПС 1000 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
1 день дифференцировки



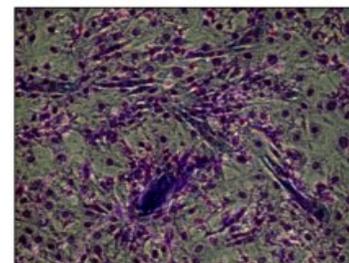
4 день дифференцировки



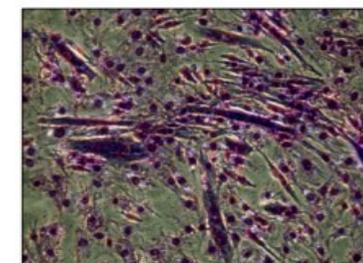
Pertussis toxin 100 нг/мл
4 день дифференцировки



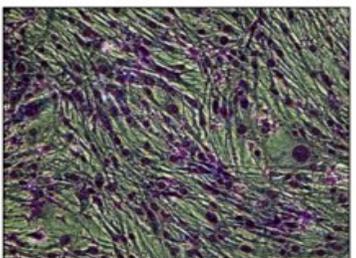
ЭМГПС 10 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
4 день дифференцировки



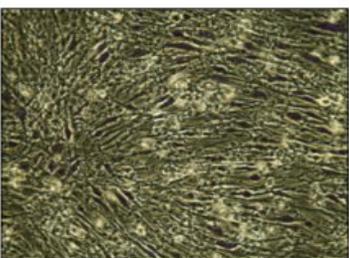
ЭМГПС 100 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
4 день дифференцировки



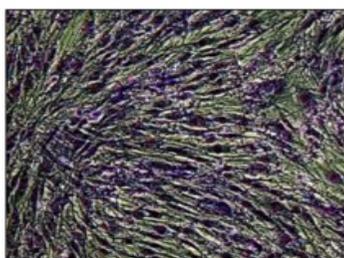
ЭМГПС 1000 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
4 день дифференцировки



7 день дифференцировки



Pertussis toxin 100 нг/мл
7 день дифференцировки



ЭМГПС 10 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
7 день дифференцировки



ЭМГПС 100 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
7 день дифференцировки



ЭМГПС 1000 мкМ +
Pertussis toxin 100 нг/мл
7 день дифференцировки

Масштабная линейка:  100 мкм

Рисунок 59 – Изолированное влияние Pertussis toxin 100 нг/мл и при совместном действии с ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на дифференцировку клеток линии C2C12
Примечание – Фазово-контрастная микроскопия, увеличение ×200. Окраска ядер по Романовскому-Гимзе

На 1 день дифференцировки индуцирующее действие ЭМГПС на MyoD подавлялось Pertussis toxin (Рисунок 60).

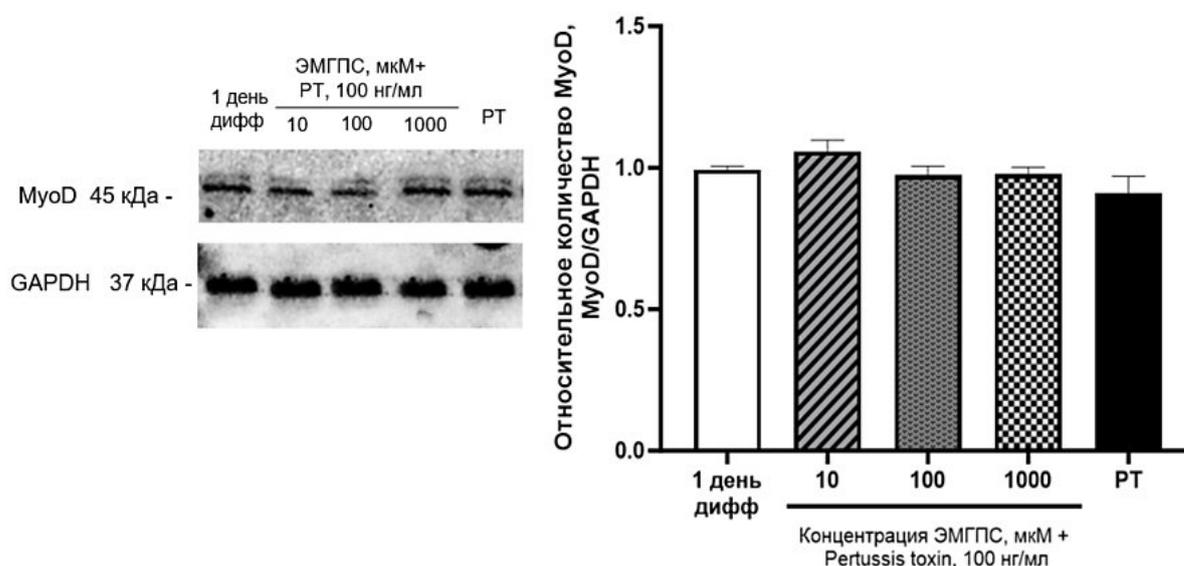


Рисунок 60 – Относительное количество MyoD при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=5,860$; $p=0,0108$

При сочетанном применении Pertussis toxin (100 нг/мл) и ЭМГПС в концентрации 10 мкМ относительное количество MyoD повышалось на 24,5% ($p=0,0006$) относительно значений на 4 день дифференцировки, и снижалось на 15,9% ($p=0,001$) по сравнению с уровнем MyoD при самостоятельном действии ЭМГПС (10 мкМ). Аналогичная тенденция отмечалась и при использовании ЭМГПС в концентрации 100 мкМ: относительное количество MyoD повышалось на 19,1% ($p=0,05$) относительно 4 дня дифференцировки и снижалось на 10,2% ($p=0,004$) относительно самостоятельного действия ЭМГПС в концентрации 100 мкМ. При воздействии Pertussis toxin и ЭМГПС в концентрации 1000 мкМ относительное количество MyoD не изменялось относительно значений 4 дня дифференцировки и было ниже на 26,8% ($p=0,01$) по сравнению с самостоятельным действием ЭМГПС (Рисунки 36, 61).

При самостоятельном действии PT уровень MyoD снижался на 23,2% ($p=0,0206$) относительно клеток 4 день дифференцировки (Рисунок 61).

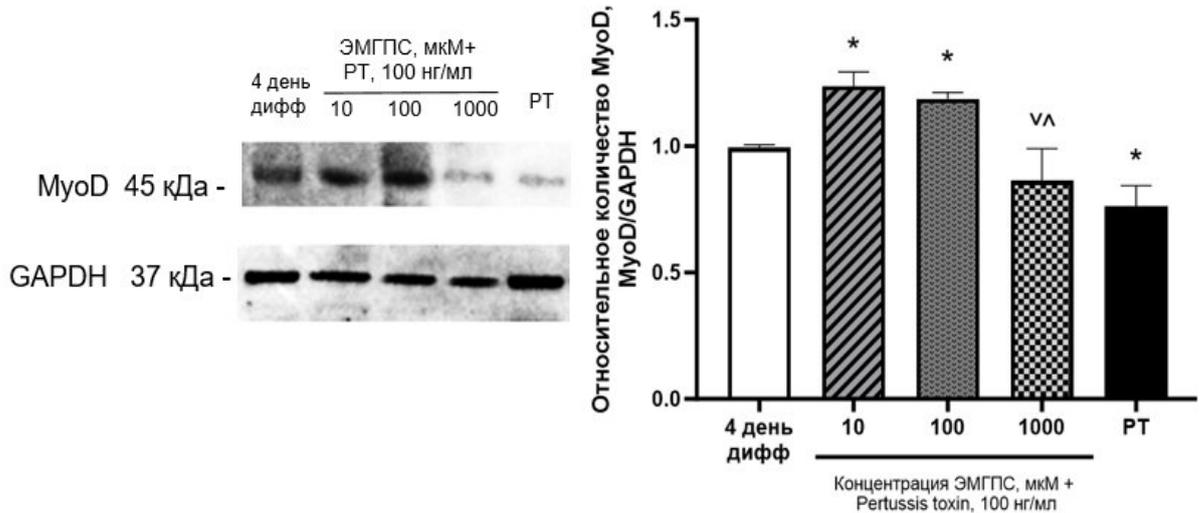


Рисунок 61 – Относительное количество MyoD при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дней дифференцировки, $p \leq 0,05$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ+Pertussis toxin, 100 нг/мл, $p < 0,001$; v – статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 100 мкМ+Pertussis toxin, 100 нг/мл, $p < 0,001$. Результат дисперсионного анализа $F=23,32$; $p < 0,0001$

Относительное количество α -актина на 4 день дифференцировки при совместном воздействии ЭМГПС 10 мкМ и РТ возросло на 23,4% ($p=0,0027$), по сравнению с клетками среднего этапа дифференцировки. Относительное количество α -актина при совместном действии ЭМГПС 10 мкМ и РТ было выше на 20,9% ($p=0,005$) и 19,4% ($p=0,0078$) относительно добавления ЭМГПС 100, 1000 мкМ и РТ (Рисунок 62). Относительно самостоятельного действия ЭМГПС уровень α -актина снижался на 16,3% ($p=0,0260$) при совместном внесении ЭМГПС 10 мкМ и РТ (Рисунки 37, 62).

На 7 день дифференцировки действие Pertussis toxin нивелировало индуцирующее воздействие ЭМГПС на дифференцировку клеток С2С12: относительное количество MyoG и MyH статистически значимо не отличалось от клеток 7 дня дифференцировки (Рисунки 63, 64). При самостоятельном действии РТ уровень MyoG снижался на 17,2% ($p=0,0067$) по сравнению с клетками 7 дня дифференцировки (Рисунок 63). Относительное количество MyH при самостоятельном действии РТ снижалось на 27,3% ($p=0,0001$) по сравнению с клетками 7 дня дифференцировки (Рисунок 64).

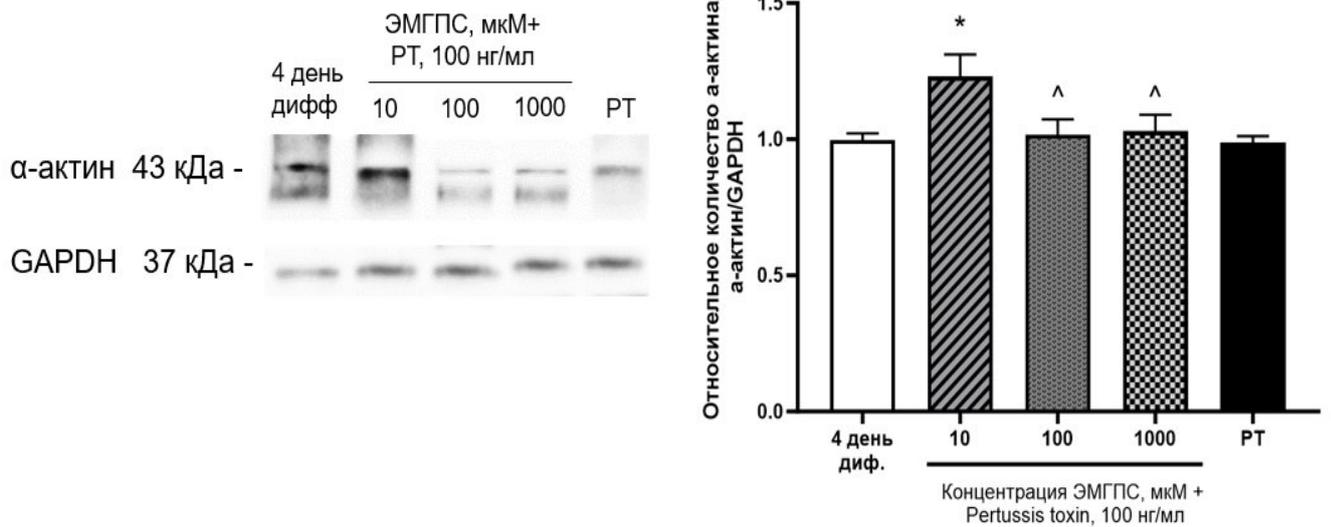


Рисунок 62 – Относительное количество α -актина при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 4 дней дифференцировки, $p < 0,01$; ^ - статистически значимые различия по сравнению с группой ЭМГПС 10 мкМ + Pertussis toxin, 100 нг/мл, $p < 0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=10,32$; $p=0,0014$

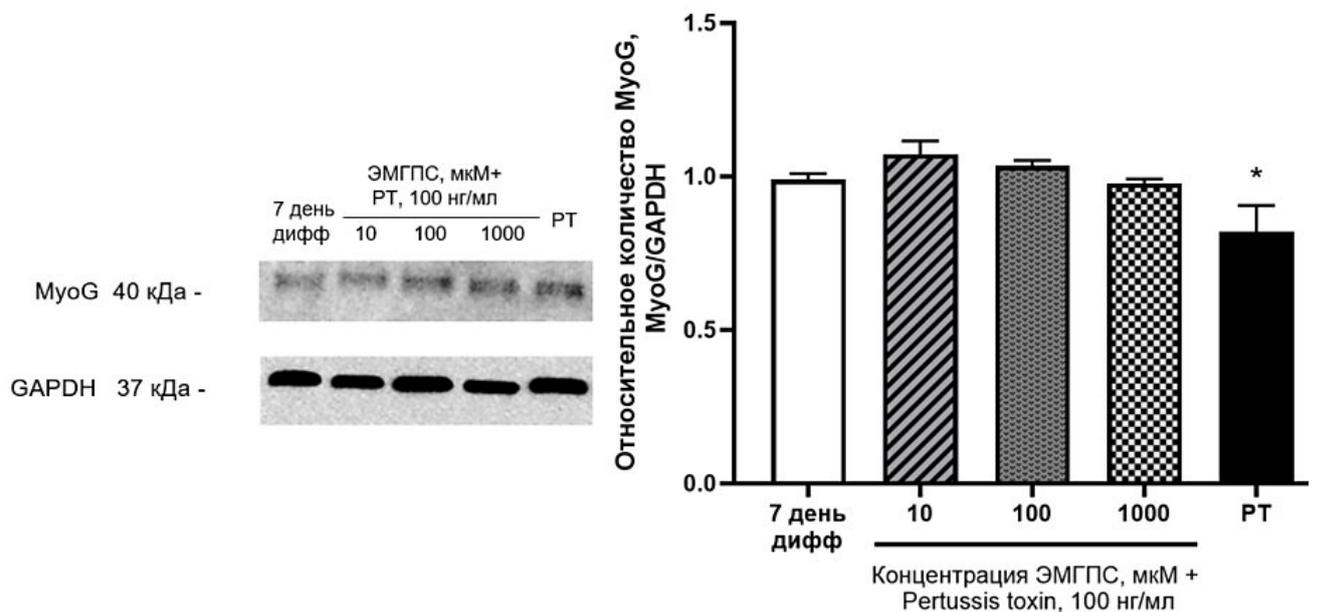


Рисунок 63 – Относительное количество MyoG при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p < 0,01$. Результат дисперсионного анализа $F=13,69$; $p=0,0005$

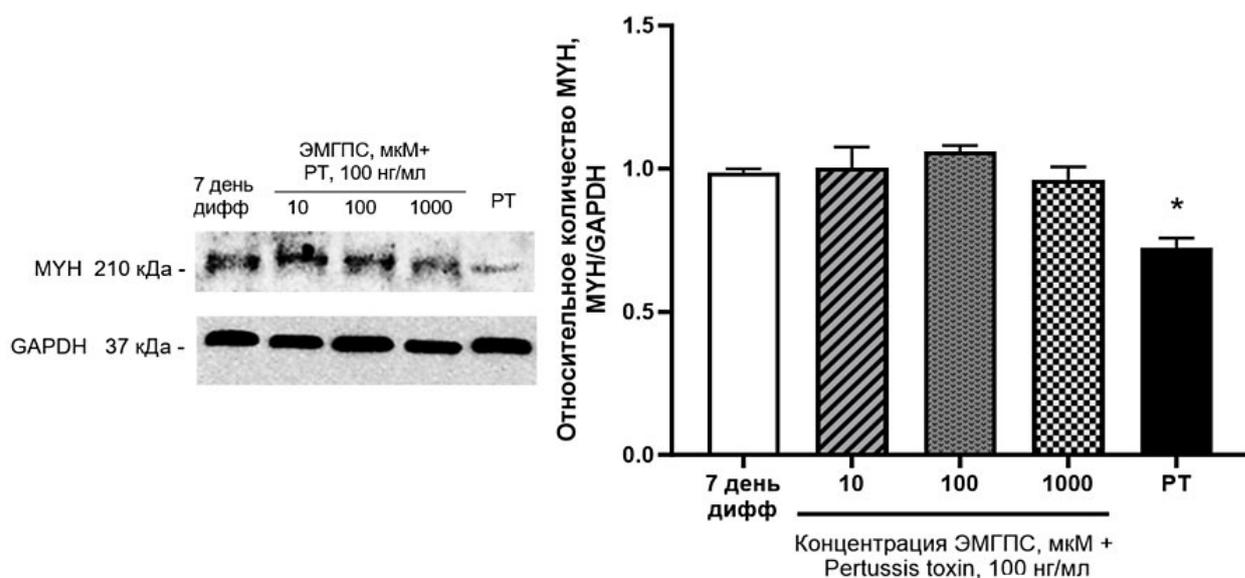


Рисунок 64 – Относительное количество МУН при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – * - статистически значимые различия по сравнению с группой клеток 7 дней дифференцировки, $p \leq 0,0001$. Результат дисперсионного анализа $F=28,60$; $p < 0,0001$

На раннем этапе дифференцировки индуцирующее действие ЭМГПС на SUCNR1 подавлялось РТ (Рисунок 65).

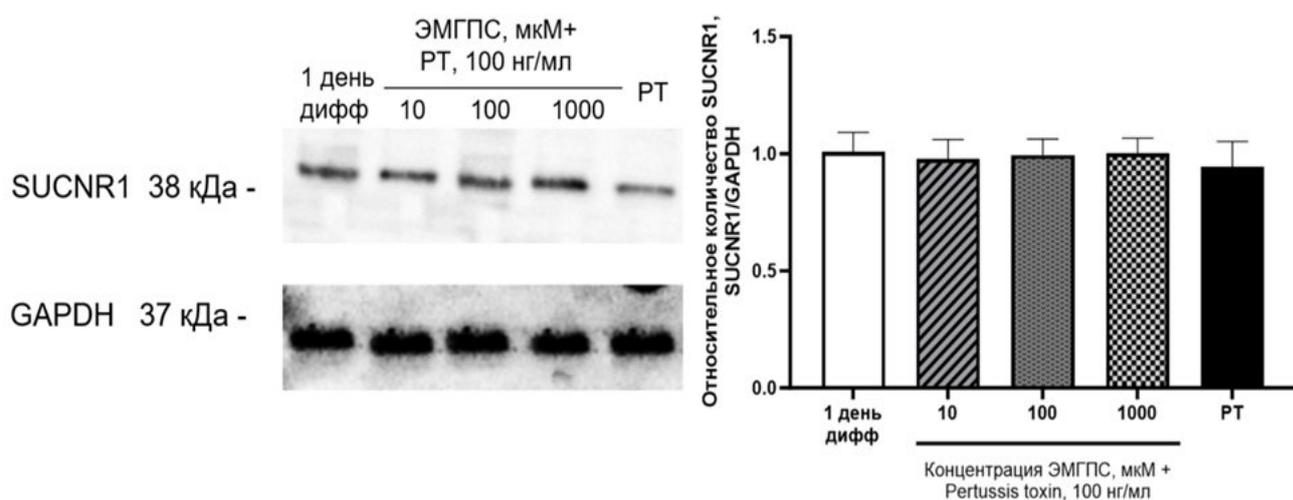


Рисунок 65 – Относительное количество SUCNR1 при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 1 дня дифференцировки

Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=0,2743$; $p=0,8880$

Сочетанное применение Pertussis toxin и ЭМГПС в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ приводило к нормализации уровня SUCNR1 в клетках C2C12 на среднем и позднем этапе миогенеза (Рисунки 66, 67).

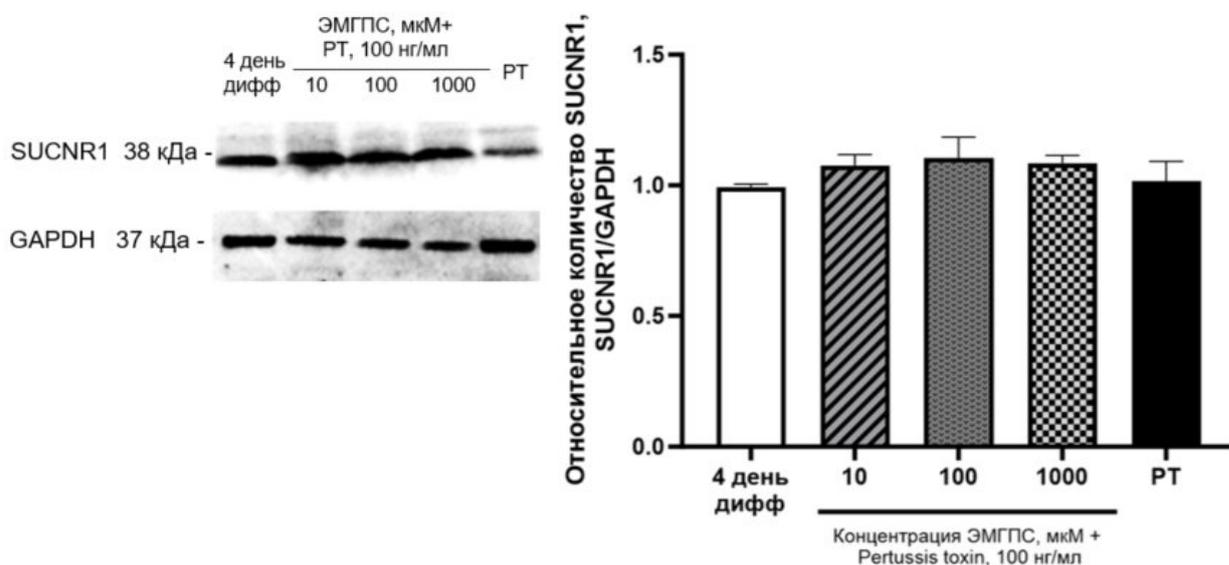


Рисунок 66 – Относительное количество SUCNR1 при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 4 дней дифференцировки

Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=2,255$; $p=0,1354$

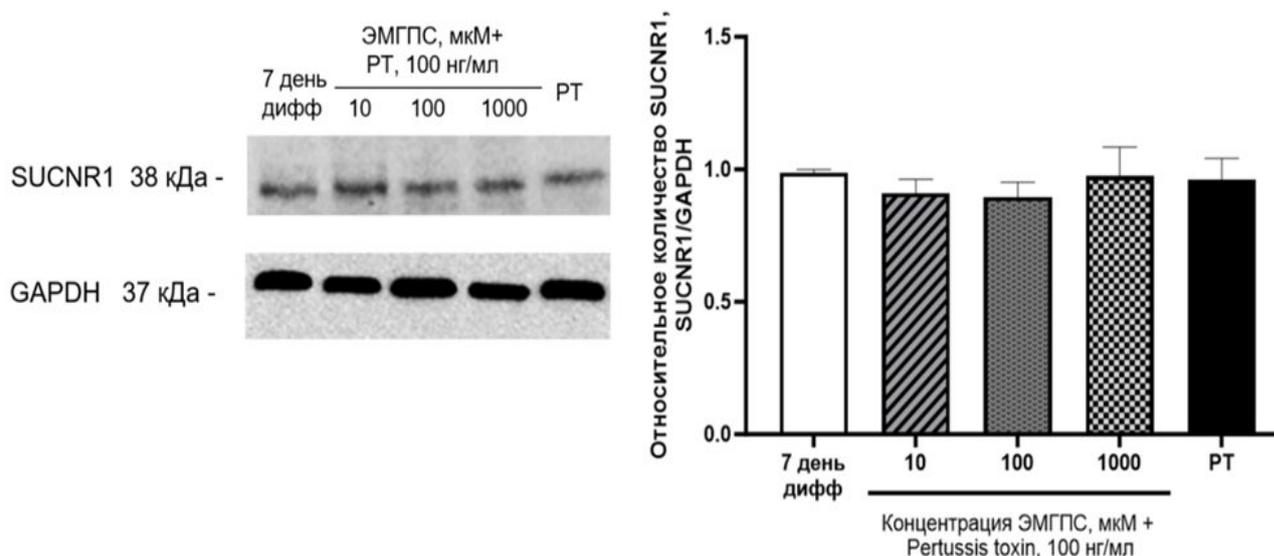


Рисунок 67 – Относительное количество SUCNR1 при совместном воздействии ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ и Pertussis toxin 100 нг/мл в течение 7 дней дифференцировки

Примечание – Результат дисперсионного анализа $F=1,043$; $p=0,4323$

Таким образом, на раннем и среднем этапах миогенеза внесение ЭМГПС (10, 100, 1000 мкМ) с РТ в питательную среду стимулировало увеличение количества многоядерных структур и ядер в них относительно клеток, культивируемых на дифференцировочной питательной среде. На среднем этапе миогенеза к увеличению размеров мышечных клеток (длины и ширины) относительно клеток 4 дня дифференцировки приводило добавление ЭМГПС в концентрации 100 мкМ совместно с РТ. Внесение ЭМГПС (10 мкМ) с РТ на 4 день дифференцировки вызывало увеличение ширины многоядерных структур, а при воздействии ЭМГПС (1000 мкМ) совместно с РТ наблюдалось возрастание длины мышечных клеток.

На раннем этапе совместное внесение ЭМГПС в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ с РТ препятствовало изменению уровня MyoD. На среднем этапе действие ЭМГПС 10, 100 мкМ с РТ стимулировало повышение относительного количества MyoD, но по сравнению с самостоятельным действием препарата уровень MyoD был ниже.

Аналогичным образом относительное количество α -актина возрастало при сочетанном действии ЭМГПС 10 мкМ с РТ, но уровень белка был ниже по сравнению с самостоятельным действием препарата. На 7 день дифференцировки РТ подавлял индуцирующее действие ЭМГПС на MyoG и MYH.

Совместное воздействие ЭМГПС 10, 100, 1000 мкМ с РТ не изменяет уровень SUCNR1 на раннем, среднем и позднем этапах миогенеза относительно клеток, культивируемых в дифференцировочной среде.

3.5. Влияние янтарной кислоты на концентрацию эндогенного сукцината в клетках C2C12 на этапах миогенной дифференцировки

При изучении концентрации сукцината в клетках C2C12 в процессе миогенной дифференцировки было показано, что его содержание постепенно снижалось, достигая минимальных значений к 7 дню.

Добавление янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ в дифференцировочную среду в течение 1 дня дифференцировки приводило к

снижению содержания янтарной кислоты внутри клетки по сравнению с группой клеток, культивируемых на дифференцировочной среде (без добавления янтарной кислоты) (Рисунок 68).

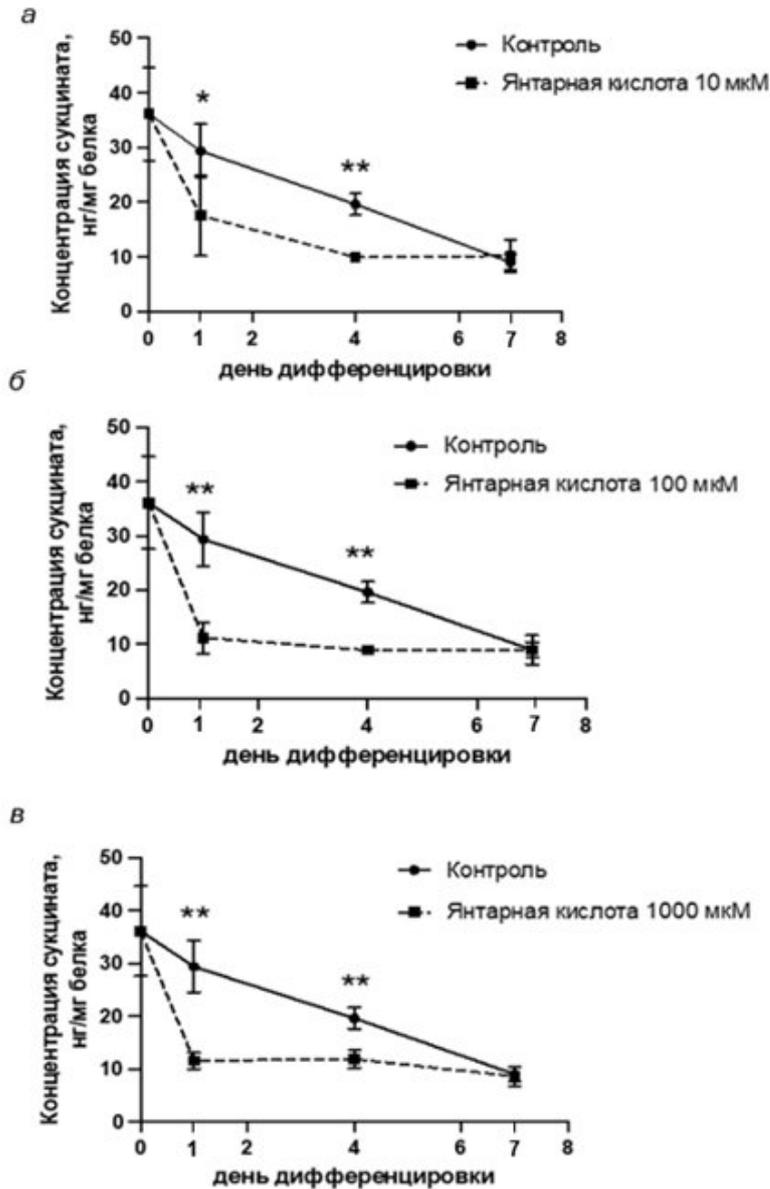


Рисунок 68 – Концентрация сукцината в клетках линии C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10 (а), 100 (б) и 1000 (в) мкМ (метод детекции ВЭЖХ МС/МС)

Примечание – * $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – статистически значимые различия между группами контроля и янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ

Вследствие того, что этилметилгидросипиридина сукцинат оказывал схожее с янтарной кислотой действие на процесс миогенеза (п.3.3.3), вероятно, что концентрация сукцината в клетках изменялись аналогичным образом.

3.6. Влияние Pertussis toxin на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой

Для определения типа G-белка, через который янтарная кислота оказывает свой эффект посредством SUCNR1 на миогенез, оценивали концентрацию инозитол-3-фосфата в лизате клеток C2C12. Добавление дифференцировочной питательной среды с янтарной кислотой приводило к постепенному нарастанию уровня инозитолмонофосфата в клетках C2C12, уровень которого достигал максимального значения к 30 мин эксперимента. Добавление коклюшного токсина в дифференцировочную среду вместе с янтарной кислотой препятствовало нарастанию уровня инозитолмонофосфата (Рисунок 69). Его концентрация достоверно не отличалась от показателей клеток при добавлении дифференцировочной питательной среды без внесения янтарной кислоты.

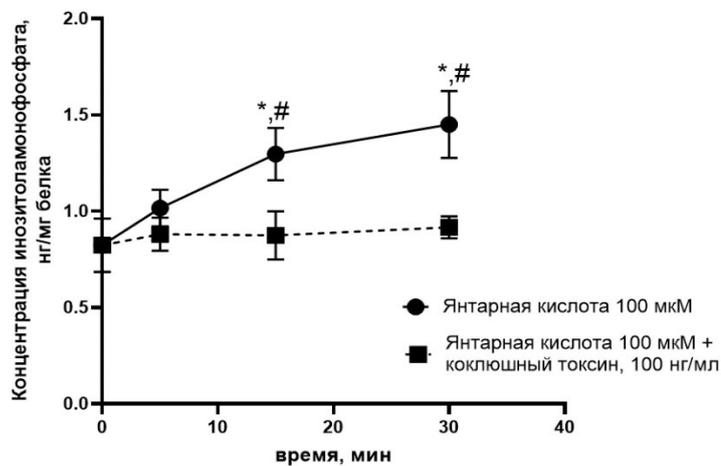


Рисунок 69 – Концентрация инозитолмонофосфата в клетках линии C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 100 мкМ (метод детекции ВЭЖХ МС/МС)

Примечание – * - $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями клеток до внесения сукцината, # - $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями при добавлении янтарной кислоты 100 мкМ + коклюшный токсин (100 нг/мл)

Таким образом, при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой, активация SUCNR1 сопровождается повышением концентрации инозитолмонофосфата, что, вероятно, характерно и для ЭМГПС, так как одним из его действующих веществ является сукцинат.

3.7. Возможность стимуляции миогенной дифференцировки в клетках C2C12 янтарной кислотой

На завершающем этапе исследования нами была проверена гипотеза о возможности запуска миогенной дифференцировки клеток C2C12 при добавлении янтарной кислоты в обычную культуральную питательную среду, без замены ее на дифференцировочную (с содержанием 2% лошадиной сыворотки).

Для данной экспериментальной группы в качестве тестовой концентрации янтарной кислоты была выбрана 100 мкМ и срок воздействия 7 дней, в связи с тем, что в данных условиях отмечалось максимальное увеличение индекса миогенеза и относительного количества мышечных белков, однако изменения не носили дозозависимый характер.

В ходе исследования было установлено, что янтарная кислота самостоятельно запускала процесс миогенной дифференцировки, о чем свидетельствовали морфологические изменения клеток. Индекс миогенеза увеличивался уже с 1 суток и достигал максимального значения к 7 суткам – $42,1 \pm 3,0\%$ (Рисунок 70).

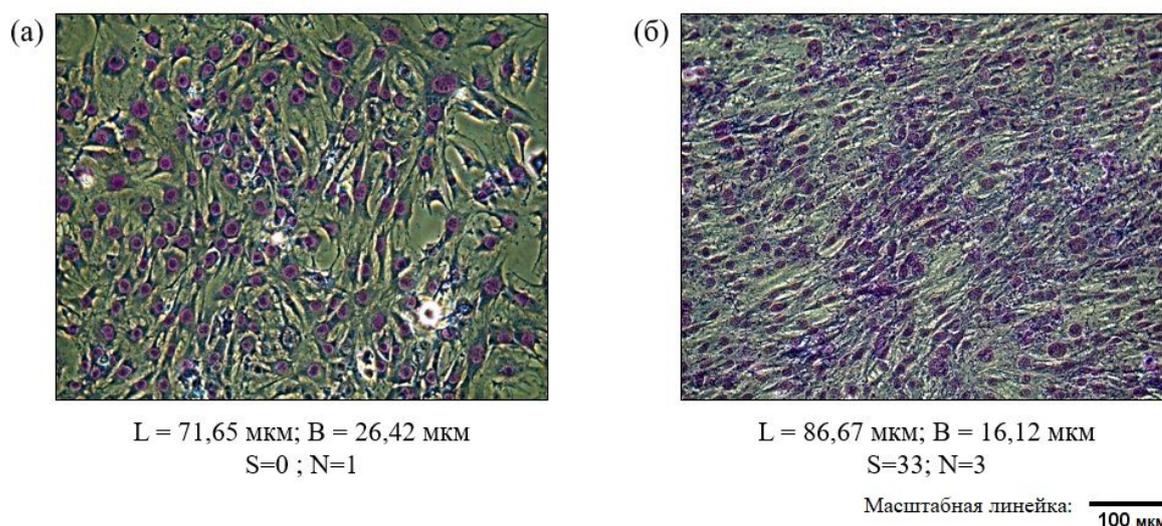


Рисунок 70 – Клетки C2C12 до дифференцировки (а) и при стимуляции миогенеза янтарной кислотой (б), 100 мкМ

Примечание – Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$. Окрашивание ядер по Романовскому-Гимзе. L – длина миобластов, B – ширина миобластов, S – количество многоядерных структур в поле зрения, N – количество ядер в многоядерных структурах

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

C2C12 – клеточная линия мышечных миобластов, выделенных из сателлитных клеток. C2C12 являются субклоном миобластов C2, которые могут спонтанно дифференцироваться после замены питательной среды, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, на дифференцировочную питательную среду, содержащую 2% лошадиной сыворотки, что дает возможность для исследования модели миогенеза [47].

Дифференцировка мышц – это сложный процесс, который включает в себя комбинированное действие нескольких факторов транскрипции, действующих на разных этапах миогенеза. Многое известно относительно механизмов, регулирующих дифференцировку мышц, однако, мало изучены специфические механизмы этапов миогенеза. Для того, чтобы расширить представления о вкладе транскрипционных факторов MyoD и MyoG в этапы миогенеза в исследовании были объединены биохимический и морфологический подходы. Вестерн-блоттинг – это метод, который позволяет определить количественные изменения белков в разные этапы дифференцировки, однако он не предоставляет информации о типе клеток. Именно поэтому был использован метод визуализации этапов дифференцировки миогенеза и оценка индекса слияния клеток.

Было доказано, что недифференцированные клетки размером 20-80 мкм имеют отростчатую структуру, одно ядро с несколькими ядрышками. В таком состоянии миобласты экспрессируют актин на периферии, а в области фокальных контактов, ближе к ядру локализован миозин [48].

В исследовании было получено, что на 1 день дифференцировки клеток C2C12 в дифференцировочной питательной среде наблюдалось формирование миотуб, имеющих в своей структуре два ядра. На 4 день дифференцировки возрастало количество двуядерных клеток, что сопровождалось повышением количества MyoD и α -актина. Визуально обнаруживались пучки тонких нитей, тесно связанных с телами Z, известные как первичные места закрепления актина [48,127], также присутствовали митохондрии и эндоплазматический ретикулум.

К 7 дню дифференцировки усиливалось слияние клеток с образованием миотрубочек длиной 100-600 мкм и шириной 30-50 мкм, содержащих более двух ядер, относительное количество MyoD и α -актина не изменялось, а MyoG и MYH увеличивалось. Клеточный монослой проявлял определенную прочность, характеризующуюся отрывом клеток от лабораторной посуды. В них присутствовали саркомеры, миофибриллы, а цитоплазма была богата миозином и актином. Ядра сгруппированы и располагались в центре или были распределены по всей структуре миотрубок. Миозин в мышечных трубках содержался в большем количестве, чем в миобластах. Часть клеток C2C12 не подвергалась дифференцировке и оставалась в виде одноядерных недифференцированных миобластов [51]. На каждом этапе миогенеза отмечалось увеличение индекса миогенеза.

Полученные результаты исследования демонстрируют, что MyoD является первым транскрипционным фактором, активируемым во время миогенной дифференцировки. MyoD присоединяет соматические клетки к миогенной линии, тогда как MyoG способствует терминальной дифференцировке миобластов в многоядерные миотрубки [21,34]. Было доказано участие MyoD и MyoG в регуляции увеличения количества специфичных мышечных белков – α -актина и MYH (Рисунок 71).

Клетки C2C12 применяются в широком спектре исследований: изучение молекулярных и клеточных механизмов дифференцировки, регенерации и трансплантации, тестирование воздействия различных биохимических и фармакологических агентов на мышечные клетки, моделирование заболеваний мышц и разработка новых терапевтических подходов к их лечению. Терапия трансплантацией клеток для регенерации мышц имеет давнюю историю. С момента проведения новаторских исследований несколькими группами в 1970 и 1990 годах методы трансплантации миобластов достигли успешных результатов [101,115,126,140].

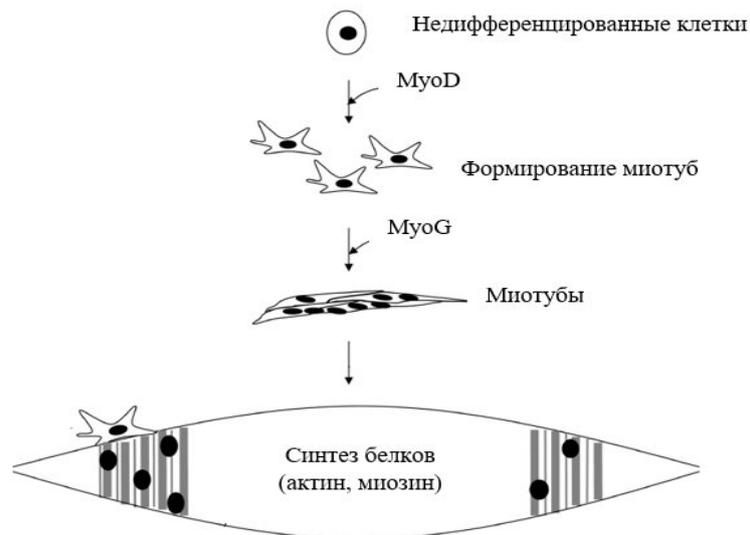


Рисунок 71 – Этапы миогенеза и участие транскрипционных факторов MyoD и MyoG, адаптировано (Цит. по Asfour H. A. et al, 2018) [34]

Было доказано, что при повреждении мышц клетки-сателлиты могут повторно включаться в клеточный цикл и формировать миогенные предшественники, способные сливаться и образовывать новые мышечные волокна [82]. Учитывая их естественную природу, клетки-сателлиты считаются удобным кандидатом для регенерации мышц, и, действительно, они продемонстрировали хороший терапевтический потенциал и использовались в большом количестве исследований [39,144,148]. Было также показано, что миобласты C2C12 способны генерировать функциональные стволовые и мышечные волокна в здоровых и поврежденных клетках [187]. Полученные результаты указывают на то, что клеточная линия C2C12 может широко использоваться *in vitro* в качестве экспериментальной модели для понимания прогрессирования метаболических заболеваний.

Несмотря на то, в модельных системах инокуляция миогенных клеток-предшественников продемонстрировала многообещающие результаты, изменив течение заболевания, еще предстоит много исследований, чтобы сделать регенеративную медицину действенным инструментом клинического вмешательства. Последние достижения в области биотехнологии и биоинженерии предлагают новые подходы к устранению дефектов мягких тканей, объединяющие

знания из области клеточной биологии, переноса генов, биоматериалов и использования биореакторов [20,53].

Описанный метод культивирования клеточной линии C2C12 в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей 2% лошадиной сыворотки, L-глутамин (4 мМ), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина подходит для формирования мышечных клеток, в которых определяется наличие характерных транскрипционных факторов и белков. Так, на раннем этапе дифференцировки индекс миогенеза составил $0,15 \pm 0,05$ и возрастало количество MyoD, на среднем индекс миогенеза был равен $0,44 \pm 0,14$, что сопровождалось повышением уровня MyoD и актина, на позднем индекс миогенеза - $0,77 \pm 0,04$ и возрастало количество MyoG и MYH.

В ходе исследования нами было доказано наличие сукцинатных рецепторов (SUCNR1) в C2C12, при этом в ходе миогенной дифференцировки относительное количество рецепторов уменьшалось. В исследовании Tao Wang et al. в 2019 было установлено, что при мышечной нагрузке в икроножных мышцах мышей увеличивается количество сукцинатных рецепторов [161]. Полученные результаты позволяют предположить, что SUCNR1, скорее всего, важен в процессе миогенеза, при завершении миогенеза его количество снижается. С этим может быть связан и тот факт, что SUCNR1 не обнаружены в мышечной ткани у взрослых людей (возраст 55 ± 7 лет) [52].

В ходе настоящего исследования было установлено, что янтарная кислота стимулирует миогенную дифференцировку, как при использовании лошадиной сыворотки, так и самостоятельно, в клеточной линии миобластов C2C12 [110]. Однако положительный эффект на регенерацию мышечной ткани при добавлении в дифференцировочную среду янтарной кислоты носит более значительный характер по сравнению с самостоятельным действием данного метаболита. Полученные результаты согласуются с данными других авторов. Например, на мышцах C57BL/6J было показано, что добавление в пищевую рацион животных 0,5% или 1% натриевой соли янтарной кислоты повышает выносливость к физическим нагрузкам, экспрессию MYH I, активность ферментов, потребление кислорода и

биогенез митохондрий в скелетных мышцах [161]. Выявлено, что янтарная кислота в концентрации 1 мкМ не оказывает влияния на миогенную дифференцировку клеток линии C2C12.

При изучении механизмов данного воздействия янтарной кислоты нами выявлено, что тестируемое вещество повышает относительное количество как MyoD, так и MyoG, то есть влияет как на ранний, так и на поздний этапы миогенеза. Рост индекса миогенеза носил дозозависимый характер в 1 и 4 дни дифференцировки: при концентрации янтарной кислоты (100 и 1000 мкМ) был выше по сравнению с добавлением концентрации 10 мкМ. На позднем этапе миогенеза не наблюдалась зависимости увеличения индекса миогенеза от дозы. На 4 день дифференцировки повышение уровня MyoD приобретало дозозависимый характер. Относительное количество MyoD было выше при внесении янтарной кислоты в концентрациях 100 и 1000 мкМ, чем при использовании 10 мкМ. Также, возрастание уровня α -актина на среднем этапе дифференцировки носило дозозависимый характер: при действии янтарной кислоты в концентрации 1000 мкМ уровень α -актина был ниже по сравнению с воздействием тестируемым веществом в концентрации 100 мкМ. Стоит отметить, что максимальный прирост индекса миогенеза происходил на 1-е сутки, а увеличение количества MyoD и MyoG – на 4-е и 7-е сутки соответственно, то есть увеличение индекса миогенеза несколько опережало активацию транскрипционных факторов. Выявленное опережение нарастания индекса миогенеза по сравнению с нарастанием уровня MyoD может быть связано именно с накоплением активной дефосфорилированной формы данного транскрипционного фактора под действием янтарной кислоты, а не с увеличением его общего количества [9].

Янтарная кислота является субстратом цикла Кребса и поставщиком ФАДН₂ для дыхательной цепи митохондрий [189], поэтому можно было предположить, что выявленный эффект связан с его участием в метаболических процессах как субстрата. Однако нами было показано, что в ходе миогенной дифференцировки концентрация сукцината в клетках прогрессивно падает, достигая минимального уровня к 7 дню эксперимента, а добавление янтарной кислоты во всех

концентрациях не только не приводит к повышению внутриклеточного уровня сукцината, а наоборот, ускоряет процесс снижения его содержания.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сукцинат, видимо, быстро метаболизируется и эффект стимуляции миогенеза реализуется не через влияние на метаболизм клеток и дыхательную цепь. Таким образом, янтарная кислота принимает участие в процессе дифференцировки миобластов не как энергетический субстрат, а как сигнальная молекула.

Для изучения возможных механизмов индукции миогенеза сукцинатом было оценено его влияние на количество транскрипционных факторов: прегнан X рецептора и α субъединицы фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α). HIF-1 α – один из основных факторов, обеспечивающих адаптацию клеток к гипоксии [91]. В ряде исследований было показано, что этот фактор может запускать процесс миогенной дифференцировки [92], а сукцинат стимулирует экспрессию HIF-1 α [162].

PXR - является членом суперсемейства ядерных рецепторов, который обеспечивает ответ клеток на ксенобиотики. PXR стимулирует экспрессию ферментов I и II фазы биотрансформации, а также белков-транспортеров [63].

В исследовании на клетках линии C2C12 было показано, что флавоноид (-)-Epicatechin индуцировал миогенную дифференцировку клеток линии C2C12 за счет индукции прегнан X рецептора [145].

В ходе нашего исследования было показано, что янтарная кислота не оказывает влияния на содержание транскрипционных факторов HIF-1 α , PXR.

Мы предположили, что эффект янтарной кислоты может реализоваться через SUCNR1. Интересно отметить, что при воздействии янтарной кислоты количество SUCNR1 снижается в большей степени, чем при культивировании в дифференцировочной среде (без янтарной кислоты). Учитывая, что происходит ускорение миогенеза, данные результаты могут быть связаны именно с этим. С другой стороны, снижение уровня рецептора может служить ответом на его стимуляцию лигандом. При активации рецепторов, связанных с G-белком, их лиганды также инициируют процессы десенсбилизации – адаптивный ответ,

используемый клетками для остановки передачи сигналов G-белками, таким образом предотвращая потенциально вредные эффекты, которые могут возникнуть в результате персистенции стимуляции [97].

Предполагается, что SUCNR1 может реализовывать свои эффекты через белки G α i, $\beta\gamma$ и G α q. Активация G α i приводит к снижению уровня цАМФ [93], а G α q запускает PLC- β сигнальный каскад [109]. Однако точка зрения на то, что SUCNR1 связан с Gq, была подвергнута сомнению, и несколько авторов выдвинули гипотезу, что наблюдаемая мобилизация [Ca²⁺]_i при активации рецептора была следствием активации PLC- β димером $\beta\gamma$ [103].

Для оценки роли SUCNR1-G α i сигнального пути в стимуляции миогенеза под действием янтарной кислоты применяли специфический ингибитор G α i-белка – Pertussis toxin (Рисунок 72). Pertussis toxin катализирует АДФ-рибозилирование по остаткам цистеина (Cys351) на С-конце специфических α -субъединиц тримерных G-белков семейства G_{1/o} (G₁/G_o) [103]. Показано, что Pertussis toxin может подавлять основные эффекты SUCNR1 [166].

В настоящем исследовании было установлено, что Pertussis toxin подавляет миогенную дифференцировку, вызванную янтарной кислотой. Уровень SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в присутствии Pertussis toxin статистически значимо не отличался от показателей клеток без ее воздействия (в дифференцировочной среде). Известно, что Pertussis toxin может предотвращать интернализацию G-белка, связанного с рецептором при воздействии лиганда [71].

Дополнительно в рамках исследования было оценено влияние коклюшного токсина на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой, поскольку показано, что активациях SUCNR1 сопровождается повышением его концентрации [93]. Добавление дифференцировочной питательной среды, содержащей янтарную кислоту, на первый день начала миогенной дифференцировки приводило к постепенному нарастанию уровня инозитолмонофосфата в клетках C2C12. Добавление коклюшного токсина в дифференцировочную среду вместе с янтарной кислотой препятствовало нарастанию уровня инозитолмонофосфата. В

совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что янтарная кислота стимулирует миогенную дифференцировку C2C12, действуя через SUCNR1-Gαi, а не через SUCNR1-Gαq.

Сделанные выводы согласуются с классическими представлениями о регуляции миогенеза. Известно, что повышенный внутриклеточный уровень цАМФ может ингибировать экспрессию специфичных генов, инициирующих миогенную дифференцировку, тогда как снижение цАМФ может их активировать и запускать миогенез [71], например, за счет дефосфорилирования MyoD по остатку Ser200 [26]. Данный факт также был косвенно подтвержден в ходе исследования: внесение янтарной кислоты в питательную среду, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, запускало процесс миогенной дифференцировки.

Таким образом, в настоящем исследовании на клетках миобластов C2C12 было установлено, что янтарная кислота запускает и ускоряет процесс миогенной дифференцировки, действуя через SUCNR1-Gαi.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) - лекарственный препарат, содержащий в своем составе янтарную кислоту, обладающий выраженной антиоксидантной и антигипоксантажной активностью. Сукцинат, являясь субстратом цикла Кребса, в молекуле препарата отвечает за антигипоксический эффект, этилметилгидроксипиридин может инактивировать свободные радикалы - антиоксидантная активность [6,16].

В рамках настоящего исследования оценивалось влияние ЭМГПС на процесс миогенной дифференцировки. Было показано, что и ЭМГПС ускоряет процесс миогенной дифференцировки миобластов, о чем свидетельствуют морфологические изменения миобластов C2C12, а также повышение уровня специфических мышечных белков α-актина, миозина и факторов миогенной дифференцировки – MyoD и миогенина.

При этом достоверных различий между содержанием изучаемых белков на фоне применения ЭМГПС и сукцината получено не было, что, скорее всего, свидетельствует о том, что ЭМГПС оказывает влияние на миогенез за счет молекулы сукцината, входящей в его состав.

Таким образом, ЭМГПС можно рассматривать в качестве перспективного лекарственного средства для стимуляции регенерации скелетных мышц у пациентов с мышечной атрофией (например, у пациентов с гиподинамией после острого нарушения мозгового кровообращения) и у профессиональных спортсменов.

В ходе настоящего исследования были проанализированы возможные механизмы воздействия ЭМГПС на миогенез, для чего оценивалось его влияние на уровень транскрипционных факторов HIF-1 α и PXR. Выявлено, что ЭМГПС не влияет на количество данных транскрипционных факторов в процессе миогенной дифференцировки, а следовательно, HIF-1 α и PXR не участвуют в стимуляции миогенеза тестируемым веществом [5].

В нашем исследовании предполагалось, что основную роль в стимуляции миогенеза под действием ЭМГПС играет SUCNR1-Gi сигнальный путь. Для проверки данной гипотезы мы использовали ингибитор Gi белка коклюшный токсин (Pertussis toxin).

Добавление токсина совместно с ЭМГПС статистически значимо снижало индекс миогенеза относительно самостоятельного действия ЭМГПС на раннем и позднем этапах дифференцировки. Формирование мышечного волокна ингибировалось Pertussis toxin, о чем свидетельствовали значения длины и ширины многоядерных структур клеток C2C12.

На раннем этапе дифференцировки Pertussis toxin подавлял положительное действие ЭМГПС на уровне MyoD и SUCNR1. На среднем этапе дифференцировки добавление токсина совместно с ЭМГПС увеличивало относительное количество MyoD по сравнению с группой клеток 4 дня дифференцировки и снижало относительно самостоятельного действия ЭМГПС. На позднем этапе дифференцировки действие Pertussis toxin нивелировало стимулирующее действие ЭМГПС на дифференцировку клеток мышечной ткани, все изучаемые показатели достоверно не отличались от значений самостоятельного действия ЭМГПС.

Таким образом, ЭМГПС дозозависимо ускоряет миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, и этот эффект реализуется янтарной кислотой через SUCNR1-

Gi сигнальный путь. В свою очередь SUCNR1-Gi сигнальный путь может рассматриваться как перспективная мишень для фармакологического воздействия на процесс миогенной дифференцировки.

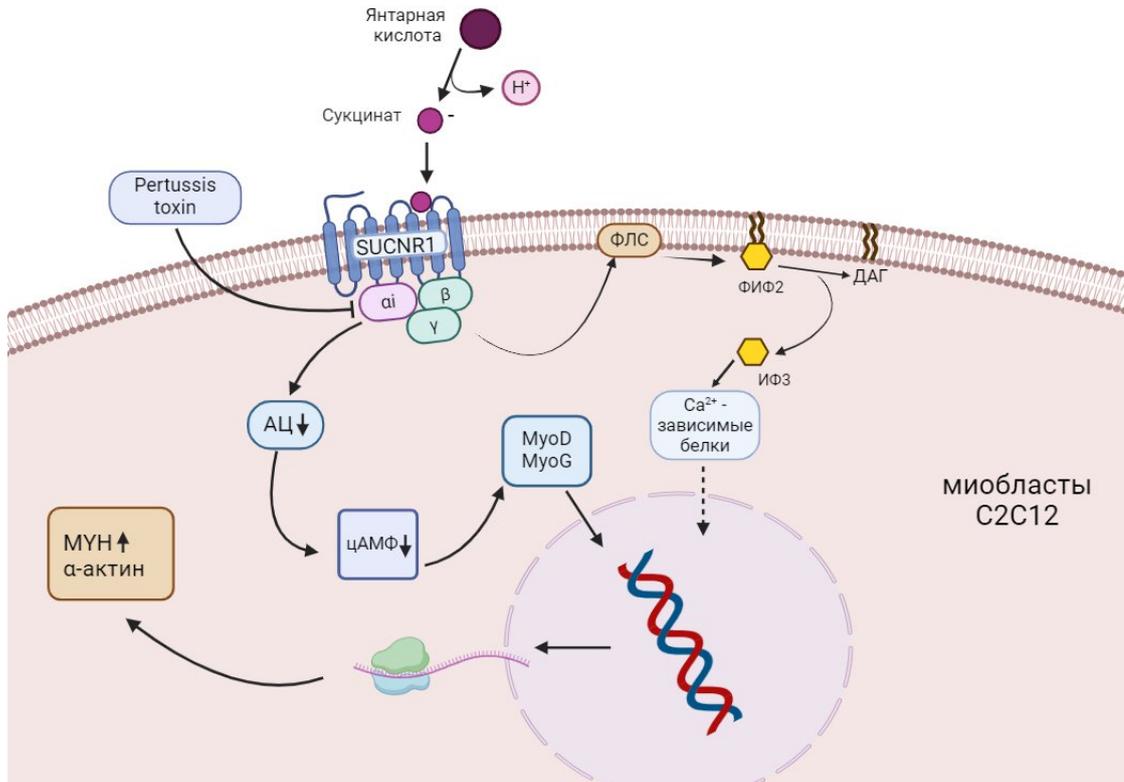


Рисунок 72 – Предполагаемый механизм действия янтарной кислоты на процесс миогенной дифференцировки клеток C2C12

Примечание – АЦ – аденилатциклаза; ФЛС – фосфолипаза С; ФИФ2 – фосфатидилинозитол-1,5-дифосфат; ДАГ – диацилглицерол; ИФ3 – инозитол-3-фосфат; \longrightarrow - механизма действия через белок $G\alpha_i$; \longrightarrow - механизма действия через белок $G\gamma\beta$; $---\longrightarrow$ - механизма действия через Ca^{2+} - зависимые белки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования на клеточной линии C2C12 было показано, что янтарная кислота в концентрации 1 мкМ не влияет на миогенез, а в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ ускоряет дифференцировку миобластов за счет повышения уровня основных регуляторных факторов - MyoD, MyoG; белков мышечной ткани - α -актина, тяжелых цепей миозина (MYH). Аналогичный эффект наблюдали при добавлении препарата, содержащего в своем составе янтарную кислоту – ЭМГПС в концентрации 10, 100, 1000 мкМ.

Важно отметить, что янтарная кислота способствует увеличению индекса миогенеза, а также приводит к возрастанию количества и размера многоядерных структур, что проявляется в повышении длины и ширины миобластов. Аналогичным эффектом обладал сукцинатсодержащий препарат (ЭМГПС), что, возможно, обусловлено наличием янтарной кислоты в его составе. Индуцирующий эффект подавлялся при воздействии ингибитора G α i сигнального пути pertussis toxin.

Снижение относительного количества SUCNR1 при добавлении янтарной кислоты в дифференцированную питательную среду на 1, 4 и 7 миогенеза может быть связано с ее действием через данный рецептор. Добавление янтарной кислоты 100 мкМ приводит к повышению концентрации инозитолмонофосфата в клетке, при ингибировании G α i-сигнального пути SUCNR1 не происходит увеличения его уровня.

Янтарная кислота в концентрации 100 мкМ самостоятельно запускает процесс миогенной дифференцировки в клетках, культивируемых в недифференцировочной питательной среде (без содержания лошадиной сыворотки).

ВЫВОДЫ

1. Янтарная кислота в концентрации 1 мкМ не оказывает дифференцировочного воздействия на клетки C2C12. Янтарная кислота в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ стимулирует миогенез в клетках линии C2C12, что проявляется в морфологических изменениях (увеличение длины, ширины миобластов, количества многоядерных структур и ядер в них), повышении индекса миогенеза, относительного количества MyoD и MyoG, α -актина и MYH.

2. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ дозозависимо ускоряет миогенную дифференцировку клеток линии C2C12 возможно за счет сукцината, содержащегося в молекуле препарата, повышая уровень MyoD, MyoG, α -актина и MYH.

3. Доказано участие SUCNR1 в процессе миогенеза в клетках C2C12, относительное количество рецепторов снижается при активации процесса миогенеза. HIF-1 α и PXR не вносят вклад в индуцирующее действие янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината на процесс миогенеза.

4. Концентрация сукцината в цитоплазме клеток C2C12 при экзогенном воздействии янтарной кислоты (10, 100, 1000 мкМ) не изменялась по сравнению с соответствующим этапом дифференцировки, что связано с его регуляторным действием на миогенез, а не с энергетической функцией.

5. Янтарная кислота и этилметилгидроксипиридина сукцинат инициируют и ускоряют процесс миогенной дифференцировки в клетках C2C12 за счет действия сукцината через SUCNR1-G α i – сигнальный путь.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется проведение исследований для анализа целесообразности включения янтарной кислоты в пищевые добавки для спортсменов и людей, активно занимающихся физической культурой, для поддержания мышечной функции и восстановления после тренировки.

2. Рекомендуется изучить возможность включения препаратов янтарной кислоты в лечебные программы для пациентов с метаболическими нарушениями, влияющими на мышечную функцию, таких как сахарный диабет типа 2 и ожирение.

3. Янтарная кислота может быть изучена в доклинических и клинических исследованиях для ускорения восстановления мышечной ткани в астеническом периоде после травм или операций и в комплексной терапии для стимуляции регенерации мышц.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Оценка влияния янтарной кислоты на воспалительные медиаторы и цитокины в культуре клеток C2C12, что может иметь значение для регенерации мышечной ткани.
2. Синтез и тестирование новых молекул, модифицирующих действие янтарной кислоты, для улучшения процесса дифференцировки и регенерации мышечной ткани.
3. Проведение клинических испытаний для оценки эффективности и безопасности применения янтарной кислоты или её аналогов в терапии мышечных заболеваний. Исследование комбинации янтарной кислоты с другими веществами и методами лечения для усиления терапевтического эффекта.
4. Наблюдение за долгосрочными последствиями воздействия янтарной кислоты на миогенез и выявление возможных побочных эффектов.
5. Изучение потенциального воздействия янтарной кислоты на процессы старения мышечной ткани и разработка стратегий для замедления мышечной дегенерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АЦ – аденилатциклаза

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДАГ – диацилглицерол

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФ3 – инозитол-1,4,5-трифосфат

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат

п.з. – поле зрения

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ФАДН₂ - восстановленный флавинадениндинуклеотид

ФИФ2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

CDK – циклинзависимая киназа (англ.: cyclin-dependent kinase)

CREB - белок, связывающий элемент ответа цАМФ (англ.: cAMP response element-binding protein)

E-box – энхансерный бокс (англ.: Enhancer Box).

ECL - внеклеточные петли (англ.: extracellular loops)

ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа (англ.: extracellular signal-regulated kinase).

GPCR – рецепторы, связанные с G-белком (англ.: G protein-coupled receptors)

HIF-1 α – гипоксия-индуцибельный фактор 1 α (англ.: Hypoxia-inducible factor 1 α)

JNK – N-концевые (терминальные) киназы c-Jun (англ.: c-Jun N-terminal kinases)

МАРК p38 – митоген-активируемые протеинкиназы p38 (англ.: p38 mitogen-activated protein kinase).

- MLC – легкие цепи миозина (англ.: myosin light chain)
- MRF – миогенные регуляторные факторы (англ.: myogenic regulation factors).
- MRF4 – геркулин (англ.: herculin)
- MTC1 – транспортер монокарбоксилатов 1 (англ.: monocarboxylate transporter 1)
- mTOR – механистическая мишень рапамицина (англ.: mechanistic target of rapamycin)
- Myf5 – миогенный фактор 5 (англ.: myogenic factor 5).
- MYH – тяжелая цепь миозина (англ.: myosin heavy chain gene)
- MyoD – белок детерминации миобластов 1 (англ.: Myogenic determination protein 1).
- MyoG – миогенин (англ.: myogenin)
- NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (англ.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- Paх – Парный бокс-ген (англ.: Paired box gene)
- PI3K/АКТ – фосфотидилинозитол-3-киназа/протеинкиназа В (англ.: Phosphatidylinositol 3-kinase / Protein kinase B)
- PT - коклюшный токсин (англ.: pertussis toxin)
- PXR – прегнан Х рецептор (англ.: pregnane X receptor)
- p21 – ингибитор клеточного цикла (англ.: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)
- SUCNR1, GPR91 – рецептор сукцината 1 (англ.: Succinate receptor 1)
- SWI/SNF – комплексы ремоделирования хроматина (англ.: SWItch/Sucrose Non-Fermentable)
- VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (англ.: Vascular endothelial growth factor)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаленихина, Ю.В. Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* : специальность 1.5.4. «Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Абаленихина Юлия Владимировна; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. - Рязань, 2022. - 249 с. – Текст : непосредственный.
2. Буев, Д.О. Fusion-феномен в нормальном гистогенезе и при патологии. Часть 1 / Д.О. Буев, А.М. Емелин, Р.В. Деев. – Текст : непосредственный // Гены и Клетки. – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 13-21.
3. Взаимосвязь сфинголипидных механизмов с окислительным стрессом и изменениями митохондрий при функциональной разгрузке постуральных мышц / В.А. Протопопов, А.В. Секунов, А.В. Панов, И.Г. Брындина – Текст : непосредственный // Acta Biomedica Scientifica. – 2024. – Т. 9, № 2. – С. 228-242.
4. Влияние мексидола на экспрессию транскрипционного фактора Nrf2 в коре больших полушарий головного мозга при экспериментальной ишемии / Е.Н. Якушева, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, А.В. Шулькин. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2018. – Т. 5. – С. 63-67.
5. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, М.О. Порошина, А.Н. Рябков [и др.] – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85, № 6. – С. 14-18.
6. Воронина, Т. А. Антиоксиданты/антигипоксанты – недостающий пазл эффективной патогенетической терапии пациентов с COVID-19 / Т.А. Воронина. – Текст: непосредственный // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 186, № 2. – С. 97-103.
7. Воронина, Т.А. Комбинированное применение мексидола с известными лекарственными средствами / Т.А. Воронина, Е.А. Иванова. – Текст : непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, № 4. – С. 115-124.

8. Екушева, Е.В. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на процессы нейропластичности после ишемического инсульта / Е.В. Екушева. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 8. – С. 37-44.
9. Изменение показателей миогенеза клеточной линии C2C12 при воздействии сукцината *in vitro* / М.О. Исаева, Ю.В. Абаленихина, Ф.Т. Гаджиева [и др.]. – Текст : непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2024. – Т. 27, № 1. – С. 92-99.
10. Ингибирующее действие DL-бутионинсульфоксимида на активность Р-гликопротеина *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева. – Текст : непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т. 103, №5. – С. 780-787.
11. Индейкин, Ф.А. Направленное перепрограммирование дифференцированных клеток в миогенном направлении / Ф.А. Индейкин, М.О. Мавликеев, Р.В. Деев. – Текст : непосредственный // Гены и Клетки. - 2018. - Т. 13, № 4. - С. 9-16.
12. Использование препаратов, содержащих сукцинат, в клинике инфекционных болезней / Е.О. Тихонова, Е.П. Ляпина, А.А. Шульдяков, С.А. Сатарова. – Текст : непосредственный // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 11. – С. 121-127.
13. Количественная оценка миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 с использованием полиэтиленгликоля и индукционных сред *in vitro* / А.М. Емелин, Д.О. Буев, А.А. Слабикова [и др.]. – Текст : непосредственный // Гены и Клетки. - 2019. - Т. 14, № 3. - С. 87-87.
14. Копанцева, Е.Е. Регуляторы скелетно-мышечного миогенеза / Е.Е. Копанцева, А.В. Белявский. – Текст : непосредственный // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50, № 2. – С. 195-222.
15. Марсянова, Ю.А. Влияние сукцината на некоторые показатели биоэнергетического обмена в семенных пузырьках и эпидидимисе у самцов крыс в условиях хронической гипоксии / Ю.А. Марсянова, В.И. Звягина. – Текст :

непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 49-54.

16. Механизм действия реамберина (Na, N-метилглюкамония натрия сукцината) / В.В. Афанасьев, А.Ю. Петров, А.Л. Коваленко, М.Г. Романцов. – Текст : непосредственный // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 7. – С. 24-24.

17. Механизм стимуляции миогенеза под действием этилметилгидроксипиридина сукцината / Ю.В. Абаленихина, М.О. Исаева, А.В. Шулькин [и др.] – Текст : непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2024. – Т. 58, № 6. – С. 10-17.

18. Молекулярные механизмы изменения мышечного тонуса в условиях космического полета и при его моделировании / Б.С. Шенкман, А.К. Цатурян, И.М. Вихлянцев [и др.]. – Текст : непосредственный // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 85-97.

19. Немировская, Т.Л. Регуляция кальциевого обмена в скелетных мышцах при их функциональной разгрузке / Т.Л. Немировская, К.А. Шарло. – Текст : непосредственный // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2022. – Т. 56, № 1. – С. 5-13.

20. Регенеративный гистогенез при дефекте скелетных мышц с локальной имплантацией генно-активированного гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты в эксперименте / Р.В. Деев, И.Я. Бозо, М.О. Мавликеев [и др.]. – Текст : непосредственный // Гены и клетки. – 2020. – Т. 15, № 2. – С. 66-72.

21. Способ культивирования и механизмы регуляции этапов миогенеза клеточной линии C2C12 / М.О. Исаева, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2023. – Т. 31, № 4. – С. 525-534.

22. Стельмах, В.В. Эффективность инфузионного гепатотропного препарата ремаксол в патогенетической терапии хронических вирусных гепатитов на цирротической стадии / В.В. Стельмах, В.К. Козлов, В.Ф. Иванова. – Текст : непосредственный // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 87, № 8. – С. 67-72.

23. Судакова, Е.А. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro* : специальность 1.5.4. «Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Судакова Елена Александровна; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. - Рязань, 2022. - 113 с. – Текст : непосредственный.
24. Шишкин, С.С. Миостатин и некоторые другие биохимические факторы, регулирующие рост мышечных тканей у человека и ряда высших позвоночных / С.С. Шишкин. – Текст : непосредственный // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 209-262.
25. Яснецов, В.В. Влияние некоторых нейротропных веществ на дыхание митохондрий клеток головного мозга крыс / В.В. Яснецов. – Текст : непосредственный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2009. – Т. 6, № 2. – С. 72-73.
26. A cyclic AMP-dependent pathway regulates the expression of acetylcholinesterase during myogenic differentiation of C2C12 cells / N.L. Siow, R.C. Choi, A.W. Cheng [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, № 39. – P. 36129-36136.
27. A dual-color PAX7 and MYF5 *in vivo* reporter to investigate muscle stem cell heterogeneity in regeneration and aging / S. Ancel, J. Michaud, F. Sizzano [et al.]. – Text : visual // Stem Cell Reports. – 2024. – Vol. 19, № 7. - P. 1024-1040.
28. A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation / B.H. Penn, D.A. Bergstrom, F.J. Dilworth [et al.]. – Text : visual // Genes & development. – 2004. – Vol. 18, № 19. – P. 2348-2353.
29. Activation of Akt2 Inhibits anoikis and apoptosis induced by myogenic differentiation / Y. Fujio, Y. Mitsuuchi, J.R. Testa, K. Walsh. – Text : visual // Cell Death Differ. – 2001. – Vol. 8, № 12. – P. 1207-1212.
30. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release / S.L. Vargas, I. Toma, J.J. Kang [et al.]. – Text : visual // Journal of the American Society of Nephrology. – 2009. – Vol. 20, № 5. – P. 1002-1011.

31. Acute succinate administration increases oxidative phosphorylation and skeletal muscle explosive strength via SUCNR1 / G. Xu, Y. Yuan, P. Luo [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 8. – P. 808863.
32. Analysis of the global RNA expression profiles of skeletal muscle cells treated with statins / S. Morikawa, T. Murakami, H. Yamazaki [et al.]. – Text : visual // *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. – 2005. – Vol. 12, № 3. – P. 121-131.
33. Arginine promotes myogenic differentiation and myotube formation through the elevation of cytoplasmic calcium concentration / L. Gong, X. Zhang, K. Qiu [et al.]. – Text : visual // *Animal Nutrition*. – 2021. – Vol. 7, № 4. – P. 1115.
34. Asfour, H.A. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery / H.A. Asfour, M.Z. Allouh, R.S. Said. – Text : visual // *Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 432, № 2. – P. 118-128.
35. Atiprimod triggered apoptotic cell death via acting on PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP and STAT3/NF-KB axis in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 breast cancer cells / A. Coker-Gurkan, E. Can, S. Sahin [et al.]. – Text : visual // *Molecular Biology Reports*. – 2021. – Vol. 48, № 6. – P. 5233-5247.
36. Atorvastatin impaired glucose metabolism in C2C12 cells partly via inhibiting cholesterol-dependent glucose transporter 4 translocation / B. Sun, Z. Zhong, F. Wang [et al.]. – Text : visual // *Biochemical pharmacology*. – 2018. – Vol. 150. – P. 108-119.
37. Audet, M. Restructuring G-protein-coupled receptor activation / M. Audet, M. Bouvier. – Text : visual // *Cell*. – 2012. – Vol. 511, № 1. – P. 14-23.
38. Azhar, M. The regenerative potential of Pax3/Pax7 on skeletal muscle injury / M. Azhar, B.W.K. Wardhani, E. Renesteen. – Text : visual // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 143.
39. Benabdallah, B.F. Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal / B.F. Benabdallah, M. Bouchentouf, J.P. Tremblay. – Text : visual // *Transplantation*. – 2005. – Vol. 79, № 12. – P. 1696-1702.
40. Berggren, J.R. Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism / J.R. Berggren, C.J. Tanner, J.A. Houmard. – Text : visual // *Exercise and sport sciences reviews*. – 2007. – Vol. 35, №2. – P. 56-61.

41. bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion / D.J. Seward, J.C. Haney, M.A. Rudnicki, S.J. Swoap. – Text : visual // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2001. – Vol. 802, № 2. – P. 408-413.
42. Biodegradable polymers for modern vaccine development / R.J. Bose, M. Kim, J.H. Chang [et al.]. – Text : visual // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2019. – Vol. 77. – P. 12-24.
43. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text : visual // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248-254.
44. Breakdown of the potentiality principle and its impact on global stem cell research / G. Testa, L. Borghese, J.A. Steinbeck, O. Brüstle. – Text : visual // *Cell Stem Cell*. – 2007. – Vol. 1, № 2. – P. 153-156.
45. Brooks, N.E. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways / N.E. Brooks, K.H. Myburgh. – Text : visual // *Frontiers in physiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 99.
46. Burns, D.L. Secretion of Pertussis Toxin from *Bordetella pertussis* / D.L. Burns. – Text : visual // *Toxins (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 8. – P. 574.
47. C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties / D.K. McMahon, P.A. Anderson, R. Nassar [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 1994. – Vol. 266, № 6. – P. C1795-C1802.
48. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization / S. Burattini, P. Ferri, M. Battistelli [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Histochemistry*. – 2004. – Vol. 48, № 3. – P. 223-233.
49. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration / A. Otto, C. Schmidt, G. Luke [et al.]. – Text : visual // *Journal of cell science*. – 2008. – Vol. 121, № 17. – P. 2939-2950.
50. cdk1-and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity / M. Kitzmann, M.

- Vandromme, V. Schaeffer [et al.]. – Text : visual // *Molecular and cellular biology*. – 1999. – Vol. 19, № 4. – P. 3167-3176.
51. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells' / N. Yoshida, S. Yoshida, K. Koishi [et al.]. – Text : visual // *Journal of cell science*. – 1998. – Vol. 111, № 6. – P. 769-779.
52. Cell selectivity in succinate receptor SUCNR1/GPR91 signaling in skeletal muscle / A.M. Abdelmoez, O. Dmytriyeva, Y.X. Zurke [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2023. – Vol. 324, № 4. – P. E289-E298.
53. Characterization of C2C12 cells in simulated microgravity: Possible use for myoblast regeneration / D. Calzia, L. Ottaggio, A. Cora [et al.]. – Text : visual // *Journal of cellular physiology*. – 2020. – Vol. 235, № 4. – P. 3508-3518.
54. Chemerin inhibition of myogenesis and induction of adipogenesis in C2C12 myoblasts / H.X. Li, K.L. Chen, H.Y. Wang [et al.]. – Text : visual // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2015. – Vol. 414. – P. 216-223.
55. Chemical manipulation of an activation/inhibition switch in the nuclear receptor PXR / E. Garcia-Maldonado, A.D. Huber, S.C. Chai [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 51, № 1. – P. 4054.
56. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors / W. He, F.J.P. Miao, D.C.-H. Lin [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P. 188-193.
57. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins / I.C. Macaulay, M.R. Tijssen, D.C. Thijssen-Timmer [et al.]. – Text : visual // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, № 8. – P. 3260-3269.
58. Cortisone and dexamethasone inhibit myogenesis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway in C2C12 / J. Kim, M.Y. Park, H.K. Kim [et al.]. – Text : visual // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2016. – Vol. 80, № 11. – P. 2093-2099.
59. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways / L. Deldicque, D. Theisen, L. Bertrand [et al.]. – Text : visual //

American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2007. – Vol. 293, № 4. – P. C1263-C1271.

60. Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts / P. Sestili, E. Barbieri, C. Martinelli [et al.]. – Text : visual // Molecular Nutrition & Food Research. – 2009. – Vol. 53, № 9. – P. 1187-1204.

61. Cuadrado, A. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling / A. Cuadrado, A.R. Nebreda. – Text : visual // Biochemical journal. – 2010. – Vol. 429, № 3. – P. 403-417.

62. Cyclin E–Cdk2 Phosphorylation Promotes Late G1-Phase Degradation of MyoD in Muscle Cells / L.A. Tintignac, M.P. Leibovitch, M. Kitzmann [et al.]. – Text : visual // Experimental cell research. – 2000. – Vol. 259, № 1. – P. 300-307.

63. Daujat-Chavanieu, M. Regulation of CAR and PXR Expression in Health and Disease / M. Daujat-Chavanieu, S. Gerbal-Chaloin. – Text : visual // Cells. – 2020. – Vol. 9, № 11. – P. 2395.

64. Davis, R.L. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts / R.L. Davis, H. Weintraub, A.B. Lassar. – Text : visual // Cell. – 1987. – Vol. 51, № 6. – P. 987–1000.

65. De Falco, M. Involvement of cdks and cyclins in muscle differentiation / M. De Falco, A. De Luca. – Text : visual // European Journal of Histochemistry. – 2006. – Vol. 50, № 1. – P. 19-24.

66. Deen, P.M. Succinate receptors in the kidney / P.M. Deen, J.H. Robben. – Text : visual // Journal of the American Society of Nephrology. – 2011. – Vol. 22, № 8. – P. 1416-1422.

67. Deteriorating insulin resistance due to WL15 peptide from cysteine and glycine-rich protein 2 in high glucose-induced rat skeletal muscle L6 cells / A. Guru, P.K. Issac, N.T. Saraswathi [et al.]. – Text : visual // Cell Biology International. – 2021. – Vol. 45, № 8. – P. 1698-1709.

68. Detraux, D. Succinate as a new actor in pluripotency and early development? / D. Detraux, P. Renard. – Text : visual // Metabolites. – 2022. – Vol. 12, № 7. – P. 651.

69. Dietary L-carnitine alters gene expression in skeletal muscle of piglets / J. Keller, R. Ringseis, S. Priebe [et al.]. – Text : visual // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2011. – Vol. 55, № 3. – P. 419.
70. Differentiation of C2C12 myoblasts expressing lamin A mutated at a site responsible for Emery–Dreifuss muscular dystrophy is improved by inhibition of the MEK–ERK pathway and stimulation of the PI3-kinase pathway / C. Favreau, E. Delbarre, J.C. Courvalin, B. Buendia. – Text : visual // *Experimental cell research*. – 2008. – Vol. 314, № 6. – P. 1392-1405.
71. Distinct regions of C-terminus of the high affinity neurotensin receptor mediate the functional coupling with pertussis toxin sensitive and insensitive G-proteins / M. Najimi, P. Gailly, J.M. Maloteaux, E. Hermans. – Text : visual // *FEBS letters*. – 2002. – Vol. 512, № 1-3. – P. 329-333.
72. Dystrophin gene editing by CRISPR/Cas9 system in human skeletal muscle cell line (HskMC) / M. Dara, V. Razban, M. Mazloomrezaei [et al.]. – Text : visual // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2021. – Vol. 24, № 8. – P. 1153-1158.
73. Engquist, E.N. The satellite cell at 60: The foundation years / E.N. Engquist, P.S. Zammit. – Text : visual // *Journal of Neuromuscular Diseases*. – 2021. – Vol. 8, № s2. – P. S183-S203.
74. EPA and DHA Inhibit Myogenesis and Downregulate the Expression of Muscle-related Genes in C2C12 Myoblasts / J. Zhang, X. Xu, Y. Liu [et al.]. – Text : visual // *Genes*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 64.
75. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion / N.C. Jones, Y.V. Fedorov, R.S. Rosenthal, B.B. Olwin. – Text : visual // *Journal of cellular physiology*. – 2001. – Vol. 861, № 1. – P. 104-115.
76. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts / P. Ferri, E. Barbieri, S. Burattini [et al.]. – Text : visual // *Journal of cellular biochemistry*. – 2009. – Vol. 108, № 6. – P. 1302-1317.

77. Extracellular succinate hyperpolarizes M2 macrophages through SUCNR1/GPR91-mediated Gq signaling / M. Trauelsen, T.K. Hiron, D. Lin [et al.]. – Text : visual // Cell reports. – 2021. – Vol. 35, № 11. – P. 109246.
78. Factors regulating or regulated by myogenic regulatory factors in skeletal muscle stem cells / T. Shirakawa, T. Toyono, A. Inoue [et al.]. – Text : visual // Cells. – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1493.
79. Forskolin-free cAMP assay for Gi-coupled receptors / J. Gilissen, P. Geubelle, N. Dupuis [et al.]. – Text : visual // Biochemical pharmacology. – 2015. – Vol. 98, № 3. – P. 381-391.
80. Gee, R.R.F. Regulation of PXR in drug metabolism: chemical and structural perspectives / R.R.F. Gee, A.D. Huber, T. Chen. – Text : visual // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2024. – Vol. 20, № 1-2. – P. 9-23.
81. Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming / Y. Cao, Z. Yao, D. Sarkar [et al.]. – Text : visual // Developmental cell. – 2010. – Vol. 18, № 4. – P. 662-674.
82. Giordani, L. Satellite cell self-renewal / L. Giordani, A. Parisi, F. Le Grand – Text : visual // Current topics in developmental biology. – 2018. – Vol. 126. – P. 177-203.
83. Girardi, F. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration / F. Girardi, F. Le Grand. – Text : visual // Progress in molecular biology and translational science. – 2018. – Vol. 153. – P. 157-179.
84. Glu20Ter variant in PLEC 1f isoform causes limb-girdle muscle dystrophy with lung injury / R.V. Deev, S.N. Bardakov, M.O. Mavlikeev [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Neurology. – 2017. – Vol. 8. – P. 367.
85. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates / M. de C. Fonseca, C.J. Aguiar, J.A. da Rocha Franco [et al.]. – Text : visual // Nephrology (Saint-Petersburg). – 2017. – Vol. 21, № 1. – P. 9-18.
86. G-protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery / D. Hamel, M. Sanchez, F. Duhamel [et al.]. – Text : visual // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 285-293.

87. Grimolizzi, F. Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood / F. Grimolizzi, L. Arranz. – Text : visual // *Haematologica*. – 2018. – Vol. 103, № 10. – P. 1586-1592.
88. Halestrap, A.P. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization / A.P. Halestrap. – Text : visual // *IUBMB Life*. – 2012. – Vol. 64, № 1. – P. 1-9.
89. Hardwick, L.J.A. MyoD phosphorylation on multiple C terminal sites regulates myogenic conversion activity / L.J.A. Hardwick, J.D. Davies, A. Philpott. – Text : visual // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2016. – Vol. 481, № 1-2. – P. 97-103.
90. High glucose-mediated alterations of mechanisms important in myogenesis of mouse C2C12 myoblasts / K. Grzelkowska-Kowalczyk, W. Wieteska-Skrzeczyńska, K. Grabiec [et al.]. – Text : visual // *Cell biology international*. – 2013. – Vol. 37, № 1. – P. 29-35.
91. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases / G.L. Semenza, F. Agani, D. Feldser [et al.]. – Text : visual // *Oxygen sensing: molecule to man*. – 2000. – Vol. 475. – P. 123-130.
92. Hypoxia-inducible factor 1- α induces miR-210 in normoxic differentiating myoblasts / L. Ortiz-Flores, V. Di Stefano, E. Isaia [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, № 53. – P. 44761-44771.
93. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function / J. Gilissen, F. Jouret, B. Pirotte, J. Hanson. – Text : visual // *Pharmacology & therapeutics*. – 2016. – Vol. 159. – P. 56-65.
94. Insight into the molecular function and transcriptional regulation of activator protein 1 (AP-1) components c-Jun/c-Fos ortholog in red lip mullet (*Liza haematocheila*) / N.D. Janson, N. Jehanathan, S. Jung [et al.]. – Text : visual // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2019. – Vol. 93. – P. 597-611.
95. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, № 7527. – P. 431-435.

96. JNK regulates muscle remodeling via myostatin/SMAD inhibition / S.J. Lessard, T.L. MacDonald, P. Pathak [et al.]. – Text : visual // Nature communications. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 3030.
97. Kohout, T.A. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization / T.A. Kohout, R.J. Lefkowitz. – Text : visual // Molecular pharmacology. – 2003. – Vol. 63, № 1. – P. 9-18.
98. Lee, H. Role of l-carnitine and oleate in myogenic differentiation: implications for myofiber regeneration / H. Lee, J.Y. Lim, S.J. Choi. – Text : visual // Journal of exercise nutrition & biochemistry. – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 36.
99. Legerlotz, K. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle / K. Legerlotz, H.K. Smith. – Text : visual // Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine. – 2008. – Vol. 38, № 3. – P. 1087-1100.
100. Lehka, L. Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay / L. Lehka, M.J. Rędownicz. – Text : visual // Seminars in cell & developmental biology (Academic Press). – 2020. – Vol. 104. – P. 81-92.
101. Lipton, B.H. Developmental fate of skeletal muscle satellite cells / B.H. Lipton, E. Schultz. – Text : visual // Science. – 1979. – Vol. 205, № 4412. – P. 1292-1294.
102. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells / J.H. Robben, R.A. Fenton, S.L. Vargas [et al.]. – Text : visual // Kidney international. – 2009. – Vol. 76, № 12. – P. 1258-1267.
103. Locht, C. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit / C. Locht, R. Antoine. – Text : visual // Biochimie. – 1995. – Vol. 77, № 5. – P. 333-340.
104. Locht, C. The History of Pertussis Toxin / C. Locht, R. Antoine. – Text : visual // Toxins. – 2021. – Vol. 13, № 9. – P. 623.
105. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size / J.R. Knapp, J.K. Davie, A. Myer [et al.]. – Text : visual // Development. – 2006. – Vol. 133, № 4. – P. 601-610.

106. Louvi, A. Notch and disease: a growing field / A. Louvi, S. Artavanis-Tsakonas. – Text : visual // *Seminars in cell & developmental biology* (Academic Press). – 2012. – Vol. 23, № 4. – P. 473-480.
107. Ludolph, D.C. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program / D.C. Ludolph, S.F. Konieczny. – Text : visual // *The FASEB Journal*. – 1995. – Vol. 9, № 15. – P. 1595-1595.
108. Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation / B.M.T. Ling, N. Bharathy, T.K. Chung [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109, № 3. – P. 841-846.
109. Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C- β signaling nodes / T.K. Harden, G.L. Waldo, S.N. Hicks, J. Sondek. – Text : visual // *Chemical reviews*. – 2011. – Vol. 111, № 10. – P. 6120-6129.
110. Mechanism of stimulation of myogenesis under the action of succinic acid through the succinate receptor SUCNR1 / Y.V. Abalenikhina, M.O. Isayeva, P.Y. Mylnikov [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – Vol. 89, № 7. – P. 1325-1335.
111. Mechanism of succinate efflux upon reperfusion of the ischaemic heart / H.A. Prag, A.V. Gruszczuk, M.M. Huang [et al.]. – Text : visual // *Cardiovascular research*. – 2021. – Vol. 117, № 4. – P. 1188-1201.
112. Mechanisms of insulin resistance by simvastatin in C2C12 myotubes and in mouse skeletal muscle / G.M. Sanvee, M.V. Panajatovic, J. Bouitbir, S Krähenbühl. – Text : visual // *Biochemical pharmacology*. – 2019. – Vol. 164. – P. 23-33.
113. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis / D.G. Edmondson, G.E. Lyons, J.F. Martin, E.N. Olson. – Text : visual // *Development*. – 1994. – Vol. 120, № 5. – P. 1251-1263.
114. MEF2 impairment underlies skeletal muscle atrophy in polyglutamine disease / S.R. Nath, M.L. Lieberman, Z. Yu [et al.]. – Text : visual // *Acta Neuropathologica*. – 2020. – Vol. 140. – P. 63-80.

115. Mendell, J.R. Immunocytochemical localization studies of myelin basic protein / J.R. Mendell, J.N. Whitaker. – Text : visual // *The Journal of cell biology*. – 1978. – Vol. 76, № 2. – P. 502-511.
116. Micropatterning contractile C2C12 myotubes embedded in a fibrin gel / K. Nagamine, T. Kawashima, T. Ishibashi [et al.]. – Text : visual // *Biotechnology and bioengineering*. – 2010. – Vol. 105, № 6. – P. 1161-1167.
117. Millay, D.P. Regulation of the myoblast fusion reaction for muscle development, regeneration, and adaptations / D. P. Millay. – Text : visual // *Experimental cell research*. – 2022. – Vol. 415, № 2. – P. 113134.
118. Mitochondrial dynamics is a distinguishing feature of skeletal muscle fiber types and regulates organellar compartmentalization / P. Mishra, G. Varuzhanyan, A.H. Pham, D.C. Chan. – Text : visual // *Cell metabolism*. – 2015. – Vol. 22, № 6. – P. 1033-1044.
119. Mitochondrial respiration after one session of calf raise exercise in patients with peripheral vascular disease and healthy older adults / M. van Schaardenburgh, M. Wohlwend, Ø. Rognmo [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 10. – P. 1.
120. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts / J. Sin, A.M. Andres, D.J. Taylor [et al.]. – Text : visual // *Autophagy*. – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 369-380.
121. Modulation of lysine methylation in myocyte enhancer factor 2 during skeletal muscle cell differentiation / J. Choi, H. Jang, H. Kim [et al.]. – Text : visual // *Nucleic acids research*. – 2014. – Vol. 42, № 1. – P. 224-234.
122. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors / A.J. Venkatakrisnan, X. Deupi, G. Lebon [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2013. – Vol. 494, № 7436. – P. 185-194.
123. Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells / D. Hong, H.X. Chen, H.Q. Yu [et al.]. – Text : visual // *Experimental cell research*. – 2010. – Vol. 316, № 14. – P. 2291-2300.

124. MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity / I. Moretti, S. Ciciliot, K.A. Dyar [et al.]. – Text : visual // Nature communications. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 12397.
125. Myf6/MRF4 is a myogenic niche regulator required for the maintenance of the muscle stem cell pool / F. Lazure, D.M. Blackburn, A.H. Corchado [et al.]. – Text : visual // EMBO reports. – 2020. – Vol. 21, № 12. – P. e49499.
126. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy / J.R. Mendell, J.T. Kissel, A.A. Amato [et al.]. – Text : visual // New England Journal of Medicine. – 1995. – Vol. 333, № 13. – P. 832-838.
127. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells / J.W. Sanger, P. Chowrashi, N.C. Shaner [et al.]. – Text : visual // Clin Orthop Relat Res (1976-2007). – 2002. – Vol. 403. – P. S153-S162.
128. Myogenic Differentiation of Stem Cells for Skeletal Muscle Regeneration / D. Yu, Z. Cai, D. Li [et al.]. – Text : visual // Stem Cells International. – 2021. – Vol. 2021, № 1. – P. 8884283.
129. Myogenic progenitor cell transplantation for muscle regeneration following hindlimb ischemia and reperfusion / F. Messner, M. Thurner, J. Müller [et al.]. – Text : visual // Stem cell research & therapy. – 2021. – Vol. 12. – P. 1-15.
130. Myogenin is an essential regulator of adult myofibre growth and muscle stem cell homeostasis / M. Ganassi, S. Badodi, K. Wanders [et al.]. – Text : visual // Elife. – 2020. – Vol. 9. – P. e60445.
131. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size / M. Ganassi, S. Badodi, H.P. Ortuste Quiroga [et al.]. – Text : visual // Nature communications. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 4232.
132. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells / E. Meadows, J.H. Cho, J.M. Flynn, W.H. Klein. – Text : visual // Developmental biology. – 2008. – Vol. 322, № 2. – P. 406-414.
133. Myogenin regulates exercise capacity and skeletal muscle metabolism in the adult mouse / J.M. Flynn, E. Meadows, M. Fiorotto, W.H. Klein. – Text : visual // PloS one. – 2010. – Vol. 5, № 10. – P. e13535.

134. Myotube formation on micro-patterned glass: intracellular organization and protein distribution in C2C12 skeletal muscle cells / D.L. Yamamoto, R.I. Csikasz, Y. Li [et al.]. – Text : visual // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2008. – Vol. 56, № 10. – P. 881-892.
135. N(6)-Methyldeoxyadenosine, a nucleoside commonly found in prokaryotes, induces C2C12 myogenic differentiation / M.P. Charles, J.L. Ravanat, D. Adamski [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2004. – Vol. 314, № 2. – P. 476-482.
136. Nemirovskaya, T.L. Roles of ATP and SERCA in the Regulation of Calcium Turnover in Unloaded Skeletal Muscles: Current View and Future Directions / T.L. Nemirovskaya, K.A. Sharlo. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 13. – P. 6937.
137. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry / A. Brunet, D. Roux, P. Lenormand [et al.]. - Text : visual // *The EMBO journal*. – 1999. – Vol. 18. – P. 664–674.
138. Olson, E.N. MyoD family: a paradigm for development / E.N. Olson – Text : visual // *Genes & Development*. – 1990. – Vol. 4, № 9. – P. 1454-1461.
139. Ostarine-Induced Myogenic Differentiation in C2C12, L6, and Rat Muscles / N. Leciejewska, P.A. Kołodziejcki, M. Sassek [et al.]. – Text : visual // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 8. – P. 4404.
140. Partridge, T.A. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts / T.A. Partridge, M. Grounds, J.C. Sloper. – Text : visual // *Nature*. – 1978. – Vol. 273, № 5660. – P. 306-308.
141. Phenotypic behavior of C2C12 myoblasts upon expression of the dystrophy-related caveolin-3 P104L and TFT mutants / A. Fanzani, E. Stoppani, L. Gualandi [et al.]. – Text : visual // *FEBS letters*. – 2007. – Vol. 581, № 26. – P. 5099-5104.
142. pH-Gated Succinate Secretion Regulates Muscle Remodeling in Response to Exercise / A. Reddy, L.H.M. Bozi, O.K. Yaghi [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2020. – Vol. 831, № 1. – P. 62-75.e17.

143. Pinset, C. Manipulation of medium conditions and differentiation in the rat myogenic cell line L6 / C. Pinset, R.G. Whalen. – Text : visual // *Developmental biology*. – 1984. – Vol. 102, № 2. – P. 269-277.
144. Pluripotent stem cell-derived myogenic progenitors remodel their molecular signature upon in vivo engraftment / T. Incitti, A. Magli, R. Darabi [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Vol. 116, № 10. – P. 4346-4351.
145. PXR is a target of (-)-epicatechin in skeletal muscle / M. Ortiz-Flores, A. Portilla-Martínez, F. Cabrera-Pérez [et al.]. – Text : visual // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6, № 10. – P. e05357.
146. Quercetin glycosides prevent dexamethasone-induced muscle atrophy in mice / Y. Otsuka, K. Egawa, N. Kanzaki [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry and biophysics reports*. – 2019. – Vol. 18. – P. 100618.
147. Ranolazine promotes muscle differentiation and reduces oxidative stress in C2C12 skeletal muscle cells / I. Terruzzi, A. Montesano, P. Senesi [et al.]. – Text : visual // *Endocrine*. – 2017. – Vol. 58, № 1. – P. 33-45.
148. Real-time imaging of myoblast transplantation using the human sodium iodide symporter / M. Bouchentouf, B.F. Benabdallah, M. Dumont [et al.]. – Text : visual // *Biotechniques*. – 2005. – Vol. 38, № 6. – P. 937-942.
149. Regard, J.B. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression / J.B. Regard, I.T. Sato, S.R. Coughlin. – Text : visual // *Cell*. – 2008. – Vol. 135, № 3. – P. 561-571.
150. Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer / E.D. Pozza, I. Dando, R. Pacchiana [et al.]. – Text : visual // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2020. – Vol. 98. – P. 4-14.
151. Riluzole-induced block of voltage-gated Na⁺ current and activation of BKCa channels in cultured differentiated human skeletal muscle cells / Y.J. Wang, M.W. Lin, A.A. Lin, S.N. Wu. – Text : visual // *Life sciences*. – 2008. – Vol. 82, № 1-2. – P. 11-20.

152. Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells / S. Hartwig, S. Raschke, B. Knebel [et al.]. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2014. – Vol. 1844, № 5. – P. 1011-1017.
153. Segalés, J. Regulation of Muscle Stem Cell Functions: A Focus on the p38 MAPK Signaling Pathway / J. Segalés, E. Perdiguero, P. Muñoz-Cánoves. – Text : visual // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2016. – Vol. 4. – P. 91.
154. Selenium alleviates the negative effect of heat stress on myogenic differentiation of C2C12 cells with the response of selenome / Y. Liu, A. He, J. Tang [et al.]. – Text : visual // *Journal of Thermal Biology*. – 2021. – Vol. 97. – P. 102874.
155. Structural basis of the bHLH domains of MyoD-E47 heterodimer / J. Zhong, Z. Jin, L. Jiang [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2022. – Vol. 621. – P. 88-93.
156. Subunit S1 of pertussis toxin: mapping of the regions essential for ADP-ribosyltransferase activity / M. Pizza, A. Bartoloni, A. Prugnola [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – Vol. 85, № 20. – P. 7521-7525.
157. Succinate as a mobilization cue / E.I. Maevsky, A.A. Vasilyeva, M.V. Kozhurin [et al.] – Text : visual // *Cardiometry*. – 2020. – N. 17. – P. 110-120.
158. Succinate as a signaling molecule in the mediation of liver diseases / H. Chen, C. Jin, L. Xie, J. Wu. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2024. – Vol. 1870, № 2. – P. 166935.
159. Succinate causes alpha-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells / Y.H. Li, S.H. Woo, D.H. Choi, E.H. Cho. – Text : visual // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2015. – Vol. 463, № 4. – P. 853-858.
160. Succinate independently stimulates full platelet activation via cAMP and phosphoinositide 3-kinase-beta signaling / C. Hogberg, O. Gidlof, C. Tan [et al.]. – Text : visual // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 9, № 2. – P. 361-372.

161. Succinate induces skeletal muscle fiber remodeling via SUNC1 signaling / T. Wang, Y.Q. Xu, Y.X. Yuan [et al.]. – Text : visual // *EMBO reports*. – 2019. – Vol. 20, № 9. – P. e47892.
162. Succinate induces synovial angiogenesis in rheumatoid arthritis through metabolic remodeling and HIF-1 α /VEGF axis / Y. Li, Y. Liu, C. Wang [et al.]. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 126. – P. 1-14.
163. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α / G.M. Tannahill, A.M. Curtis, J. Adamik [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2013. – Vol. 496, № 7444. – P. 238-242.
164. Succinate modulates Ca(2+) transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway / C.J. Aguiar, V.L. Andrade, E.R. Gomes [et al.]. – Text : visual // *Cell Calcium*. – 2010. - Vol. 47, № 1. – P. 37-46.
165. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney / I. Toma, J.J. Kang, A. Sipos [et al.]. – Text : visual // *The Journal of clinical investigation*. – 2008. – Vol. 118. – P. 2526-2534.
166. Succinate receptor GPR91, a G α (i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC β / L. Sundström, P.J. Greasley, S. Engberg [et al.]. – Text : visual // *FEBS letters*. – 2013. – Vol. 587, № 15. – P. 2399-2404.
167. Succinate reverses in-vitro platelet inhibition by acetylsalicylic acid and P2Y receptor antagonists / B. Spath, A. Hansen, C. Bokemeyer [et al.]. – Text : visual // *Platelets*. – 2012. – Vol. 23, № 1. – P. 60-68.
168. SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes / J.A. van Diepen, J.H. Robben, G.J. Hooiveld [et al.]. – Text : visual // *Diabetologia*. – 2017. – Vol. 60. – P. 1304-1313.
169. Suryawan, A. Regulation of protein degradation pathways by amino acids and insulin in skeletal muscle of neonatal pigs / A. Suryawan, T.A. Davis. – Text : visual // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 8.
170. Szpakowska, M. Closing the ring: a fourth extracellular loop in chemokine receptors / M. Szpakowska, D.P. Bercoff, A. Chevigné. – Text : visual // *Science signaling*. – 2014. – Vol. 7, № 341. – P. pe21-pe21.

171. Tapscott, S.J. MyoD and the regulation of myogenesis by helix-loop-helix proteins / S.J. Tapscott, H. Weintraub. – Text : visual // *The Journal of clinical investigation*. – 1991. – Vol. 87, № 4. – P. 1133-1138.
172. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death / T. Braun, M.A. Rudnicki, H.H. Arnold, R. Jaenisch. – Text : visual // *Cell*. – 1992. – Vol. 71, № 3. – P. 369-382.
173. Taurine Protects C2C12 Myoblasts From Impaired Cell Proliferation and Myotube Differentiation Under Cisplatin-Induced ROS Exposure / L. Zhou, R. Lu, C. Huang, D. Lin. – Text : visual // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – Vol. 8. – P. 685362.
174. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints / R. Fredriksson, M.C. Lagerstrom, L.G. Lundin, H.B. Schiöth. – Text : visual // *Molecular pharmacology*. – 2003. – Vol. 63, № 6. – P. 1256-1272.
175. The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development / D.Z. Wang, M.R. Valdez, J. McAnally [et al.]. – Text : visual // *Development*. – 2001. – Vol. 128, № 22. – P. 4623-4633.
176. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis / M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson. – Text : visual // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 12827.
177. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis / Y. Hakak, K. Lehmann-Bruinsma, S. Phillips [et al.]. – Text : visual // *Journal of Leucocyte Biology*. – 2009. – Vol. 85. – P. 837-843.
178. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis / P. Sapieha, M. Sirinyan, D. Hamel [et al.]. – Text : visual // *Nature medicine*. – 2008. – Vol. 14, № 10. – P. 1067-1076.
179. The wasting-associated metabolite succinate disrupts myogenesis and impairs skeletal muscle regeneration / P.C. Arneson-Wissink, K.A. Hogan, A.M. Ducharme [et al.]. – Text : visual // *JCSM rapid communications*. – 2020. – Vol. 3, № 2. – P. 56-69.
180. Theaflavin Promotes Myogenic Differentiation by Regulating the Cell Cycle and Surface Mechanical Properties of C2C12 Cells / Z. Qu, C. Liu, P. Li [et al.]. – Text :

visual // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68, № 37. – P. 9978-9992.

181. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle / Y. Yang, A. Creer, B. Jemiolo, S. Trappe. – Text : visual // *Journal of applied physiology*. – 2005. – Vol. 98, № 5. – P. 1745-1752.

182. Tolosa, L. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay / L. Tolosa, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechon. – Text : visual // *Protocols in in vitro hepatocyte research*. – 2015. – Vol. 1250. – P. 333-348.

183. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT / P. G. Hogan, L. Chen, J. Nardone, A. Rao. – Text : visual // *Genes & development*. – 2003. – Vol. 17, № 18. – P. 2205-2232.

184. Tretter, L. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis / L. Tretter, A. Patocs, C. Chinopoulos. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2016. – Vol. 1578, № 8. – P. 1086-1101.

185. Triggering the succinate receptor GPR91 enhances pressure overload-induced right ventricular hypertrophy / L. Yang, D. Yu, H.H. Fan [et al.]. – Text : visual // *International journal of clinical and experimental pathology*. – 2014. – Vol. 7, № 9. – P. 5415-5428.

186. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity / T. Rubic, G. Lametschwandtner, S. Jost [et al.]. – Text : visual // *Nature immunology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 1261-1269.

187. Two-dimensional differential adherence and alignment of C2C12 myoblasts / T.M. Patz, A. Doraiswamy, R.J. Narayan [et al.]. – Text : visual // *Materials Science and Engineering: B*. – 2005. – Vol. 123, № 3. – P. 242-247.

188. Type I collagen promotes the migration and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts via the release of interleukin-6 mediated by FAK/NF- κ B p65 activation / X. Liu, Y. Gao, X. Long [et al.]. – Text : visual // *Food & function*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 328-338.

189. Vercellino, I. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain / I. Vercellino, L.A. Sazanov. – Text : visual // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23, № 2. – P. 141-161.
190. Vicente-García, C. Regulation of myogenic gene expression / C. Vicente-García, J.D. Hernández-Camacho, J.J. Carvajal. – Text : visual // *Experimental Cell Research*. – 2022. – Vol. 419, № 1. – P. 113299.
191. Vikhlyantsev, I. Torpor versus interbout arousal: what is more important for protein metabolism and regeneration? / I. Vikhlyantsev. – Text : visual // *Experimental Physiology*. – 2021. – Vol. 106, № 4. – P. 801-802.
192. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells / C.M. Girgis, R.J. Clifton-Bligh, N. Mokbel [et al.]. – Text : visual // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155, № 2. – P. 347-357.
193. Wittenberger, T. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors / T. Wittenberger, H.C. Schaller, S. Hellebrand. – Text : visual // *Journal of molecular biology*. – 2001. – Vol. 307, № 3. – P. 799-813.
194. Wong, C.Y. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage / C.Y. Wong, H. Al-Salami, C.R. Dass. – Text : visual // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2020. – Vol. 72, № 12. – P. 1667-1693.
195. Wu, J. Regulation of myogenic cell proliferation and differentiation during mammalian skeletal myogenesis / J. Wu, B. Yue. – Text : visual // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2024. – Vol. 174. – P. 116563.
196. Yaffe, D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells / D. Yaffe. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1968. – Vol. 61, № 2. – P. 477-483.
197. Yaffe, D. Serial Passaging and Differentiation of Myogenic Cells Isolated from Dystrophic Mouse Muscle / D. Yaffe, O. Saxel. – Text : visual // *Nature*. – 1977. – Vol. 270, № 5639. – P. 725-727.

198. Zammit, P.S. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold / P.S. Zammit, T.A. Partridge, Z. Yablonka-Reuveni. – Text : visual // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 11. – P. 1177-1191.
199. Zhang, X. The importance of ligands for G protein-coupled receptor stability / X. Zhang, R.C. Stevens, F. Xu. – Text : visual // *Trends in biochemical sciences*. – 2015. – Vol. 40, № 2. – P. 79-87.