

УДК 612.74, 577.29, 57.085.23

## ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ МИОТУБ КАК МОДЕЛЬ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЦ *in vitro*: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

### Обзор

© 2021 Т.Ф. Вепхвадзе<sup>1</sup>, А.В. Воротников<sup>2</sup>, Д.В. Попов<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва, Россия; электронная почта: danil-porov@yandex.ru

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, 121552 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.12.2020

После доработки 04.04.2021

Принята к публикации 05.04.2021

Скелетные мышцы составляют более трети массы тела человека и вносят значительный вклад в регуляцию метаболизма в организме. Хроническое уменьшение двигательной активности замедляет метаболизм и снижает функциональные возможности мышц, ведет к нарушению обмена веществ, а также развитию социально значимых заболеваний и снижению уровня и продолжительности жизни. Экспериментальные модели на основе клеток-предшественников, выделяемых из мышечной ткани человека при биопсии и дифференцированных в зрелые волокна *in vitro*, могут быть использованы для решения широкого спектра экспериментальных задач. В обзоре обсуждаются особенности динамики и регуляции миогенеза, имеющие критическое значение для создания адекватной клеточной модели. Основной функцией скелетной мышцы является сокращение, поэтому электростимуляция миотуб представляется перспективным подходом для успешного завершения миогенеза и для моделирования *in vitro* основных процессов, происходящих в скелетной мышце при физических нагрузках. В обзоре анализируются текущие недостатки и возможности оптимизации существующей клеточной модели, а также перспективы её развития для решения фундаментальных задач, связанных с физиологией и биохимией мышечной деятельности, а также изучением механизмов развития метаболических заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** скелетная мышца, физическая нагрузка, сателлитные клетки, миогенез, электростимуляция, метаболизм, экспрессия генов.

**DOI:** 10.31857/S0320972521050080

### ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы составляют более трети массы тела человека и в норме обладают высокой метаболической активностью. В покое они осуществляют до 90% инсулин-зависимого потребления глюкозы [1], дополнительно растущего при физических нагрузках [2]. При низкоин-

тенсивной и продолжительной нагрузке мышечные волокна с высокими окислительными возможностями активно используют жирные кислоты в качестве энергетических субстратов, координируя углеводно-жировой обмен в организме и препятствуя развитию ожирения и инсулинорезистентности как раннего проявления диабетических изменений [1–3]. Хроническое уменьшение двигательной активности снижает метаболизм и функциональные возможности скелетных мышц, приводит к нарушению обмена веществ, развитию ожирения, метаболического синдрома и диабета II типа, усугубляет развитие возрастной саркопении (потери мышечной массы), повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, депрессии и синдрома хронической усталости, а также сокращает продолжительность жизни [4–8].

Принятые сокращения: СК – сателлитные клетки; ЭМГ – электромиограмма; ЭМСК – эмбриональные мышечные стволовые клетки; АМРК – АМР-зависимая протеинкиназа; GLUT4 – инсулин-регулируемый транспортер глюкозы 4; mTORC1 – мишень рапамицина, комплекс 1; MyoG – миогенин; p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38; Pax3/Pax7 – спаренные гомеобоксные транскрипционные факторы 3/7; TNF1 – фактор некроза опухоли 1.

\* Адресат для корреспонденции.

Во время интенсивной сократительной активности мышечные клетки испытывают механическое напряжение, повышается внутримышечная температура, изменяется содержание многих тканевых метаболитов, снижается рН и запасы гликогена. Эти и другие факторы активируют многочисленные сигнальные пути и заметно изменяют транскриптомный профиль (экспрессию сотен генов) в течение нескольких часов восстановления после активности [9, 10]. Во время и после работы скелетные мышцы выделяют множество метаболитов и миокинов, оказывающих эндо-, пара- и аутокринные воздействия [5, 11, 12]. Регулярные аэробные нагрузки (длительные и низкоинтенсивные, энергообеспечение которых идет в основном за счет окислительного фосфорилирования) являются эффективным инструментом для повышения функциональных возможностей скелетных мышц (чувствительности к инсулину, максимальной скорости окисления жиров и углеводов, работоспособности) и профилактики многих заболеваний, включая саркопению, сердечно-сосудистые заболевания и системные метаболические нарушения при диабете II типа [6, 7, 13–15]. У людей нетренированных и с пониженными функциональными возможностями работоспособность ограничена прежде всего низкой окислительной способностью скелетных мышц и их высокой утомляемостью, а не производительностью кислородтранспортной системы [16]. Это подчеркивает важность изучения молекулярных и биохимических механизмов адаптации скелетных мышц к сократительной активности.

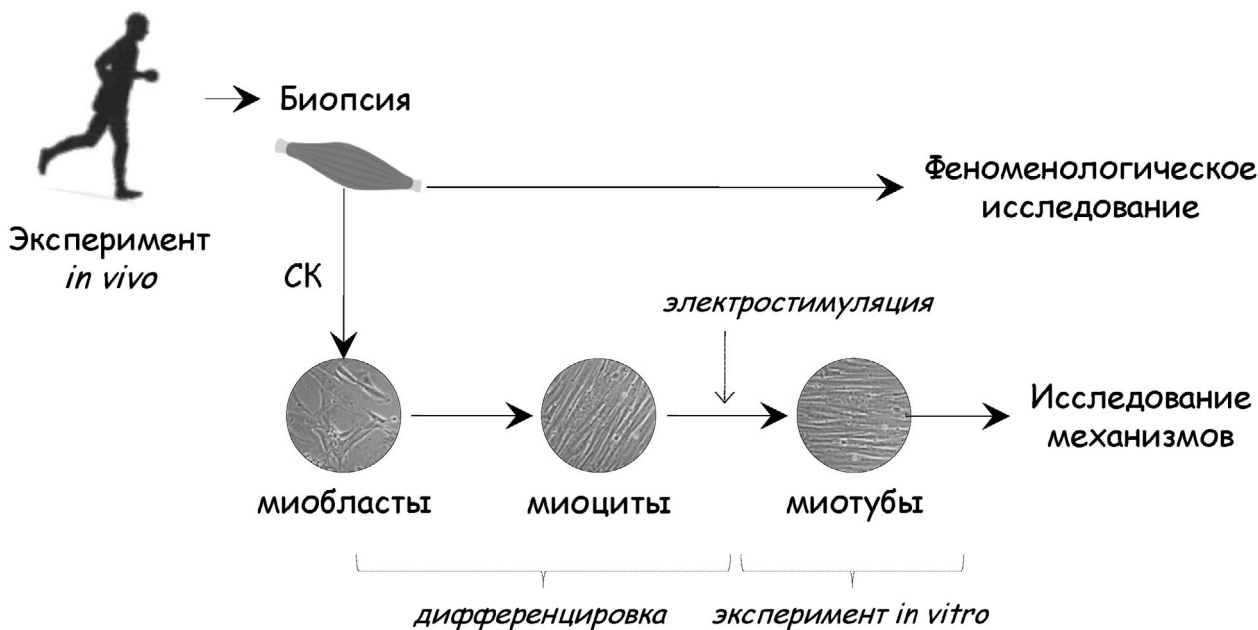
Понимание сути изменений во внутриклеточной сигнализации и профиле экспрессии генов, происходящих в скелетной мышце при однократных и регулярных аэробных упражнениях, важно для поиска оптимальных подходов для профилактики и борьбы с метаболическими нарушениями (на уровне скелетных мышц и организма), а также при восстановлении после ограничения двигательной активности (малоподвижный образ жизни, длительное пребывание на постельном режиме, реабилитация космонавтов после полета и т.д.). Данная информация также важна для поиска эффективных путей увеличения функциональных возможностей скелетных мышц (и организма в целом) у людей с нормальным уровнем двигательной активности и спортсменов, тренирующих выносливость. Несмотря на большое количество исследований в этой области, молекулярные механизмы адаптации скелетной мышцы к аэробным нагрузкам остаются во многом неясными.

Исследования молекулярных и биохимических механизмов адаптации скелетной мышцы с

участием добровольцев *in vivo* связаны с этическими ограничениями: повторяющиеся биопсии мышц, использование фармакологических активаторов, ингибиторов и радиоактивных трейсеров, регуляция экспрессии генов (рис. 1). Применение животных моделей позволяет преодолеть часть ограничений, однако некоторые механизмы адаптации мышц грызунов к физическим нагрузкам отличаются от наблюдаемых у человека. Например, у грызунов в отличие от человека физические нагрузки изменяют соотношение мышечных волокон I и II типов [17, 18], значительно различающихся метаболическим профилем [19]. Помимо этого циркадные ритмы влияют на экспрессию нескольких сотен генов в мышцах грызунов [20, 21] и человека [22]. Это затрудняет сравнение и интерпретацию данных, полученных в разных моделях *in vivo* [23], поэтому использование клеточной модели для изучения механизмов адаптации скелетных мышц представляется оптимальным и может применяться на практике.

Проблема неспособности терминально дифференцированных мышечных клеток к культивированию решается путём выделения из мышечных биопсий сателлитных клеток-предшественников (СК), превращающихся в процессе пролиферации и последующей дифференцировки *in vitro* в функциональные миотубы (рис. 1). СК рассматриваются как «взрослые» стволовые клетки, которые отличаются от эмбриональных мышечных стволовых клеток (ЭМСК) профилем экспрессии транскрипционных факторов и степенью коммитированности. Контролируемый миогенез *in vitro* позволяет использовать СК как исходный материал для создания клеточной модели и решения широкого спектра экспериментальных задач, в том числе для исследования миогенного и регенеративного потенциала этих клеток в норме и при патологическом изменении метаболической активности.

Основной функцией скелетной мышцы является сократительная активность, которая должна быть смоделирована в эксперименте. Скелетная мышца состоит из мышечных волокон, представляющих собой многоядерный синцитий, образуемый при слиянии миоцитов в миотубы. Формирование миотуб, способных к сокращению *in vitro*, зависит от ряда факторов и является отдельной проблемой (см. ниже). Электростимуляция может дать ключ к ее решению, поскольку она служит основным триггером, запускающим сокращение миотуб. При этом происходят изменения внутриклеточной сигнализации, паттерна экспрессии генов, а также клеточного фенотипа. В условиях *in vitro* электростиму-



**Рис. 1.** Два подхода к исследованию молекулярных и биохимических механизмов адаптации сократительной активности мышц. В первом случае (вверху) используются пробы скелетных мышц, взятых до и после какого-либо воздействия или у различных когорт добровольцев (эксперимент *in vivo*) для анализа их феноменологических характеристик (активность ферментов, модификации белков, транскрипционная активность, профили экспрессии и т.п.); экспериментальные манипуляции с донорским материалом при таком подходе практически невозможны. Во втором случае (внизу) из мышечных биопсий выделяют сателлитные клетки, которые далее культивируют *in vitro*; дифференцированные в миотубы клетки доступны для широкого спектра экспериментальных воздействий, включая электростимуляцию, моделирующую различные режимы сократительной активности мышц

ления может инициировать молекулярные события последних стадий миогенеза и формирования функциональных миотуб (рис. 1).

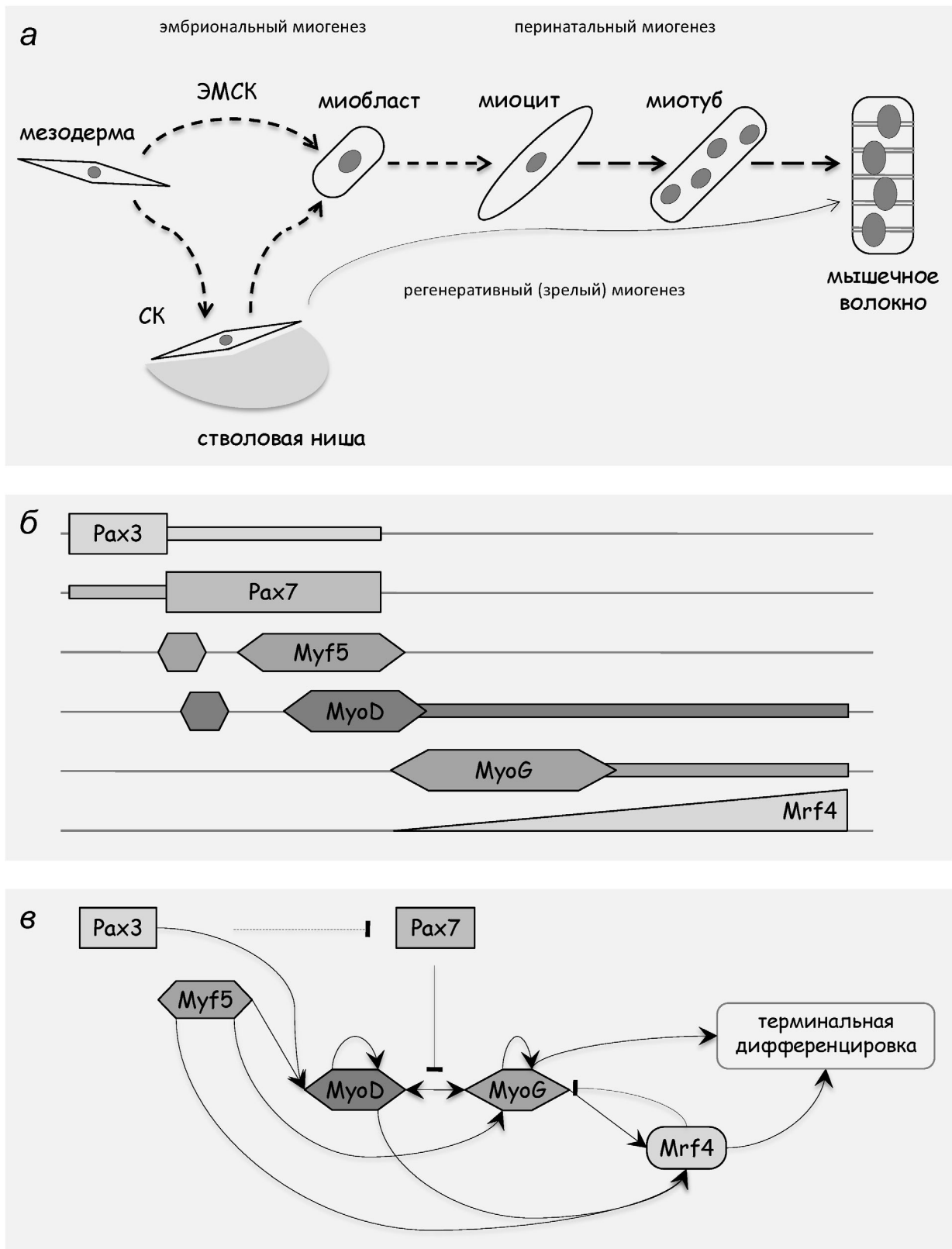
## МИОГЕНЕЗ И САТЕЛЛИТНЫЕ КЛЕТКИ

Миогенез представляет собой процесс формирования мышечных волокон из клеток-предшественников и обновления структур волокон, утрачиваемых в процессе жизнедеятельности. Обычно его разделяют на три фазы (рис. 2, а) [24–27].

Миогенез регулируется рядом транскрипционных факторов, главными на регенеративной стадии считаются 4 классических: Myf5, MyoD, MyoG (миогенин) и Mrf4 (Myf6) [24, 27–30]. Для поддержания стволового состояния и регенеративного потенциала важна работа факторов Pax3/Pax7 [29, 31]. Последовательные изменения уровня экспрессии всех этих факторов (рис. 2, б), инактивация и активация их генов *in vitro* [32], а также данные полногеномных исследований [30] указывают на сложные взаимосвязи между этими факторами и важность их взаимодействия в процессе миогенеза. Они формируют регуляторную сеть с многочисленными

прямыми и обратными связями (рис. 2, в), динамика которой меняется, определяя протекание миогенеза. Динамические изменения Myf5 и Pax3/Pax7 поддерживают СК в стволовом состоянии, MyoD регулирует мобилизацию СК из стволовой ниши, а MyoG участвует в формировании миотуб [24]. Первичная активация ЭМСК связана с падением экспрессии Pax3, индукцией Pax7 и транзитной экспрессией Myf5 и MyoD. Коммитирование ЭМСК в направлении СК обусловлено реактивацией экспрессии Myf5, дальнейшая дифференцировка до миобластов происходит при активации MyoD (рис. 2, б). Повышение уровня MyoG маркирует дифференцировку миобластов в миоциты, Mrf4 координирует формирование миотуб. При этом Pax7 служит базовым маркером СК, и его наличие позволяет контролировать выделение истинных СК из мышечных биопсий и поддержание их в клеточной культуре в виде стволовых клеток [29].

Внешние факторы также играют важную роль в поддержании стволового фенотипа частично коммитированных СК. В условиях *in vitro* они могут быть важными для удержания СК от преждевременной дифференцировки, позволяя провести наращивание культуры путем пролиферации. Как уже отмечено, одним их таких



**Рис. 2.** *а* – Общая схема миогенеза, где условные фазы отражены различными пунктирными стрелками; *б* – профили экспрессии транскрипционных факторов, где высота затемненных фигур отражает уровень экспрессии указанного фактора в момент, соответствующий общей схеме миогенеза; *в* – регуляторные взаимоотношения транскрипционных факторов, где активирующие воздействия показаны стрелками, а ингибирующие – Т-образными связями

факторов является наличие внеклеточного матрикса вокруг клеток, который не только механически имитирует стволовую нишу, но и влияет на доступность для клеток кислорода и питательных веществ, гормонов и цитокинов, а также на способность к формированию межклеточных контактов. Регенеративные свойства и активность СК усиливаются при умеренной гипоксии, но снижаются при жесткой [33]. Это может быть связано с биогенезом митохондрий, активность которых способствует регенеративному миогенезу посредством работы с-Мус и кальциневрина, регулирующих экспрессию MyoD и MyoG [34]. Миогенез нарушается при воспалении под действием воспалительных интерлейкинов, фактора некроза опухолей (TNF $\alpha$ ) и интерферона- $\gamma$  [35]. Сходная картина наблюдается в жировой ткани, когда повышенный воспалительный фон препятствует жировой дифференцировке резидентных клеток-предшественников и играет ключевую роль в развитии инсулинорезистентности и других метаболических нарушений [8]. Анаболические гормоны, такие как инсулин и инсулиноподобный фактор роста 1, гормон роста и андрогены, противодействуют развитию воспаления и активируют синтез мышечных белков, однако их влияние на СК полностью не изучено [35]. При этом инсулин – активатор комплекса mTORC1 (ключевого регулятора синтеза белка) – часто используют как компонент среды для индукции миогенеза СК *in vitro*; напротив, подавление активности mTORC1 блокирует слияние миоцитов, образование и созревание миотуб в клеточных моделях [36]. С другой стороны, повышенное содержание глюкозы в среде ингибирует пролиферацию первичных миобластов мышцы [37] и дифференцировку клеток линии C2C12, влияя на содержание и локализацию MyoD [38, 39] и фактора транскрипции Mlx, регулирующего слияние миотуб [40]. Однако в других работах было показано, что гипергликемия ускоряет дифференцировку клеток C2C12 на фоне сниженной активности АМР-зависимой протеинкиназы (АМРК), ключевого регулятора углеводно-жирового обмена и биогенеза митохондрий, и максимальной скорости дыхания митохондрий [41, 42], а также увеличивала содержание митохондриальных белков в первичных миотубах человека [43]. Еще в одном исследовании различий в перечисленных выше характеристиках первичных миотуб выявлено не было [44]. Таким образом, данные о глюкозозависимой регуляции миогенеза достаточно противоречивы и требуют дополнительных исследований.

Физические контакты с соседними клетками и внеклеточным матриксом претерпевают изме-

нения на разных стадиях миогенеза. На ранней стадии активации ЭМСК запуск сигнального пути Notch и механизма эпителиально-мезенхимального перехода ведет к разрушению межклеточных контактов, опосредованных N-кадгеринами и  $\beta$ -катенином. В результате  $\beta$ -катенин перемещается в ядро, где запускает экспрессию Myf5 [45] и Pax7 [31], коммитируя развитие ЭМСК в мышечном направлении. Переход ЭМСК в СК дополнительно связан с формированием стволовой ниши на поверхности миотуб (или мышечных волокон), когда вокруг СК формируется оболочка внеклеточного матрикса, препятствующая межклеточным контактам и поддерживающая плюрипотентный/стволовой фенотип СК [24]. При этом СК могут делиться как симметрично вдоль волокна с образованием двух дочерних СК, так и асимметрично поперек волокна с образованием дочерней клетки, обеспечивающей регенеративный миогенез. Наконец, восстановление межклеточных контактов вносит критический вклад в слияние дифференцированных миобластов в миотубы или присоединение к мышечным волокнам [45].

Таким образом, использование СК из мышечных биопсий для создания клеточных моделей требует контроля нескольких ключевых этапов миогенеза. Во-первых, это характеристика выделяемых СК по наличию ключевых маркеров этих клеток. Во-вторых, это создание условий для пролиферации СК при сохранении их стволового фенотипа, что может быть достигнуто через ослабление межклеточных взаимодействий или путём регуляции экспрессии факторов транскрипции, таких как Pax7, Myf5 и MyoD. В-третьих, это контроль внешних факторов, включая гормоны для индукции дифференцировки, а также оптимизация клеточного субстрата, например, использование специальных субстратов с микроструктурой (см. ниже). Наконец, это обеспечение слияния миоцитов в миотубы, чему способствует восстановление межклеточных контактов за счет разрыхления внеклеточного матрикса или специфической стимуляции миоцитов. Как обсуждается ниже, применение электростимуляции миоцитов может использоваться как воздействие для ускорения завершения дифференцировки и формирования зрелых многоядерных миотуб.

### КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЫШЦ

Использовать электростимуляцию мышечных клеток в экспериментах *in vitro* начали уже в середине 70-х годов прошлого века. В начале

XXI века было проведено первое исследование с электростимуляцией первичных миотуб человека [46]. Для этого из биопсийной пробы ткани скелетной мышцы были выделены СК, миобласты культивировали и инициировали дифференцировку *in vitro* в миотубы. Такие клеточные модели особенно привлекательны для изучения миогенеза, поскольку позволяют ассоциировать конкретные изменения профиля экспрессии генов с изменениями морфологии и функциональных характеристик клеток. По-видимому, это частично объясняет резкое усиление интереса к этой модели, произошедшее в последнее десятилетие [47, 48].

Обычно миотубы выращивают и стимулируют в чашках Петри с помощью угольных или платиновых электродов, используя биполярные электрические импульсы. Известные протоколы стимуляции [48, 49] можно условно разделить на те, которые моделируют однократную физическую нагрузку (кратковременная стимуляция в течение 5–120 мин) и регулярные тренировки (длительная стимуляция от нескольких часов до двух суток). Клеточная модель электростимуляции миотуб из ткани человека дает несколько важных преимуществ в сравнении с использованием биопсийного материала в экспериментах *in vivo*. Она позволяет:

1. минимизировать влияние циркадных осцилляций;
2. использовать клетки человека, а не иммортализованные линии клеток лабораторных животных, такие как C2C12 или L6;
3. исследовать молекулярные ответы в мышечных клетках, а не в смеси различных клеток;
4. точно дозировать величину сократительной активности;
5. применять широкий набор экспериментальных воздействий (включая активацию или ингибирование экспрессии генов);
6. обеспечивать равномерную и одновременную доставку стимуляторов/ингибиторов.

Длительность стимуляции миотуб варьирует от нескольких минут до нескольких суток, а частота стимуляции от 1 до 100 Гц, что сопоставимо с частотой импульсации мотонейронов *in vivo*. Такая *in vitro* модель мышечной активности хорошо воспроизводит физиологические и молекулярные ответы, регистрируемые после однократной или регулярных аэробных физических нагрузок в скелетной мышце человека [47, 48]. Например, электростимуляция прикрепленных к подложке миотуб вызывает видимые ритмичные сокращения, сопровождающиеся отчетливыми кальциевыми волнами [50–53], приводит к увеличению потребления глюкозы и жирных кислот [54, 55] и снижению

запасов мышечного гликогена. Однократная стимуляция миотуб вызывает сходные с *in vivo* изменения внутриклеточной сигнализации: активацию АМРК и р38 MAP-киназы, увеличение уровня фосфорилирования транскрипционных факторов CREB1 и ATF1, а также усиление секреции миокинов (интерлейкинов, хемокинов семейств CXC, CC и др.) [51, 55–61]. Важно подчеркнуть, что любая стимуляция усиливает экспрессию ключевых генов-регуляторов углеводно-жирового обмена, ангиогенеза и митохондриального биогенеза (*PPARGC1A*, *GABPA*, *ESRRA*, *NR4A3*, *TFAM* и *PDK4*), повышает содержание митохондриальных белков, максимальную скорость дыхания митохондрий и инсулинозависимое потребление глюкозы [54, 55, 59, 62–65]. На основе этих данных можно сделать вывод, что описываемая клеточная модель представляется адекватной для моделирования процессов, происходящих в мышце как при однократных, так и при регулярных аэробных нагрузках.

В большинстве исследований с электростимуляцией миотуб использовались стандартные иммортализованные мышечные линии клеток мышцы C2C12 или крысы L6, а также первичные клетки, полученные из мышц грызунов. В последние годы резко увеличилось число исследований с использованием первичных клеток, полученных из скелетной мышцы человека. Сравнение миотуб иммортализованных миобластов грызунов и первичных миобластов человека выявило множество различий как на уровне базальной экспрессии генов (в частности, кодирующих сократительные белки), так и функциональных возможностей клеток (инсулинозависимое потребление глюкозы и синтез гликогена, максимальная скорость дыхания митохондрий), а также реакций клеток на электростимуляцию (изменение профиля экспрессии генов, потребления глюкозы) [66]. В другом исследовании было показано, что миотубы, полученные из сателлитных клеток человека, демонстрируют менее выраженный сократительный ответ на электростимуляцию по сравнению с миотубами из иммортализованных клеток грызунов. Экспрессия мРНК и различных миокинов в ответ на электростимуляцию в клетках человека также оказалась значительно ниже по сравнению с клетками линии C2C12 [58]. Указанные данные подтверждают, что результаты, полученные на иммортализованных клетках грызунов, следует с осторожностью экстраполировать на человека, подчеркивая важность проведения экспериментов непосредственно на клетках человека.

В ряде работ было продемонстрировано, что миотубы, выращенные из мышц разных доно-

ров, частично сохраняют нативные свойства биопсийной мышечной ткани и по-разному отвечают на электростимуляцию. Учитывая эту информацию, описываемая модель *in vitro* может быть использована для изучения механизмов развития различных патологий, таких как ожирение, диабет II типа и др. Так, миотубы, выращенные из миобластов мышц пациентов, страдающих синдромом хронической усталости, демонстрируют повышенную экспрессию *MyoG* и сниженную секрецию миокина IL-6 по сравнению с клетками, выращенными из мышц здоровых людей того же возраста. После 16 ч стимуляции в этих клетках, в отличие от контрольных, не увеличивался уровень фосфорилирования АМРК, потребления глюкозы и секреции IL-6 [56]. Сходная ситуация наблюдалась и в миотубах, полученных от пациентов с ожирением: стимуляция повышала чувствительность к инсулину только в инсулинорезистентных клетках, при этом приводила к увеличению скорости окисления жиров, повышению содержания митохондрий и экспрессии мРНК IL-6 только в контроле [67]. Активация АМРК в ответ на электростимуляцию (24 ч) была также снижена в миотубах, полученных из мышц людей с ожирением, по сравнению с миотубами, полученными от доноров с нормальной массой тела. Электростимуляция увеличила уровень фосфорилирования белков инсулинового каскада и транслокацию инсулинозависимого транспортера глюкозы, GLUT4, при стимуляции инсулином, однако эти изменения были менее выражены в миотубах от пациентов с ожирением, чем из контрольной группы [68]. Помимо этого, миотубы, полученные из мышечных биопсий тренированных людей, демонстрируют большую скорость окисления жиров и глюкозы по сравнению с миотубами из биопсий людей, ведущих обычный образ жизни [69]. Эти и другие работы с использованием клеточных моделей показывают, что ожирение, возраст и уровень двигательной активности доноров влияют на молекулярные и функциональные характеристики миотуб, причём отличия остаются заметными даже после культивирования и дифференцировки из первичных миобластов [70].

Тот факт, что миотубы, полученные от доноров с разным возрастом, двигательной активностью, окислительным и метаболическим статусом мышц, воспроизводят характерные функциональные и фенотипические различия даёт основания полагать, что этот феномен обусловлен эпигенетическими изменениями, произошедшими в СК до их выделения из тканевых биопсий. В единичных исследованиях описаны изменения паттерна метилирования ДНК миотуб,

происходящие при изменении уровня двигательной активности, ожирении и старении доноров [71–73]. Если особенности фенотипа миотуб обусловлены эпигенетическими характеристиками клеток донора, то возникает вопрос, как долго могут сохраняться эти изменения (например, паттерн метилирования) при культивировании клеток. По нашему мнению, изучение эпигенетических изменений, происходящих при культивировании клеток от разных доноров, может помочь в понимании механизмов, лежащих в основе этого феномена.

### ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРИЧИНЫ НЕСООТВЕТСТВИЙ МОДЕЛИ С РЕЗУЛЬТАТАМИ *in vivo* И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ РАЗВИТИЯ

Многokrратно показано, что в базальном состоянии дифференцированные миотубы и скелетные мышцы значительно различаются по ряду характеристик. Например, в миотубах преимущественно экспрессируются тяжёлые цепи миозина, характерные для быстросокращающихся волокон II типа, а экспрессия GLUT4, наоборот, снижена [70]. На сегодняшний день проведены десятки исследований, посвящённых эффектам кратковременной и длительной электростимуляции миотуб. Анализ их результатов показал, что кратковременная электростимуляция не полностью воспроизводит ключевые молекулярные ответы, наблюдаемые в скелетной мышце после однократной физической нагрузки [47]. Например, электростимуляция не всегда инициирует активацию p38 MAP-киназы, увеличение экспрессии транспортера GLUT4 и его транспортировку на клеточную мембрану, ускорение окисления жиров. Во многих работах молекулярные ответы, возникающие в скелетной мышце после однократной физической нагрузки, были зарегистрированы только после длительной электростимуляции миотуб. Например, 90-мин электростимуляция не активировала экспрессию гена *PPARGC1A*, ключевого регулятора углеводно-жирового обмена, ангиогенеза и биогенеза митохондрий; увеличение экспрессии этого гена происходило только после нескольких серий стимуляции в течение нескольких дней [63]. Ниже будут проанализированы потенциальные причины несоответствия модели электростимуляции миотуб результатам, полученным *in vivo*, а также обсуждены перспективы оптимизации этой модели.

**Паттерн электростимуляции.** В разных исследованиях используются протоколы электростимуляции, значительно различающиеся по дли-

тельности (от нескольких минут до нескольких суток), частоте (от 1 до 100 Гц), типу стимуляции (по силе тока или напряжению), а также паттерну стимуляции [48]. Отчасти это связано с отсутствием четкой методологии и терминологии в этой области и с желанием смоделировать *in vitro* различные эффекты сократительной активности *in vivo* [47]. Известно, что при низкоинтенсивной продолжительной (аэробной) физической нагрузке (десятки минут) в работу вовлечены медленно сокращающиеся мышечные волокна I типа. Они обладают высокой окислительной способностью и активируются мотонейронами с частотой импульсации 5–20 Гц. Энергообеспечение такой работы идет в основном за счет окислительного фосфорилирования с использованием жирных кислот в качестве субстрата. Регулярные упражнения такого типа ведут к увеличению окислительных возможностей мышц, повышению плотности митохондрий и аэробной работоспособности. Напротив, при коротких (от нескольких до десятков секунд) околорекрутационных физических нагрузках рекрутируются волокна II типа, которые активируются мотонейронами с частотой 50–100 Гц и характеризуются быстрой скоростью сокращения. Синтез АТФ при такой работе идет преимущественно за счет аденилаткиназной и креатинкиназной системы и анаэробного гликолиза. Такие регулярные нагрузки ведут к увеличению размеров мышечных волокон тренируемых мышц и их максимальной силы. При этом значимых изменений в окислительных возможностях (и выносливости) мышц не наблюдается. Различия в адаптационных ответах связаны с тем, что физические нагрузки вызывают специфические для них метаболические сдвиги в работающей мышце и крови, связанные с активацией различных сигнальных каскадов и изменением паттернов экспрессии генов и белков [74]. Очевидно, что для адекватного воспроизведения эффектов *in vitro* необходимо хотя бы приблизительно смоделировать режимы сократительной активности мышечных волокон, наблюдаемые *in vivo*.

Вместе с тем используемые протоколы электростимуляции миотуб кардинально отличаются от паттернов сократительной активности, наблюдаемых *in vivo* [48]. Так, во время однократной аэробной локомоторной нагрузки (например, велоэргометрия) работающие скелетные мышцы сокращаются с частотой ~ 1 Гц на протяжении нескольких десятков минут. При этом длительность каждого периода сокращения мышц составляет 400–500 мс. Тем не менее в наиболее популярных протоколах электростимуляции используется совершенно другой

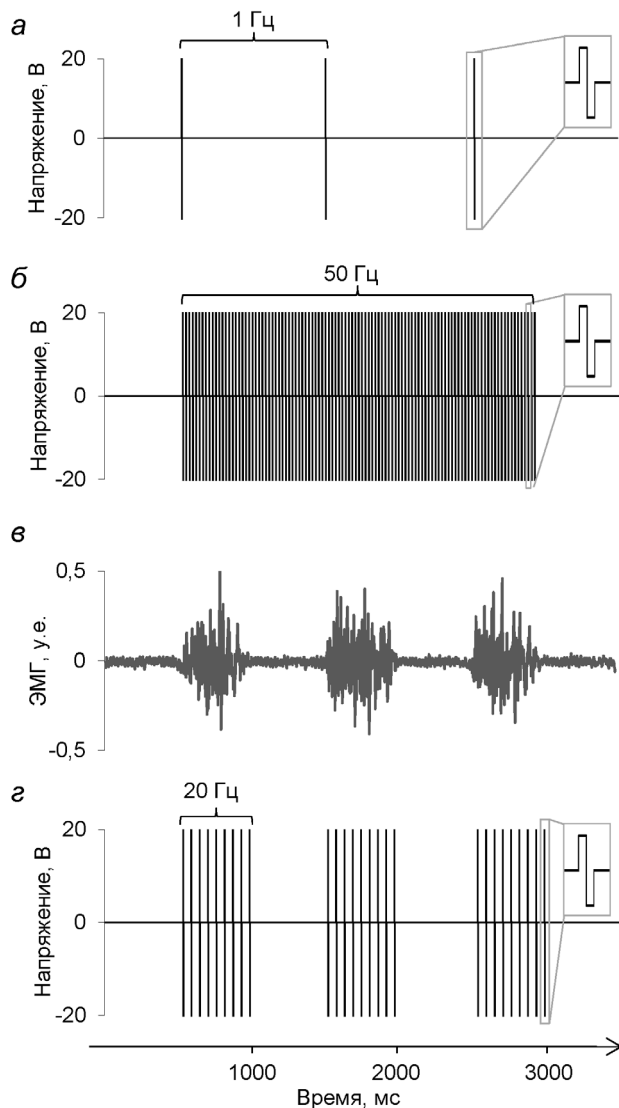
паттерн: стимуляция идет не периодами (пачками), а одиночными импульсами, с частотой 1–100 Гц, что скорее напоминает паттерн сокращения кардиомиоцитов.

Электростимуляция мышечных волокон с частотой 20 Гц, в отличие от 100 Гц, активирует  $Ca^{2+}$ -зависимый сигнальный каскад кальциневрина и транскрипционных факторов NFATC и инициирует транслокацию последних в ядро [75]. NFATC участвуют в регуляции экспрессии специфических регуляторов миогенеза, таких как MyoG, Myf6 и MyoD1, а также играют ключевую роль в регуляции экспрессии тяжелых цепей миозина в мышечных волокнах – этот показатель тесно связан с метаболическими характеристиками клетки [76]. Sciancalepore et al. в качестве образца паттерна стимуляции миотуб использовали электромиограмму, записанную при ритмических мышечных сокращениях *in vivo*. Такой асинхронный режим стимуляции привел к более выраженным внутриклеточным осцилляциям  $Ca^{2+}$  и увеличению количества сокращающихся миотуб по сравнению со стимуляцией с фиксированной частотой 1 или 45 Гц [52]. Однако при таком подходе сложно стандартизовать частоту сокращения миотуб и воспроизводить эксперимент в других лабораториях.

Для моделирования эффектов однократных аэробных упражнений перспективным, на наш взгляд, является протокол, где стимуляция осуществляется каждую секунду пачками по 400–500 мс. При этом используется частота импульсов, типичная для мышечных волокон I типа – до 20 Гц (рис. 3); по сравнению с протоколом стимуляции с частотой 1 Гц суммарное время электростимуляционной активности миотуб (например, за один час) возрастает в 8–10 раз. Можно предположить, что данный подход вызовет дополнительную активацию некоторых сигнальных каскадов. Подобный паттерн электростимуляции уже применялся ранее [64], однако его эффективность не сопоставлялась со стандартными протоколами.

**Продолжительность кратковременной электростимуляции.** Длительность кратковременной электростимуляции миотуб варьирует от нескольких минут до нескольких часов. Важно отметить, что сократительная активность мышц продолжительностью более 1 ч значительно истощает внутримышечные запасы гликогена и триглицеридов *in vivo*. Это может влиять на энергетическое обеспечение работы и приводить к активации специфических сигнальных молекул, например, AMPK [77]. Использовать протоколы кратковременной электростимуляции продолжительностью более часа следует с осторожностью, контролируя истощение этих





**Рис. 3.** Паттерны электростимуляции миотуб и электромиографическая (ЭМГ) активность скелетной мышцы при локомоциях. *а, б* – Электростимуляция с фиксированной частотой 1 и 50 Гц (наиболее популярные паттерны стимуляции); *в* – ЭМГ активность наружной головки четырехглавой мышцы бедра человека при работе на велоэргометре с частотой вращения педалей 1 Гц; *г* – паттерн электростимуляции миотуб, моделирующий сократительную активность волокон скелетной мышцы со следующими параметрами: частота импульсов внутри пачки – 20 Гц (типичная частота разряда медленных мотонейронов), продолжительность периода стимуляции – 500 мс, частота периодов сокращения – 1 Гц

внутриклеточных субстратов и снижение содержания глюкозы в среде.

**Динамика молекулярных ответов после стимуляции.** Активация сигнальных белков, индуцируемых сократительной активностью *in vivo* (таких как CaMK, AMPK, p38 MAPK), наблюдается сразу после окончания нагрузки [74, 78]. Наиболее выраженные изменения экспрессии генов

происходят в течение нескольких часов (до 8 ч) «отдыха», причем большая часть этих генов имеет определенный временной паттерн экспрессии [10, 23, 79]. В подавляющем большинстве исследований молекулярные ответы миотуб регистрировали в один момент времени (как правило, после окончания электростимуляции), и лишь в некоторых работах ответы регистрировали в нескольких временных точках [63–65, 80, 81]. Определение динамики развития молекулярных ответов на кратковременную однократную стимуляцию миотуб важно для сопоставления их специфичности *in vivo* и *in vitro*.

Использование методов широкого охвата, таких как фосфопротеомный и транскриптомный анализ, представляется наиболее перспективным решением этой задачи, поскольку дает возможность одновременно оценить реакции множества сигнальных молекул и генов и сопоставить направленность этих ответов с полученными *in vivo*. Так, представлены примеры исследований динамики фосфопротеома в различных клеточных культурах при стимуляции инсулином [82–86], а также в мышечных клетках сразу после фармакологических воздействий, имитирующих отдельные эффекты сократительной активности [87, 88]. Помимо этого, в нескольких работах изучались изменения транскриптомного профиля сразу после электростимуляции миотуб [51, 89]. Насколько нам известно, только в работе Hoshino et al. был проведен анализ динамики изменений транскриптома, метаболома и уровня фосфорилирования некоторых сигнальных молекул в миотубах линии C2C12 во время и после сократительной активности [90]. В работе проведено сопоставление эффектов непрерывной стимуляции (в течение 1 ч) с частотой 2 и 20 Гц, которое продемонстрировало, что многие молекулярные ответы по направленности совпадают с тем, что должно было происходить в скелетной мышце после сократительной активности. Однако прямого сопоставления с данными *in vivo* не проводилось.

**Протоколы для исследования эффектов хронической сократительной активности.** Периоды повышенной активности скелетной мышцы *in vivo* сочетаются с достаточно продолжительными (несколько часов, сутки) периодами низкой активности или покоя. После однократной аэробной нагрузки в мышце происходит транзиторная активация различных сигнальных каскадов [74, 78], изменяется (преимущественно увеличивается) экспрессия нескольких сотен генов [10, 23, 79], происходит транслокация транспортеров глюкозы (GLUT4) и жиров (CD36) [2, 14], активируется убиквитин-протеасомная система деградации поврежденных белков [91, 92] и уси-

ливаются синтез митохондриальных белков [93–95]. Очевидно, что эти процессы могут зависеть от соотношения АТР, АДФ и АМР в мышечной клетке и модулироваться наличием/отсутствием последующих периодов сократительной активности. Как упоминалось ранее, для моделирования эффектов сократительной активности используют, как правило, протоколы длительной и непрерывной (от нескольких часов до суток) электростимуляции миотуб [48], которые скорее воспроизводят сократительную активность сердца, чем скелетной мышцы. С одной стороны, использование протоколов с непрерывной стимуляцией укорачивает суммарное время воздействия, необходимое для изменения фенотипа (увеличения содержания специфических транспортеров, регуляторных белков, активности окислительных ферментов и митохондриальной плотности). С другой стороны, отсутствие периодов восстановления может оказывать значительное воздействие на скорость и направленность молекулярных ответов и изменений фенотипа. Следует отметить, что эффекты длительной электростимуляции миотуб изучены гораздо меньше, чем эффекты кратковременной стимуляции, а работы по оптимизации протоколов длительной стимуляции отсутствуют.

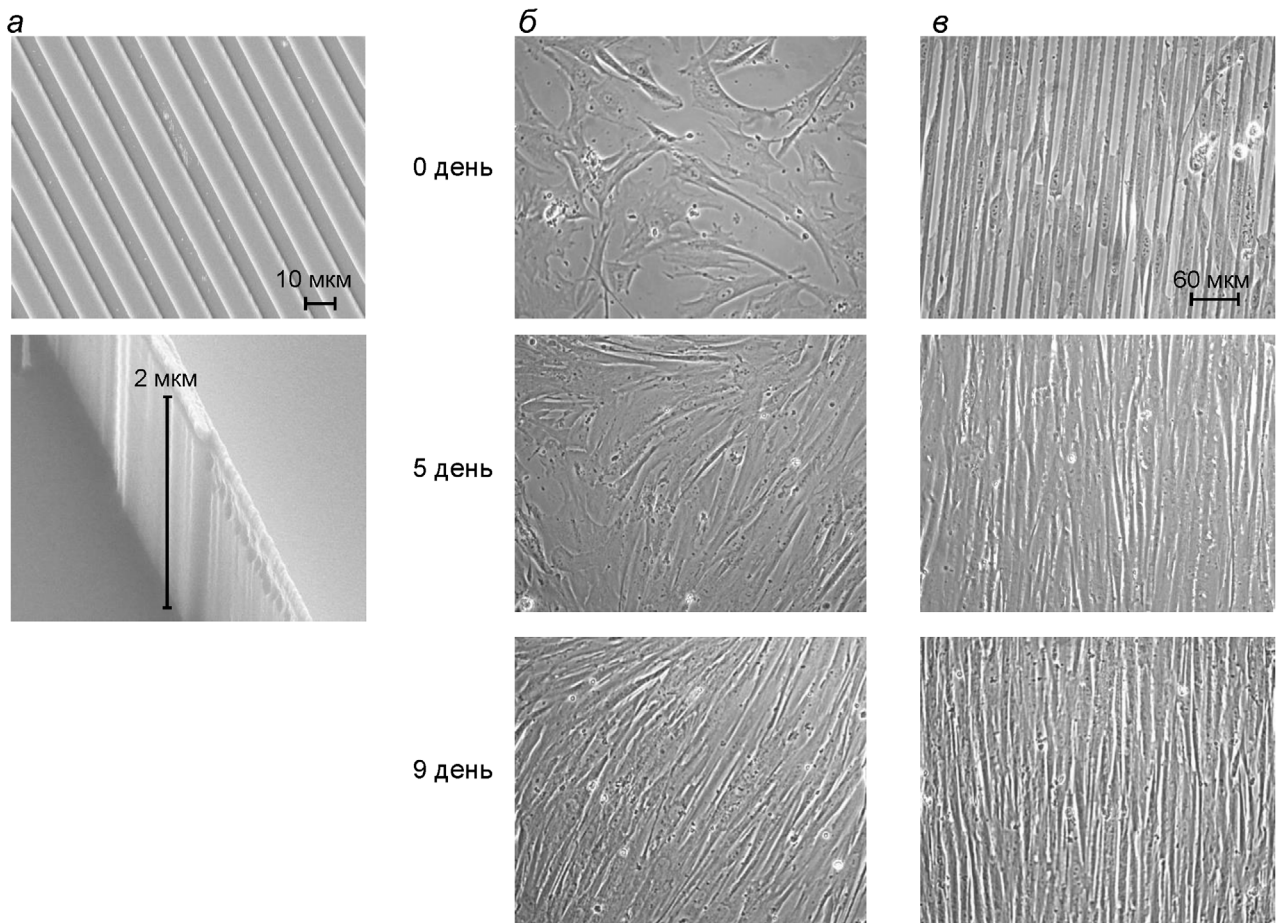
**Степень дифференцировки миотуб.** В разных исследованиях используют различные протоколы культивирования и дифференцировки клеток. До сих пор нет четких и общепризнанных критериев, характеризующих степень созревания миотуб на поздних этапах дифференцировки, что является одной из наиболее острых и нерешенных проблем при сопоставлении результатов исследований. Очевидно, что степень созревания миотуб влияет на функциональные возможности клеток и молекулярные ответы на экспериментальные воздействия [70]. Миотубы, полученные из СК человека, демонстрируют менее выраженный сократительный ответ на электростимуляцию по сравнению с миотубами из иммортализованных клеток грызунов [58], что может быть связано с недостаточной степенью дифференцировки миотуб, полученных из биопсии мышц человека.

Иннервация играет важную роль в созревании мышечных волокон [96], а частота импульсации мотонейрона является ключевым фактором, определяющим тип мышечного волокна [97]. Волокна классифицируются по экспрессии тяжелых цепей миозина, специфических для быстро и медленно сокращающихся волокон. В некоторых работах было отмечено, что при первой электростимуляции сократительный ответ у «дифференцированных» миотуб может отсут-

ствовать; при этом после электростимуляции уже через несколько часов он появляется или значительно усиливается [53, 55, 98, 99], причём наибольший сократительный ответ достигается при частоте стимуляции 1 Гц [53, 55]. Через несколько часов восстановления после 8-часовой электростимуляции (1 Гц) происходит увеличение размеров миотуб и индекса их слияния, снижается экспрессия миостатина и активируется комплекс mTORC1 (оба – анаболические маркеры) [80]. Сходные данные были получены при длительной стимуляции (~1 неделя, 1 или 10 Гц) пучка миотуб (искусственной мышцы) [100, 101]. В совокупности эти данные позволяют рассматривать электростимуляцию как один из подходов к ускорению созревания клеток, который может быть использован на финальных этапах дифференцировки миоцитов в миотубы до проведения основного эксперимента (т.е. и в экспериментальных культурах, и в контроле).

Скорость дифференцировки миобластов зависит от множества факторов, таких как состав среды, условия инкубации, тип используемого субстрата и т.д. Кроме того, этот показатель сильно зависит от наличия упорядоченной микроструктуры на субстрате. Для воспроизведения структуры, характерной для волокон скелетных мышц, было предложено использовать желатиновый гидрогель с параллельными бороздками шириной около 10 мкм [102–105]. Для этого методом «мягкой литографии» изготавливается мастер-форма (рис. 4, а), которую используют для создания штампов из полидиметилсилоксана (ПДМС) [106]. С помощью штампов изготавливают оттки на 10%-ном желатиновом гидрогеле, который затем инкубируют с транслютаминазой для повышения его модуля упругости до значений, сопоставимых с мышечной тканью (10–50 кПа) [107, 108]. Дифференцировка миобластов на таком субстрате (рис. 4, в) оказывает положительное влияние на клеточный цикл, пролиферацию и выживаемость миобластов, увеличивает количество формирующихся миотуб и их размер. При этом обеспечивается более плотная и упорядоченная (параллельная) организация миотуб, что позитивно влияет на их морфологию, степень созревания саркомерного аппарата, экспрессию саркомерных белков и их мРНК [89, 103, 105, 108].

Миобласты, культивируемые на субстратах без микроструктуры, могут отслаиваться во время дифференцировки. Интересно, что использование желатинового гидрогеля с микроструктурой позволяет снизить этот эффект и поддерживать культуру миотуб в течение длительного периода (до 3 недель) [108]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что использование



**Рис. 4.** Пример использования субстрата с микроструктурой для дифференцировки миотуб. *а* – Микрофотография мастер-формы, используемой для создания штампов из ПДМС: сверху представлен общий вид, внизу показана глубина бороздки; *б* и *в* – миотубы человека, дифференцирующиеся на гладком желатиновом субстрате и желатиновом гидрогеле с микроструктурой соответственно на 0-й, 5-й и 9-й день дифференцировки. При использовании микроструктуры, в отличие от гладкого субстрата, все миотубы располагаются упорядоченно вдоль бороздок (Вепхвадзе, Попов, неопубликованные данные). Масштаб – 60 мкм

микроструктур может увеличить выживаемость миотуб в экспериментах с кратковременной и в особенности с длительной электростимуляцией. Любопытно отметить, что для увеличения степени дифференцировки миотуб можно использовать не только субстрат с микроструктурой, но и монослой фибробластов [109].

**Сокультивирование с другими клетками.** Мышечные клетки секретируют миокины, оказывающие эндокринное действие на различные ткани. Миотубы могут быть сокультивированы с клетками других тканей, например, с фибробластами [109], раковыми клетками кишечника [110, 111], адипоцитами [112–114]. Эти исследования убедительно продемонстрировали, что такой подход открывает широкие возможности не только для исследования влияния миокинов, но также и действия цитокинов, секретируемых другими клетками, на миотубы. Учитывая выраженное распространение ожирения и диабета

II типа, проблема взаиморегуляции метаболизма мышечных и жировых клеток привлекает особое внимание. Гипертрофия адипоцитов и жировой ткани вызывает латентное воспаление и приводит к усилению секреции провоспалительных адипокинов, негативно влияя на функционирование различных тканей, в том числе и скелетных мышц [8, 115, 116]. Поскольку секреция миокинов значительно возрастает после сократительной активности, то совместное культивирование адипоцитов с миотубами представляется перспективной моделью для исследования механизмов межтканевой регуляции метаболизма.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Электростимуляция миотуб представляется адекватным методом для моделирования *in vitro*

основных процессов, происходящих в скелетной мышце, как при однократном аэробном упражнении, так и при регулярных аэробных нагрузках. Важно отметить, что миотубы, полученные из СК людей с разным уровнем двигательной активности, разного возраста, а также страдающих ожирением и диабетом II типа, воспроизводят наблюдаемые в условиях *in vivo* различия в некоторых функциональных и фенотипических характеристиках и по-разному отвечают на электростимуляцию. Данный феномен открывает перспективы для изучения молекулярных и биохимических процессов, ассоциированных с различными нарушениями работы скелетной мускулатуры, а также эпигенетических механизмов, ответственных за сохранение специфических характеристик в культуре мышечных клеток от разных доноров.

Один из основных текущих недостатков модели – это неполное соответствие между молекулярными ответами на кратковременную электростимуляцию миотуб и теми, которые характерны для скелетной мышцы после однократной физической нагрузки. Это может быть связано с недостаточной степенью дифференцировки миотуб, особенно полученных из первичных клеток человека. Перспективным подходом для ускорения и стандартизации дифференцировки может быть использование субстратов с упорядоченной микроструктурой в сочетании с электростимуляцией на финальных этапах дифференцировки. Ускорение созревания и повышение выживаемости миотуб особенно важно для экспериментов с длительной электростимуляцией. Наконец, оптимизация паттернов

электростимуляции миотуб также необходима для приведения их в соответствие с паттернами активации мышечных волокон, регистрируемыми *in vivo*.

Для дальнейшей оптимизации и валидации модели необходимо сопоставить динамику молекулярных ответов на сократительную активность в миотубах и в мышце, в том числе с помощью методов широкого охвата, таких как фосфопротеомный, протеомный и транскриптомный анализы. Эффекты длительной электростимуляции пока изучены значительно хуже по сравнению с короткими протоколами; они требуют дополнительной оптимизации. Длинные протоколы электростимуляции моделируют эффекты регулярных физических нагрузок *in vivo*, которые широко применяются для профилактики метаболических нарушений и поддержания работоспособности мышц и организма. Наконец, клеточная модель миотуб позволяет решать задачи, связанные с исследованием механизмов межклеточной регуляции метаболизма при совместном культивировании миотуб с клетками других тканей, в частности с адипоцитами.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00415.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Bjorkman, O., Olsson, M., and Wahren, J. (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus, *J. Clin. Invest.*, **76**, 149-155.
- Sylov, L., Kleinert, M., Richter, E. A., and Jensen, T. E. (2017) Exercise-stimulated glucose uptake – regulation and implications for glycaemic control, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **13**, 133-148.
- Frayn, K. N. (2003) The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective, *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1115-1119.
- Agudelo, L. Z., Femenia, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Gojny, M., et al. (2014) Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression, *Cell*, **159**, 33-45.
- Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**, 457-465.
- Demontis, F., Piccirillo, R., Goldberg, A. L., and Perrimon, N. (2013) The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan, *Aging Cell*, **12**, 943-949.
- Lanza, I. R., Short, D. K., Short, K. R., Raghavakaimal, S., Basu, R., et al. (2008) Endurance exercise as a countermeasure for aging, *Diabetes*, **57**, 2933-2942.
- Vorotnikov, A. V., Stafeev, I. S., Menshikov, M. Y., Shestakova, M. V., and Parfyonova, Y. V. (2019) Latent inflammation and defect in adipocyte renewal as a mechanism of obesity-associated insulin resistance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1329-1345.
- Pillon, N. J., Gabriel, B. M., Dollet, L., Smith, J. A. B., Sardon, P. L., et al. (2020) Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity, *Nat. Commun.*, **11**, 470.
- Makhnovskii, P. A., Bokov, R. O., Kolpakov, F. A., and Popov, D. V. (2021) Transcriptomic signatures and upstream regulation in human skeletal muscle adapted to disuse and aerobic exercise, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1208, doi: 10.3390/ijms22031208.
- Schnyder, S., and Handschin, C. (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 $\alpha$ , myokines and exercise, *Bone*, **80**, 115-125.
- Whitham, M., Parker, B. L., Friedrichsen, M., Hingst, J. R., Hjorth, M., et al. (2018) Extracellular vesicles pro-

- vide a means for tissue crosstalk during exercise, *Cell. Metab.*, **27**, 237-251.
13. Lee, D. C., Brellenthin, A. G., Thompson, P. D., Sui, X., Lee, I. M., and Lavie, C. J. (2017) Running as a key lifestyle medicine for longevity, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **60**, 45-55.
  14. Yoshida, Y., Jain, S. S., McFarlan, J. T., Snook, L. A., Chabowski, A., and Bonen, A. (2013) Exercise- and training-induced upregulation of skeletal muscle fatty acid oxidation are not solely dependent on mitochondrial machinery and biogenesis, *J. Physiol.*, **591**, 4415-4426.
  15. Chambers, T. L., Burnett, T. R., Raue, U., Lee, G. A., Finch, W. H., et al. (2020) Skeletal muscle size, function, and adiposity with lifelong aerobic exercise, *J. Appl. Physiol. (1985)*, **128**, 368-378.
  16. Gifford, J. R., Weavil, J. C., and Nelson, A. D. (2016) Symmorphosis in patients with chronic heart failure? *J. Appl. Physiol. (1985)*, **121**, 1039.
  17. Kovanen, V., and Suominen, H. (1987) Effects of age and life-time physical training on fibre composition of slow and fast skeletal muscle in rats, *Pflugers Arch.*, **408**, 543-551.
  18. Schantz, P. G., and Dhoot, G. K. (1987) Coexistence of slow and fast isoforms of contractile and regulatory proteins in human skeletal muscle fibres induced by endurance training, *Acta Physiol. Scand.*, **131**, 147-154.
  19. Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.*, **91**, 1447-1531.
  20. McCarthy, J. J., Andrews, J. L., McDearmon, E. L., Campbell, K. S., Barber, B. K., et al. (2007) Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle, *Physiol. Genomics*, **31**, 86-95.
  21. Miller, B. H., McDearmon, E. L., Panda, S., Hayes, K. R., Zhang, J., et al. (2007) Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3342-3347.
  22. Perrin, L., Loizides-Mangold, U., Chanon, S., Gobet, C., Hulo, N., et al. (2018) Transcriptomic analyses reveal rhythmic and CLOCK-driven pathways in human skeletal muscle, *Elife*, **7**, e34114, doi: 10.7554/eLife.34114.
  23. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Shagimardanova, E. I., Gazizova, G. R., Lysenko, E. A., et al. (2019) Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **316**, e605-e614.
  24. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., and Rudnicki, M. A. (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a008342, doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
  25. Chal, J., and Pourquie, O. (2017) Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*, *Development*, **144**, 2104-2122.
  26. Tajbakhsh, S. (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis, *J. Intern. Med.*, **266**, 372-389.
  27. Zammit, P. S. (2017) Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **72**, 19-32.
  28. Asfour, H. A., Allouh, M. Z., and Said, R. S. (2018) Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery, *Exp. Biol. Med. (Maywood.)*, **243**, 118-128.
  29. Buckingham, M., and Relaix, F. (2015) PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **44**, 115-125.
  30. Comai, G., and Tajbakhsh, S. (2014) Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **110**, 1-73.
  31. Olguin, H. C., and Pisconti, A. (2012) Marking the tempo for myogenesis: Pax7 and the regulation of muscle stem cell fate decisions, *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 1013-1025.
  32. Hutcheson, D. A., and Kardon, G. (2009) Genetic manipulations reveal dynamic cell and gene functions: Cre-ating a new view of myogenesis, *Cell Cycle*, **8**, 3675-3678.
  33. Chaillou, T., and Lanner, J. T. (2016) Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: effects of oxygen levels on satellite cell activity, *FASEB J.*, **30**, 3929-3941.
  34. Wagatsuma, A., and Sakuma, K. (2013) Mitochondria as a potential regulator of myogenesis, *Sci. World J.*, **2013**, 593267.
  35. Costamagna, D., Costelli, P., Sampaolesi, M., and Penna, F. (2015) Role of inflammation in muscle homeostasis and myogenesis, *Mediators Inflamm.*, **2015**, 805172.
  36. Ge, Y., and Chen, J. (2012) Mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling network in skeletal myogenesis, *J. Biol. Chem.*, **287**, 43928-43935.
  37. Furuichi, Y., Kawabata, Y., Aoki, M., Mita, Y., Fujii, N. L., and Manabe, Y. (2021) Excess glucose impedes the proliferation of skeletal muscle satellite cells under adherent culture conditions, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 640399.
  38. Grabiec, K., Gajewska, M., Milewska, M., Blaszczyk, M., and Grzelkowska-Kowalczyk, K. (2014) The influence of high glucose and high insulin on mechanisms controlling cell cycle progression and arrest in mouse C2C12 myoblasts: the comparison with IGF-I effect, *J. Endocrinol. Invest.*, **37**, 233-245.
  39. Luo, W., Ai, L., Wang, B. F., and Zhou, Y. (2019) High glucose inhibits myogenesis and induces insulin resistance by down-regulating AKT signaling, *Biomed. Pharmacother.*, **120**, 109498.
  40. Hunt, L. C., Xu, B., Finkelstein, D., Fan, Y., Carroll, P. A., et al. (2015) The glucose-sensing transcription factor MLX promotes myogenesis via myokine signaling, *Genes Dev.*, **29**, 2475-2489.
  41. Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E. P., McBurney, M. W., Sauve, A. A., and Sartorelli, V. (2008) Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt, *Dev. Cell*, **14**, 661-673.
  42. Elkalaf, M., Andel, M., and Trnka, J. (2013) Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes, *PLoS One*, **8**, e70772.
  43. Costford, S. R., Crawford, S. A., Dent, R., McPherson, R., and Harper, M. E. (2009) Increased susceptibility to oxidative damage in post-diabetic human myotubes, *Diabetologia*, **52**, 2405-2415.
  44. Aguer, C., Gambarotta, D., Mailloux, R. J., Moffat, C., Dent, R., et al. (2011) Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells, *PLoS One*, **6**, e28536.
  45. Krauss, R. S., Joseph, G. A., and Goel, A. J. (2017) Keep your friends close: cell-cell contact and skeletal myogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9**, a029298.
  46. Aas, V., Torbla, S., Andersen, M. H., Jensen, J., and Rustan, A. C. (2002) Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **967**, 506-515.
  47. Carter, S., and Solomon, T. P. J. (2019) *In vitro* experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments, *Pflugers Arch.*, **471**, 413-429.
  48. Nikolic, N., Gorgens, S. W., Thoresen, G. H., Aas, V., Eckel, J., and Eckardt, K. (2017) Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for *in vitro* exercise – possibilities and limitations, *Acta Physiol. (Oxf)*, **220**, 310-331.
  49. Nikolic, N., and Aas, V. (2019) Electrical pulse stimulation of primary human skeletal muscle cells, *Methods Mol. Biol.*, **1889**, 17-24.

50. Valdes, J. A., Gaggero, E., Hidalgo, J., Leal, N., Jaimovich, E., and Carrasco, M. A. (2008) NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, C715-C725.
51. Sidorenko, S., Klimanova, E., Milovanova, K., Lopina, O. D., Kapilevich, L. V., et al. (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca(2+)-i-mediated and Ca(2+)-i-independent signaling and elevated [Na(+)]i/[K(+)]i ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72-86.
52. Sciancalepore, M., Coslovich, T., Lorenzon, P., Ziraldo, G., and Taccola, G. (2015) Extracellular stimulation with human "noisy" electromyographic patterns facilitates myotube activity, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 349-357.
53. Fujita, H., Nedachi, T., and Kanzaki, M. (2007) Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes, *Exp. Cell Res.*, **313**, 1853-1865.
54. Nikolic, N., Bakke, S. S., Kase, E. T., Rudberg, I., Flo, H., et al. (2012) Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an *in vitro* model of exercise, *PLoS One*, **7**, e33203.
55. Lambernd, S., Taube, A., Schober, A., Platzbecker, B., Gorgens, S. W., et al. (2012) Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways, *Diabetologia*, **55**, 1128-1139.
56. Brown, A. E., Jones, D. E., Walker, M., and Newton, J. L. (2015) Abnormalities of AMPK activation and glucose uptake in cultured skeletal muscle cells from individuals with chronic fatigue syndrome, *PLoS One*, **10**, e0122982.
57. Li, Z., Yue, Y., Hu, F., Zhang, C., Ma, X., et al. (2018) Electrical pulse stimulation induces GLUT4 translocation in C2C12 myotubes that depends on Rab8A, Rab13, and Rab14, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **314**, E478-E493.
58. Chen, W., Nyasha, M. R., Koide, M., Tsuchiya, M., Suzuki, N., et al. (2019) *In vitro* exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes, *Sci. Rep.*, **9**, 11914.
59. Son, Y. H., Lee, S. M., Lee, S. H., Yoon, J. H., Kang, J. S., et al. (2019) Comparative molecular analysis of endurance exercise *in vivo* with electrically stimulated *in vitro* myotube contraction, *J. Appl. Physiol.*, **127**, 1742-1753.
60. Hartwig, S., Raschke, S., Knebel, B., Scheler, M., Irmeler, M., et al. (2014) Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1011-1017.
61. Raschke, S., Eckardt, K., Bjorklund, H. K., Jensen, J., and Eckel, J. (2013) Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells, *PLoS One*, **8**, e62008.
62. Feng, H., Kang, C., Dickman, J. R., Koenig, R., Awoyinka, I., et al. (2013) Training-induced mitochondrial adaptation: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, nuclear factor-kappaB and beta-blockade, *Exp. Physiol.*, **98**, 784-795.
63. Burch, N., Arnold, A. S., Item, F., Summermatter, S., Brochmann Santana, S. G., et al. (2010) Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle, *PLoS One*, **5**, e10970.
64. Silveira, L. R., Pilegaard, H., Kusuhara, K., Curi, R., and Hellsten, Y. (2006) The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 969-976.
65. Beiter, T., Hudemann, J., Burgstahler, C., Niess, A. M., and Munz, B. (2018) Effects of extracellular orotic acid on acute contraction-induced adaptation patterns in C2C12 cells, *Mol. Cell Biochem.*, **448**, 251-263.
66. Abdelmoez, A. M., Sardon, P. L., Smith, J. A. B., Gabriel, B. M., Savikj, M., et al. (2020) Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **318**, C615-C626.
67. Feng, Y. Z., Nikolic, N., Bakke, S. S., Kase, E. T., Guderud, K., et al. (2015) Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an *in vitro* model of exercise, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **308**, C548-C556.
68. Park, S., Turner, K. D., Zheng, D., Brault, J. J., Zou, K., et al. (2019) Electrical pulse stimulation induces differential responses in insulin action in myotubes from severely obese individuals, *J. Physiol.*, **597**, 449-466.
69. Lund, J., Rustan, A. C., Lovsletten, N. G., Mudry, J. M., Langleite, T. M., et al. (2017) Exercise *in vivo* marks human myotubes *in vitro*: training-induced increase in lipid metabolism, *PLoS One*, **12**, e0175441.
70. Gaster, M. (2019) The diabetic phenotype is preserved in myotubes established from type 2 diabetic subjects: a critical appraisal, *APMIS*, **127**, 3-26.
71. Nilsson, E., and Ling, C. (2017) DNA methylation links genetics, fetal environment, and an unhealthy lifestyle to the development of type 2 diabetes, *Clin. Epigenetics*, **9**, 105.
72. Varemö, L., Henriksen, T. I., Scheele, C., Broholm, C., Pedersen, M., et al. (2017) Type 2 diabetes and obesity induce similar transcriptional reprogramming in human myocytes, *Genome Med.*, **9**, 47.
73. Turner, D. C., Gorski, P. P., Maasar, M. F., Seaborne, R. A., Baumert, P., et al. (2020) DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: the role of HOX genes and physical activity, *Sci. Rep.*, **10**, 15360.
74. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J., and Zierath, J. R. (2014) Integrative biology of exercise, *Cell*, **159**, 738-749.
75. Tothova, J., Blaauw, B., Pallafacchina, G., Rudolf, R., Argentini, C., et al. (2006) NFATc1 nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle, *J. Cell Sci.*, **119**, 1604-1611.
76. Ehlers, M. L., Celona, B., and Black, B. L. (2014) NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity, *Cell Rep.*, **8**, 1639-1648.
77. Wojtaszewski, J. F., Mourtzakis, M., Hillig, T., Saltin, B., and Pilegaard, H. (2002) Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 309-316.
78. Popov, D. V. (2018) Adaptation of skeletal muscles to contractile activity of varying duration and intensity: the role of PGC1a, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 613-628.
79. Popov, D. V., Makhnovskii, P. A., Kurochkina, N. S., Lysenko, E. A., Vepkhvadze, T. F., and Vinogradova, O. L. (2018) Intensity-dependent gene expression after aerobic exercise in endurance-trained skeletal muscle, *Biol. Sport*, **35**, 277-289.
80. Tarum, J., Folkesson, M., Atherton, P. J., and Kadi, F. (2017) Electrical pulse stimulation: an *in vitro* exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A proof-of-concept study, *Exp. Physiol.*, **102**, 1405-1413.

81. Valero-Breton, M., Warnier, G., Castro-Sepulveda, M., Deldicque, L., and Zbinden-Foncea, H. (2020) Acute and chronic effects of high frequency electric pulse stimulation on the Akt/mTOR pathway in human primary myotubes, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 565679.
82. Humphrey, S. J., Yang, G., Yang, P., Fazakerley, D. J., Stockli, J., et al. (2013) Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2, *Cell Metab.*, **17**, 1009-1020.
83. Humphrey, S. J., Azimifar, S. B., and Mann, M. (2015) High-throughput phosphoproteomics reveals *in vivo* insulin signaling dynamics, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 990-995.
84. Sacco, F., Humphrey, S. J., Cox, J., Mischnik, M., Schulte, A., et al. (2016) Glucose-regulated and drug-perturbed phosphoproteome reveals molecular mechanisms controlling insulin secretion, *Nat. Commun.*, **7**, 13250.
85. Li, J., Li, Q., Tang, J., Xia, F., Wu, J., and Zeng, R. (2015) Quantitative Phosphoproteomics revealed glucose-stimulated responses of islet associated with insulin secretion, *J. Proteome Res.*, **14**, 4635-4646.
86. Tang, J. S., Li, Q. R., Li, J. M., Wu, J. R., and Zeng, R. (2017) Systematic synergy of glucose and GLP-1 to stimulate insulin secretion revealed by quantitative phosphoproteomics, *Sci. Rep.*, **7**, 1018.
87. Hoffman, N. J., Parker, B. L., Chaudhuri, R., Fisher-Wellman, K. H., Kleinert, M., et al. (2015) Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise-regulated kinases and AMPK substrates, *Cell Metab.*, **22**, 922-935.
88. Needham, E. J., Humphrey, S. J., Cooke, K. C., Fazakerley, D. J., Duan, X., et al. (2019) Phosphoproteomics of acute cell stressors targeting exercise signaling networks reveal drug interactions regulating protein secretion, *Cell Rep.*, **29**, 1524-1538.
89. Denes, L. T., Riley, L. A., Mijares, J. R., Arboleda, J. D., McKee, K., et al. (2019) Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels accelerates myotube maturation, *Skelet. Muscle*, **9**, 17.
90. Hoshino, D., Kawata, K., Kunida, K., Hatano, A., Yugi, K., et al. (2020) Trans-omic analysis reveals ROS-dependent pentose phosphate pathway activation after high-frequency electrical stimulation in C2C12 myotubes, *iScience*, **23**, 101558.
91. Stefanetti, R. J., Lamon, S., Wallace, M., Vendelbo, M. H., Russell, A. P., and Vissing, K. (2015) Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training, *Pflugers Arch.*, **467**, 1523-1537.
92. Pagano, A. F., Py, G., Bernardi, H., Candau, R. B., and Sanchez, A. M. (2014) Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **46**, 1314-1325.
93. Wilkinson, S. B., Phillips, S. M., Atherton, P. J., Patel, R., Yarasheski, K. E., et al. (2008) Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle, *J. Physiol.*, **586**, 3701-3717.
94. Donges, C. E., Burd, N. A., Duffield, R., Smith, G. C., West, D. W., et al. (2012) Concurrent resistance and aerobic exercise stimulates both myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in sedentary middle-aged men, *J. Appl. Physiol. (1985.)*, **112**, 1992-2001.
95. Di Donato, D. M., West, D. W., Churchward-Venne, T. A., Breen, L., et al. (2014) Influence of aerobic exercise intensity on myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in young men during early and late postexercise recovery, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **306**, E1025-E1032.
96. Midrio, M. (2006) The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **98**, 1-21.
97. Salmons, S., and Sreter, F. A. (1976) Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type, *Nature*, **263**, 30-34.
98. Ferrari, M. B., Podugu, S., and Eskew, J. D. (2006) Assembling the myofibril: coordinating contractile cable construction with calcium, *Cell Biochem. Biophys.*, **45**, 317-337.
99. Nedachi, T., Fujita, H., and Kanzaki, M. (2008) Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1191-E1204.
100. Khodabukus, A., Madden, L., Prabhu, N. K., Koves, T. R., Jackman, C. P., et al. (2019) Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle, *Biomaterials*, **198**, 259-269.
101. Park, H., Bhalla, R., Saigal, R., Radisic, M., Watson, N., et al. (2008) Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 279-287.
102. Shimizu, K., Fujita, H., and Nagamori, E. (2009) Alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes using linear micropatterned surfaces ground with abrasives, *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 631-638.
103. Huang, N. F., Lee, R. J., and Li, S. (2010) Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning, *Am. J. Transl. Res.*, **2**, 43-55.
104. Huang, N. F., Thakar, R. G., Wong, M., Kim, D., Lee, R. J., and Li, S. (2004) Tissue engineering of muscle on micropatterned polymer films, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, **2004**, 4966-4969.
105. Huang, N. F., Patel, S., Thakar, R. G., Wu, J., Hsiao, B. S., et al. (2006) Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers, *Nano. Lett.*, **6**, 537-542.
106. Букатин А. С., Мухин И. С., Малышев Е. И., Кухтевич И. В., Евстапов А. А., Дубина М. В. (2016) Особенности формирования микроструктур с высоким аспектным соотношением при изготовлении полимерных микрофлюидных чипов для исследования единичных живых клеток *in vitro*, *Журнал технической физики*, **86**, 125-130.
107. Suh, G. C., Bettadapur, A., Santoso, J. W., and McCain, M. L. (2017) Fabrication of micromolded gelatin hydrogels for long-term culture of aligned skeletal myotubes, *Methods Mol. Biol.*, **1668**, 147-163.
108. Bettadapur, A., Suh, G. C., Geisse, N. A., Wang, E. R., Hua, C., et al. (2016) Prolonged culture of aligned skeletal myotubes on micromolded gelatin hydrogels, *Sci. Rep.*, **6**, 28855.
109. Cooper, S. T., Maxwell, A. L., Kizana, E., Ghoddusi, M., Hardeman, E. C., et al. (2004) C2C12 co-culture on a fibroblast substratum enables sustained survival of contractile, highly differentiated myotubes with peripheral nuclei and adult fast myosin expression, *Cell Motil. Cytoskelet.*, **58**, 200-211.
110. Lautaoja, J. H., Pekkala, S., Pasternack, A., Laitinen, M., Ritvos, O., and Hulmi, J. J. (2020) Differentiation of murine C2C12 myoblasts strongly reduces the effects of myostatin on intracellular signaling, *Biomolecules*, **10**, 695, doi: 10.3390/biom10050695.
111. Pekkala, S., Keskitalo, A., Kettunen, E., Lensu, S., Nykanen, N., et al. (2019) Blocking activin receptor ligands is not sufficient to rescue cancer-associated gut microbiota—a role for gut microbial flagellin in colorectal cancer and cachexia? *Cancers. (Basel)*, **11**, 1799, doi: 10.3390/cancers11111799.
112. Pandurangan, M., Jeong, D., Amna, T., Van, B. H., and Hwang, I. (2012) Co-culture of C2C12 and 3T3-L1 preadipocyte cells alters the gene expression of calpains, caspases and heat shock proteins, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **48**, 577-582.

113. Pandurangan, M., and Hwang, I. (2014) Application of cell co-culture system to study fat and muscle cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 7359-7364.
114. Takegahara, Y., Yamanouchi, K., Nakamura, K., Nakano, S., and Nishihara, M. (2014) Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner, *Exp. Cell Res.*, **324**, 105-114.
115. Collins, K. H., Herzog, W., MacDonald, G. Z., Reimer, R. A., Rios, J. L., et al. (2018) Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity, *Front. Physiol.*, **9**, 112.
116. Stafeev, I., Podkuychenko, N., Michurina, S., Sklyanik, I., Panevina, A., et al. (2019) Low proliferative potential of adipose-derived stromal cells associates with hypertrophy and inflammation in subcutaneous and omental adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus, *J. Diabetes Complicat.*, **33**, 148-159.

## ELECTRICAL STIMULATION OF CULTURED MYOTUBES *in vitro* AS A MODEL OF SKELETAL MUSCLE ACTIVITY: AN UPDATE AND PERSPECTIVES

### Review

T. F. Vepkhvadze<sup>1</sup>, A. V. Vorotnikov<sup>2</sup>, and D. V. Popov<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution of Science State Scientific Center of the Russian Federation Institute of Biomedical Problems of the Russia Academy of Sciences, 123007 Moscow, Russia; E-mail: danil-popov@yandex.ru

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Skeletal muscle tissue comprises more than a third of the human body mass and makes a critical contribution to the regulation of metabolism in the organism. Chronic inactivity reduces metabolic activity and functional capabilities of muscles, leads to metabolic disorders, the development of common diseases, and reduces the quality and duration of life. Cell models based on progenitor cells isolated from human muscle biopsies and differentiated into mature fibers *in vitro* can be used to solve a wide range of experimental tasks. The review discusses the features of the dynamics and regulation of myogenesis, which are important for the creation of an adequate cell model. The main function of skeletal muscle is contraction; therefore, electrical stimulation seems to be important both for the successful completion of myogenesis and for *in vitro* modeling of the main processes induced in skeletal muscle by acute and regular physical exercise. The review analyzes current drawbacks and possibilities of optimizing this cellular model, as well as the prospects for its development for solving fundamental problems related to the physiology and biochemistry of muscle, and understanding the cellular and molecular mechanisms of metabolic diseases.

**Keywords:** skeletal muscle, physical exercise, satellite cells, myogenesis, electrical stimulation, metabolism, gene expression