



Rozprawa doktorska

**Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces
miogenezy w kierunku otrzymywania mięsa technikami *in
vitro***

mgr inż. Karolina Zygmunt

Praca wykonana pod kierunkiem
Promotor prof. dr hab. Katarzyny Piórkowskiej
oraz Promotora Pomocniczego dr inż. Wojciecha Witarskiego

Kraków, 2026

Serdeczne podziękowania kieruję do Promotora – Pani prof. dr hab. Katarzyny Piórkowskiej za opiekę naukową, wsparcie, przekazaną wiedzę, poświęcony czas, życzliwość i cierpliwość podczas realizacji pracy doktorskiej.

Pragnę serdecznie podziękować również Promotorowi Pomocniczemu – Panu dr inż. Wojciechowi Witarowskiemu za opiekę naukową, przekazaną wiedzę, cenne wskazówki, wsparcie, cierpliwość i poświęcony czas podczas realizacji pracy doktorskiej.

Podziękowania kieruję również do wszystkich Współpracowników z Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt oraz do Kierownika Zakładu – Pani prof. dr hab. Katarzyny Ropki-Molik za okazaną pomoc i życzliwość.

Szczególnie dziękuję Pani dr inż. Angelice Mąsior za motywację, cenne rady i wskazówki oraz okazaną pomoc w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Szczere podziękowania kieruję również do wszystkich osób, z którymi miałam możliwość współpracy przez ostatnie kilka lat – szczególnie dziękuję Panu dr hab. Tomaszowi Ząbkowi, prof. IZ i Panu dr inż. Kacprowi Żukowskiemu – za okazaną pomoc i cenne rady.

Szczególnie dziękuję moim Najbliższym za codzienne wsparcie i motywację. Dziękuję za wszystko.

Spis treści

Spis treści	3
Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	6
Źródło finansowania badań	7
Wykaz skrótów.....	8
1. Streszczenie rozprawy doktorskiej	10
1.1. Wersja polskojęzyczna streszczenia.....	10
1.2. Wersja angielskojęzyczna streszczenia	12
2. Wstęp.....	14
2.1. Mięso komórkowe jako uzupełnienie dla tradycyjnej hodowli mięsa	14
2.2. Źródło komórek o potencjale miogennym.....	16
2.3. Mięśniowe komórki satelitarne i przebieg procesu miogenezy.....	17
2.4. Ograniczenia w stosowaniu pierwotnych linii komórkowych w technologii mięsa komórkowego	18
2.5. Skład i ekonomiczność pożywek hodowlanych	19
2.6. Systemy hodowli - hodowle dwuwymiarowe i trójwymiarowe w kontekście bioinżynierii tkanki mięśniowej	20
2.7. Fibroblasty – komórki tkanki łącznej - jako potencjalny modulator miogenezy	21
2.8. Odtworzenie procesu miogenezy w warunkach <i>in vitro</i> jako istotne narzędzie bioinżynierii.....	22
3. Cele pracy i hipotezy badawcze	23
4. Wykaz i streszczenie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	24
5. Materiały i metody	27
5.1. Ocena wpływu składu pożywki hodowlanej na poziom proliferacji bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych	27
5.1.1. Wyprowadzenie pierwotnej linii mięśniowych komórek satelitarnych.....	27
5.1.2. Wybór badanych komponentów pożywki hodowlanej.....	27
5.1.3. Ocena tempa proliferacji komórek mięśniowych wraz z przyżyciowymi analizami mikroskopowymi	28
5.1.4. Analiza statystyczna i analiza DOE	29
5.1.5. Analiza względnej ekspresji genów markerowych procesu miogenezy	29
5.1.6. Analiza statystyczna względnej ekspresji genów markerowych	30

5.2 Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych w hodowli 2D	30
5.2.1 Wyprowadzenie pierwotnej linii fibroblastów bydlęcych	30
5.2.2 Kokultura mięśniowych komórek satelitarnych i fibroblastów	30
5.2.3. Analiza transkryptomu	31
5.2.4. Analiza bioinformatyczna	31
5.2.5 Walidacja wyników sekwencjowania	32
5.2.6 Analiza tempa proliferacji komórek mięśniowych	32
5.2.7 Analizy proteomiczne	32
5.2.8. Analizy statystyczne	33
5.3. Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych w hodowli w naczyniu typu <i>spinner flask</i>	34
5.3.1 Wyprowadzenie linii mięśniowych komórek satelitarnych i fibroblastów	34
5.3.2. Hodowla mięśniowych komórek satelitarnych w bioreaktorach typu <i>spinner flask</i>	34
5.3.3. Ilościowe analizy metaboliczne	35
5.3.4. Analiza ekspresji genów markerowych	35
5.3.5. Analizy proteomiczne	36
5.3.6. Analiza statystyczna	36
6. Wyniki i dyskusja	37
6.1. Ocena wpływu składu pożywki hodowlanej na poziom proliferacji bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych	37
6.2. Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych w hodowli dwuwymiarowej	42
6.2.1 Analiza transkryptomu MuSCs hodowanych w kokulturze z fibroblastami	42
6.2.2. Analiza względnej ekspresji genów z rodziny PAX i MRF metodą qPCR	44
6.2.3 Analiza tempa proliferacji mięśniowych komórek satelitarnych	45
6.2.4. Analiza markerów miogenezy – miozyny i synekanu-4 - na poziomie białkowym	46
6.3 Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych w hodowli w naczyniu typu <i>spinner flask</i>	49
6.3.1. Analiza warunków hodowlanych – obserwacje mikroskopowe oraz analizy metaboliczne	49
6.3.2. Izolacja komórek mięśniowych od fibroblastów metodą FACS	51
6.3.3. Analiza ekspresji markerów miogenezy	51

7. Wnioski	54
8. Ograniczenia i przyszłe kierunki badań	55
9. Bibliografia.....	56
10. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia współautorów	63

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej zostały zawarte w następujących publikacjach naukowych:

P1. Zygmunt K, Otwinowska-Mindur A, Piórkowska K, Witarski W. Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation. *Animals*. 2023; 13(11):1855. <https://doi.org/10.3390/ani13111855>

MEIN₂₀₂₃= 100 IF₂₀₂₄=2.7

Wkład autorski Zygmunt K.: Udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy i w opracowaniu metodologii, przeprowadzenie analiz, udział w analizie statystycznej wyników, zarządzanie otrzymanymi danymi, wizualizacja wyników, wiodące przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu.

P2. Zygmunt K, Żukowski K, Piórkowska K, Smołucha G, Wierzbicka A, Witarski W. Paracrine effect of fibroblasts on the proliferation and differentiation of bovine satellite cells in vitro. *Biochimie*. 2026; 241:26-43. doi:10.1016/j.biochi.2025.11.006

MEIN₂₀₂₆= 100 IF₂₀₂₆=3.0

Wkład autorski Zygmunt K.: Udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy i w opracowaniu metodologii, przeprowadzenie analiz i walidacja, częściowa analiza statystyczna wyników, zarządzanie otrzymanymi danymi, wizualizacja wyników, nadzór nad przebiegiem badań, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu.

P3. Zygmunt K., Piórkowska K., Adamiak J., Witarski W. Modulation of Bovine Muscle Satellite Cells Myogenesis by Paracrine Fibroblast-Derived Signaling in Three-Dimensional Spinner Flask Culture System. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2026. 197-198; 106970. doi.org/10.1016/j.biocel.2026.106970

MEIN₂₀₂₆= 100 IF₂₀₂₆= 2.8

Wkład autorski Zygmunt K.: Udział w opracowaniu założeń koncepcyjnych pracy i w opracowaniu metodologii, przeprowadzenie analiz i walidacja, analiza statystyczna wyników, zarządzanie otrzymanymi danymi, wizualizacja wyników, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, częściowe pozyskanie funduszy na badania i zarządzanie projektem.

Źródło finansowania badań

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej realizowane były w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki:

Miniatura 5, pt. „Wpływ kompozycji komórkowej mięsa, hodowanego w warunkach *in-vitro*, na zawartość składników odżywczych”,
numer: 2021/05/X/NZ9/01365,
kierownik: dr inż. Wojciech WitarSKI
okres realizacji: 12.2021-06.2023

Ponadto, koszt wyprowadzenia pierwotnych linii bydlęcych fibroblastów i mięśniowych komórek satelitarnych oraz ich charakterystyka (wykorzystanych w publikacji nr 3) został zrealizowany w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki:

Preludium 22, pt. „Wpływ fibroblastowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na modulację procesów miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych: w kierunku otrzymywania mięsa technikami *in-vitro*”,
numer: 2023/49/N/NZ9/02189,
kierownik: mgr inż. Karolina Zygmunt,
okres realizacji: 02.2024-02.2027

Wykaz skrótów

AIC – (ang. akaike information criterion) kryterium informacyjne akaiego
ANK3 – ang. ankyrin-3
BCA – (ang. bicinchoninic acid assay) metoda kwasu bicinchoninowego
bFGF – (ang. basic fibroblasts growth factor) zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BHLHA15 – ang. basic helix-loop-helix family member a15
BIC – (ang. bayesian information criterion) bayesowskie kryterium informacyjne
BMP – ang. bone morphogenetic protein
BSA – (ang. bovine serum albumin) albumina surowicy bydlęcej
CALCRL – ang. calcitonin receptor-like
CAV1 – ang. caveolin-1
CLAHE (ang. contrast limited adaptive histogram equalization)
CRYAB – ang. crystallin alpha B
DAPI - (4',6)-diamidyno-(2)-fenyloindol
DCN – ang. decorin
dCO₂ (ang. dissolved carbon dioxide) rozpuszczony dwutlenek węgla
DEGs – (ang. differentially expressed genes) geny o zróżnicowanej ekspresji
DES – ang. desmin
DMEM – (ang. Dulbecco's modified Eagle medium) zmodyfikowana pożywka Dulbecco Eagle
DMSO – (ang. dimethyl sulfoxide) dimetylosulfotlenek
DO – (ang. dissolved oxygen) tlen rozpuszczony
DOE – (ang. design of experiments)
ECM – (ang. extracellular matrix) macierz zewnątrzkomórkowa
EGF – (ang. epidermal growth factor) epidermalny czynnik wzrostu
EGR1 – ang. early growth response 1
ESCs - (ang. embryonic stem cells) embrionalne komórki macierzyste
EVs - (ang. extracellular vesicles) pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
EYA2 – ang. eyes absent homolog 2
FAP – (ang. fibroadipogenic progenitors) progenitory fibroadipogenne
FBS – (ang. fetal bovine serum) bydlęca surowica płodowa
FGF – (ang. fibroblasts growth factor) czynnik wzrostu fibroblastów
FGF-2 – (ang. fibroblast growth factor 2)
FLNC – ang. filamin C
FOXS1 – ang. forkhead
GDF15 – ang. growth/differentiation factor 15
GEO – (ang. Gene Expression Omnibus)
GO - (ang. Gene Ontology) analiza wzbogacenia genów
HDAC4 – ang. histone deacetylase 9
HEPES – 4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazynoetanowy kwas sulfonowy
HES1 – ang. hes family BHLH transcription factor 1
HOMER1 – ang. homer scaffold protein 1
HS – (ang. horse serum) surowica końska

IGF-1 – (ang. insulin-like growth factor 1) insulinopodobny czynnik wzrostu 1
 IL6 – ang. interleukin 6
 iPSCs– (ang. induced pluripotent stem cells) indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
 ITGA7 – ang. integrin 7 alpha
 KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
 LMOD1 – ang. leiomodulin 1
 MACS- (ang. magnetic activated cell sorting) magnetyczne sortowanie komórek
 MRF – (ang. myogenic regulatory factors) miogeniczne czynniki regulacyjne
 MSC - (ang. mesenchymal stem cells) mezenchymalne komórki macierzyste,
 MuSCs – (ang. muscle satellite cells) mięśniowe komórki satelitarne
 MYOM1 – ang. myomesin 1
 MYORG – ang. myogenesis-regulating glycosidase
 NEAA- (ang. non-essential amino acids) aminokwasy nieistotne
 NES – ang. nestin
 NGS – (ang. next-generation sequencing) sekwencjonowanie nowej generacji
 NR4A1 – ang. nuclear receptor subfamily 4 group a member 1
 PAX - ang. paired box protein
 PBS - (ang. phosphate buffer saline) roztwór fosforanowy soli fizjologicznej
 PITX1 – ang. paired like homeodomain 1
 PPI - ang. protein-protein interaction
 PVDF - polifluorek winylidenu
 RB1 – ang. RB transcriptional corepressor 1
 RFU – (ang. relative fluorescence unit) względna jednostka fluorescencji
 ROCK1 – ang. rho associated coiled-coil containing protein kinase 1
 RUNX1 – ang. RUNX Family Transcription Factor 1
 SDS-PAGE – (ang. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
 SOCS3 – ang. suppressor of cytokine signaling 3
 TCAP – ang. telethonin
 TGF- β – (ang. transforming growth factor β) transformujący czynnik wzrostu β
 VEGF – (ang. vascular endothelial growth factor) czynnik wzrostu śródbłonnki naczyniowej
 XIRP – ang. xin actin binding repeat containing 1

1. Streszczenie rozprawy doktorskiej

1.1. Wersja polskojęzyczna streszczenia

Mięso komórkowe (ang. cultured meat) stanowi uzupełnienie dla tradycyjnej hodowli mięsa, wykorzystując zdolność komórek mięśniowych do formowania w warunkach *in vitro* zaawansowanych trójwymiarowych struktur odpowiadających tkance mięśniowej. Wykorzystanie potencjału mięśniowych komórek – komórek prekursorowych mięśni – do samoodnowy, proliferacji i różnicowania, w połączeniu z zaawansowanymi technikami hodowli komórkowej, umożliwiło przeprowadzenie pomyślnych prac prowadzących do otrzymania *in vitro* struktur odpowiadających tkance mięśniowej. Niemniej jednak, redukcja kosztów produkcji końcowego produktu oraz doskonalenie technik bioinżynierskich wymagają dalszych badań naukowców z wielu dziedzin.

Celem niniejszej pracy była ocena parakrynnego wpływu fibroblastów – komórek tkanki łącznej – na przebieg miogenezy bydlęcych komórek satelitarnych w systemie hodowli dwuwymiarowej (inserty typu *Transwell*) oraz hodowli trójwymiarowej (bioreaktory typu *spinner flask*). We wstępnym etapie, z wykorzystaniem analizy statystycznej DOE (ang. Design of Experiments), opracowano skład pożywki hodowlanej wspierającej proliferację komórek mięśniowych, przy jednoczesnym niskim stopniu spontanicznego różnicowania.

Otrzymane wyniki wskazują, że najistotniejszym czynnikiem determinującym tempo podziałów był rodzaj zastosowanej surowicy, a w dalszej kolejności dodatek czynnika mitogennego – zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF). Stężenie glukozy nie wpływało istotnie na tempo proliferacji, jednakże w warunkach obniżonej zawartości glukozy (1 g/L) utrzymywany był fenotyp komórek samoodnawiających się.

Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na przebieg procesu miogenezy w hodowlach dwuwymiarowych z wykorzystaniem analizy transkryptomu (RNA-Seq) wykazała, że fibroblasty poprzez sygnalizację parakrynną promują wczesny etap różnicowania miogenego. W warunkach promujących proliferację (tj. w pożywce wzrostowej) obserwowano zwiększoną ekspresję genów wczesnego różnicowania, takich jak *EGRI*, *IL6*, *NR4A1*, *SOCS3* czy *EYA2*, przy jednoczesnej supresji ekspresji genów późnego różnicowania. Po indukcji różnicowania poprzez modyfikację warunków hodowli efekt ten ulegał nasileniu, co wskazuje, że sygnalizacja parakrynną fibroblastów może regulować zakres różnicowania miogenego. Istotnym okazał się również stosunek sygnałów parakrynnych, który ulegał

zmianom w trakcie hodowli z uwagi na szybsze tempo proliferacji fibroblastów, co mogło wywierać hamujący wpływ na terminalne różnicowanie (tj. formowanie się miotub) m.in. poprzez podwyższoną sygnalizację TGF- β .

Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na przebieg miogenezy w warunkach trójwymiarowych, z wykorzystaniem żelatynowych mikronośników i bioreaktorów typu *spinner flask*, wykazała istotnie wyższą ekspresję genów zaangażowanych w proliferację (jak *PAX7*, *MYF5*, *MYOD*), jak i wczesne różnicowanie (*MYOG*, *EGR1*). Ponadto, poziom ekspresji białka miozyny szkieletowej – markera różnicowania – był istotnie wyższy w warunkach kokultury z fibroblastami.

Podsumowując, fibroblasty na drodze parakrynnnej sygnalizacji wpływają stymulująco na wczesny etap różnicowania miogennej komórek mięśniowych, co potwierdzają analizy przeprowadzone z wykorzystaniem modeli hodowli dwuwymiarowych i trójwymiarowych. Poprzez modulację stosunku ilości sygnałów pochodzących z fibroblastów możliwe jest ukierunkowane indukowanie różnicowania miogennej. Ponadto uzyskane wyniki wskazują na potencjał wykorzystania elementów sygnalizacji parakrynnnej, np. w postaci pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs – ang. extracellular vesicles), jako efektywnego substytutu kosztownych czynników biologicznych i chemicznych dodawanych do pożywki hodowlanej.

1.2. Wersja angielskojęzyczna streszczenia

Cultured meat is a promising supplement to traditional meat husbandry, utilizing the ability of muscle cells to form advanced three-dimensional structures *in vitro*, which closely resemble muscle tissue. Using the potential of muscle satellite cells – precursors of muscle cells – for self-renewal, proliferation, and differentiation, combined with advanced cell culture techniques, has enabled successful attempts to obtain structures reflecting muscle tissue *in vitro*. However, reducing the production costs of the final product and further improving bioengineering techniques requires further research from scientists in many fields.

The aim of this study was to evaluate the paracrine effect of fibroblasts – connective tissue cells – on the myogenesis of bovine muscle satellite cells in a two-dimensional culture system (Transwell inserts) and a three-dimensional culture system (spinner flask bioreactors). At the initial stage, using DOE (Design of Experiments) statistical analysis, a culture medium composition was developed that supported muscle cell proliferation while maintaining a low rate of spontaneous differentiation.

The results indicate that the most important factor determining the rate of cell division was the type of serum used, followed by the addition of the mitogenic factor – basic fibroblast growth factor (bFGF). Glucose concentration did not significantly affect the proliferation rate; however, under conditions of reduced glucose (1 g/L), the self-renewing cell phenotype was maintained.

Assessment of the paracrine effect of fibroblasts on the myogenesis process in two-dimensional cultures using transcriptome analysis (RNA-Seq) demonstrated that fibroblasts promote early myogenic differentiation through paracrine signaling. Under proliferation-promoting conditions (in growth medium), increased expression of early differentiation genes such as *EGR1*, *IL6*, *NR4A1*, *SOCS3*, and *EYA2* was observed, while the expression of late differentiation genes was downregulated. After induction of differentiation by modifying cell culture conditions, this effect was enhanced, indicating that fibroblast paracrine signaling may regulate the extent of myogenic differentiation. The ratio of paracrine signals also proved significant, as it changed during culture due to the faster rate of fibroblast proliferation, which could have an inhibitory effect on terminal differentiation, including through increased TGF- β signaling.

Assessment of the paracrine influence of fibroblasts on the course of myogenesis under three-dimensional conditions, using gelatin microcarriers and spinner flask bioreactors, revealed significantly higher expression of genes involved in proliferation (such as *PAX7*, *MYF5*, *MYOD*) and early differentiation (*MYOG*, *EGR1*). Furthermore, skeletal myosin –

a differentiation marker – protein expression levels were significantly higher in the co-culture with fibroblasts.

In summary, fibroblasts stimulate early myogenic differentiation of muscle cells through paracrine signaling, as confirmed by analyses conducted using two-dimensional and three-dimensional cell culture models. By modulating the ratio of paracrine signals from fibroblasts, it is possible to induce myogenic differentiation. Furthermore, the obtained results indicate the potential of using paracrine signaling elements, such as extracellular vesicles (EVs), as an effective substitute for expensive biological and chemical factors added to the culture medium.

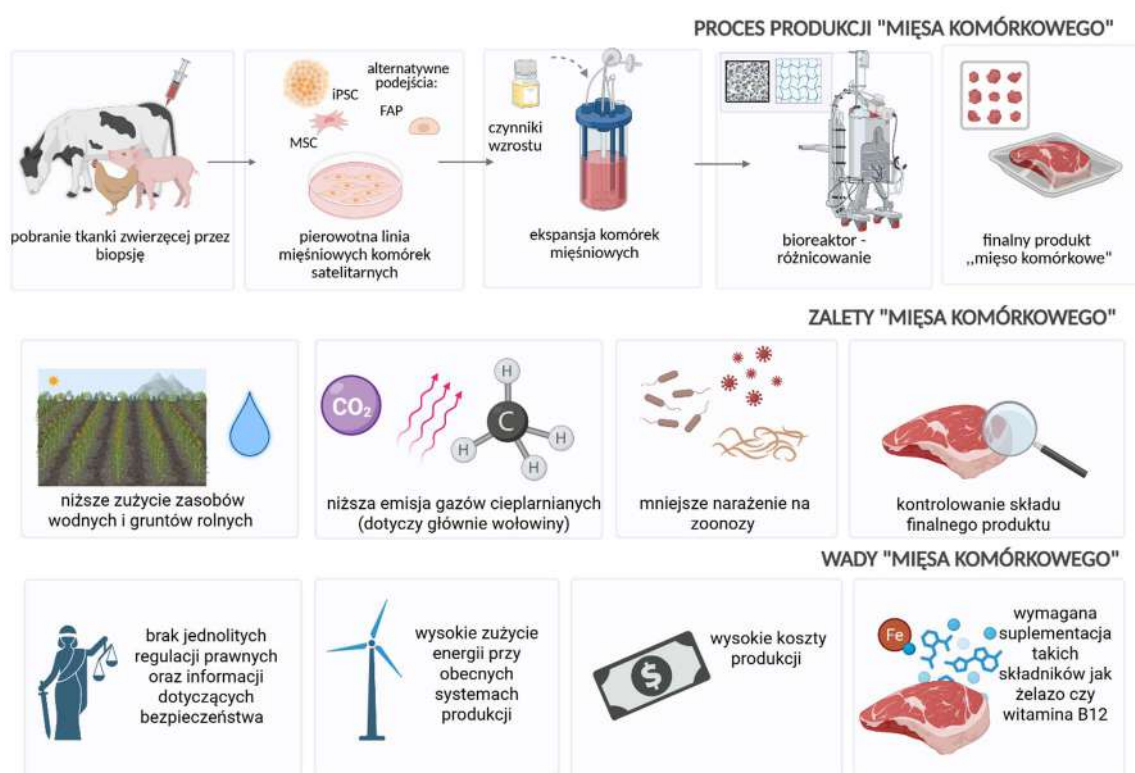
2. Wstęp

2.1. Mięso komórkowe jako uzupełnienie dla tradycyjnej hodowli mięsa

Szybki rozwój gospodarczy oraz wzrost populacji powodują zwiększony popyt na żywność, w tym na mięso i alternatywne źródła białka, stanowiące kluczowy element dobrze zbilansowanej diety. Pomimo że zrównoważona intensyfikacja rolnictwa oraz modele agroekologiczne mają potencjał, by ograniczać degradację środowiska i zwiększać efektywność produkcji na obecnych gruntach rolnych, ich powszechne wdrożenie napotyka liczne przeszkody polityczne oraz społeczno-ekonomiczne (Hocquette i wsp., 2025; Vezovnik, 2025). W ujęciu prawnym mięso definiowane jest jako jadalne części zwierząt, w tym krew (rozporządzenie nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady), jednak współczesna biotechnologia oferuje przełomową alternatywę, mogącą stanowić uzupełnienie dla sektora mięsnego. „Mięso komórkowe” (ang. cultured meat, alternatywnie nazywane „mięsem *in vitro*”) wytworzone technikami *ex vivo* dostarcza potencjalnych rozwiązań dla wyzwań związanych z tradycyjną hodowlą mięsa. Technologia ta mogłaby stanowić bardziej zrównoważoną opcję dla środowiska poprzez mniejszą emisję gazów cieplarnianych (dwutlenku węgla czy metanu) o 78–96%, mniejsze zużycie gruntów rolnych o 99% oraz zasobów wodnych o 82–96% (Xie i wsp., 2025). Ponadto produkcja „mięsa *in vitro*” może przyczynić się do zminimalizowania zoonoz i patogenów odzwierzęcych (jak *Escherichia coli*, *Campylobacter* czy *Salmonella*), zwiększając tym samym bezpieczeństwo żywności. Pod względem wartości odżywczej skład „mięsa komórkowego” może być precyzyjnie kontrolowany poprzez wzbogacenie pożywki hodowlanej o prozdrowotne składniki takie jak nienasycone kwasy tłuszczowe (Moraes da Silva i wsp., 2022). W przeciwieństwie do alternatywnych źródeł białka pochodzenia roślinnego „mięso komórkowe” może naśladować strukturę tkanki mięśniowej, profil odżywczy oraz cechy sensoryczne konwencjonalnego mięsa (Gurel i wsp., 2024).

Produkcja „mięsa komórkowego” wiąże się jednak z wieloma wyzwaniami, które wymagają interdyscyplinarnej współpracy naukowców w celu umożliwienia wytwarzania go na skalę przemysłową. Brak jednolitych regulacji prawnych i obawy dotyczące bezpieczeństwa wpływają na ograniczoną akceptację technologii „mięsa komórkowego” przez konsumentów (Chriki i wsp., 2025). Także brak szczegółowych danych dotyczących jakości i bezpieczeństwa „mięsa komórkowego” (Ong i wsp., 2021), wymaga rygorystycznego monitorowania każdego etapu produkcji. Wielkoskalowa produkcja musiałaby rozwiązać problem wysokich kosztów

technologii czy wysokiego zużycia energii (np. poprzez odnawialne źródła energii) (Chen i wsp., 2022; Hubalek i wsp., 2022). Co istotne, szacunki dotyczące zmniejszenia emisji gazów cieplarnianych oraz nakładów energii dotyczą głównie wołowiny, podczas gdy dla wieprzowiny czy drobiu nie są już tak obiecujące. Niemniej jednak to konwencjonalna produkcja wołowiny stanowi część sektora hodowlanego, który generuje najwyższy poziom emisji gazów cieplarnianych (Sinke i wsp., 2023, Tavan i wsp., 2026). Wątpliwym jest również zawartość kluczowych składników odżywczych, takich jak witamina B12 czy żelazo, w „mięsie komórkowym” (Chriki i wsp., 2022; Fraeye i wsp., 2020), jednak możliwa jest ich suplementacja na końcowym etapie formowania produktu (Demarquoy, 2025; Rice i wsp., 2025) (Rycina 1).



Rycina 1. Proces produkcji „mięsa komórkowego” oraz zalety i wady tej technologii.

iPSCs (ang. induced pluripotent stem cells) – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, MSC (ang. mesenchymal stem cell) – mezenchymalne komórki macierzyste, FAP (ang. fibroadipogenic progenitors) – progenitory fibroadipogenne. Grafika przygotowana w programie Biorender.

Pierwszy produkt technologii „mięsa komórkowego” uzyskał w 2013 roku holenderski naukowiec Mark Post, który, hodując bydlęce mioblasty w bioreaktorach perfuzyjnych, wytworzył burgera wołowego (Post, 2014). Obecnie szacuje się, że 57,35% produkcji „mięsa komórkowego” dotyczy wołowiny, a w dalszej kolejności: wieprzowiny, drobiu, owoców morza i jagnięciny (Yun i wsp., 2024). Wykorzystanie zaawansowanych technik

bioinżynieryjnych, obejmujących metody takie jak biodruk 3D oraz innowacyjne rusztowania stanowiące podłoże dla komórek, pozwala na odtworzenie struktury tkanki mięśniowej i profilu organoleptycznego mięsa konwencjonalnego (Gurel i wsp., 2024).

Obecnie obrót „mięsem komórkowym” został oficjalnie zatwierdzony w Singapurze, Izraelu i Stanach Zjednoczonych. Pionierem w tym zakresie był Singapur, który w 2020 roku jako pierwszy kraj wydał zezwolenie na sprzedaż „mięsa komórkowego” – firma EatJust wypuściła na rynek komercyjną linię „nuggetsów” spełniających wymogi bezpieczeństwa i jakości (Tan i wsp., 2025). Ciekawym kierunkiem jest również wykorzystanie „mięsa *in vitro*” jako karmy dla zwierząt domowych. Przykładem jest firma Bene Meat Technologies, która w 2023 roku uzyskała oficjalną rejestrację takiego produktu (Stieberová i wsp., 2026). „Mięso komórkowe” klasyfikowane jest jako „nowa żywność” (ang. novel food), a ramy regulacyjne jego produkcji są w dalszym ciągu opracowywane i aktualizowane. W celu pozyskania akceptacji konsumentów niezbędne jest określenie przepisów i wytycznych dotyczących bezpieczeństwa, etykietowania i dopuszczenia na rynek (Bryant i Barnett, 2020).

Dostępne dane wskazują na zwiększającą się liczbę firm i startupów zajmujących się technologią „mięsa komórkowego”, wraz ze stale rosnącymi inwestycjami przez podmioty publiczne i prywatne (Benussi i Samoggia, 2025). Baza danych *Good Food Institute* zawiera 153 pozycje firm i startupów koncentrujących się na technologii mięsa *in vitro* (stan na 04.2026). W Polsce działa pojedynczy startup, Labfarm sp. z o. o. który zajmuje się produkcją drobiowego „mięsa komórkowego”, osiągając coraz większe sukcesy na międzynarodowym rynku.

Efektywność produkcji „mięsa komórkowego” zależy od istotnych aspektów bioinżynieryjnych, takich jak źródło pozyskania komórek, skład i cena pożywek hodowlanych, odpowiednie rusztowania hodowlane bądź komórki rosnące zawieszinowo, wydajne systemy bioreaktorów oraz odtworzenie tekstury i cech sensorycznych tkanki mięśniowej (Gu i wsp., 2025; Martins i wsp., 2024).

2.2. Źródło komórek o potencjale miogennym

W celu produkcji „mięsa komórkowego” wykorzystywane są różne typy komórek, w tym embrionalne komórki macierzyste (ESCs – ang. embryonic stem cells), indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs – ang. induced pluripotent stem cells), pierwotne linie komórkowe (m.in. mięśniowe komórki satelitarne oraz FAPs – ang. fibroadipogenic progenitors) oraz nieśmiertelnione linie komórkowe (Martins i wsp., 2024).

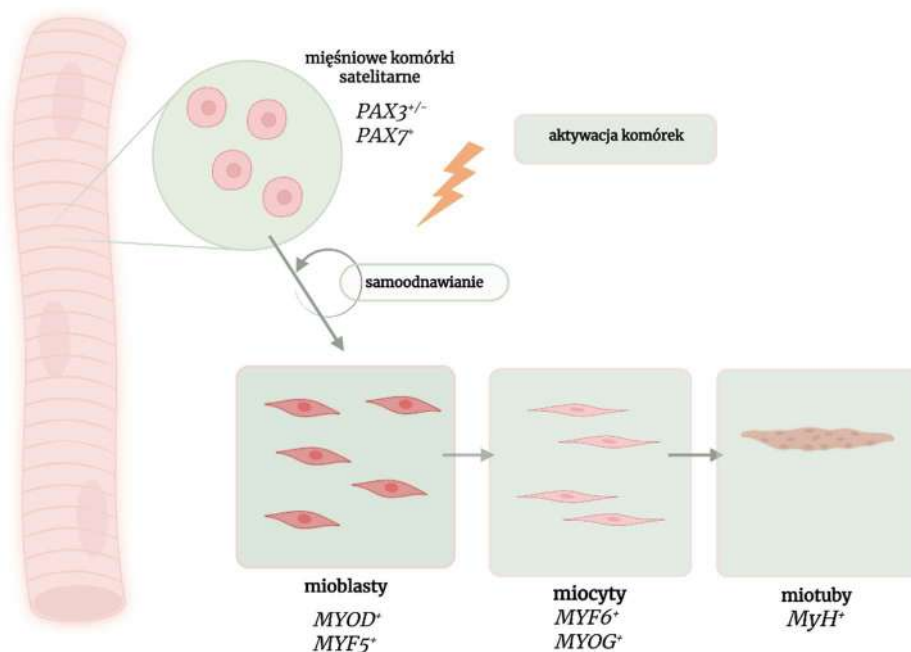
Kluczowymi kryteriami wyboru odpowiedniej linii komórkowej są parametry hodowlane takie jak: wysoka wydajność izolacji, zdolność ekspansji i różnicowania, skład pożywki, długotrwała stabilność linii komórkowej oraz jej kompatybilność z wielkoskalowymi systemami hodowli, zdolność do hodowania w zawiesinie oraz zdolność do unieśmiertelnienia (Gu i wsp., 2025; Martins i wsp., 2024). Wykorzystanie ssaczych embrionalnych komórek macierzystych wiąże się z implikacjami etycznymi, co sprawia, że ich potencjał do nieskończonej liczby podziałów i różnicowania w różne typy komórek nie może zostać w pełni wykorzystany (Xie i wsp., 2025).

W związku z tym do produkcji ssaczego „mięsa komórkowego” powszechnie wykorzystywane są dorosłe komórki macierzyste, takie jak mezenchymalne komórki macierzyste, komórki macierzyste tkanki tłuszczowej oraz komórki progenitorowe mięśni – mięśniowe komórki satelitarne.

2.3. Mięśniowe komórki satelitarne i przebieg procesu miogenezy

Mięśniowe komórki satelitarne (MuSCs – ang. muscle satellite cells) – komórki prekursorowe mięśni – zaangażowane są w proces wzrostu i regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych (Chargé i Rudnicki, 2004). Po raz pierwszy MuSCs zostały opisane w 1961 roku przez Alexandra Mauro, który, wykorzystując mikroskopię elektronową, zaobserwował ich obecność na obwodzie włókna mięśniowego żaby (Mauro, 1961). MuSCs lokalizują się między błoną podstawną, a sarkolemmą włókien mięśniowych u dorosłych osobników, a ich liczba jest ściśle związana z rodzajem włókien mięśniowych, wiekiem i gatunkiem. W warunkach homeostazy organizmu MuSCs są mitotycznie nieaktywne – znajdują się w fazie G₀ cyklu komórkowego, co angażuje ponad 500 genów obejmujących regulatory cyklu komórkowego, inhibitory miogenezy, jak i inne geny zaangażowane w regulację wzrostu komórek, sygnalizację międzykomórkową czy tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej – ECM (ang. extracellular matrix) (Almeida i wsp., 2016). Nieaktywne mitotycznie MuSCs charakteryzują się zwiększoną ilością heterochromatyny i niewielką ilością cytoplazmy, co odróżnia je od mioblastów – proliferujących komórek mięśniowych (Hawke i Garry, 2001). Kluczową cechą komórek satelitarnych jest ich zdolność do samoodnawiania, w której pod wpływem warunków mikrośrodowiskowych i ekspresji specyficznych genów komórka ulega podziałowi symetrycznemu (na dwie komórki progenitorowe lub dwie komórki macierzyste) lub asymetrycznemu (na komórkę progenitorową i komórkę macierzystą). Komórki progenitorowe przechodzą kolejne etapy miogenezy, aby różnicować się we włókna mięśniowe (Shirakawa i wsp., 2022).

Uśpione komórki satelitarne wykazują ekspresję genu *PAX7* (w niektórych tkankach również genu *PAX3*), który reguluje geny promujące wejście w proliferację i hamuje różnicowanie miogenne. Geny *MYF5*, *MYOD*, *MYF6* i *MYOG* kodują białka należące do rodziny miogenicznych czynników regulacyjnych (MRF – ang. Myogenic Regulatory Factors). *MYF5* i *MYOD*, aktywowane przez *PAX7* i *PAX3*, są kluczowe na wczesnym etapie miogenezy. Wraz z postępem różnicowania mioblastów – aktywowanych komórek satelitarnych – zwiększa się ekspresja genów *MYF6* i *MYOG*. Ekspresja genu *MYF6* nadzoruje hamowanie przedwczesnego różnicowania i jest utrzymywana na stałym poziomie. Ekspresja *MYOG* (miogeniny) ma kluczowe znaczenie dla regulacji ekspresji genów związanych z różnicowaniem w miocyty (Kuang i Chargé, 2006; Le Grand i Rudnicki, 2007; Chal i Pourquie, 2017) (Rycina 2). Wykorzystując zdolność MuSCs do samoodnawiania, proliferacji i różnicowania, możliwe jest odtworzenie tkanki mięśniowej w warunkach *in vitro*.



Rycina 2. Schemat przebiegu procesu miogenezy mięśniowych komórek satelitarnych.
Schemat przygotowany w programie Biorender.

2.4. Ograniczenia w stosowaniu pierwotnych linii komórkowych w technologii mięsa komórkowego

Jednym z ograniczeń stosowania mięśniowych komórek satelitarnych jest wysoka heterogeniczność pierwotnej linii komórkowej, co wiąże się z koniecznością zwiększenia homogeniczności hodowli pierwotnej (oraz następnie wyprowadzonej pierwotnej linii

komórkowej) z wykorzystaniem metody wstępnego posiewu (ang. pre-plating) lub metod magnetycznego lub aktywowanego fluorescencyjnie sortowania komórek (Martins et al., 2024).

Prolifерacja – namnażanie się komórek – stanowi kluczowy element produkcji biomasy, niezbędnej do wytworzenia struktur *in vitro* odpowiadających tkance mięśniowej. Głównym ograniczeniem tego etapu jest brak zdolności komórek do nieograniczonej liczby podziałów, definiowany jako limit Hayflicka (Gu i wsp., 2025). Długotrwała hodowla pierwotnych linii komórek macierzystych przyczynia się do utraty ich fenotypu i zdolności do różnicowania. Obserwowane starzenie komórkowe wiąże się z wyjściem z cyklu komórkowego, zmianą profilu ekspresji genów oraz zmianami morfologicznymi. Istotnym elementem utrzymania macierzystości jest wykorzystanie wysoko homogenicznej populacji (Ding et al., 2018). Ekstensywne namnażanie komórek mięśniowych może prowadzić do niestabilności genetycznej, dlatego też istotnym elementem monitoringu na etapie przemysłowym jest kontrola prawidłowości genomu (Hocquette i wsp., 2025).

Rozwiązaniem pozwalającym na obejście problemów związanych z ograniczoną liczbą podziałów jest unieśmiertelnienie komórek definiowane jako ustanowienie banku komórek zdolnych do nieskończonych podziałów komórkowych (Fridman i Tainsky, 2008). Spontaniczne unieśmiertelnienie jest dość rzadkim procesem, dlatego zastosowanie narzędzi biologii molekularnej – modyfikacji genetycznych – daje realne możliwości wykorzystania unieśmiertelnionych linii komórkowych w technologii mięsa *in vitro* (Gu i wsp., 2025). Jednak modyfikacje genetyczne generują problemy regulacyjno-prawne i zwiększają obawę i niechęć konsumentów do technologii „mięsa komórkowego” (Broad i wsp., 2026; Zão i wsp., 2026).

2.5. Skład i ekonomiczność pożywek hodowlanych

Główny koszt obecnego systemu produkcji mięsa komórkowego (31–99%) stanowią pożywki hodowlane, dostarczające niezbędnych składników odżywczych dla dzielących się komórek (Goodwin i wsp., 2026). Jednym z kluczowych kierunków w badaniach nad „mięsem komórkowym” jest ograniczenie stosowania składników pochodzenia odzwierzęcego - głównie płodowej surowicy bydlęcej (FBS – ang. fetal bovine serum), której zastosowanie jest sprzeczne z założeniami technologii „mięsa komórkowego” oraz z założeniami biznesowymi przedsiębiorstw. Opracowano kilka formuł bezsurowicznych pożywek, w tym pożywki produkowanej przez firmę MosaMeat, przeznaczonej dla bydlęcych komórek mięśniowych (Hong i wsp., 2021). Ponadto roślinne suplementy jak hydrolizat białka pszenicy, ekstrakt z alg czy izolat białka sojowego mogą efektywnie zastąpić surowicę bydlęcą (Xie i wsp., 2025).

Istotne jest zidentyfikowanie kluczowych składników pożywek hodowlanych, takich jak źródło energii (np. w postaci glukozy), zawartość aminokwasów i witamin, czynników wzrostu i cytokin, hormonów czy środków buforujących utrzymujących odpowiednie pH pożywki hodowlanej, które będą zgodne z zastosowaną linią komórkową, systemem hodowli oraz normami regulacyjnymi i przepisami prawnymi (Soleymani i wsp., 2024).

2.6. Systemy hodowli - hodowle dwuwymiarowe i trójwymiarowe w kontekście bioinżynierii tkanki mięśniowej

Zastosowanie dwuwymiarowych hodowli (2D) komórkowych wiąże się z ograniczoną reprezentatywnością warunków naturalnie występujących w organizmie oraz uproszczeniem interakcji międzykomórkowych. Komórki adherentne (zależne od podłoża – naczynia hodowlanego) rosną zwykle w płaskiej monowarstwie, które nie odzwierciedla ich naturalnego wzrostu i organizacji (Oh et al., 2009).

Hodowle trójwymiarowe (3D) stwarzają możliwość modelowania środowiska komórkowego zbliżonego do warunków *in vivo*, oferując ogromny wachlarz możliwości w zależności od żądanych parametrów hodowli. Zastosowanie hodowli 3D pozwala na precyzyjniejsze badanie wzrostu, proliferacji, różnicowania, komunikacji międzykomórkowej oraz ekspresji specyficznych markerów komórkowych (Antoni i wsp., 2015). W technologii „mięsa komórkowego” wykorzystywane są dwa podejścia: hodowle komórek w zawiesinie (niezależnie od podłoża) oraz hodowle komórek z wykorzystaniem mikronośników (zależnie od podłoża). Zastosowanie mikronośników uchodzi za szybką i wydajną metodę umożliwiającą rozległą ekspansję komórek mięśniowych, charakteryzującą się większym stosunkiem powierzchni do objętości, w porównaniu z hodowlą 2D (Oyama i wsp., 2021). Wykorzystanie mięśniowych komórek satelitarnych w produkcji „mięsa komórkowego” wymaga przyczepienia do podłoża, nie wywołując *anoiks* – rodzaju śmierci apoptotycznej wynikającej z utraty interakcji macierzy zewnątrzkomórkowej (Samandari i wsp., 2023). Ponadto optymalne byłoby zastosowanie mikronośników biokompatybilnych z tkanką mięśniową o jakości spożywczej, co nie wymagałoby dysocjacji mikronośników i zwiększałoby tym samym odzysk komórek (Andreassen i wsp., 2022).

Zapewnienie optymalnych warunków hodowlanych, takich jak: temperatura, stężenie gazów (DO, dCO₂), pH i odpowiedni skład pożywki, lepkość, osmolalność, mieszanie przy niskiej sile ścinającej, jest kluczowe dla sukcesu formowania tkanki mięśniowej w warunkach *in vitro* w złożonych systemach hodowli, takich jak bioreaktory. Wiele związków bioaktywnych – w tym czynniki wzrostu jak TGF-β czy IGF-1, hormony jak insulina,

deksametazon oraz białka funkcjonalne jak FGF, VEGF czy mioglobina – wpływa stymulująco na przebieg formowania się włókien mięśniowych (Ahmad i wsp., 2022; Syverud i wsp., 2016; Simsa i wsp., 2019). Jednak możliwe jest również zastąpienie kosztownych czynników biologicznych i chemicznych, odpowiednio modulując środowisko wzrostu komórek, wykorzystując pośrednio komórki, tworzące niszę dla komórek mięśniowych, jak fibroblasty, preadipocyty czy FAP.

2.7. Fibroblasty – komórki tkanki łącznej - jako potencjalny modulator miogenezy

Fibroblasty, komórki tkanki łącznej, syntetyzują elementy macierzy zewnątrzkomórkowej – ECM, bogatej w szereg białek takich jak lamininy, fibronektyny, proteoglikany, kolagen czy synekany (Gillies et al., 2011). Badania pokazują, że w warunkach *in vivo* i *in vitro* fibroblasty wspierają proces regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych, poprzez tworzenie stabilnej macierzy zewnątrzkomórkowej, syntetyzowanej w odpowiedzi na bodźce mechaniczne. W wyniku uszkodzenia mięśnia fibroblasty wykazują wysoki potencjał proliferacyjny, co wiąże się ze wzrostem liczby komórek satelitarnych, podczas gdy ich niedobór silnie sprzyja przedwczesnemu różnicowaniu komórek mięśniowych (Murphy i in., 2011; Dumont i in., 2015). Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej odgrywają kluczową rolę w procesie regeneracji – kolageny typów V i VI biorą udział w utrzymaniu puli komórek satelitarnych (Prüller i in., 2018). Modele kokultury komórek mięśniowych i fibroblastów wykazały stymulujący wpływ fibroblastów na różnicowanie i fuzję mioblastów. Jednak, co istotne, większość badań dotyczyła sygnalizacji typu komórka-komórka, pomijając znaczenie parakrynną sygnalizację (Mann i wsp., 2011). Wykorzystując system *Transwell*, wykazano redukcję apoptozy komórek mięśniowych podczas różnicowania w warunkach hodowli kształtowanych przez parakrynną sygnalizację fibroblastów (Zhang i wsp., 2010). Kokultura świńskich komórek mięśniowych i fibroblastów przez 24 h i 48 h wykazała zmiany ekspresji kluczowych markerów z rodzin PAX i MRF – głównie wyższą ekspresję genu *MYF5* (Siddiqui i wsp., 2019). Współhodowla linii mysich mioblastów C2C12 hodowanych z linią fibroblastów 3T3 wykazała hamujący wpływ fibroblastów na drodze parakrynną sygnalizację, przypisywaną szlakowi sygnałowemu FGF-2 (Hinds i wsp., 2013). Z kolei, Rao i wsp. (2013) sugerują, że to komunikacja bezpośrednia jest podstawą sygnalizacji pomiędzy komórkami mięśniowymi, a fibroblastami.

W ostatnich latach potencjał wykorzystania fibroblastów w technologii produkcji „mięsa komórkowego” znacząco wzrósł. Fibroblasty embrionalne cechuje wysoka zdolność do podziałów komórkowych, podczas gdy te specyficzne tkankowo (jak fibroblasty pochodzące

ze skóry) są łatwe w izolacji. Fibroblasty wykazują wysoką plastyczność fenotypu i zdolność do różnicowania w procesie miogenezy (w komórki mięśniowe), adipogenezy (w komórki tłuszczowe) i chondrogenyzy (w chondrocyty) (Ma i wsp., 2024). Ostatnie badania wskazują na możliwość uzyskania komórek wykazujących cechy komórek mięśniowych (jak zdolność do różnicowania w miotuby) na drodze różnicowania fibroblastów z wykorzystaniem manipulacji genetycznych takich jak transdukcja lentiwirusowa (Jeong i wsp., 2022; Zhao i wsp., 2025). W tym kontekście, wykorzystanie sygnalizacji parakrynej fibroblastów w modulacji przebiegu miogenezy może stanowić obiecujący kierunek w technologii „mięsa komórkowego”.

2.8. Odtworzenie procesu miogenezy w warunkach *in vitro* jako istotne narzędzie bioinżynierii

Odtworzenie procesu formowania się mięśni w warunkach *in vitro* wraz z postępem wiedzy i narzędzi bioinżynieryjnych stało się realne. Zrozumienie mechanizmów tego procesu jest kluczowe zarówno dla postępu medycyny, jak i nauk zootechnicznych. Należy podkreślić, że obowiązujące przepisy w ramach „Europejskiej Konwencji w sprawie ochrony zwierząt kręgowych wykorzystywanych do celów doświadczalnych oraz innych celów naukowych” (Dyrektywa UE 2010/63/UE) podkreślają istotność stosowania zasady „3R” (ang. replacement – zastąpienie, reduction – ograniczenie, refinement – doskonalenie). W tym kontekście nowoczesne metody hodowli komórkowych, w szczególności trójwymiarowe systemy hodowlane, stanowią trafną alternatywę, umożliwiając realizację badań naukowych przy ograniczonym udziale zwierząt w doświadczeniach.

3. Cele pracy i hipotezy badawcze

Odtworzenie procesu miogenezy w warunkach *in vitro* wymaga dostarczenia odpowiednich czynników wspomagających proliferację mięśniowych komórek satelitarnych, przy jednoczesnym niskim poziomie spontanicznego różnicowania się komórek. Wykorzystanie parakrynnych sygnałów pochodzących z fibroblastów w modulacji przebiegu procesu miogenezy mogłoby stanowić efektywny substytut kosztownych czynników biologicznych i chemicznych, powszechnie używanych w suplementacji pożywek hodowlanych.

Doskonalenie technik bioinżynieryjnych, pozwalających na otrzymywanie struktur *in vitro* odpowiadających tkance mięśniowej, jest istotnym elementem rozwoju technologii „mięsa komórkowego” jako alternatywnego źródła białka. Ponadto wykorzystanie zaawansowanych modeli komórkowych tkanki mięśniowej, może stanowić istotny etap badań zootechnicznych wpisując się w zasadę „3R” (zastąpienie, zmniejszenie i doskonalenie).

Główne cele badawcze rozprawy doktorskiej obejmowały:

1. Opracowanie składu pożywki hodowlanej, która wysoce wydajnie stymuluje proliferację mięśniowych komórek satelitarnych w oparciu o metodę planowania doświadczeń DOE (ang. design of experiments).
2. Ocenę parakrynnego wpływu fibroblastów na przebieg miogenezy mięśniowych komórek satelitarnych przy wykorzystaniu hodowli typu kokultura w warunkach 2D.
3. Analizę transkryptomu i zmian ekspresji wybranych genów i szlaków sygnałowych kluczowych w procesie miogenezy odtworzonej w warunkach *in vitro*, w kokulturze z fibroblastami w warunkach 2D.
4. Ocenę parakrynnego wpływu fibroblastów na przebieg miogenezy mięśniowych komórek satelitarnych przy wykorzystaniu hodowli typu kokultura w warunkach 3D .

Główne hipotezy badawcze zakładają:

1. Pożywka hodowlana suplementowana płodową surowicą bydlęcą oraz czynnikiem mitogennym bFGF będzie wykazywać najwyższą efektywność w stymulacji proliferacji bydlęcych komórek satelitarnych.
2. Fibroblasty poprzez sygnalizację parakrynną będą stymulowały przebieg miogenezy, co będzie obserwowane poprzez zmiany w transkryptomie oraz w ekspresji wybranych markerów białkowych.
3. Hodowle komórkowe prowadzone w bioreaktorach typu *spinner flask*, ze względu na warunki hodowli, w tym cechy fizykochemiczne, będą wpływać na regulację szlaków sygnałowych i odmienne wzorce ekspresji kluczowych markerów miogenezy w porównaniu z hodowlą 2D.

4. Wykaz i streszczenie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

4.1. Publikacja nr 1

Zygmunt K, Otwinowska-Mindur A, Piórkowska K, Witarski W. Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation. *Animals*. 2023; 13(11):1855. <https://doi.org/10.3390/ani13111855>

Odtworzenie przebiegu miogenezy w warunkach *in vitro*, a tym samym struktury przypominającej tkankę mięśniową, stanowi podstawę badań nad pozyskiwaniem „mięsa komórkowego” i wymaga dostarczenia odpowiednich czynników wspomagających proliferację komórek satelitarnych – prekursorów mięśni szkieletowych. Celem pracy było opracowanie składu pożywki hodowlanej, która wysoce wydajnie stymulowałaby proliferację bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych. Wykorzystując statystyczną metodę optymalizacji i modelowania DOE, możliwe było zbadanie synergistycznego wpływu trzech głównych komponentów pożywki: typu surowicy (płodowa surowica bydlęca vs surowica końska), stężenia dodatku czynnika mitogennego bFGF (5 ng/mL vs 10 ng/mL) oraz poziomu glukozy (1 g/L vs 4,5 g/L) na tempo proliferacji komórek mięśniowych. Dodatkowo, w celu zbadania względnej ekspresji genów markerowych – *PAX7* i genów z rodziny MRF przeprowadzono analizę qPCR.

Otrzymane wyniki wykazały statystycznie istotny, stymulujący wpływ rodzaju surowicy (płodowa surowica bydlęca) oraz czynnika mitogennego bFGF (10 ng/mL) na proliferację bydlęcych komórek mięśniowych. Istotnie wyższy poziom ekspresji *PAX7* i *MYF5* (genów zaangażowanych w samoodnawianie i proliferację komórek mięśniowych) zaobserwowano w komórkach hodowanych w pożywce o niższej zawartości glukozy ($p < 0.05$).

Podsumowując, składniki pożywki hodowlanej, takie jak płodowa surowica bydlęca i dodatek czynnika mitogennego bFGF w stężeniu 10 ng/mL, wysoce wydajnie stymulują proliferację komórek mięśniowych. Z kolei, niska zawartość glukozy w pożywce zapewnia ekspresję genów zaangażowanych w samoodnawianie i proliferację komórek mięśniowych.

4.2. Publikacja nr 2

Zygmunt K, Żukowski K, Piórkowska K, Smołucha G, Wierzbicka A, Witarski W. Paracrine effect of fibroblasts on the proliferation and differentiation of bovine satellite cells in vitro. *Biochimie*. 2026; 241:26-43. doi:10.1016/j.biochi.2025.11.006

Kokultura komórek mięśniowych i fibroblastów stanowi obiecujący kierunek w celu udoskonalenia technik otrzymywania „mięsa komórkowego”. Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na stymulujący wpływ fibroblastów na przebieg miogenezy, jednak większość badań opierała się na interakcjach komórka-komórka, pomijając istotność komunikacji parakrynną. Celem pracy było zbadanie parakrynnego wpływu fibroblastów na miogenezę bydlęcych komórek mięśniowych, głównie w oparciu o analizę zmian transkryptomu z wykorzystaniem sekwencjonowania RNA (RNA-seq). Komórki mięśniowe i fibroblasty współhodowano na płytkach *Transwell* przez 5 dni w warunkach promujących proliferację (tj. w pożywce wzrostowej) oraz następnie przez 24 h i 72 h w warunkach promujących różnicowanie. W celu oceny zmian ekspresji kluczowych szlaków sygnałowych i markerów miogennych wykorzystano analizę RNA-Seq oraz analizy proteomiczne (Western Blot i ELISA) w połączeniu z analizą immunofluorescencyjną dla wybranych markerów.

Otrzymane wyniki wykazały zmiany w ekspresji wielu genów zaangażowanych w miogenezę. Na etapie proliferacji zaobserwowano zwiększoną ekspresję genów takich jak *IL6*, *SOCS3* czy *EGR1* zaangażowanych we wczesny etap różnicowania. Na 24-godzinny i 72-godzinny etapie różnicowania również zaobserwowano nadekspresję genów zaangażowanych we wczesny etap różnicowania, z jednoczesnym obniżeniem ekspresji genów odpowiedzialnych za terminalne różnicowanie (tj. formowanie się miotub). Analiza ELISA wykazała istotnie wyższą ekspresję miozyny szkieletowej na etapie proliferacji ($p=0,0183$), jednak nie wykazała istotnych różnic na etapie różnicowania.

Podsumowując, fibroblasty poprzez parakrynną sygnalizację promują wczesny etap różnicowania miogennego i poprzez ilość sygnałów mogą modulować jego zakres.

4.3. Publikacja nr 3

Zygmunt K., Piórkowska K., Adamiak J., Witarski W. Modulation of Bovine Muscle Satellite Cells Myogenesis by Paracrine Fibroblast-Derived Signaling in Three-Dimensional Spinner Flask Culture System. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2026. 197-198; 106970. doi.org/10.1016/j.biocel.2026.106970

Wcześniejsze badania z wykorzystaniem systemu typu *Transwell* w warunkach 2D potwierdziły stymulujący wpływ fibroblastów poprzez sygnalizację parakrynną na przebieg miogenezy bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych. Jednak modele trójwymiarowe (3D) znacznie lepiej oddają złożoność tkanki mięśniowej w warunkach *in vivo*. Celem pracy była ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na miogenezę bydlęcych komórek mięśniowych w warunkach 3D z wykorzystaniem bioreaktorów typu *spinner flask*. Komórki mięśniowe hodowano w monokulturze lub w kokulturze z fibroblastami na żelatynowych mikronośnikach, stanowiących podłoże dla komórek, zwiększając dostępną powierzchnię wzrostu dla komórek. Następnie komórki mięśniowe oddzielono od fibroblastów metodą FACS w oparciu o negatywną ekspresję białka powierzchniowego CD90 – markera fibroblastów. Przeprowadzono testy metaboliczne i barwienia fluorescencyjne w celu kontroli warunków hodowli. Ocenę procesu miogenezy przeprowadzono w oparciu o analizę względnej ekspresji genów markerowych (wybranych w oparciu o wyniki uzyskane z etapu hodowli 2D) metodą qPCR oraz analizę ELISA dla miozyny szkieletowej (MYH).

Otrzymane wyniki wskazują na istotnie zwiększoną ekspresję markerów proliferacji (*PAX7*, *MYF5* i *MYOD*) oraz różnicowania (*MYOG*, *EGR1* i *MYH*). Nie wykazano istotnie wyższej ekspresji genów takich jak *TCAP*, *IL6*, *SOCS3*, *TGFB1* oraz *ITGA7*. Analizy metaboliczne i barwienia fluorescencyjne potwierdziły prawidłowość przeprowadzonej hodowli w bioreaktorach typu *spinner flask*.

Podsumowując, fibroblasty poprzez parakrynną sygnalizację promują wczesne różnicowanie miogenne, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami. Ponadto w oparciu o analizę ekspresji markerów miogennych można przypuszczać, że fibroblasty promują również proliferację komórek mięśniowych.

5. Materiały i metody

5.1. Ocena wpływu składu pożywki hodowlanej na poziom proliferacji bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych

5.1.1. Wyprowadzenie pierwotnej linii mięśniowych komórek satelitarnych

Materiał badawczy stanowiły fragmenty mięśnia najdłuższego grzbietu (*musculus longissimus dorsi*) trzech osobników bydła domowego – *Bos taurus* (jałówek rasy holsztyńsko-fryzyjskiej), pozyskane jako materiał rzeźny poubojowy. Zgodnie z obowiązującym prawem procedura ta nie wymagała zgody Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Komórki mięśniowe izolowano metodą enzymatyczną. Tkanę poddano trawieniu kolagenazą II (2 mg/mL) w buforze PBS (ang. phosphate buffer saline) (pH 7,2) z dodatkiem 4% albuminy surowicy bydlęcej (BSA – ang. bovine serum albumin). Proces trawienia prowadzono przez ok. 2 h w temperaturze 37 °C. Uzyskany nadsącz przefiltrowano przez nylonowe sitko o średnicy porów 70 µm i przemyto w sterylnym buforze PBS. Komórki wirowano 10 min przy prędkości 500 x g, uzyskany supernatant odrzucono, a otrzymaną heterogenną populację komórek mięśniowych oczyszczono metodą wstępnego posiewu (ang. pre-plating), opartej na szybkości adhezji komórek do podłoża. Komórki wysiano w pożywce Skeletal Muscle Cell Medium (Cell Applications) z 1% dodatkiem antybiotyku Primocin (InVivoGen) na niepowlekanej płytce hodowlanej. Po upływie 1h pożywkę hodowlaną zawierającą nieprzyczepione komórki przeniesiono do nowych naczyń hodowlanych pokrytych cienką warstwą 0,1% żelatyny. Po uzyskaniu wysokiej konfluencji procedurę powtórzono. Wyprowadzone linie mięśniowych komórek satelitarnych zamrożono w celu dalszych badań w medium DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) z dodatkiem 20% płodowej surowicy bydlęcej (FBS – ang. fetal bovine serum) i 10% DMSO jako krioprotektanta.

5.1.2. Wybór badanych komponentów pożywki hodowlanej

Zastosowany układ doświadczalny miał na celu zbadanie synergistycznego wpływu trzech komponentów pożywki hodowlanej na proliferację bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych.

Badanymi czynnikami były:

Czynnik A – stężenie glukozy w pożywce hodowlanej - niska zawartość (1 g/L) vs wysoka zawartość (4,5 g/L) (Thermo Fisher Scientific)

Czynnik B – rodzaj surowicy - surowica końska (ang. horse serum - HS) vs bydlęca surowica płodowa (FBS)

Czynnik C – zawartość zasadowego czynnika wzrostu bFGF (ang. basic fibroblast growth factor) (Thermo Fisher Scientific) –5 ng/mL vs 10 ng/mL.

Kompletną pożywkę hodowlaną przygotowywano bezpośrednio przed użyciem ze względu na niską stabilność czynnika wzrostu bFGF. W celu zminimalizowania zmienności wyników w przeprowadzonym eksperymencie wykorzystano surowicę pochodzącą z jednej serii.

5.1.3. Ocena tempa proliferacji komórek mięśniowych wraz z przyżyciowymi analizami mikroskopowymi

W celu zbadania wpływu komponentów pożywki hodowlanej na tempo proliferacji wybrano dwie pierwotne linie mięśniowych komórek satelitarnych na trzecim pasażu, oznaczone jako R1 oraz R2. Komórki posiano na 96-dołkowych płytkach hodowlanych powlekanych 0,1% żelatyną, w gęstości 3500 komórek/dołek, w pożywce Skeletal Muscle Cell Medium z 1% dodatkiem antybiotyku Primocin. Doświadczenie przeprowadzono w czterech powtórzeniach technicznych dla każdej z badanych grup i linii komórkowych.

Po 24 h liczba komórek została oszacowana (dzień 0) za pomocą testu fluorometrycznego CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega). Odczynnik przygotowano zgodnie z protokołem producenta. Inkubacja odczynnika z komórkami trwała 1 h w warunkach wysokiej wilgotności, temperaturze 37 °C i atmosferze 5% CO₂. Czas inkubacji oraz wyjściowa gęstość komórek zostały wcześniej zoptymalizowane. Pomiar fluorescencji (535_{ex}/595_{em} nm) przeprowadzono z wykorzystaniem czytnika Plate Reader AF2200 (Eppendorf).

Po przeprowadzonym pomiarze w dniu 0, w dołkach wymieniono pożywkę na docelową, o różnej kombinacji badanych czynników. Ocenę proliferacji przeprowadzono w trzecim, piątym, siódmym i dziesiątym dniu z wykorzystaniem testu CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Wyniki otrzymane w jednostce RFU (ang. relative fluorescence unit) zostały znormalizowane do wartości otrzymanych w dniu 0.

Równocześnie, prowadzone były przyżyciowe analizy mikroskopowe z wykorzystaniem mikroskopu Opta-tech i programu OptaView-IS. Zdjęcia zostały poddane obróbce w programie ImageJ w celu zwiększenia kontrastu, stosując algorytm CLAHE (ang. Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization).

5.1.4. Analiza statystyczna i analiza DOE

Analizę danych przeprowadzono w środowisku Python z wykorzystaniem bibliotek NumPy, SciPy, Stats Models, Pandas i Matplotlib. W celu oceny wpływu badanych komponentów (X_i) zastosowano analizę DOE – pełny układ czynnikowy 2^3 . Pozwoliło to na ocenę wpływu trzech składników (X_1 – glukoza, X_2 – surowica, X_3 – bFGF) na tempo proliferacji komórek mięśniowych wyrażonej w wartościach RFU. Dla każdej linii komórkowej oraz każdego punktu czasowego opracowano oddzielny model (łącznie 8 układów DOE) w czterech powtórzeniach. Zmienne niezależne zostały zakodowane jako -1 (poziom minimalny) oraz +1 (poziom maksymalny) (Tabela 1). Zastosowano model regresji uwzględniający efekty główne oraz interakcje. Istotność współczynników oceniano na podstawie wartości p ($p < 0,05$ oznacza istotność na poziomie ufności 95%). Dopasowanie modeli zweryfikowano za pomocą kryteriów AIC (ang. Akaike Information Criterion), BIC (ang. Bayesian Information Criterion) oraz współczynników determinacji (R^2 , R^2_{adj}). W celu oceny ważności parametrów i interakcji wykorzystano wykresy Pareto. Walidację statystyczną modelu przeprowadzono za pomocą analizy wariancji (ANOVA). Jako efekt główny zdefiniowano średnią wszystkich odpowiedzi uzyskanych poprzez zmianę badanego czynnika. Szczegółowe dane dotyczące warunków eksperymentalnych oraz model matematyczny użyty do przeprowadzenia analiz znajdują się w Publikacji nr 1.

Tabela 1. Badane czynniki i ich poziomy wykorzystane w pełnym układzie czynnikowym 2^3 .

Zmienne	Badane czynniki	Poziom minimalny (-1)	Poziom maksymalny (+1)
X_1	glukoza	1g/L	4,5 g/L
X_2	surowica	20% HS	20%FBS
X_3	bFGF	5 ng/mL	10 ng/mL

5.1.5. Analiza względnej ekspresji genów markerowych procesu miogenezy

Wpływ każdego z badanych komponentów oceniano indywidualnie. Mięśniowe komórki satelitarne zostały wysiane na szalkach hodowlanych o średnicy 35 mm powlekanych 0,1% żelatyną, w gęstości 8500 komórek/cm² w medium Skeletal Muscle Cell Medium z 1% dodatkiem antybiotyku Primocin. RNA izolowano w trzecim i piątym dniu hodowli z wykorzystaniem zestawu PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) i PureLink™ DNase Set (Thermo Fisher Scientific). Stężenie RNA oznaczono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific), a jakość

i integralność RNA oceniono elektroforetycznie. 500 ng RNA zostało przepisane na cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher). Względą ekspresję genów markerowych oceniano metodą qPCR, a geny *RPL27* oraz *OAZ1* stanowiły kontrolę endogenną. Sekwencje starterów zostały zaprojektowane w programie Primer3 web (wersja 4.10) i zsyntetyzowane przez firmę Genomed (Warszawa, Polska). Sekwencje starterów znajdują się w Publikacji nr 1. Analizę względnej ekspresji badanych genów przeprowadzono z zastosowaniem zestawu HS-PCR Mix SYBR zgodnie z instrukcją producenta (A&A Biotechnology) i systemu QuantStudio 7 Pro (Thermo Fisher Scientific).

5.1.6. Analiza statystyczna względnej ekspresji genów markerowych

Analiza statystyczna otrzymanych wyników została przeprowadzona w programie Statistica (StatSoft, wersja 13). Zgodność rozkładu danych z rozkładem normalnym potwierdzono testem Shapiro-Wilka. W celu oceny istotności różnic wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Bonferroniego. W przypadku niespełnienia założenia testu Levene, zastosowano nieparametryczny test Mann-Whitney U.

5.2 Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydłych komórek satelitarnych w hodowli 2D

5.2.1 Wyprowadzenie pierwotnej linii fibroblastów bydłych

Fragmenty skóry trzech osobników bydła domowego (rasa holsztyńsko – fryzyjska) pozyskano jako materiał rzeźny poubojowy. W pierwszej kolejności usunięto warstwę naskórka, a pozostałą tkankę przemyto 70% etanolem oraz sześciokrotnie buforem PBS (pH 7,2) z dodatkiem antybiotyku Primocin. Następnie, przy użyciu sterylnych narzędzi, tkankę pocięto na fragmenty o średnicy ok. 5 mm i prowadzono hodowlę metodą eksplantu w pożywce DMEM z 10% dodatkiem FBS, zestawem aminokwasów NEAA (ang. non-essential amino acids) (Thermo Fisher Scientific) i antybiotykiem Primocin. Ze względu na specyfikę materiału przez okres pierwszego tygodnia hodowli stosowano antybiotyk Normocure (InVivoGen) o szerokim zakresie działania.

5.2.2 Kokultura mięśniowych komórek satelitarnych i fibroblastów

Trzy połączone linie mięśniowych komórek satelitarnych (pasaż trzeci) i trzy połączone linie fibroblastów (pasaż dziesiąty) wysiano na 6-dołkowe płytki hodowlane typu *Transwell* – posiadające inserty o wielkości porów 0,4 μm . Komórki mięśniowe wysiano na dolnej części

płytki, a fibroblasty na górnej części insertu - w czterech powtórzeniach technicznych, w ilości 8500 komórek/cm², w pożywce DMEM z niską zawartością glukozy i 20% dodatkiem FBS i antybiotyku Primocin. Po pięciu dniach hodowli różnicowanie indukowano poprzez zmianę pożywki na DMEM z wysoką zawartością glukozy oraz z dodatkiem 10% surowicy końskiej i antybiotyku Primocin.

5.2.3. Analiza transkryptomu

Całkowite RNA wyizolowano z użyciem zestawu PureLink RNA Mini Kit i DNase Set. Analizę ilościową i jakościową wyizolowanego RNA przeprowadzono odpowiednio za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-1 Spectrophotometr (DeNovix) i TapeStation 2200 (Agilent Technologies). Biblioteki cDNA przygotowano z użyciem zestawu Vazyme VAHTS Universal V8 RNA-Seq Library Prep Kit, zgodnie z instrukcją producenta. Analizę jakościową i ilościową bibliotek cDNA przeprowadzono odpowiednio z zastosowaniem urządzeń TapeStation 2200 (D1000 tapes) oraz Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS – ang. next-generation sequencing) zlecono firmie Admera Health (USA) jako usługę zewnętrzną. Sekwencjonowanie musiało spełniać następujące kryteria: i) przeprowadzenie na urządzeniu Illumina zgodnym z zastosowanym kitem do przygotowania bibliotek cDNA, ii) wszystkie 24 próbki miały zostać poddane kontroli jakości na każdym etapie, iii) długość odczytów powinna wynosić 150 pz (pair-ended), iv) przy głębokości sekwencjonowania 40 mln odczytów na próbkę.

5.2.4. Analiza bioinformatyczna

Jakość surowych danych oceniono w programie FastQC. Następnie adaptory Illumina oraz sekwencje poli-A zostały usunięte z wykorzystaniem programu fastp. Sekwencje o długości poniżej 36 pz oraz sekwencje o jakości poniżej 20 zostały wyeliminowane. Oczyszczone sekwencje zmapowano do genomu *Bos taurus* (ARS-UCD1.3-bosTau9) z wykorzystaniem bazy Ensembl. Poziom ekspresji oszacowano za pomocą pakietu RSEM z algorytmem STAR. Jakość mapowania zweryfikowano w programach SAMStat i NRA-SeQC, a końcowy raport wygenerowano w programie MultiQC. Geny o zróżnicowanej ekspresji analizowano z użyciem programu DESeq2 dla następujących parametrów: $p_{adj} \leq 0,05$ i $|\log_2 \text{krotnej zmiany}| \geq 0,5$. Analizę wzbogacenia ontologii genów (GO) oraz protein-protein interaction (PPI) przeprowadzono w programie STRING, a analizę nadreprezentowanych szlaków w programie KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Szczegółowe dane

z etapu sekwencjonowania i analizy bioinformatycznej znajdują się w bazie Gene Expression Omnibus (GEO) pod numerem akcesyjnym GSE289644.

5.2.5 Walidacja wyników sekwencjonowania

Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 300 ng RNA oraz zestawu High-Capacity RNA to cDNA Kit. Względą ekspresję wybranych DEGs (*EGR1*, *IL6*, *ITGA7*, *SOCS3* oraz *TCAP*) oraz genów z rodziny PAX (*PAX7*) i MRF (*MYF5*, *MYOD*, *MYF6* oraz *MYOG*) oznaczono metodą qPCR z użyciem zestawu RT HS-PCR MIX SYBR (A&A Biotechnology). Kontrolę endogenną stanowiły geny *RPL27* i *OAZ1*. Sekwencje starterów dla poszczególnych genów znajdują się w publikacji nr 2. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono w oparciu o korelację Pearsona, porównując je z znormalizowanymi danymi RNA-seq (oprogramowanie Statistica, wersja 13.1).

5.2.6 Analiza tempa proliferacji komórek mięśniowych

Tempo proliferacji komórek mięśniowych analizowano metodą fluorymetryczną z wykorzystaniem testu CellTiter-Blue® Cell Viability Assay na etapie proliferacji. Odczynnik przygotowano zgodnie z protokołem producenta i inkubowano z komórkami przez 1 h w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Pomiar fluorescencji (535_{ex}/595_{em} nm) przeprowadzono z wykorzystaniem czytnika Plate Reader AF2200 (Eppendorf).

5.2.7 Analizy proteomiczne

W celu potwierdzenia ekspresji miozyny szkieletowej przeprowadzono analizę Western Blot. Lizaty komórkowe przygotowano z zastosowaniem buforu RIPA Lysis and Extraction Buffer oraz inhibitorów proteaz Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific). Oznaczanie ilościowe białka przeprowadzono metodą BCA z wykorzystaniem zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Białko (1 µg/mL) zmieszano z buforem obciążającym Gel Loading Buffer II (Denaturing PAGE) (Thermo Fisher Scientific) i przeprowadzono denaturację przez 10 min w 100 °C. Białka rozdzielono metodą SDS-PAGE, a następnie przeprowadzono transfer mokry na membranę PVDF o średnicy 0,45 µm przez 100 min. Membranę inkubowano w buforze blokującym przez 1 h w temperaturze pokojowej, a inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym prowadzono w 4 °C przez noc. Następnie membranę płukano czterokrotnie i inkubowano w buforze z przeciwciałem drugorzędowym (Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific)).

Wizualizację przeprowadzono z zastosowaniem substratu Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) i systemu do obrazowania ChemiDoc™ (Bio-Rad).

W celu oceny zmian w ekspresji miozyny szkieletowej przeprowadzono test ELISA. Powierzchnię dołków płytek dedykowanych do analiz immunoenzymatycznych opłaszczono roztworem białka (1 µg/mL w 100 µL 100 mM buforu wodorowęglanowego) i inkubowano przez 16 h w temperaturze pokojowej. Następnie płytki płukano czterokrotnie buforem płuczającym i inkubowano w buforze blokującym przez 2 h. Inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym (anty-miozyna, stężenie 1:1000 w 0,1% buforze BSA w PBS) przeprowadzono przez 1 h, a następnie płytki przepłukano czterokrotnie buforem płuczającym. Inkubację z przeciwciałem drugorzędowym – Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, (Thermo Fisher Scientific) w stężeniu 1:4000 w 0,1% buforze BSA) przeprowadzono przez 1 h. Płytki przepłukano czterokrotnie buforem płuczającym, a następnie inkubowano z substratem HRP (Sigma) do momentu całkowitej zmiany koloru, po czym reakcję zatrzymano z użyciem 1 N HCl w stosunku 1:1. Detekcję sygnału przeprowadzono z wykorzystaniem absorbancji o długości fali 410 nm z czytnikiem płytek Plate Reader AF2200.

W celu przeprowadzenia barwienia immunofluorescencyjnego dla syndekanu-4, komórki mięśniowe wysiano na szkiełkach przeznaczonych do obrazowania, pokrytych 0,1% żelatyną. Na danym etapie eksperymentu komórki utrwalano w 4% paraformaldehydzie w PBS przez 20 min w temperaturze pokojowej i w metanolu przez 5 min w -20 °C. Permabilizację przeprowadzano w 0,1% Tween-20 przez 15 min w temperaturze pokojowej. Inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym (syndekan-4 -#sc-12766 AF594, Santa Cruz Biotechnology) w stężeniu 1:50 przeprowadzono przez 90 min w temperaturze 37 °C. Preparaty zamknięto w medium Fluoroshield z DAPI (Sigma Aldrich). Komórki analizowano z użyciem mikroskopu Zeiss AX100 Imager D.2 (Niemcy) oraz oprogramowania Zeiss Zen 2 Blue Edition.

5.2.8. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne wyników otrzymanych na etapie badania ekspresji genów przeprowadzono z użyciem programu Statistica (Statsoft, wersja 13). Normalność rozkładu danych oceniono testem Shapiro-Wilka. Istotność różnic między grupami oceniono testem t- Studenta. W przypadku niespełnienia założenia o jednorodności wariancji wykorzystano test U Mann-Whitney'a. Wykresy wygenerowano w programie GraphPad (Prism, wersja 10.2.3).

5.3. Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydłych komórek satelitarnych w hodowli w naczyniu typu *spinner flask*

5.3.1 Wyprowadzenie linii mięśniowych komórek satelitarnych i fibroblastów

Mięśniowe komórki satelitarne oraz fibroblasty wyizolowano zgodnie z protokołami opisanymi w podpunktach 5.1.1 oraz 5.2.1. Pierwotną linię fibroblastów oczyszczono metodą magnetycznego sortowania komórek – MACS (ang. magnetic-activated cell sorting) w oparciu o pozytywną ekspresję CD90 – powierzchniowego markera charakterystycznego dla fibroblastów. W celu otrzymania homogennej populacji mięśniowych komórek satelitarnych przeprowadzono sortowanie metodą fluorescencyjnego sortowania komórek – FACS (ang. fluorescence-activated cell sorting). W pierwszej kolejności przeprowadzono sortowanie w oparciu o negatywną selekcję dla CD31 – markera komórek endotelialnych oraz CD45 – markera komórek krwiotwórczych. Następnie przeprowadzono procedurę sortowania FACS w oparciu o pozytywną selekcję dla markerów CD29 oraz CD56. Analizę FACS przeprowadzono z zastosowaniem sortera CytoFlex SRT (Beckman Coulter).

5.3.2. Hodowla mięśniowych komórek satelitarnych w bioreaktorach typu *spinner flask*

Etap proliferacji prowadzono w pożywce DMEM z wysoką zawartością glukozy, suplementowanej 20% FBS, 25 mM HEPES oraz antybiotykiem Primocin. Na etapie różnicowania komórki hodowano w pożywce DMEM z wysoką zawartością glukozy, uzupełnionej o 10% surowicy końskiej, 25 mM HEPES oraz Primocin.

Żelatynowe mikronośniki Cultishper G o standardowej porowatości (Sigma Aldrich) przygotowano zgodnie z protokołem producenta. W celu przygotowania mikronośniki przepłukano dwukrotnie buforem PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , a następnie autoklawowano (121 °C, 20 min). Po sterylizacji mikronośniki zawieszono w podłożu hodowlanym (0,01 g/mL). Mięśniowe komórki satelitarne oraz fibroblasty (w stosunku 2:1) wysiano oddzielnie na mikronośnikach w gęstości 8500 komórek/cm² w nieadherentnych szalkach hodowlanych. Po 18-godzinnym etapie adhezji mikronośniki zostały przeniesione do 250-mL bioreaktorów typu *spinner flask*. Początkowo obroty ustawiono na 30 obrotów/min w pierwszym dniu, następnie zwiększono do 50 obrotów/min w fazie proliferacji trwającej 4 dni w pożywce wzrostowej. Etap różnicowania trwał 3 dni w pożywce do różnicowania przy 70 obrotach/min. Prędkość mieszadła, skład pożywki oraz odporność mechaniczna mikronośników zostały wcześniej zoptymalizowane. Zastosowano tzw. strategię *fed-batch*, w której 50% pożywki było wymieniane co 24 h. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych (z dwoma powtórzeniami technicznymi).

W celu wizualizacji komórki barwiono przyżyciowo barwnikiem CellTracker CMFDA (Thermo Fisher Scientific). Następnie komórki utrwalono w 4% paraformaldehynie przez 20 min i barwiono DAPI (1:1000, Sigma Aldrich) przez 20 min. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono z użyciem mikroskopu Zeiss AX100 imager D.2 oraz oprogramowania Zeiss Zen Blue 2 Edition Software.

W celu oddzielenia komórek mięśniowych od fibroblastów wykorzystano metodę FACS w oparciu o negatywną ekspresję markera CD90 w komórkach mięśniowych. Komórki na mikronośnikach inkubowane były z przeciwciałem anti-CD90 (1 µg/mL, #MA135307, Thermo Fisher Scientific) w buforze do FACS przez 45 min na lodzie. Po trzykrotnym przepłukaniu buforem płuczącym, komórki inkubowane były z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem Alexa Fluor 594 (#A211201, Thermo Fisher Scientific) przez 20 min na lodzie. Komórki negatywne dla markera CD90 (definiowane jako komórki mięśniowe) wybrano do dalszych etapów badania. Analizę FACS przeprowadzono z zastosowaniem sortera CytoFlex SRT (Beckman Coulter).

5.3.3. Ilościowe analizy metaboliczne

Próbki pożywek z obu badanych grup zbierano na etapie proliferacji (dzień 5) oraz różnicowania (dzień 8) i wirowano przy przyspieszeniu 1000 x g, celem usunięcia resztek komórkowych i zanieczyszczeń. Dedykowane testy luminescencyjne wybrano do analizy czterech kluczowych metabolitów. Metabolizm glukozy oceniano testem Glucose-Glo™ (Promega), a produkcję kwasu mlekowego testem Lactate-Glo™ (Promega). Metabolizm glutaminy oraz glutationu oceniano testem Glutamine/Glutamate-Glo™ (Promega). Wszystkie testy zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem producenta, a intensywność luminescencji mierzono z wykorzystaniem urządzenia BioTek Cytation 1 Cell Imaging Multimode Reader (Agilent Technologies).

5.3.4. Analiza ekspresji genów markerowych

Całkowite RNA wyizolowano z użyciem zestawu PureLink RNA Mini Kit i DNase Set. Ocenę ilościową i jakościową wyizolowanego RNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru DeNovix DS-1, a integralność oceniono metodą elektroforetyczną. Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 250 ng RNA oraz zestawu High-Capacity RNA to cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific). Względną ekspresję genów markerowych oceniono metodą qPCR z wykorzystaniem zestawu RT HS-PCR MIX SYBR (A&A Biotechnology). Kontrole

endogenne stanowiły geny *YWHAZ* i *ACTB*. Sekwencje starterów badanych genów znajdują się w publikacji nr 3.

5.3.5. Analizy proteomiczne

Poziom ekspresji białka miozyny został oceniony testem ELISA, którego metodyka została szczegółowo opisana w podpunkcie 5.2.7.

5.3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono w programie Statistica (Statsoft, wersja 19) oraz w programie GraphPad (Prism, wersja 10.2.3). Normalność rozkładu danych oceniono testem Shapiro-Wilka, a analizy przeprowadzono testem t-Studenta dla danych z analizy ekspresji genów i dwuczynnikową ANOVA dla testów metabolizmu.

6. Wyniki i dyskusja

6.1. Ocena wpływu składu pożywki hodowlanej na poziom proliferacji bydlęcych mięśniowych komórek satelitarnych

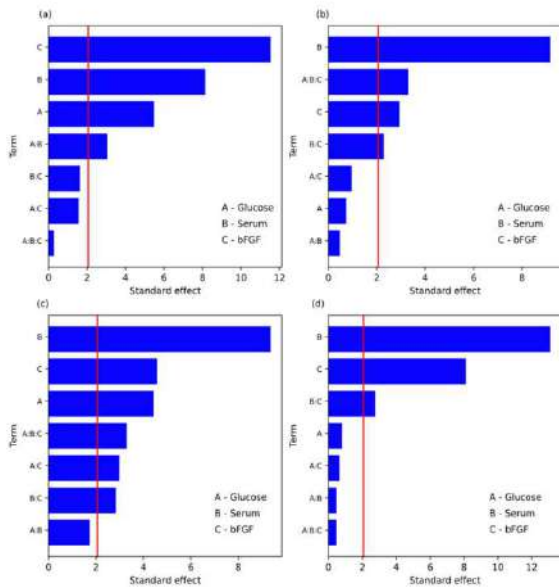
Analiza statystyczna wykazała istotną zmienność czynników wpływających na proliferację mięśniowych komórek satelitarnych w trakcie prowadzonej hodowli. Dobór zastosowanych modeli oparto na parametrach dopasowania: kryterium informacyjnym Akaikiego (AIC), bayesowskim kryterium informacyjnym (BIC) oraz współczynniku determinacji (R^2). W trzecim dniu hodowli w linii komórkowej R1 największą siłę efektu spośród testowanych składników (wartość efektu $6,92 \times 10^3$) wykazywał dodatek bFGF (komponent C). W piątym, siódmym i dziesiątym dniu największą siłę efektu wykazywał rodzaj surowicy (komponent B). We wszystkich punktach czasowych efekty główne (komponenty A, B i C) były istotne. Odnotowano również istotne interakcje: w trzecim dniu A:B, w piątym A:B:C i B:C oraz w siódmym – A:B:C, A:C oraz B:C (Rycina 3).

W linii komórkowej R2 rodzaj surowicy (komponent B) wykazywał największą siłę efektu spośród wszystkich testowanych czynników przez cały czas trwania eksperymentu. Istotny wpływ wykazywał również dodatek czynnika wzrostu bFGF (komponent C). W trzecim dniu hodowli istotne były interakcje A:C oraz A:B, natomiast w siódmym dniu interakcja A:C (Rycina 3). Szczegółowe dane dotyczące zastosowanych modeli oraz szacowanych efektów i współczynników dla poszczególnych etapów doświadczenia znajdują się w Publikacji nr 1.

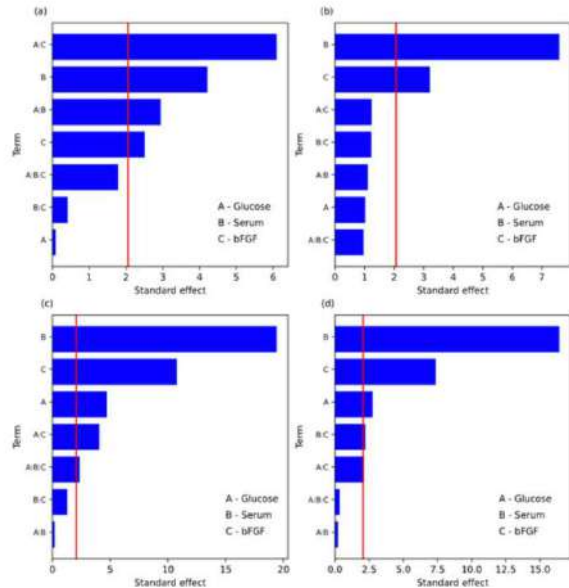
W celu przedstawienia zastosowanych modeli oraz zachodzących interakcji wygenerowano wykresy sześciennie dla poszczególnych linii komórkowych. W linii komórkowej R1 najwyższą wartość RFU uzyskano przy dodatku FBS oraz czynnika wzrostu bFGF w stężeniu 10 ng/mL, a w trzecim i siódmym dniu również przy wysokim stężeniu glukozy. W linii komórkowej R2 najwyższą wartość RFU uzyskano przy dodatku FBS oraz czynnika wzrostu w stężeniu 10 ng/mL, a w siódmym i dziesiątym dniu również dla niskiego stężenia glukozy (Rycina 4).

Przyżyciowe obserwacje mikroskopowe wykazały wolniejsze tempo różnicowania komórek mięśniowych w pożywce hodowlanej z dodatkiem FBS oraz czynnika wzrostu bFGF w stężeniu 10 ng/mL, w porównaniu z grupą hodowaną w pożywce z dodatkiem surowicy końskiej i bFGF w stężeniu 5 ng/mL. Formowanie się miotub w warunkach stymulujących różnicowanie obserwowane było od piątego dnia hodowli (Rycina 5).

Linia R1

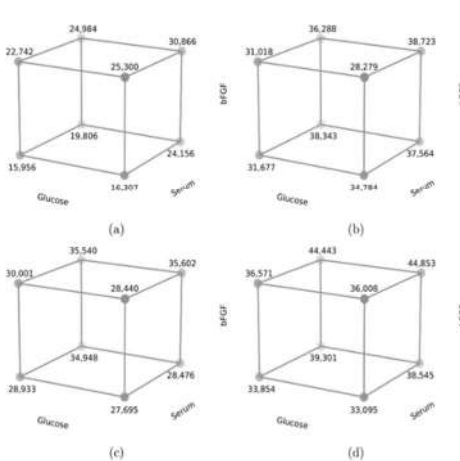


Linia R2

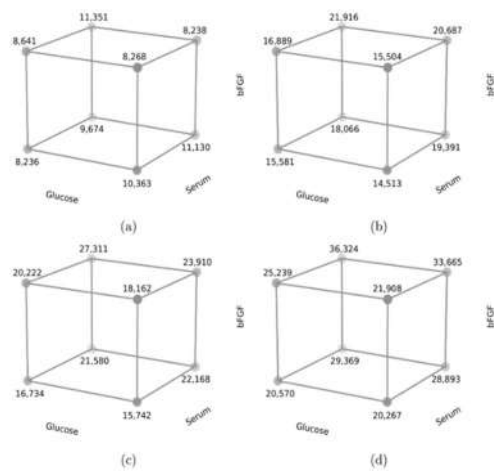


Rycina 3. Wykres Pareto dla identyfikacji najistotniejszych czynników dla linii komórkowych R1 oraz R2: **(a)** dzień trzeci, **(b)** dzień piąty, **(c)** dzień siódmy, **(d)** dzień dziesiąty. Czerwona linia odpowiada poziomowi istotności $\alpha = 0,05$.

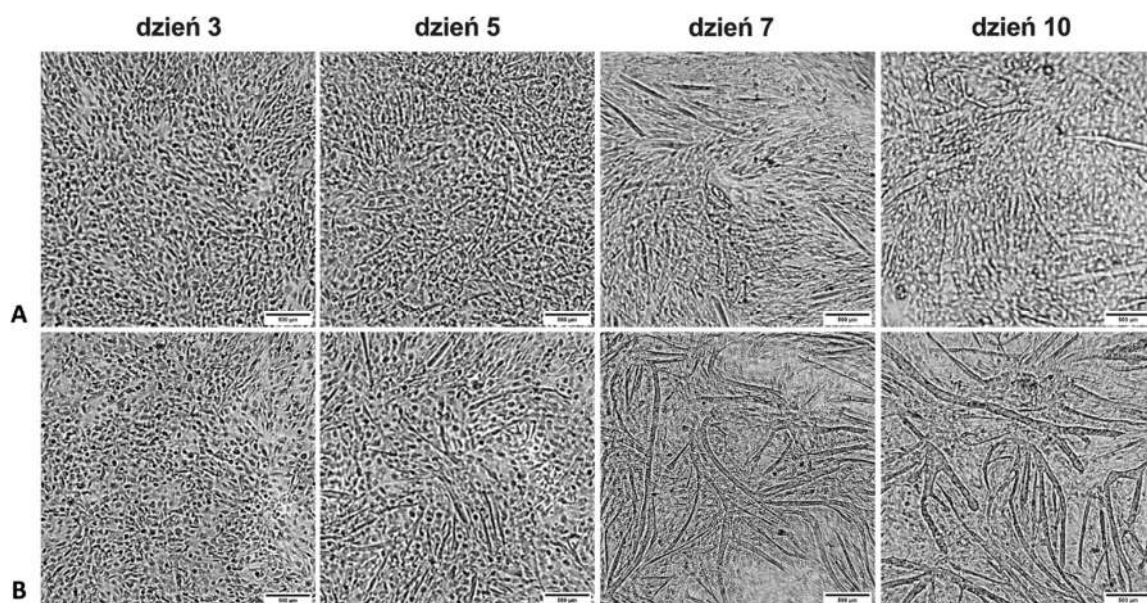
Linia R1



Linia R2

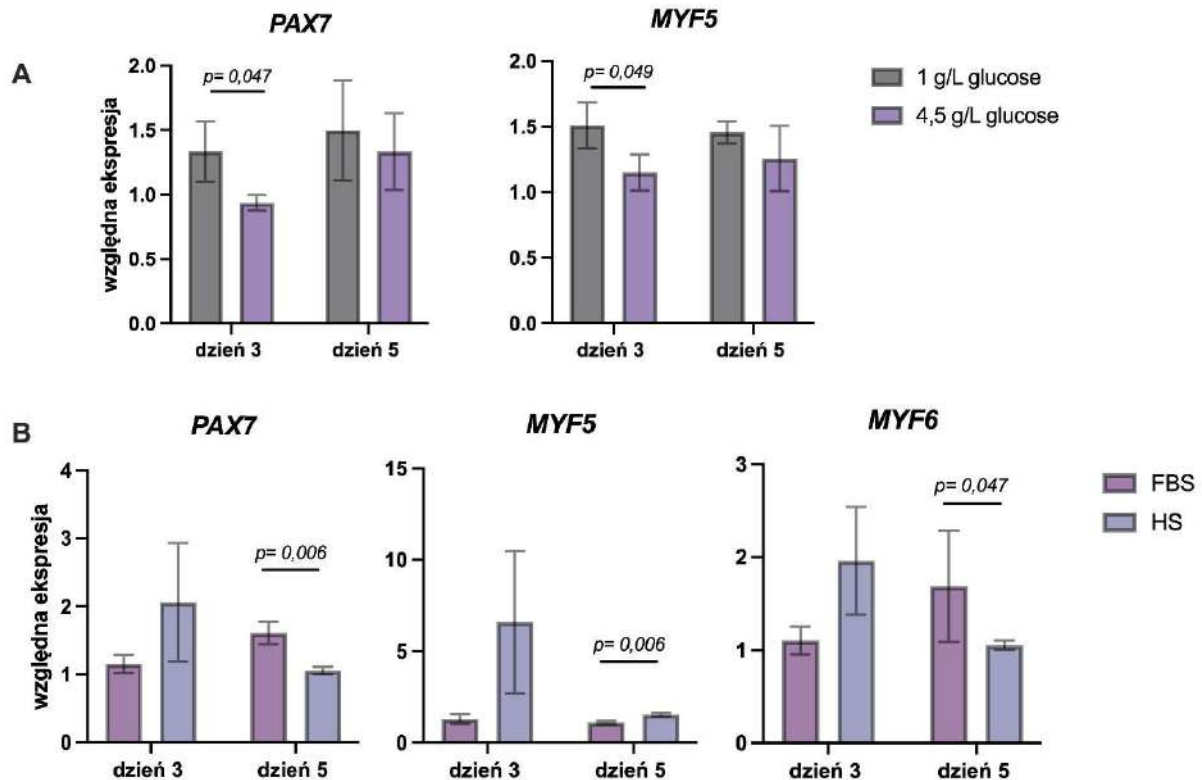


Rycina 4. Wykresy sześciennic dla badanych składników medium dla linii komórkowych R1 oraz R2: **(a)** dzień trzeci, **(b)** dzień piąty, **(c)** dzień siódmy, **(d)** dzień dziesiąty.



Rycina 5. Obserwacje mikroskopowe mięśniowych komórek satelitarnych; **(A)** komórki mięśniowe hodowane w medium z wysoką zawartością glukozy, 20% dodatkiem FBS i bFGF o stężeniu 10 ng/mL; **(B)** komórki mięśniowe hodowane w medium z niską zawartością glukozy, 20% dodatkiem HS i bFGF w stężeniu 5 ng/mL. Pasek skali odpowiada 500 µm.

Analiza względnej ekspresji genów markerowych oznaczonych metodą qPCR nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami różniącymi się stężeniem bFGF (5 ng/mL vs 10 ng/mL). Jednak istotnie wyższą ekspresję genów wczesnej miogenezy – *PAX7* oraz *MYF5* zaobserwowano w trzecim dniu hodowli w komórkach utrzymywanych w niższym stężeniu glukozy (1 g/L) (Rycina 6A). W piątym dniu hodowli obserwowano istotnie wyższą względną ekspresję *PAX7* i *MYF6* oraz istotnie niższą względną ekspresję *MYF5* w komórkach hodowanych w pożywce suplementowanej płodową surowicą bydlęcą (Rycina 6B).



Rycina 6. (A) Względna ekspresja genów markerowych komórek mięśniowych hodowanych w pożywce z różnym stężeniem glukozy (1 g/L vs 4,5 g/L) **(B)** Względna ekspresja genów markerowych komórek mięśniowych hodowanych w pożywce suplementowanych różnym typem surowicy (FBS vs HS) oznaczonych metodą qPCR (n=3). Wykresy dla wszystkich badanych czynników znajdują się w publikacji nr 1.

Odtworzenie przebiegu miogenezy w warunkach *in vitro* wymaga dostarczenia odpowiednich składników podłoża hodowlanego, które stymulują proliferację komórek mięśniowych, jednocześnie hamując ich spontaniczne różnicowanie w miotuby. Niespójność dostępnych w literaturze danych utrudnia wybór optymalnego składu pożywki, a ponadto większość opracowanych kompozycji ukierunkowana jest na proces różnicowania, a nie na stymulowanie podziałów komórkowych (Will i wsp., 2015). Wykorzystanie metody modelowania i optymalizacji DOE umożliwiło zbadanie synergistycznego wpływu trzech komponentów: stężenia glukozy (1 g/L vs 4,5 g/L), rodzaju surowicy (płodowa surowica bydlęca vs surowica końska) oraz stężenia czynnika wzrostu bFGF (5 ng/mL vs 10 ng/mL) na proliferację mięśniowych komórek satelitarnych (Yasui i wsp., 2021). Otrzymane wyniki wskazują, że spośród testowanych czynników to rodzaj surowicy (czynnik B) najsilniej stymulował proces proliferacji bydlęcych MuSCs. Uzyskane dane są zgodne z obserwacjami Franke i wsp. (2014), którzy odnotowali wyższe tempo proliferacji bydlęcych MuSCs

w pożywce suplementowanej FBS po 24 godzinach hodowli. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku końskich komórek mezenchymalnych, które hodowane w pożywce z dodatkiem FBS wykazywały zwiększone tempo proliferacji i wyższy poziom sekrecji m.in. interleukin oraz bFGF (Pezzanite i wsp., 2021).

W niniejszym badaniu wykazano również istotną interakcję między rodzajem surowicy, a stężeniem bFGF (czynnika C). Potwierdzono mitogeny wpływ czynnika wzrostu – stężenie 10 ng/mL silniej stymulowało proliferację komórek mięśniowych, stanowiąc drugi, co do istotności, czynnik wpływający na tempo podziałów komórkowych. Dowiedziono, że bFGF reguluje miogenezę poprzez aktywację lub hamowanie specyficznych szlaków metabolicznych mięśni oraz hamuje proces przedwczesnego różnicowania komórek satelitarnych (Pawlikowski i wsp., 2017). Stymulujący wpływ bFGF i nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF – ang. epidermal growth factor) na tempo proliferacji oraz poziom ekspresji genu *MYOD* zaobserwowano w przypadku komórek mięśniowych świń rasy Jeju Black (Park i wsp., 2021).

Pomimo że poziom glukozy nie wykazał istotnego wpływu na tempo podziałów komórkowych, analiza ekspresji genów markerowych wykazała istotnie wyższy poziom względnej ekspresji genów *PAX7* i *MYF5* w trzecim dniu hodowli w grupie o niższej zawartości glukozy (1 g/L). Geny te są kluczowe dla wczesnej miogenezы i zaangażowane są w samoodnawianie populacji komórek satelitarnych, co potwierdziły wcześniejsze badania, w których wykazano zdolność komórek mięśniowych do samoodnawiania się w warunkach o ograniczonej dostępności glukozy (Furuichi i wsp., 2021).

Warto pokreślić, że wykorzystanie surowicy pochodzenia zwierzęcego jest sprzeczne z podstawowymi założeniami technologii „mięsa komórkowego”, dlatego głównym kierunkiem badań stało się opracowanie nieodziewierzęcych substytutów, które stymulowałyby proliferację komórek mięśniowych z wydajnością porównywalną do bydlęcej surowicy płodowej (Kolkman i wsp., 2020). Podjęte przez nasz zespół próby ekspansji komórek mięśniowych w pożywce zawierającej komercyjnie dostępny zamiennik surowicy KnockOut™ Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific) wykazały jednak istotnie niższe tempo proliferacji komórek mięśniowych, przy jednoczesnym wzroście względnej ekspresji *MYF5*. Poza aspektem etycznym i ekonomicznym, istotnym ograniczeniem w stosowaniu surowicy bydlęcej jest naturalnie występująca zmienność pomiędzy partiami produktu w stężeniu czynników wzrostu i cytokin. Opracowanie alternatyw o ściśle zdefiniowanym i powtarzalnym składzie jest niezbędne dla standaryzacji protokołów technologii „mięsa komórkowego”.

W związku z ryzykiem ograniczonej dostępności konkretnej partii surowicy na dalszych etapach badań, w celu zapewnienia powtarzalności otrzymanych wyników, przetestowano

komercyjnie dostępne pożywki – MesenPRO RS™ Medium (Thermo Fisher Scientific), StemFlex™ Medium (Thermo Scientific) oraz HSkMC Growth Medium (Cell Applications), oceniając ich wpływ na proliferację komórek mięśniowych. Wykazano, że pożywka HSkMC Growth Medium zapewnia najszybsze tempo proliferacji, przy jednoczesnym utrzymaniu komórek w stanie niezróżnicowanym, co potwierdziła istotnie niższa względna ekspresja genów *MYOD* i *MYF6*. Z kolei zastosowanie pożywki MesenPRO RS™ skutkowało niższym tempem proliferacji oraz istotnie wyższą ekspresją genów *MYF5*, *MYOD* i *MYF6*. Na podstawie przeprowadzonych analiz wytypowano pożywkę HSkMC Growth jako wydajny komercyjny substytut pożywki hodowlanej na etapie ekspansji bydłych MuSCs (Zygmunt i wsp., 2023).

6.2. Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydłych komórek satelitarnych w hodowli dwuwymiarowej

6.2.1 Analiza transkryptomu MuSCs hodowanych w kokulturze z fibroblastami

W celu oceny parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy przygotowano biblioteki cDNA mięśniowych komórek satelitarnych hodowanych w monokulturze i w kokulturze z fibroblastami dla trzech punktów czasowych (prolifracja, 24-godzinne różnicowanie, 72-godzinne różnicowanie). Selekcję genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs – ang. differentially expressed genes) oparto na skorygowanym poziomie istotności (p_{adj}) $p_{adj} \leq 0,05$ oraz module logarytmu o podstawie dwa zmiany krotności $|\log_2FC| \geq 0,05$. W celu sklasyfikowania i scharakteryzowania biologicznego znaczenia DEGs przeprowadzono analizę wzbogacenia GO (ang. gene ontology). W przeprowadzonych analizach skupiono się na terminach GO związanych z miogenezą, takich jak procesy rozwojowe, proliferacja komórek i różnicowanie. Szczegółowe dane dotyczące analizy wzbogacenia znajdują się w publikacji nr 2.

Analiza różnicowej ekspresji genów na etapie proliferacji wykazała istotną zmianę ekspresji 1133 genów, z czego 483 wykazywało podwyższoną i 650 obniżoną ekspresję. Spośród DEGs wybrano 15 genów o obniżonej ekspresji i 17 genów o podwyższonej ekspresji, kluczowych dla procesu miogenezy.

Genem o najbardziej obniżonej ekspresji był *FGF2* ($\log_2FC = -1,16$), wspierający proliferację MuSCs. Z kolei genem o najbardziej podwyższonej ekspresji był *SOCS3* promujący różnicowanie miogenne poprzez hamowanie szlaku JAK/STAT1/STAT3 ($\log_2FC = 1,09$) (Diao i wsp., 2009). Zaobserwowano również wzrost ekspresji DEGs indukujących różnicowanie, takich jak *IL6* ($\log_2FC = 1,06$) oraz *EGR1* ($\log_2FC = 1,01$). Wykazano, że *IL6* zwiększa ekspresję *MYOD* i *MYOG* i promuje przejście komórek do fazy

G₀/G₁ (Steyn i wsp., 2019), natomiast EGR1 promuje różnicowanie miogenne poprzez pozytywną regulację ekspresji *MYOG* (Zhang i wsp., 2018). Regulatory transkrypcji, takie jak *NR4A1*, *HDAC4*, *PITX1* czy *EYA2*, wykazały zwiększoną ekspresję w warunkach kokultury z fibroblastami. HDAC4 reguluje proliferację poprzez hamowanie ekspresji p21 oraz wpływa na różnicowanie miogenne poprzez hamowanie ekspresji Sharp1 (Renzini i wsp., 2018). NR4A1 zaangażowany jest w różnicowanie miogenne, a jego nadekspresja promuje zwiększoną fuzję mioblastów (Pan i wsp., 2019). Z kolei EYA2 aktywuje geny takie jak *MYOD*, *MYF6* czy *MYOG* (Grifone i wsp., 2007).

W naszym badaniu zaobserwowano obniżoną ekspresję DEGs istotnych na etapie terminalnego różnicowania, m.in. *MYOM1*, *CALCRL*, *CRYAB*, *CAV1*, *ANK3* oraz podwyższoną ekspresję *DES* (integracja miofibryli oraz organelli w komórce), *XIRP* (regeneracja włókien mięśniowych), *TCAP* (tworzenie rusztowania dla miofibryli) (Capetanaki i wsp., 1997; Otten i wsp., 2012; Markert i wsp., 2010). Ponadto wykazano obniżenie ekspresji innych markerów różnicowania zaangażowanych w regenerację mięśni, takich jak *GDF15*, *HOMER1*, *ROCK1*, *RBI*. Co istotne, zaobserwowano podwyższoną ekspresję *TGFB1*, kluczowego elementu szlaku sygnałowego TGF- β , istotnego w procesie rozwoju mięśni.

Analiza różnicowej ekspresji genów (DEGs) na etapie 24-godzinnego różnicowania wykazała istotną zmianę ekspresji 397 genów – 158 o podwyższonej ekspresji i 239 o obniżonej ekspresji. Spośród DEGs wybrano 19 genów o obniżonej ekspresji i 18 genów o podwyższonej ekspresji kluczowych dla procesu miogenezy. Genem o najbardziej obniżonej ekspresji był *ITGA7*, kluczowy marker mięśniowych komórek satelitarnych decydujący o ich polarności i tworzeniu połączeń z ECM (Dominici i Richard, 2022; Ozeki i wsp., 2006). Spadek ekspresji odnotowano również dla *BHLHA15*, *FOXSI*, *HESI*, kontrolujących aktywność *MYOD1*, jednego z najważniejszych czynników transkrypcyjnych z rodziny MRF. Obniżona ekspresja represorów MYOD wskazuje na promowanie różnicowania w warunkach kokultury z fibroblastami. Ponadto wiele innych DEGs, w tym m.in. *MYORG* (rozwój mięśni), *NES* (utrzymanie populacji MuSCs), *CD44* (różnicowanie i migracja komórek mięśniowych), *TCAP* oraz *GDF15* wykazywały obniżoną ekspresję w komórkach mięśniowych hodowanych w kokulturze z fibroblastami (Datta i wsp., 2009; Pallari i wsp., 2011). Obniżona ekspresja NES przekładała się na promowanie wczesnej miogenezy – poprzez zwiększoną ekspresję MyHC oraz *MYOG* (Pallari i wsp., 2011).

Genem o najbardziej podwyższonej ekspresji był *EGR1* ($\log_2FC = 3,49$). Ponadto, wyższy poziom transkryptów wykazano m.in. dla *DCN* (promowanie proliferacji), *IL6*, regulatorów transkrypcji: *RUNX1*, *NR4A1*, *SOCS3*, *EYA2*. Odnotowano również podwyższoną

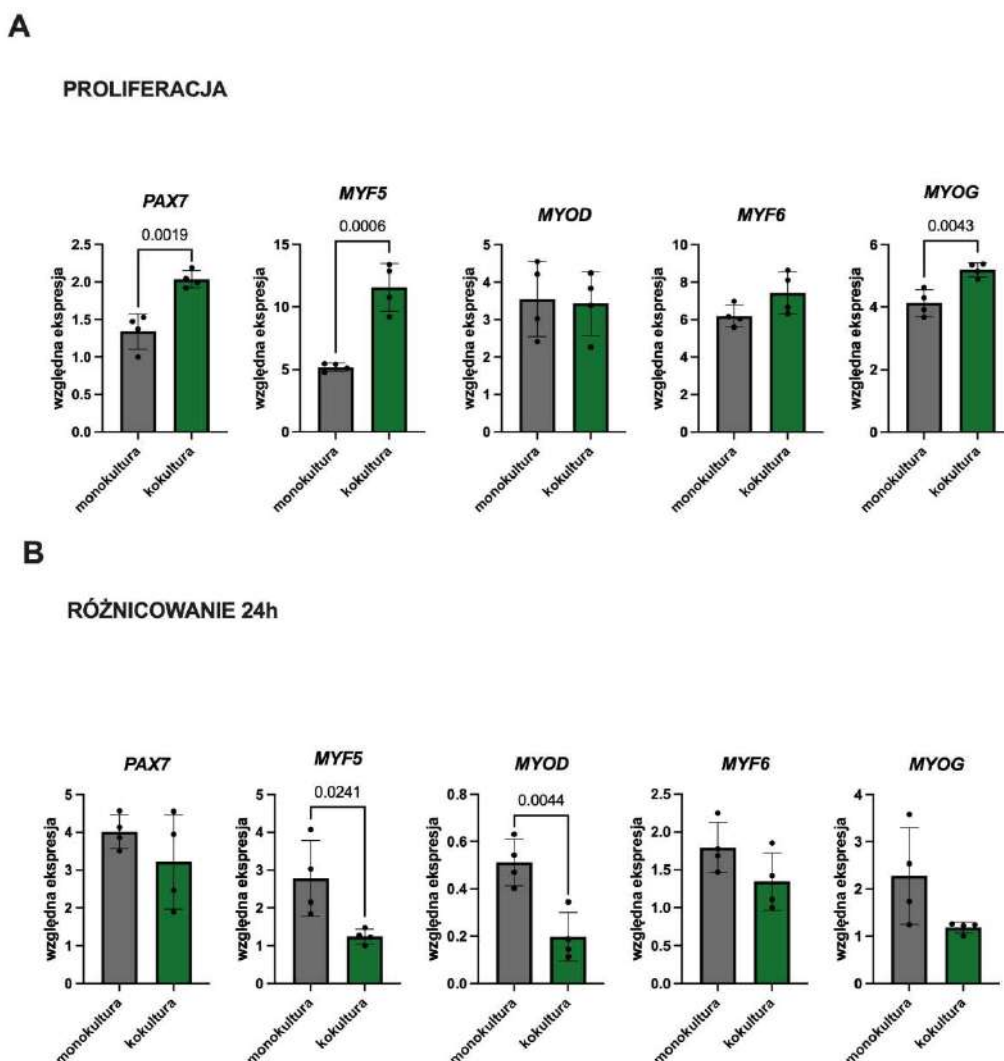
ekspresję genów zaangażowanych w kluczowe szlaki sygnałowe, takie jak WNT, Hedgehog, BMP oraz TGF- β .

Analiza różnicowej ekspresji genów na etapie 72-godzinnego różnicowania wykazała istotną zmianę ekspresji 1630 genów – 922 o podwyższonej ekspresji i 708 o obniżonej ekspresji. Spośród DEGs wybrano 23 geny o obniżonej ekspresji i 12 genów o podwyższonej ekspresji kluczowych dla procesu miogenezy. Genem o najbardziej obniżonej ekspresji był *ITGA7* ($\log_2FC = 2,01$). Spadek ekspresji odnotowano również dla *FOXS1* oraz *HEYL2*, kontrolujących aktywność MYOD1, a także dla szeregu DEGs biorących udział w procesie różnicowania oraz formowania cytoszkieletu, takich jak *DES*, *MYOM1*, *CRYAB*, *GDF15*, *NES*, *LMOD1* (promowanie różnicowania miogenicznego), *FLNC* (budowa dysku Z sarkomeru). Genem o najbardziej podwyższonej ekspresji był *IL6* ($\log_2FC=2,66$). Ponadto DEGs takie jak *EGRI*, *SOCS3*, *HDAC4* wykazywały zwiększoną ekspresję w MuSCs w warunkach kokultury z fibroblastami. Co istotne, zaobserwowano zwiększoną ekspresję receptorów sygnalizacji TGF- β , takich jak *TGFBRI* oraz *TGFBRI3*, które hamują terminalne różnicowanie.

Walidacja wyników RNA-Seq przeprowadzona metodą qPCR częściowo potwierdziła otrzymane wyniki. Współczynnik Pearsona (R^2) dla *EGRI*, *IL6* oraz *ITGA7* wynosił $>0,78$, a dla pozostałych walidowanych genów – *SOCS3* oraz *TCAP* – $<0,32$. Tabele ze szczegółowymi danymi dotyczącymi otrzymanych wartości dla badanych genów znajdują się w publikacji nr 2.

6.2.2. Analiza względnej ekspresji genów z rodziny PAX i MRF metodą qPCR

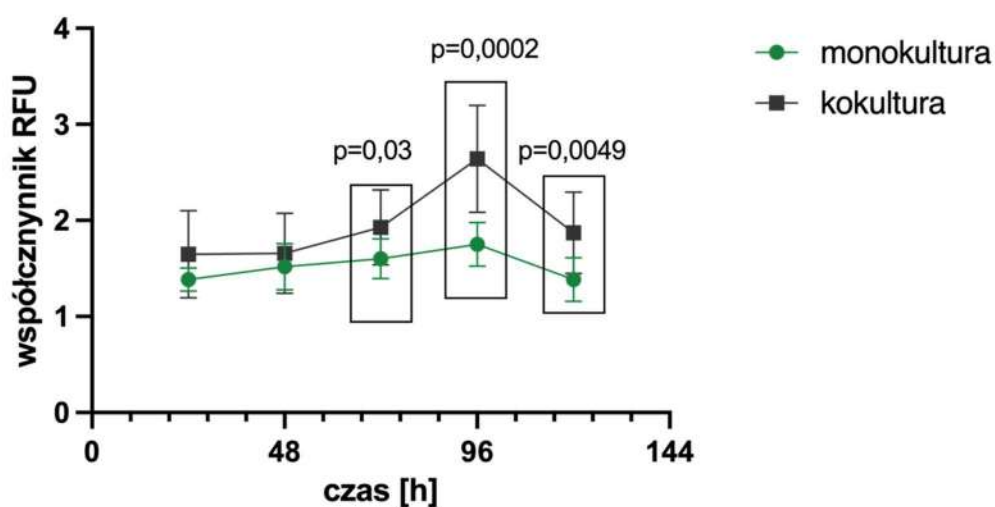
Względną ekspresję genów z rodziny PAX – *PAX7* oraz MRF – *MYF5*, *MYOD*, *MYF6*, *MYOG* dla których nie wykryto zmian ekspresji analizą RNA-Seq, oceniono techniką qPCR. Na etapie proliferacji istotnie wyższą ekspresję genów *PAX7* ($p=0,0019$), *MYF5* ($p=0,006$) i *MYOG* ($p=0,0043$) obserwowano w komórkach hodowanych w kokulturze z fibroblastami (Rycina 7A). Na etapie 24-godzinnego różnicowania istotnie niższą ekspresję genów *MYF5* ($p=0,0241$) i *MYOD* ($p=0,0044$) obserwowano w układzie kokultury (Rycina 7B). Brak istotnie statystycznych różnic między badanymi grupami obserwowano na etapie 72-godzinnego różnicowania.



Rycina 7. Względna ekspresja genów markerowych oznaczonych metodą qPCR (n=4): **(A)** na etapie proliferacji; **(B)** na etapie 24 godzinnego różnicowania.

6.2.3 Analiza tempa proliferacji mięśniowych komórek satelitarnych

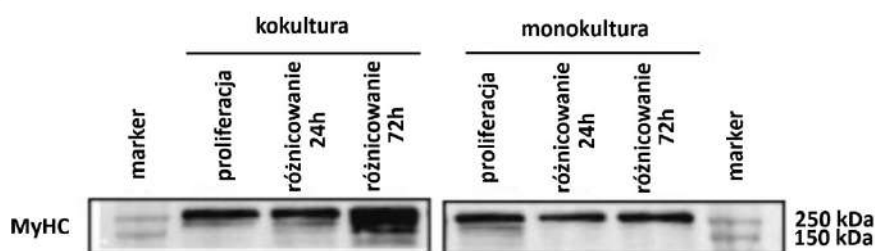
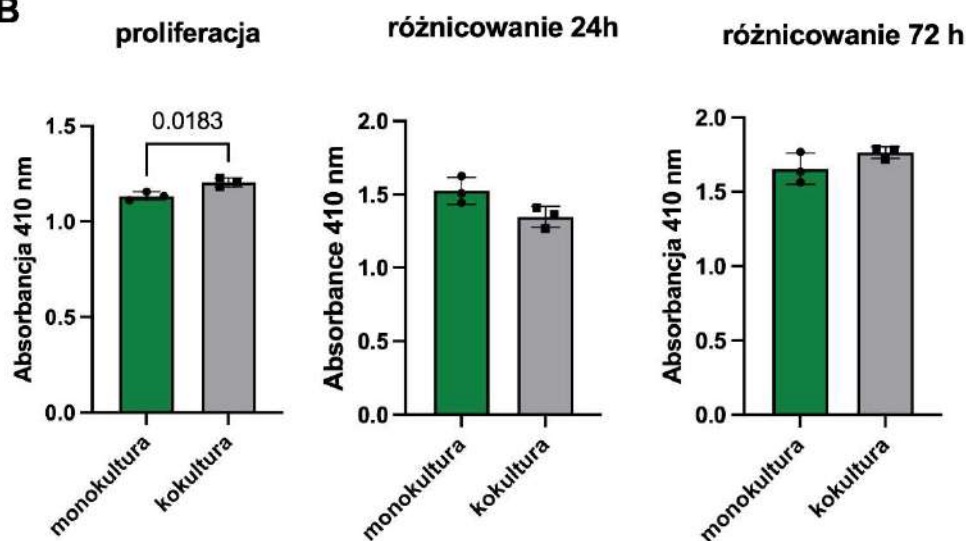
Analiza tempa proliferacji MuSCs z wykorzystaniem fluorymetrycznego testu opartego na pomiarze resazury, wykazała istotnie wyższe tempo proliferacji komórek mięśniowych hodowanych w kokulturze w trzecim ($p=0,03$), czwartym ($p=0,002$) i piątym ($p=0,0049$) dniu hodowli (Rycina 8). Jednakże, analiza RNA-seq nie wykazała zmian w ekspresji markerów proliferacji takich jak Ki-67, pCNA, kinaz zależnych od cyklin (*CDK2*, *CDK4*) czy cyklin (*CCND1*, *CCNE1*) podczas etapu proliferacji i 24 godzinnego różnicowania. Na etapie 72- godzinnego różnicowania podwyższoną ekspresję *MKI67* ($\log_2FC=1,35$), *pCNA* ($\log_2FC=0,59$) oraz *CDK2* ($\log_2FC=0,71$) zaobserwowano w grupie kokultury.



Rycina 8. Analiza tempa proliferacji MuSCs w warunkach monokultury i kokultury z fibroblastami, przeprowadzona z zastosowaniem testu fluorometrycznego CellTiter Blue Assay (Promega).

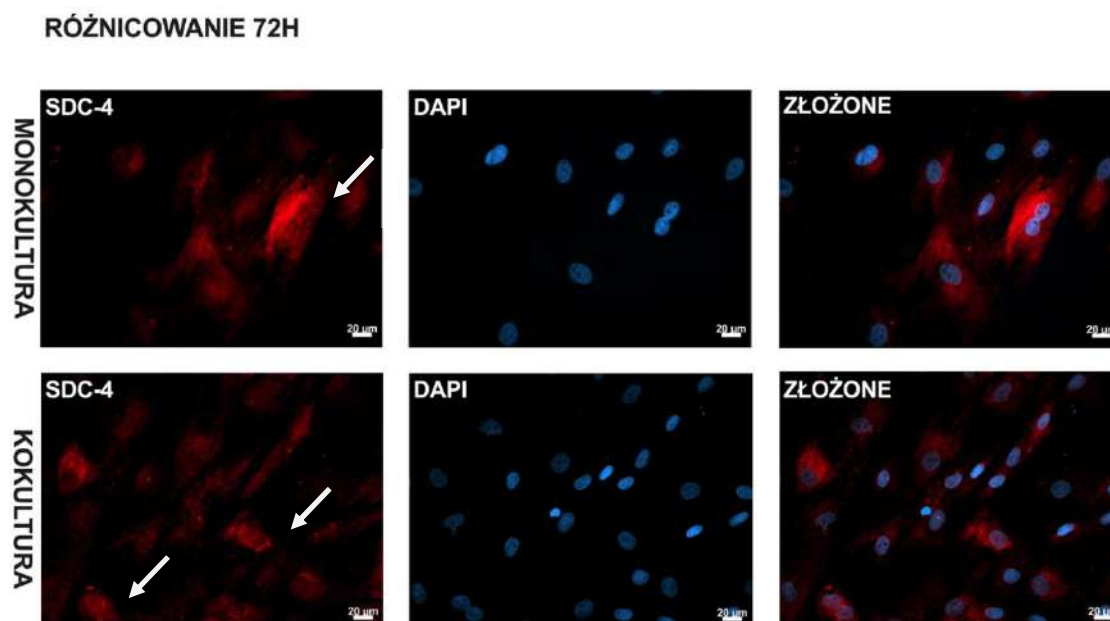
6.2.4. Analiza markerów miogenezy – miozyny i synekanu-4 - na poziomie białkowym

Analiza Western Blot dla łańcuchów ciężkich miozyny szkieletowej (MyHC) potwierdziła ekspresję białka, wykazując prążki o masie ok. 230 kDa w obu badanych grupach na wszystkich etapach hodowli (Rycina 9A). Ilościowa analiza białka miozyny szkieletowej techniką ELISA wykazała istotnie wyższą ekspresję białka ($p=0,0183$) w grupie kokultury na etapie proliferacji (Rycina 9B).

A**B**

Rycina 9. (A) Białko łańcucha ciężkiego miozyny I (MYHC- ang. myosin heavy chain) – 228 kDa w MuSCs hodowanych w monokulturze i w kokulturze z fibroblastami oznaczone metodą Western Blot **(B)** Poziom białka MYH1 w MuSCs hodowanych w monokulturze i w kokulturze z fibroblastami (n= 3) oznaczone metodą ELISA.

Barwienie immunofluorescencyjne dla syndekanu-4 wykazało ekspresję białka na wszystkich etapach w obu badanych grupach. Na etapie 72-godzinnego różnicowania zaobserwowano internalizację syndekanu-4 z cytoplazmy do lokalizacji jądrowej, co jest zgodne z obserwacjami Rønning i wsp. (2015), wskazując na postępujące różnicowanie miojenne (Rycina 10).



Rycina 10. Lokalizacja syndekanu-4 w monokulturze i w kokulturze MuSCs z fibroblastami. Obserwacje na etapie 72-godzinnego różnicowania. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Pasek skali odpowiada 20 µm.

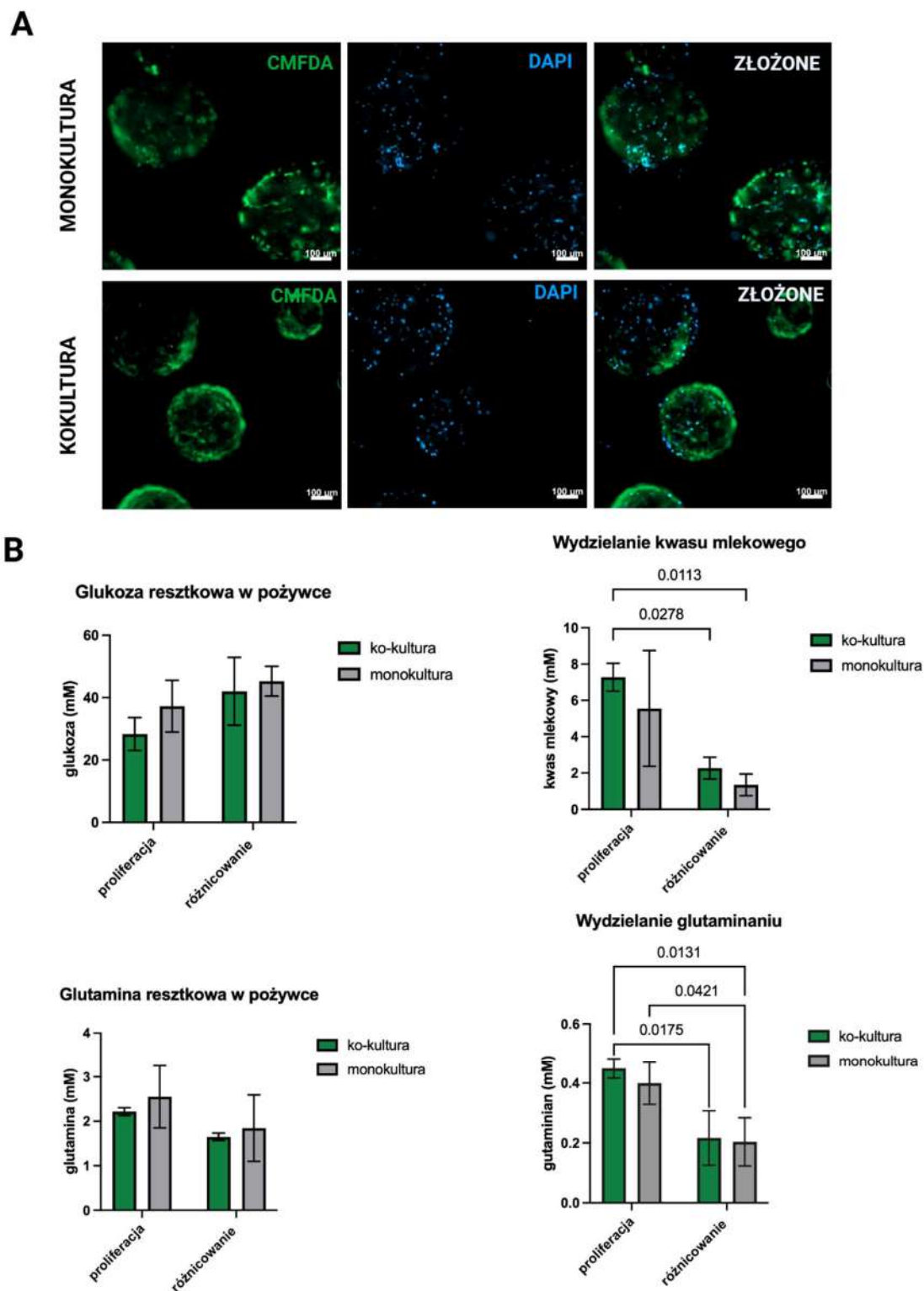
Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że fibroblasty poprzez sygnały parakrynnie stymulują wczesne różnicowanie mioblastów. W warunkach proliferacji obserwowano zwiększoną ekspresję genów wczesnego różnicowania, takich jak *EGR1*, *IL6*, *EYA2*, *NR4A1* czy *SOCS3*, przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji genów późnego różnicowania (jak *CRYAB* czy *MYOM1*). Po indukcji różnicowania poprzez zmianę warunków hodowlanych efekt ten uległ nasileniu, co wskazuje, że sygnalizacja parakrynnna fibroblastów może regulować zakres różnicowania miogenne. Istotny jest również stosunek sygnałów parakrynnnych, który ulegał zmianom w trakcie hodowli w związku z szybszym tempem proliferacji fibroblastów, co mogło hamująco wpłynąć na terminalne różnicowanie m.in. poprzez podwyższoną sygnalizację TGF- β .

6.3 Ocena parakrynnego wpływu fibroblastów na proces miogenezy bydłych komórek satelitarnych w hodowli w naczyniu typu *spinner flask*

6.3.1. Analiza warunków hodowlanych – obserwacje mikroskopowe oraz analizy metaboliczne

MuSCs i fibroblasty hodowane na nośnikach żelatynowych wybarwiono przyżyciowo barwnikami CellTracker CMDFDA (znakujący cytoplazmę) i DAPI (znakujący jądro komórkowe), aby potwierdzić ich adhezję do powierzchni mikronośników (Rycina 11A). Ponadto na etapie różnicowania w grupie kokultury komórek mięśniowych z fibroblastami nie obserwowano agregacji mikronośników, w przeciwieństwie do monokultury.

Analiza ilościowa czterech kluczowych metabolitów: glukozy, kwasu mlekowego, glutaminianu oraz glutaminy nie wykazała istotnych różnic w ich poziomach pomiędzy monokulturą, a kokulturą na danym etapie hodowli. Zużycie glukozy spadło w warunkach różnicowania w obu badanych grupach. Wydzielanie kwasu mlekowego również uległo obniżeniu, co świadczy o spadku udziału ścieżki glikolitycznej – efekt ten był szczególnie widoczny w grupie kokultury ($p=0,0278$). Podobnie sekrecja glutaminy spadła w warunkach różnicowania, a zużycie glutationu wzrosło (Rycina 11B).

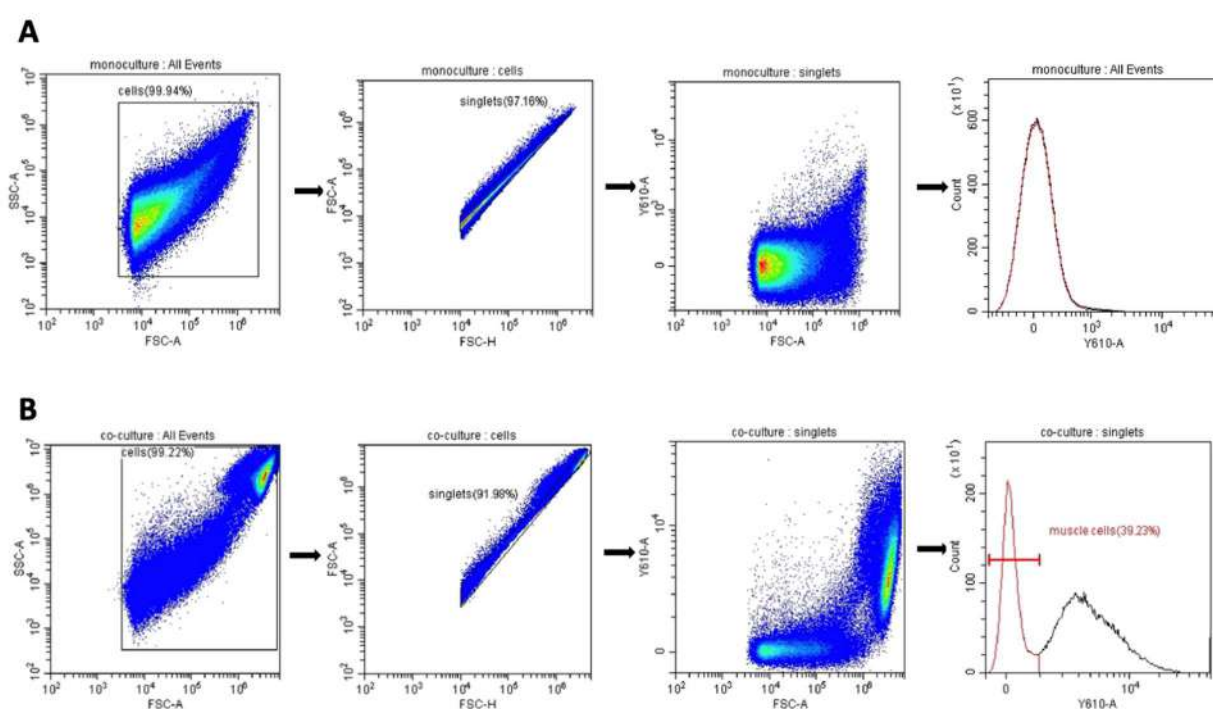


Rycina 11. (A) Komórki hodowane na mikronośnikach Cultishper G wybarwione znacznikiem przyżyciowym Cell Tracker CMFDA oraz DAPI na etapie 72-godzinnego różnicowania. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono z użyciem mikroskopu Zeiss AX100 Imager D.2 i oprogramowania Zeiss Zen 2 Blue Edition Software. Pasek skali odpowiada 100 μm **(B)** Ilościowa analiza kluczowych metabolitów: glukozy resztkowej (definiowanej jako

niewykorzystana glukoza pozostała w pożywce) (mM), mleczanu (mM), glutaminy resztkowej (definiowanej jako niewykorzystana glutamina pozostała w pożywce) (mM) oraz glutaminianu (mM) (n=3), z użyciem dedykowanych testów opartych na luminescencji (Promega).

6.3.2. Izolacja komórek mięśniowych od fibroblastów metodą FACS

Do dalszych analiz komórki mięśniowe z kokultury z fibroblastami wybrano na podstawie negatywnej selekcji dla markera CD90 z wykorzystaniem analizy FACS. Reprezentatywny histogram potwierdza obecność dwóch odrębnych populacji komórek – CD90-negatywnych (definiowanych jako komórki mięśniowe) oraz CD90-pozytywnych (definiowanych jako fibroblasty) (Rycina 12).

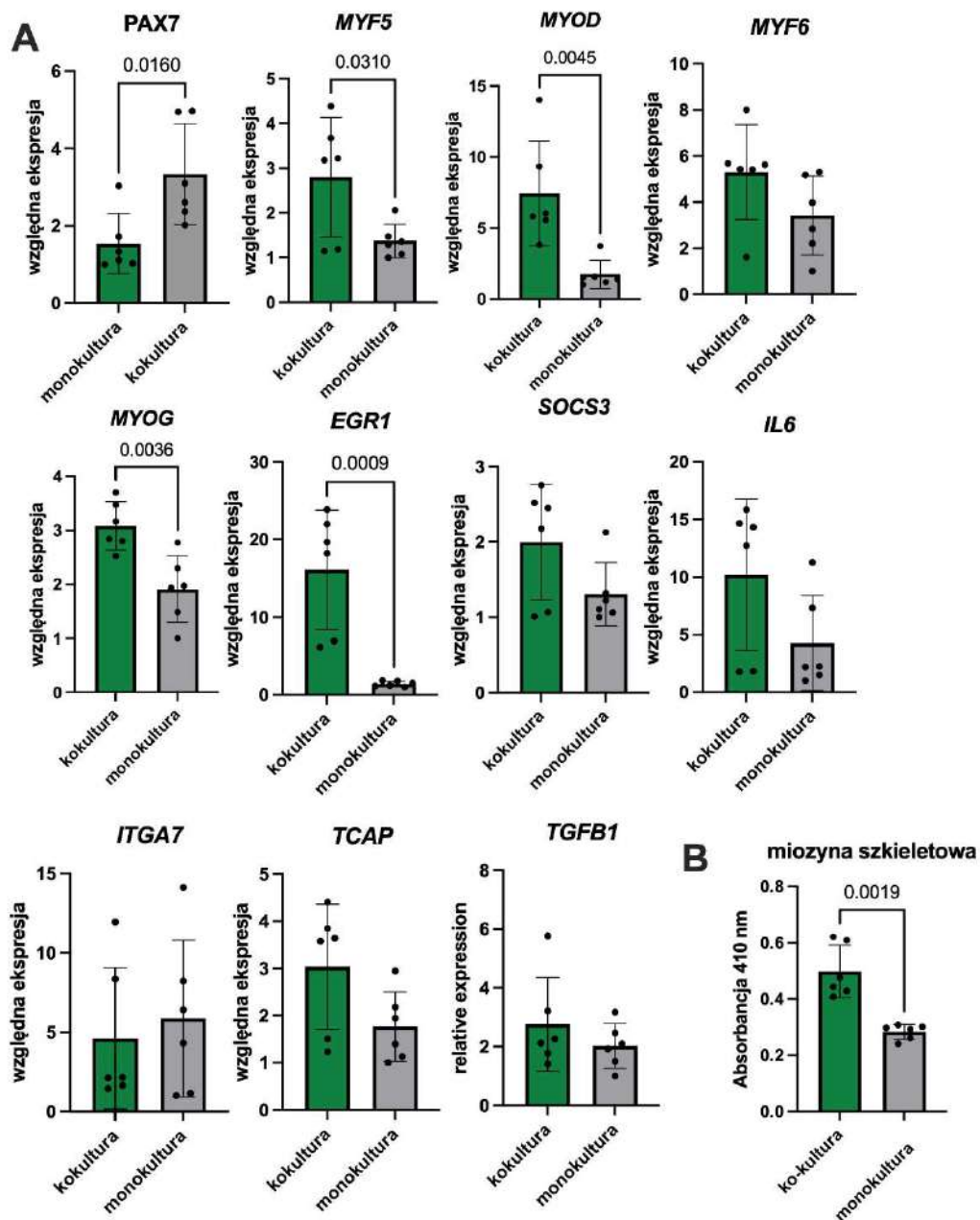


Rycina 12. Analiza FACS przeprowadzona w celu oddzielenia komórek CD90-negatywnych (definiowanych jako komórki mięśniowe) od komórek CD90-pozytywnych (definiowanych jako fibroblasty). **(A)** monokultura komórek mięśniowych **(B)** kokultura komórek mięśniowych z fibroblastami. Reprezentatywny histogram pokazuje intensywność fluorescencji w kanale Y610 w skali logarytmicznej. Dane uzyskane wykorzystując sorter CytoFlex SRT i oprogramowanie CytExpert (Beckman Coulter).

6.3.3. Analiza ekspresji markerów miogenezy

Istotnie wyższą względną ekspresję genu *PAX7*, zaangażowanego w utrzymanie stanu spoczynku i proliferacji komórek mięśniowych, zaobserwowano w grupie kokultury (p=0,0160). Ponadto istotnie wyższą ekspresję genów *MYF5*, *MYOD* i *MYOG*,

zaangażowanych w proliferację i różnicowanie miogeniczne, zaobserwowano w grupie kokultury komórek mięśniowych z fibroblastami (odpowiednio $p=0,0310$; $p=0,0045$; $p=0,0036$). Istotnie wyższą względną ekspresję *EGR1* ($p=0,0009$), który jest zaangażowany w różnicowanie miogeniczne, obserwowano w grupie kokultury. Nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic w ekspresji markerów takich jak *SOCS3*, *IL6*, *TCAP*, *ITGA7* czy *TGFB1* (Rycina 13A). Wyższą względną ekspresję białka miozyny szkieletowej zaobserwowano w grupie kokultury ($p=0,0019$) (Rycina 13B).



Rycina 13. (A) Względna ekspresja genów markerowych oznaczonych metodą qPCR ($n=6$). **(B)** Poziom ekspresji białka miozyny szkieletowej oznaczony techniką ELISA ($n=6$).

Trójwymiarowe systemy hodowli znacznie wierniej oddają złożoność interakcji międzykomórkowych niż tradycyjne hodowle dwuwymiarowe. Zastosowane mikronośniki żelatynowe zwiększają powierzchnię dostępną do adhezji i wzrostu komórek, jednocześnie zapewniając efektywną wymianę składników odżywczych i gazów dzięki swojej porowatej strukturze (Swan i wsp., 2024). Bioreaktor typu *spinner flask* pozwala na równomierne rozmieszczenie mikronośników i składników odżywczych w całym naczyniu hodowlanym, stanowiąc bardzo dobry wybór do skalowania hodowli komórkowych (Yang i wsp., 2022). Odmienne cechy fizykochemiczne hodowli w naczyniach typu *spinner flask*, jak układ dynamiczny napędzany mieszaniem, siła mechaniczna (głównie naprężenie ścinające) oraz odmienny profil transferu składników odżywczych i tlenu - stanowią istotne czynniki modulujące wzrost komórek (Vallejos i wsp., 2011; Ismadi i wsp., 2014).

Podsumowując, współhodowla komórek mięśniowych z fibroblastami w warunkach 3D potwierdziła wcześniejsze obserwacje, że fibroblasty poprzez parakrynną sygnalizację wspierają wczesne różnicowanie komórek mięśniowych oraz potencjalnie wspierają proces proliferacji komórek mięśniowych, co obserwowane było poprzez zwiększoną ekspresję genów *PAX7*, *MYF5* i *MYOD*. Ze względu na specyficzne warunki hodowli w naczyniach typu *spinner flask* (w tym warunki fizykochemiczne) obserwowane były odmienne wzorce ekspresji kluczowych markerów miogenezy. Jednak w obu systemach hodowli obserwowane było ukierunkowanie na promowanie wczesnego etapu różnicowania miogennego.

7. Wnioski

Otrzymane wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Rodzaj zastosowanej surowicy stanowi kluczowy element pożywki hodowlanej, wpływający na proliferację i różnicowanie bydłych mięśniowych komórek satelitarnych. Drugim istotnym elementem jest dodatek czynnika mitogennego.
2. Pożywka hodowlana suplementowana płodową surowicą bydłą oraz czynnikiem mitogennym w stężeniu 10 ng/mL najsilniej stymuluje proliferację komórek mięśniowych spośród badanych układów czynników.
3. Współhodowla komórek mięśniowych z fibroblastami w systemie 2D promuje wczesny etap różnicowania miogenego, co obserwowane jest poprzez wyższą ekspresję genów takich jak *IL6*, *SOCS3*, *EGRI* oraz genów kodujących białka strukturalne i cytoszkieletowe.
4. Sygnalizacja parakrynną fibroblastów może regulować zakres różnicowania miogenego, prowadząc do hamowania terminalnego różnicowania (tj. formowania się miotub) na drodze m.in. sygnalizacji TGF- β .
5. Współhodowla komórek mięśniowych z fibroblastami w warunkach 3D promuje wczesny etap różnicowania miogenego, co obserwowane jest poprzez wyższą ekspresję markerów wczesnego różnicowania oraz przypuszczalnie promuje proliferację, co obserwowane jest poprzez wyższą ekspresję genów *PAX7*, *MYF5* i *MYOD*.
6. Współhodowla komórek mięśniowych z fibroblastami w warunkach 3D w bioreaktorze typu *spinner flask*, ze względu na specyficzne warunki hodowli, skutkuje odmienną ekspresją markerów miogennych w porównaniu z hodowlą 2D. Jednak w obu systemach hodowli obserwowane było ukierunkowanie na promowanie wczesnego etapu różnicowania miogenego.
7. Wykorzystanie sygnałów parakrynnych może z sukcesem znaleźć zastosowanie w optymalizacji wielkoskalowej produkcji mięsa technikami *in vitro*.

8. Ograniczenia i przyszłe kierunki badań

Przeprowadzone badania w ramach rozprawy doktorskiej wskazują na istotny potencjał wykorzystania sygnałów parakrynnych pochodzących z fibroblastów w optymalizacji procesu miogenezy w warunkach *in vitro* oraz w redukcji kosztów technologii „mięsa komórkowego”. Należy jednak zaznaczyć, że skalowanie produkcji „mięsa komórkowego” wiąże się z koniecznością wdrożenia zaawansowanych technik hodowli w bioreaktorach, gdzie na przebieg procesu wpływa wiele czynników pominiętych w niniejszej pracy, głównie związanych z samą technologią, a nie z kwestiami biologicznymi – jak np. stres ścinający, stres mechaniczny czy równomierna dystrybucja gazów. Ponadto kluczowym etapem komercjalizacji jest standaryzacja i obniżenie kosztów pożywek hodowlanych.

Właściwym kierunkiem pozwalającym na rozwiązanie tego problemu byłaby współhodowla komórek mięśniowych z innymi typami komórek (jak fibroblasty), co stanowiłoby ekonomiczne źródło sygnałów stymulacyjnych. Alternatywnym rozwiązaniem byłoby skupienie się na konkretnych elementach sygnalizacji parakrynnnej, takich jak pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs), będące podstawą sygnalizacji parakrynnnej. Prowadzone obecnie badania w ramach grantu Preludium 22 z Narodowego Centrum Nauki wstępnie potwierdzają skuteczność wykorzystania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z fibroblastów w modulacji przebiegu miogenezy.

Jednocześnie należy podkreślić, że interpretacja uzyskanych wyników wymaga uwzględnienia specyfiki pierwotnych linii komórkowych, w tym wpływu ich pochodzenia (jak typ tkanki, wiek osobnika) oraz stosowanych technik i parametrów hodowli (jak sposób uzyskania homogennej linii komórkowej czy skład pożywek hodowlanych).

9. Bibliografia

Artykuły naukowe

1. Ahmad, S. S., Chun, H. J., Ahmad, K., Shaikh, S., Lim, J. H., Ali, S., Han, S. S., Hur, S. J., Sohn, J. H., Lee, E. J., & Choi, I. (2023). The roles of growth factors and hormones in the regulation of muscle satellite cells for cultured meat production. *Journal of animal science and technology*, 65(1), 16–31. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e114>
2. Almeida, C. F., Fernandes, S. A., Ribeiro Junior, A. F., Keith Okamoto, O., & Vainzof, M. (2016). Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem cells international*, 2016, 1078686. <https://doi.org/10.1155/2016/1078686>
3. Andreassen, R. C., Rønning, S. B., Solberg, N. T., Grønlien, K. G., Kristoffersen, K. A., Høst, V., Kolset, S. O., & Pedersen, M. E. (2022). Production of food-grade microcarriers based on by-products from the food industry to facilitate the expansion of bovine skeletal muscle satellite cells for cultured meat production. *Biomaterials*, 286, 121602. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121602>
4. Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
5. Benussi, C., & Samoggia, A. (2025). A Systematic Literature Review of Cultured Meat Through the Conceptual Frameworks of the Entrepreneurial Ecosystem and Global Value Chain. *Foods* (Basel, Switzerland), 14(5), 885. <https://doi.org/10.3390/foods14050885>
6. Broad, G.M., Glenna, L. (2025). Who Hates Cultured Meat? Examining Public Opposition to Cellular Agriculture. In: Formici, G., Mancini, M.C., Scaffardi, L. (eds) *Cell-Based Meat in the European Union and Beyond*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-032-14624-3_10
7. Bryant, C., & Barnett, J. (2018). Consumer acceptance of cultured meat: A systematic review. *Meat science*, 143, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.008>
8. Capetanaki, Y., Milner, D. J., & Weitzer, G. (1997). Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell structure and function*, 22(1), 103–116. <https://doi.org/10.1247/csf.22.103>
9. Chal, J., & Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* (Cambridge, England), 144(12), 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>
10. Chargé, S. B., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, 84(1), 209–238. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2003>
11. Chen, L., Guttieres, D., Koenigsberg, A., Barone, P. W., Sinskey, A. J., & Springs, S. L. (2022). Large-scale cultured meat production: Trends, challenges and promising biomanufacturing technologies. *Biomaterials*, 280, 121274. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121274>
12. Chriki, S., Ellies-Oury, M. P., & Hocquette, J. F. (2022). Is "cultured meat" a viable alternative to slaughtering animals and a good compromise between animal welfare and human expectations?. *Animal frontiers : the review magazine of animal agriculture*, 12(1), 35–42. <https://doi.org/10.1093/af/vfac002>
13. Chriki, S., Hallman, W., Hocquette, JF., Ellies-Oury M.-P., Takuchi M. (2025). Food culture and cell-culture: technical, ethical and social frontiers. *npj Science of Food* 9, 49 <https://doi.org/10.1038/s41538-025-00417-8>

14. Datta, K., Guan, T., & Gerace, L. (2009). NET37, a nuclear envelope transmembrane protein with glycosidase homology, is involved in myoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 284(43), 29666–29676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.034041>
15. Demarquoy J. (2025). Nutrient Equivalence of Plant-Based and Cultured Meat: Gaps, Bioavailability, and Health Perspectives. *Nutrients*, 17(24), 3860. <https://doi.org/10.3390/nu17243860>
16. Diao, Y., Wang, X., & Wu, Z. (2009). SOCS1, SOCS3, and PIAS1 promote myogenic differentiation by inhibiting the leukemia inhibitory factor-induced JAK1/STAT1/STAT3 pathway. *Molecular and cellular biology*, 29(18), 5084–5093. <https://doi.org/10.1128/MCB.00267-09>
17. Ding, S., Swennen, G. N. M., Messmer, T., Gagliardi, M., Molin, D. G. M., Li, C., Zhou, G., & Post, M. J. (2018). Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific reports*, 8(1), 10808. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28746-7>
18. Dominici, C., & Richard, S. (2022). Muscle stem cell polarity requires QKI-mediated alternative splicing of Integrin Alpha-7 (Itga7). *Life science alliance*, 5(5), e202101192. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101192>
19. Dumont, N.A., Bentzinger, C.F., Sincennes, M.-C. and Rudnicki, M.A. (2015), Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Comprehensive Physiology*, 5: 1027-1059. <https://doi.org/10.1002/j.2040-4603.2015.tb00646.x>
20. Fraeye, I., Kratka, M., Vandeburgh, H., & Thorrez, L. (2020). Sensorial and Nutritional Aspects of Cultured Meat in Comparison to Traditional Meat: Much to Be Inferred. *Frontiers in nutrition*, 7, 35. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00035>
21. Franke, J., Abs, V., Zizzadoro, C., & Abraham, G. (2014). Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC veterinary research*, 10, 119. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-119>
22. Fridman, A. L., & Tainsky, M. A. (2008). Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene*, 27(46), 5975–5987. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.213>
23. Furuichi, Y., Kawabata, Y., Aoki, M., Mita, Y., Fujii, N. L., & Manabe, Y. (2021). Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 640399. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640399>
24. Gao, C.-Q., Zhang, H.-J., Yan, H.-C., Yuan, L., Dahanayaka, S., Li, H.-C., and Wang, X.-Q. (2016) Satellite cells isolated from skeletal muscle will proliferate faster in WENS yellow feather chicks. *Anim Sci J*, 87: 126–133. doi: 10.1111/asj.12403.
25. Gillies, A. R., & Lieber, R. L. (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve*, 44(3), 318–331. <https://doi.org/10.1002/mus.22094>
26. Goodwin, C.M., Jabeen, M., Rao, B.M., & Shirwaiker, R.A. (2026). Cell Culture Media for Cultivated Meat: Review and Perspectives on First Principles Design to Drive Cost-Effective Scale-up. *Future Foods*, 13, 100908. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2026.100908>
27. Grifone, R., Demignou, J., Giordani, J., Niro, C., Souil, E., Bertin, F., Laclef, C., Xu, P. X., & Maire, P. (2007). Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Developmental biology*, 302(2), 602–616. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.059>
28. Gu, H., Kong, Y., Huang, D., Wang, Y., Raghavan, V., & Wang, J. (2025). Scaling Cultured Meat: Challenges and Solutions for Affordable Mass Production.

- Comprehensive reviews in food science and food safety, 24(4), e70221. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70221>
29. Gurel, M., Rathod, N., Cabrera, L. Y., Voyton, S., Yeo, M., Ozogul, F., & Ozbolat, I. T. (2024). A narrative review: 3D bioprinting of cultured muscle meat and seafood products and its potential for the food industry. *Trends in food science & technology*, 152, 104670. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104670>.
 30. Hawke, T. J., & Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 91(2), 534–551. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.2.534>
 31. Hinds, S., Tyhovych, N., Sistrunk, C., Terracio, L (2013) Improved tissue culture conditions for engineered skeletal muscle sheets. *The Scientific World Journal*, 370151(6)2013. <https://doi.org/10.1155/2013/37015>
 32. Hocquette, J. F., Chriki, S., Fournier, D., & Ellies-Oury, M. P. (2025). Will “cultured meat” transform our food system towards more sustainability?. *Animal*, 19, 101145. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101145>
 33. Hong, T. K., Shin, D. M., Choi, J., Do, J. T., & Han, S. G. (2021). Current Issues and Technical Advances in Cultured Meat Production: A Review. *Food science of animal resources*, 41(3), 355–372. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e14>
 34. Hubalek, S., Post, M., Moutsatsou, P.. (2022). Towards resource-efficient and cost-efficient cultured meat. *Current Opinion in Food Science*. 47:100885. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100885>
 35. Ismadi, M.-Z., Hourigan, K., & Fouras, A. (2014). Experimental Characterisation of Fluid Mechanics in a Spinner Flask Bioreactor. *Processes*, 2(4), 753-772. <https://doi.org/10.3390/pr2040753>
 36. Jeong, D., Seo, J. W., Lee, H. G., Jung, W. K., Park, Y. H., & Bae, H. (2022). Efficient Myogenic/Adipogenic Transdifferentiation of Bovine Fibroblasts in a 3D Bioprinting System for Steak-Type Cultured Meat Production. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 9(31), e2202877. <https://doi.org/10.1002/advs.202202877>
 37. Kolkman, A. M., Post, M. J., Rutjens, M. A. M., van Essen, A. L. M., & Moutsatsou, P. (2020). Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology*, 72(1), 111–120. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00361-y>
 38. Kuang, S., Chargé, S. B., Seale, P., Huh, M., & Rudnicki, M. A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *The Journal of cell biology*, 172(1), 103–113. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508001>
 39. Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current opinion in cell biology*, 19(6), 628–633. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.012>
 40. Ma, T., Ren, R., Lv, J., Yang, R., Zheng, X., Hu, Y., Zhu, G., & Wang, H. (2024). Transdifferentiation of fibroblasts into muscle cells to constitute cultured meat with tunable intramuscular fat deposition. *eLife*, 13, RP93220. <https://doi.org/10.7554/eLife.93220>
 41. Markert, C. D., Meaney, M. P., Voelker, K. A., Grange, R. W., Dalley, H. W., Cann, J. K., Ahmed, M., Bishwokarma, B., Walker, S. J., Yu, S. X., Brown, M., Lawlor, M. W., Beggs, A. H., & Childers, M. K. (2010). Functional muscle analysis of the Tcap knockout mouse. *Human molecular genetics*, 19(11), 2268–2283. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq105>
 42. Renzini, A., Marroncelli, N., Noviello, C., Moresi, V., & Adamo, S. (2018). HDAC4 Regulates Skeletal Muscle Regeneration via Soluble Factors. *Frontiers in physiology*, 9, 1387. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01387>

43. Mann, C. J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A. L., & Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 1(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-21>
44. Martins, B., Bister, A., Dohmen, R. G. J., Gouveia, M. A., Hueber, R., Melzener, L., Messmer, T., Papadopoulos, J., Pimenta, J., Raina, D., Schaeken, L., Shirley, S., Bouchet, B. P., & Flack, J. E. (2024). Advances and Challenges in Cell Biology for Cultured Meat. *Annual review of animal biosciences*, 12, 345–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021022-055132>
45. Mauro A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9(2), 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
46. Morais-da-Silva, R.L., Reis, G.G., Sanctorem, H., & Molento, C.F. (2022). The social impact of cultivated and plant-based meats as radical innovations in the food chain: Views from Brazil, the United States and Europe. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1056615>
47. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A., & Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development (Cambridge, England)*, 138(17), 3625–3637. <https://doi.org/10.1242/dev.064162>
48. Oh, S. K., Chen, A. K., Mok, Y., Chen, X., Lim, U. M., Chin, A., Choo, A. B., & Reuveny, S. (2009). Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells. *Stem cell research*, 2(3), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.02.005>
49. Ong, K. J., Johnston, J., Datar, I., Sewalt, V., Holmes, D., & Shatkin, J. A. (2021). Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(6), 5421–5448. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12853>
50. Otten, C., van der Ven, P. F., Lewrenz, I., Paul, S., Steinhagen, A., Busch-Nentwich, E., Eichhorst, J., Wiesner, B., Stemple, D., Strähle, U., Fürst, D. O., & Abdelilah-Seyfried, S. (2012). Xirp proteins mark injured skeletal muscle in zebrafish. *PloS one*, 7(2), e31041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031041>
51. Oyama, T., Imashiro, C., Kuriyama, T., Usui, H., Ando, K., Azuma, T., Morikawa, A., Kodeki, K., Takahara, O., & Takemura, K. (2021). Acoustic streaming induced by MHz-frequency ultrasound extends the volume limit of cell suspension culture. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 149(6), 4180. <https://doi.org/10.1121/10.0005197>
52. Ozeki, N., Lim, M., Yao, C. C., Tolar, M., & Kramer, R. H. (2006). alpha7 integrin expressing human fetal myogenic progenitors have stem cell-like properties and are capable of osteogenic differentiation. *Experimental cell research*, 312(20), 4162–4180. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.09.017>
53. Pallari, H. M., Lindqvist, J., Torvaldson, E., Ferraris, S. E., He, T., Sahlgren, C., & Eriksson, J. E. (2011). Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Molecular biology of the cell*, 22(9), 1539–1549. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0568>
54. Pan, X., Liu, B., Chen, S., Ding, H., Yao, X., Cheng, Y., Xu, D., Yin, Y., Dai, X., Sun, J., Xu, G., Pan, J., Xiao, L., Xie, L. (2019). Nr4a1 as a myogenic factor is upregulated in satellite cells/myoblast under proliferation and differentiation state. *Biochemical and biophysical research communications*, 513 3, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.026>
55. Park, J., Lee, J., Song, K. D., Kim, S. J., Kim, D. C., Lee, S. C., Son, Y. J., Choi, H. W., & Shim, K. (2021). Growth factors improve the proliferation of Jeju black pig muscle

- cells by regulating myogenic differentiation 1 and growth-related genes. *Animal bioscience*, 34(8), 1392–1402. <https://doi.org/10.5713/ab.20.0585>
56. Pawlikowski, B., Vogler, T. O., Gadek, K., & Olwin, B. B. (2017). Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 246(5), 359–367. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24495>
 57. Pezzanite, L., Chow, L., Griffenhagen, G., Dow, S., & Goodrich, L. (2021). Impact of Three Different Serum Sources on Functional Properties of Equine Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in veterinary science*, 8, 634064. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.634064>
 58. Post M. J. (2014). Cultured beef: medical technology to produce food. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(6), 1039–1041. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6474>
 59. Prüller, J., Mannhardt, I., Eschenhagen, T., Zammit, P. S., & Figeac, N. (2018). Satellite cells delivered in their niche efficiently generate functional myotubes in three-dimensional cell culture. *PloS one*, 13(9), e0202574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202574>
 60. Rao, N., Evans, S., Stewart, D., Spencer, K. H., Sheikh, F., Hui, E. E., & Christman, K. L. (2013). Fibroblasts influence muscle progenitor differentiation and alignment in contact independent and dependent manners in organized co-culture devices. *Biomedical microdevices*, 15(1), 161–169. <https://doi.org/10.1007/s10544-012-9709-9>
 61. Rice, D., Singh, R., Priya, H., Valerozo, J., & Anal, A. K. (2025). Transforming plant-based alternatives by harnessing precision fermentation for next-generation ingredients. *Journal of the science of food and agriculture*, 105(12), 6296–6305. <https://doi.org/10.1002/jsfa.14168>
 62. Rønning, S. B., Carlson, C. R., Stang, E., Kolset, S. O., Hollung, K., & Pedersen, M. E. (2015). Syndecan-4 Regulates Muscle Differentiation and Is Internalized from the Plasma Membrane during Myogenesis. *PloS one*, 10(6), e0129288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129288>
 63. Samandari, M., Saeedinejad, F., Quint, J., Chuah, S. X. Y., Farzad, R., & Tamayol, A. (2023). Repurposing biomedical muscle tissue engineering for cellular agriculture: challenges and opportunities. *Trends in biotechnology*, 41(7), 887–906. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.02.002>
 64. Shirakawa, T., Toyono, T., Inoue, A., Matsubara, T., Kawamoto, T., & Kokabu, S. (2022). Factors Regulating or Regulated by Myogenic Regulatory Factors in Skeletal Muscle Stem Cells. *Cells*, 11(9), 1493. <https://doi.org/10.3390/cells11091493>
 65. Siddiqui, S. H., Subramaniyan, S. A., Park, J., Kang, D., Khan, M., Belal, S. A., ... Shim, K. (2022). Modulatory effects of cell–cell interactions between porcine skeletal muscle satellite cells and fibroblasts on the expression of myogenesis-related genes. *Journal of Applied Animal Research*, 50(1), 259–268. <https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2060986>
 66. Simsa, R., Yuen, J., Stout, A., Rubio, N., Fogelstrand, P., & Kaplan, D. L. (2019). Extracellular Heme Proteins Influence Bovine Myosatellite Cell Proliferation and the Color of Cell-Based Meat. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(10), 521. <https://doi.org/10.3390/foods8100521>
 67. Sinke, P., Swartz, E., Sanctorem, H., Giesen, C., Odegard I. (2023). Ex-ante life cycle assessment of commercial-scale cultivated meat production in 2030. *The International Journal of Lify Cycle Assessment*: 28, 234–254. <https://doi.org/10.1007/s11367-022-02128-8>
 68. Soleymani, S., Naghib, S. M., & Mozafari, M. R. (2024). An overview of cultured meat and stem cell bioprinting: How to make it, challenges and prospects, environmental

- effects, society's culture and the influence of religions. *Journal of Agriculture and Food Research*, 18, 101307. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101307>
69. Steyn, P. J., Dzobo, K., Smith, R. I., & Myburgh, K. H. (2019). Interleukin-6 Induces Myogenic Differentiation via JAK2-STAT3 Signaling in Mouse C2C12 Myoblast Cell Line and Primary Human Myoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5273. <https://doi.org/10.3390/ijms20215273>
 70. Stieberová, B., Žilka, M., Bubeníček, P., Kubeš, T.. (2026). Life cycle assessment of industrial-scale cultivated meat production: case study of real market entry via pet food application. *The International Journal of Life Cycle Assessment*. 31. 10.1007/s11367-026-02629-w.
 71. Syverud, B. C., VanDusen, K. W., & Larkin, L. M. (2016). Growth Factors for Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Cells, tissues, organs*, 202(3-4), 169–179. <https://doi.org/10.1159/000444671>
 72. Tan, C. Y. Y., Yan, Y., Choo, J., Cai, X., Yusri, H., Puniamoorthy, N., Liu, M. H., & Carrasco, L. R. (2025). Improving perceptions of cultivated meat and plant-based proteins in Singapore. *Scientific reports*, 15(1), 31552. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-17395-2>
 73. Tavan, M., Smith, N. W., McNabb, W. C., & Wood, P. (2025). Reassessing the sustainability promise of cultured meat: a critical review with new data perspectives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 65(30), 7201–7209. <https://doi.org/10.1080/10408398.2025.2461262>
 74. Vezovnik, A. (2026). Ecomodernism, cultured meat and the search for the ‘Middle landscape.’ *Cultural Studies*, 40(2), 267–288. <https://doi.org/10.1080/09502386.2025.2538524>
 75. Will, K., Schering, L., Albrecht, E., Kalbe, C., & Maak, S. (2015). Differentiation of bovine satellite cell-derived myoblasts under different culture conditions. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 51(9), 885–889. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9916-9>
 76. Vallejos, J. R., Brorson, K. A., Moreira, A. R., & Rao, G. (2011). Integrating a 250 mL-spinner flask with other stirred bench-scale cell culture devices: a mass transfer perspective. *Biotechnology progress*, 27(3), 803–810. <https://doi.org/10.1002/btpr.578>
 77. Xie, Y., Cai, L., Ding, S., Wang, C., Wang, J., Ibeogu, I. H., Li, C., & Zhou, G. (2025). An Overview of Recent Progress in Cultured Meat: Focusing on Technology, Quality Properties, Safety, Industrialization, and Public Acceptance. *The Journal of nutrition*, 155(3), 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2025.01.010>
 78. Yang, F., Wang, S., Li, Y., Li, S., Liu, W., Li, Y., & Hu, H. (2022). Physical optimization of cell proliferation and differentiation using spinner flask and microcarriers. *AMB Express*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01397-8>
 79. Yasui, R., Sekine, K., & Taniguchi, H. (2021). Clever Experimental Designs: Shortcuts for Better iPSC Differentiation. *Cells*, 10(12), 3540. <https://doi.org/10.3390/cells10123540>
 80. Yiik Swan, S., Hairunnaja, M.A., Samsuddin, N.E., Mahmood, S., Abd. Aziz, M.A., Arifin, M.A., (2024). A Review on the Development of Microcarriers for Cell Culture Applications. *Pertanika Journal of Science and Technology*. 32. 10.47836/pjst.32.5.01.
 81. Yun, S. H., Lee, D. Y., Lee, J., Mariano, E., Jr, Choi, Y., Park, J., Han, D., Kim, J. S., & Hur, S. J. (2024). Current Research, Industrialization Status, and Future Perspective of Cultured Meat. *Food science of animal resources*, 44(2), 326–355. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e13>
 82. Zão, A. C. A. F., W. V.Nogueira, F. S.Rondan, and P. T.Scaglioni. 2026. “Cultured Meat: A Multidimensional Review of Technological, Nutritional, Ethical, and

- Regulatory Advances (2020–2025).” *Journal of Food Science* 91, no. 2: e70915. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70915>
83. Zhang, W., Tong, H., Zhang, Z., Shao, S., Liu, D., Li, S., & Yan, Y. (2018). Transcription factor EGR1 promotes differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by regulating MyoG gene expression. *Journal of cellular physiology*, 233(1), 350–362. <https://doi.org/10.1002/jcp.25883>
 84. Zhang, Y., Li, H., Lian, Z., & Li, N. (2010). Myofibroblasts protect myoblasts from intrinsic apoptosis associated with differentiation via β 1 integrin-PI3K/Akt pathway. *Development, growth & differentiation*, 52(8), 725–733. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01209.x>
 85. Zhao, P., Lv, J., Gu, W., Mi, H., Cui, H., Chen, L., Kurdeko, A., & Wang, H. (2025). Optimizing fatty acids composition in meat-like tissue derived from myogenic conversion of pig fibroblasts. *Communications biology*, 8(1), 1124. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08574-y>
 86. Zygmunt K., Witarski W., Piórkowska K. (2023). Wpływ wybranych pożywek hodowlanych na proliferację bydłych komórek satelitarnych in vitro. *Mikrobiologia środowiskowa i przemysłowa: aktualne trendy oraz perspektywy*, ss. 81-89, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., ISBN 978-83-67881-10-4.

Akty prawne

1. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Tekst mający znaczenie dla EOG)
2. Rozporządzenie(WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz.U. L 139 z 30.4.2004, str. 55)

10. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia współautorów

Article

Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation

Karolina Zygmunt ^{1,*} , Agnieszka Otwinowska-Mindur ² , Katarzyna Piórkowska ¹ 
and Wojciech Witariski ^{1,*} 

¹ Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, Krakowska 1, 32-083 Balice, Poland; katarzyna.piorkowska@iz.edu.pl

² Department of Genetics, Animal Breeding and Ethology, University of Agriculture in Krakow, Mickiewicza 24/28, 30-059 Krakow, Poland; agnieszka.otwinowska@urk.edu.pl

* Correspondence: karolina.zygmunt@iz.edu.pl (K.Z.); wojciech.witariski@iz.edu.pl (W.W.)

Simple Summary: Culturing of muscle precursor cells—satellite cells—is the basis for research on obtaining meat using in vitro techniques, which can become an alternative to traditional meat production. The available literature data do not give a clear answer as to the medium used at the proliferation stage of bovine satellite cells; therefore, there is a need to select the level of components of the growth medium. In our research, based on the fluorometric measurement of proliferating cell growth and qPCR analysis, we examined the effect of the three most common components: glucose, serum (bovine or horse), and bFGF—a mitogenic factor. The results show that the most critical component affecting the proliferation rate is the serum—the addition of bovine serum, followed by the addition of bFGF—at 10 ng/mL. In turn, the lower glucose content ensures the maintenance of cells at the early stage of myogenesis and, thus, the self-renewal of their population. In conclusion, a higher proliferation rate of bovine satellite cells is ensured under the conditions of bovine serum and a mitogenic factor at 10 ng/mL.

Abstract: It is predicted that already in 2040, 35% of requirements for meat will be provided by in vitro production. Recreating the course of myogenesis in vitro, and thus resembling a structure of muscle tissue, is the basis for research focusing on obtaining cultured meat and requires providing relevant factors supporting the proliferation of satellite cells—being precursors of skeletal muscles. The present work aimed to develop the composition of the medium that would most effectively stimulate the proliferation of bovine satellite cells (BSCs). The modeling and optimization methods included the measurements of the synergistic, co-stimulatory effect of three medium components: the amount of glucose, the type of serum (bovine or horse), and the amount of mitogenic factor—bFGF. Additionally, the qPCR analyses determined the expression of genes involved in myogenesis, such as Pax7 and Myogenic Regulatory Factors, depending on the level of the tested factor. The results showed significant positive effects of serum type (bovine serum) and mitogenic factor (addition of 10 ng/mL bFGF) on the proliferation rate. In turn, qPCR analysis displayed no significant differences in the relative expression level of Pax7 genes and MRF factors for both factors. However, a statistically higher Pax7 and Myf5 gene expression level was revealed when a low glucose medium was used ($p < 0.05$). In conclusion, the components of the medium, such as bovine serum and the addition of a mitogenic factor at the level of 10 ng/mL, ensure a higher proliferation rate of BSCs and lower glucose content ensured the expression of crucial genes in the self-renewal of the satellite cell population.



Citation: Zygmunt, K.; Otwinowska-Mindur, A.; Piórkowska, K.; Witariski, W. Influence of Media Composition on the Level of Bovine Satellite Cell Proliferation. *Animals* **2023**, *13*, 1855. <https://doi.org/10.3390/ani13111855>

Academic Editor: Yanting Chen

Received: 15 May 2023

Revised: 30 May 2023

Accepted: 31 May 2023

Published: 2 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: proliferation; media composition; bovine satellite cells

1. Introduction

The world population is predicted to reach approximately 9.7 billion people in 2050 [1], so the demand for food—including meat—will continue to increase, contrary to the ability

to produce the resources necessary for its production. Conventional meat production is associated with a destabilizing effect on the environment—highly impoverishing water resources and using vast areas—as much as 2/3 of available agricultural land—for pastures and meadows for grazing livestock [2]. Additionally, traditional meat farming leads to high greenhouse gas emissions—mainly carbon dioxide, nitrous oxide, and methane—which constitute 14% of total greenhouse gas emissions [3]. However, recent scientific reports show that cultured meat production using highly purified culture media can generate significantly higher carbon dioxide emissions than traditional meat husbandry. Solving the endotoxins problem or using cheaper substitutes for media components made from agricultural by-products would significantly reduce production costs [4]. In the context of a direct impact on human health, meat obtained by conventional methods poses risks of zoonotic pathogens and pesticides, fungicides or heavy metals used in agriculture for the production of fodder may be toxic. Therefore, in vitro meat production (named alternative “cultured meat”, “artificial meat”, or “lab-grown meat”) can be more environmentally friendly (by using less water and land), safer, and healthier for consumers alternative to traditional husbandry, due to much lower exposure to zoonotic pathogens such as *Salmonella*, *E. coli* or *Campylobacter* [5]. The in vitro technology also creates the possibility of enriching the composition of the product with nutrients that improve the quality and healthiness of cultured meat [6]. Using the ability of muscle stem cells to proliferate, differentiate, and self-renew their population, it is possible to construct three-dimensional structures in vitro that correspond to muscle tissue. It is predicted that already in 2040, 35% of requirements for meat will be provided by in vitro production [7].

As precursors of myofibers, muscle satellite cells (MuSCs) were first described by Alexander Mauro [8], who observed their presence between the basement membrane and the sarcolemma of myofibers dissected from the tibialis anticus muscle of an adult frog by electron microscopy. Satellite cells play a crucial role in the myogenesis process—both at the prenatal stage—when they are involved in muscle formation, and at the postnatal stage, in the regeneration of damaged skeletal muscles. During the organism’s homeostasis, MuSCs are in a quiescent state—in the G₀ phase of the cell cycle, being mitotically inactive. Because of activation, in the form of mechanical damage to the muscle, they re-enter the G₁ phase of the cell cycle. Gene *Pax7* is expressed in quiescent satellite cells; during MuSCs activation, additional genes such as genes from the family of myogenic regulatory factors (MRFs)—*Myf5* and *MyoD*—are beginning to be expressed. Activated satellite cells intensively proliferate to myoblast form and differentiate into myotubes, which is associated with *Myf6* and *MyoG* expression [9–11].

Recreating the course of myogenesis in vitro and thus resembling a structure of muscle tissue is the basis for research focusing on obtaining cultured meat. In the available literature, exist some combinations of medium components at the proliferation stage of the culture of bovine satellite cells (BSCs), and the inconsistency between their composition makes it difficult to select the optimal composition of the medium that supports the proliferation process (Table 1). So far, the conducted research has focused mainly on the selection of the medium at the stage of muscle cell differentiation [12,13]. Our research aimed to develop the optimal composition of the medium that would most effectively stimulate the proliferation of BSCs. In this case, achieving a high proliferation rate with a low degree of muscle progenitor cells that undergo spontaneous differentiation is important. The tested components were the glucose content, the type of serum and the concentration of the mitogenic factor—bFGF—which are mainly used to cultivate MuSCs. Culture media usually require serum supplementation and depend on cell type also other substances that provide cells with an additional reservoir of biologically active factors such as cytokines or hormones. The most popular type of serum is fetal bovine serum, but many studies on satellite cells also use horse serum [14–16]. Moreover, other components such as growth factors may stimulate dividing cells. bFGF—basic fibroblast growth factor—is a known mitogenic factor, inhibiting the process of satellite cell differentiation [17]. In the study, we used the modeling and optimization method—Design of experiment (DOE)—full fractional

design, which allows for studying the influence of several factors on the response and interactions between the tested factors [18]. Additionally, an analysis of the expression of key genes involved in myogenesis—*Pax7* and Myogenic Regulator Factors—MRF factors: *Myf5*, *MyoD*, *Myf6* and *MyoG*, depending on the level of a particular component of the medium, was performed.

Table 1. Summary of compositions of media for BSCs cultivation.

Composition of Media for BSCs Cultivation	References
Ham's F-10 Nutrient Mix or DMEM/F-12 as basal medium, supplemented with 20% fbs and 5 ng/mL FGF-2	[19]
Low-glucose DMEM as basal medium, supplemented with 10% hs	[20]
DMEM/F12 as basal medium, supplemented with 0.02 M glutamine and 10% fbs	[12,21]
DMEM as a basal medium, supplemented with 20% fbs, and 5 ng/mL basic FGF	[22]

2. Materials and Methods

2.1. Isolation of Muscle Satellite Cells

Satellite cells were isolated from musculus longissimus dorsi from female calf specimen as two separate isolations (described as R1 and R2). A sample of skeletal muscles was sourced from fresh slaughter waste and therefore required no ethical committee acceptance according to local law. The tissue was digested with collagenase II (2 mg (500 U)/mL; 2–3 mL/g tissue; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in Phosphate Buffered Saline—PBS buffer pH 7.2 (Thermo Fisher Scientific) with 4% BSA (Thermo Fisher Scientific) for two hours at 37 °C. Then, cells were washed in PBS buffer and filtered through a 70 µm nylon strainer (Corning, New York, NY, USA). Cells were centrifuged for 10 min at 500× g, the supernatant was discarded, and cells were purified by pre-plating method, based on the rate of adhesion of different types of cells to the surface. Cells were seeded in Skeletal Muscle Cell Medium (Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA) with 1% of antibiotic Primocin (InVivoGen, San Diego, CA, USA) on non-coated culture dish. After 1 h, the medium containing non-adherent cells were collected, centrifuged, and the cells were plated in the same medium on a thin layer of 0.1% gelatin (Thermo Fisher Scientific) [23]. The procedure was repeated during the next cell split. Part of the cells was frozen in a medium DMEM (Thermo Fisher Scientific) with the addition of 20% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific), 1% antibiotic Primocin (InVivoGen), and 10% DMSO (Thermo Fisher Scientific).

2.2. Selection of the Components of the Tested Media

The experimental design was set to measure the synergistic, co-stimulatory effect of three medium components, which effect was evaluated on the proliferation rate of BSCs. Those stimulants were:

A—Glucose content in the culture medium—DMEM medium with low glucose content (1 g/L) versus DMEM medium with high glucose content (4.5 g/L) (Thermo Fisher Scientific).

B—Type of serum—horse serum (hs) at a concentration of 20% versus fetal bovine serum (fbs) at a concentration of 20% (Thermo Fisher Scientific). It was hypothesized that fetal bovine serum would stimulate the proliferation of BSCs more efficiently [24,25].

C—Content of bFGF (Thermo Fisher Scientific) with known mitogenic effect at concentrations of 5 ng/mL and 10 ng/mL.

Culture media was prepared fresh just before each medium change due to the instability of bFGF.

During the entire experiment, sera from one lot were used due to the possibility of differences in the concentration of individual components between batches.

2.3. Cell Culture and Estimation of Proliferation Rate and Visualisation

Satellite cell lines R1 and R2 (both—3rd passage since isolation) were plated in the 96-well multiwell plate at a density of 3500 cells/wells in Skeletal Muscle Cell Medium

(Cell Applications, Inc.) supplemented with 1% addition of antibiotic Primocin (InVivo-Gen) on a thin layer of 0.1% gelatin used as a coating (Thermo Fisher Scientific). Each cell line consisted of four replicates per experimental group. After 24 h, the number of cells in each well was estimated based on a fluorimetric method—CellTiter Blue Assay (Promega, Madison, WI, USA). The CellTiter solution was prepared according to the manufacturer's protocol, then was added to the plate with treated cells and incubated for one hour in 5% CO₂ in humidified air at 37 °C (previously length of the incubation period and the number of cells/wells were optimized). Fluorescence intensity was measured at 535 nm excitation and 595 nm emission wavelength using PlateReader AF2200 (Eppendorf, Hamburg, Germany). After the measurement, in each group tested media were added containing an appropriate amount of tested factors. The number of proliferating cells was estimated, based on CellTiter Blue assay, after three, five, seven, and ten days of incubation in the tested medium. The measurement results were obtained in the RFU unit—relative fluorescence unit. RFU values from each measurement were normalized based on day 0 RFU values.

Alongside to described, microscopic observation of satellite cells was carried out. Pictures of the representative area were visualized in Opta-tech microscope using OptaView-IS programme. Further post-processing consisted of contrast enhancement for every picture using ImageJ CLAHE algorithm (blocksize 79, hist bins 50, max slope 2.5) [26,27].

2.4. Statistical Analysis

The results were analyzed using Python [28] with NumPy [29], SciPy [30], Statsmodels [31], Pandas [32,33], and Matplotlib [34]. A 2³ full factorial design was applied to evaluate the effects of three factors (Xi) on experimental results. The high and low levels defined for the 2³ factorial designs are presented in Table 2. The variables X₁, X₂, and X₃ represented the levels of glucose, serum, and bFGF, respectively. The analysis was performed separately for R1 and R2 cell lines and on the subsequent day of the experiment (3, 5, 7, or 10), so eight designs of experiments (DoE) were created. Additionally, the design is replicated fourth time. The experimental conditions obtained for each reaction set by the full factorial design are shown in Table 3. Every treatment factor in an experiment has two levels. The higher level (maximum) was designated as (+1) and the lower value (minimum) was designated as (−1).

Table 2. Factors and levels used in 2³ factorial designs.

Variables	Factors	Minimum Value (−1)	Maximum Value (+1)
X ₁	Glucose	Low	High
X ₂	Serum	20% hs	20% fbs
X ₃	bFGF	5 ng/mL	10 ng/mL

fbs—fetal bovine serum, hs—horse serum.

Table 3. Experimental design matrix and mean experiment results.

Experiment	Glucose		Serum		bFGF		Day			
	(A)	X ₁	(B)	X ₂	(C)	X ₃	3	5	7	10
Cell R1										
1	Low	−1	20% hs	−1	5	−1	15,955.75	31,677.25	28,933.00	33,853.67
2	High	1	20% hs	−1	5	−1	16,306.75	34,783.50	27,695.00	33,094.92
3	Low	−1	20% fbs	1	5	−1	19,805.75	38,343.00	34,947.75	39,300.67
4	High	1	20% fbs	1	5	−1	24,156.25	37,564.50	28,476.25	38,544.92
5	Low	−1	20% hs	−1	10	1	22,741.75	31,017.50	30,000.75	36,570.17
6	High	1	20% hs	−1	10	1	25,299.75	28,279.25	28,439.75	36,007.92
7	Low	−1	20% fbs	1	10	1	24,983.50	36,288.25	35,539.75	44,442.42
8	High	1	20% fbs	1	10	1	30,865.50	38,722.75	35,602.00	44,852.17

Table 3. Cont.

Glucose		Serum		bFGF		Day				
Experiment	(A)	X ₁	(B)	X ₂	(C)	X ₃	3	5	7	10
Cell R2										
1	Low	−1	20% hs	−1	5	−1	8235.83	15,581.58	16,733.53	20,570.58
2	High	1	20% hs	−1	5	−1	10,363.08	14,512.83	15,741.53	20,267.58
3	Low	−1	20% fbs	1	5	−1	9674.08	18,065.83	21,579.53	29,369.08
4	High	1	20% fbs	1	5	−1	11,130.58	19,391.58	22,167.53	28,893.08
5	Low	−1	20% hs	−1	10	1	8640.83	16,889.08	20,221.50	25,239.33
6	High	1	20% hs	−1	10	1	8268.33	15,504.33	18,161.50	21,907.83
7	Low	−1	20% fbs	1	10	1	11,351.08	21,916.33	27,310.75	36,324.83
8	High	1	20% fbs	1	10	1	8238.33	20,687.58	23,910.00	33,665.08

fbs—fetal bovine serum; hs—horse serum.

The coded mathematical model may be given as:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{123} X_1 X_2 X_3$$

where Y is the proliferation rate measured as RFU value, X_i are the coded variables (−1 or +1), and α_i represents the fitted constants. Additionally, in this notation the α_{ij} constant represented the estimation of the interaction effect between factor i and j for the response.

The *p*-values are used as a tool to check the significance of each coefficient, which can indicate the pattern of the interactions between the independent variables. If the *p*-value is below 0.05, then the model is significant at the 95% confidence interval. Additionally, the Akaike Information Criterion (AIC), Bayesian Information Criterion (BIC), coefficient of determination (R²), and adjusted coefficient of determination (R²_{adj}) were calculated to show the goodness of fit of models.

Pareto's charts were used to evaluate the meaning and type of effects. Pareto analysis indicates the relative importance of each independent model's parameter and their interactions on the proliferation rate measured as RFU value. The values displayed in the horizontal columns are the absolute values of t-Student test values for each effect and the vertical line indicates the minimal significant effect magnitude for a 95% confidence level.

At the end of the analysis, the statistical validation of the model was performed using an analysis of variance (Table 4). The main effect is the mean of all of the responses produced by changing the level of a factor, i.e., glucose, serum, or bFGF.

Table 4. Analysis of variance (*p*-values) for cell lines R1 and R2 in subsequent day of experiment.

Source	Cell Line R1				Cell Line R2			
	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10
Main effects	2.00×10^{-12}	1.94×10^{-8}	8.79×10^{-10}	1.35×10^{-12}	7.12×10^{-4}	3.07×10^{-7}	2.39×10^{-16}	3.56×10^{-14}
2-way interactions	9.29×10^{-3}	1.24×10^{-1}	1.99×10^{-3}	6.47×10^{-2}	8.76×10^{-6}	5.17×10^{-2}	3.17×10^{-3}	4.37×10^{-2}
3-way interaction	7.81×10^{-1}	2.99×10^{-3}	3.06×10^{-3}	6.50×10^{-1}	8.69×10^{-2}	6.58×10^{-4}	2.72×10^{-2}	7.34×10^{-1}

If the *p* < 0.05, then the source is significant.

2.5. Analysis of the Expression of Genes of Myogenesis

For the analysis of myogenesis gene expression, the effect of each component was examined individually. Satellite cells (3rd passage) were plated on 35 mm culture dishes at a density of 70,000 cells/dish in Skeletal Muscle Cell Medium (Cell Applications, Inc.) supplemented with 1% of antibiotic Primocin (InVivoGen) on a thin layer of 0.1% gelatin (Thermo Fisher Scientific), six replicates per group, within the tested factor. After 24 h, the medium was replaced with the tested medium depending on the group studied. After three days, three replicates from each group were harvested, and RNA was isolated

according to the manufacturer's protocol using PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific). The medium was changed to a new one in the residual culture plates and after five days, RNA was isolated as described above. RNA concentration was determined using a NanoDrop2000C (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer, and the integrity of the isolated RNA was checked electrophoretically on a 1.5% agarose gel. Reverse transcription was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Before starting the analysis, all tested solutions were equilibrated, regarding RNA concentrations in RNase-free water. The qPCR method was used to determine the expression of *Pax7*, *Myf5*, *MyoD*, *Myf6*, and *MyoG* genes. The *RPL27* and *OAZ1* genes were the endogenous control. The primer sequences were designed in Primer3Web (v. 4.1.0, <https://primer3.ut.ee/>, accessed on 30 November 2022) and produced by Genomed (Warsaw, Poland) (Table 5). Gene expression analysis was performed using the HS-PCR Mix SYBR according to the manufacturer's protocol (A&ABiotechnology, Gdansk, Poland) and QuantStudio 7 Pro System (Thermo Scientific).

Table 5. Primer sequences for studied genes.

Gene	Starter Forward	Starter Reverse	Length of the Product
<i>Pax7</i>	5' AAGCGGACAAGAAGGAGGAG 3'	5' CGGGTTCTGACTCCACATCT 3'	114
<i>Myf5</i>	5' TGCTTAGGGAACAGGTGGAA 3'	5' AACTGCTGCTCTTCTGGAC 3'	135
<i>MyoD</i>	5' AACACTACAGCGGCGACT 3'	5' GTAGTAAGTGCAGTCGTAGC 3'	122
<i>Myf6</i>	5' CCCTTCAGCTACAGACCCAA 3'	5' CCTTGGCAGTTATCACGAGC 3'	118
<i>MyoG</i>	5' TCCAGTACATAGAGCGCCTG 3'	5' CTATGGGAGCTGCATTCACTG 3'	121
<i>RPL27</i>	5' ATAATCACCTCATGCCCACAA 3'	5' CATGACCTTTGCCTCTCGTC 3'	206
<i>OAZ1</i>	5' TTCGCCAGAGAGAAGGAAGG 3'	5' GGACCCAGGTTACTACAGCA 3'	143

2.6. Statistical Analysis of the Expression of Genes

Statistical analysis of the obtained results was carried out in the Statistica program (StatSoft, v.13). The normal distribution was tested with the Shapiro–Wilk test. The analyzes were based on the one-way analysis of variance (ANOVA) using the Bonferroni post hoc test. In the case of failure to comply with assumptions of Levene's test, the Mann–Whitney U test was used.

3. Results

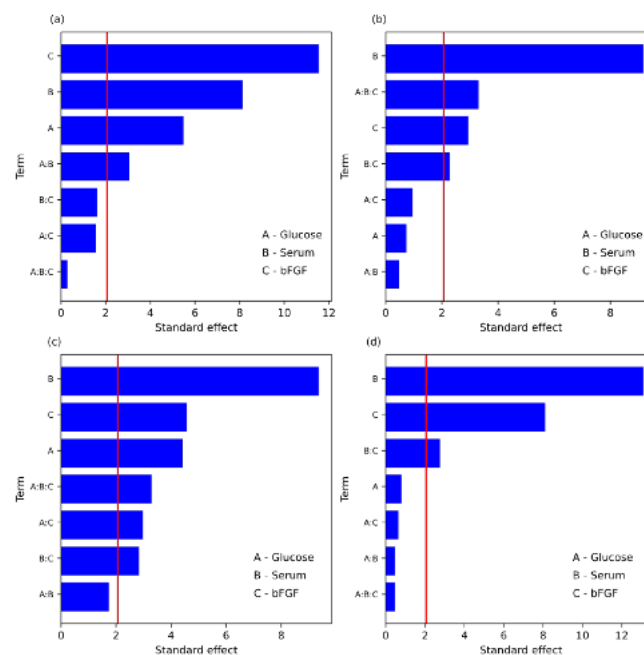
3.1. Full Factorial Design of Tested Components

On the third day, in cell line R1 (Table 6 and Figure 1a), the concentration of bFGF in the medium (component C) showed the most robust effect strength of 6.92×10^3 value from among tested components. All the effects of the main tested, i.e., glucose (A), serum (B), and bFGF (C) components, were significant ($p < 0.05$). The interaction of the two A:B factors was significant ($p < 0.05$). The obtained results indicate that component C is a key factor in stimulating the proliferation of satellite cells and that its level is independent of the levels of other tested components on the third day. According to the data presented in Table 6 and the graphical Pareto chart shown in Figure 1a, the final first-order model for RFU in terms of coded parameters can be proposed. What is important, the nonsignificant effects were neglected to form the best-fitted regression equation, so the proposed model was:

$$\text{RFU value at 3rd day} = 22,514.38 + 1642.69X_1 + 2438.38X_2 + 3458.25X_3 + 915.44X_1X_2$$

Table 6. Estimated effects and coefficients for media components, day 3, cell line R1.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	4.50×10^4	22,514.38	299.62	75.14	5.34×10^{-30}
A	3.29×10^3	1642.69	299.62	5.48	1.23×10^{-5}
B	4.88×10^3	2438.38	299.62	8.14	2.33×10^{-8}
C	6.92×10^3	3458.25	299.62	11.54	2.79×10^{-11}
A:B	1.83×10^3	915.44	299.62	3.06	5.44×10^{-3}
A:C	9.35×10^2	467.31	299.62	1.56	1.32×10^{-1}
B:C	-9.73×10^2	-486.50	299.62	-1.62	1.18×10^{-1}
A:B:C	-168.875	-84.44	299.62	-0.28	7.81×10^{-1}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
573.47	585.20	0.91	0.88		

**Figure 1.** Pareto chart for standard effect; cell line R1; (a)-3rd day, (b)-5th day, (c)-7th day, (d)-10th day. Red vertical line correspondences to a significance level of $\alpha = 0.05$.

On days 5, 7, and 10, in cell line R1 (Tables 7–9 and Figure 1b–d), the serum type (component B) showed the most robust effect strength of 6290.25; 4874.313; 6903.375 values from among tested components, respectively. The type of serum was the most important component affecting the proliferation of BSCs. The factors that occur with a p -value less than 0.05 are considered to have a significant effect on the response significantly. On days 5 and 10, the main effects of components B and C were significant ($p < 0.05$), and on day 7, all the tested components, i.e., glucose (A), serum (B), and bFGF (C) were significant ($p < 0.05$). On days 5, 7, and 10, the interaction of factors B:C was significant, and on day 7, the interaction of factors A:C was significant. On days five and seven, the interaction of all three factors A:B:C was significant. Thus, according to the data presented in Tables 7–9 and in Figure 1b–d, the regressions model for RFU in terms of coded parameters were:

$$\text{RFU value at the 5th day} = 34,584.50 + 3145.13X_2 - 1007.56X_3 + 783.44X_2X_3 + 1132.19X_1X_2X_3,$$

$$\text{RFU value at the 7th day} = 31,204.28 - 1151.03X_1 + 2437.16X_2 + 1191.28X_3 + 776.34X_1X_3 + 738.16X_2X_3 + 857.09X_1X_2X_3,$$

$$\text{RFU value at the 10th day} = 38,333.69 + 3451.69X_2 + 2134.81X_3 + 727.44X_1X_2.$$

Table 7. Estimated effects and coefficients for media components, day 5, cell line R1.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	6.92×10^4	34,584.50	342.80	100.89	4.63×10^{-33}
A	5.06×10^2	253.00	342.80	0.74	4.68×10^{-1}
B	6.29×10^3	3145.13	342.80	9.17	2.57×10^{-9}
C	-2.02×10^3	-1007.56	342.80	-2.94	7.17×10^{-3}
A:B	3.22×10^2	161.00	342.80	0.47	6.43×10^{-1}
A:C	-6.58×10^2	-328.94	342.80	-0.96	3.47×10^{-1}
B:C	1.57×10^3	783.44	342.80	2.29	3.14×10^{-2}
A:B:C	2264.375	1132.19	342.80	3.30	2.99×10^{-3}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
582.09	593.81	0.82	0.77		

Table 8. Estimated effects and coefficients for media components, day 7, cell line R1.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	6.24×10^4	31,204.28	260.24	119.90	7.40×10^{-35}
A	-2.30×10^3	-1151.03	260.24	-4.42	1.80×10^{-4}
B	4.87×10^3	2437.16	260.24	9.36	1.74×10^{-9}
C	2.38×10^3	1191.28	260.24	4.58	1.22×10^{-4}
A:B	-9.03×10^2	-451.28	260.24	-1.73	9.57×10^{-2}
A:C	1.55×10^3	776.34	260.24	2.98	6.46×10^{-3}
B:C	1.48×10^3	738.16	260.24	2.84	9.12×10^{-3}
A:B:C	1714.188	857.09	260.24	3.29	3.06×10^{-3}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
564.45	576.18	0.87	0.83		

Table 9. Estimated effects and coefficients for media components, day 10, cell line R1.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	7.67×10^4	38,333.69	263.46	145.50	7.17×10^{-37}
A	-4.17×10^2	-208.38	263.46	-0.79	4.37×10^{-1}
B	6.90×10^3	3451.69	263.46	13.10	1.99×10^{-12}
C	4.27×10^3	2134.81	263.46	8.10	2.51×10^{-8}
A:B	2.44×10^2	121.88	263.46	0.46	6.48×10^{-1}
A:C	3.41×10^2	170.25	263.46	0.65	5.24×10^{-1}
B:C	1.45×10^3	727.44	263.46	2.76	1.09×10^{-2}
A:B:C	242.25	121.13	263.46	0.46	6.50×10^{-1}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
565.24	576.97	0.91	0.89		

Four of the goodness of fit parameters, i.e., AIC, BIC, R² and R²_{adj} were calculated. The model with the lowest AIC and BIC and with higher, closer to 1 R² and R²_{adj} had better fit to data. In the case of R1 cell line, the obtained statistical parameters are presented in Tables 6–9 and show a better fit on the 3rd and 10th days.

On days 3, 5, 7, and 10, in cell line R2 (Tables 10–13 and Figure 2), the serum type (component B) showed the most robust effect strength of values of 1221.5, 4393.375, 6027.438, and 6903.375 among tested components, respectively. On days 3, 5, and 10, the main effects of components B and C were significant, and on day 7, the main effects of all components (i.e., A, B, C) were significant. On day three, the two interactions between factors A:B and A:C were significant, whereas on days 7 and 10, the interaction between factors A:C and B:C was significant. Moreover, on day seven, the interaction of the three factors A:B:C was also significant. The proposed equations of the final first-order models for RFU in term of coded parameters on each day were:

$$\text{RFU value at 3rd day} = 9487.44 + 610.75X_2 - 363.13X_3 - 426.38X_1X_2 - 883.63X_1X_3,$$

$$\text{RFU value at the 5th day} = 17,818.31 + 2196.69X_2 + 930.69X_3,$$

$$\text{RFU value at the 7th day} = 20,728.22 - 733.09X_1 + 3013.72X_2 + 1672.72X_3 - 632.09X_1X_3 - 730.1875X_1X_2X_3,$$

$$\text{RFU value at the 10th day} = 27,029.34 - 846.28X_1 + 5033.34X_2 + 2254.59X_3 - 651.53X_1X_3 + 677.34X_2X_3.$$

Table 10. Estimated effects and coefficients for media components, day 3, cell line R2.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	1.90×10^4	9487.44	144.90	65.48	1.43×10^{-28}
A	2.46×10^1	12.31	144.90	0.08	9.33×10^{-1}
B	1.22×10^3	610.75	144.90	4.22	3.06×10^{-4}
C	-7.26×10^2	-363.13	144.90	-2.51	1.94×10^{-2}
A:B	-8.53×10^2	-426.38	144.90	-2.94	7.11×10^{-3}
A:C	-1.77×10^3	-883.63	144.90	-6.10	2.68×10^{-6}
B:C	1.19×10^2	59.31	144.90	0.41	6.86×10^{-1}
A:B:C	-517.375	-258.69	144.90	-1.79	8.69×10^{-2}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
526.98	538.70	0.75	0.68		

Table 11. Estimated effects and coefficients for media components, day 5, cell line R2.

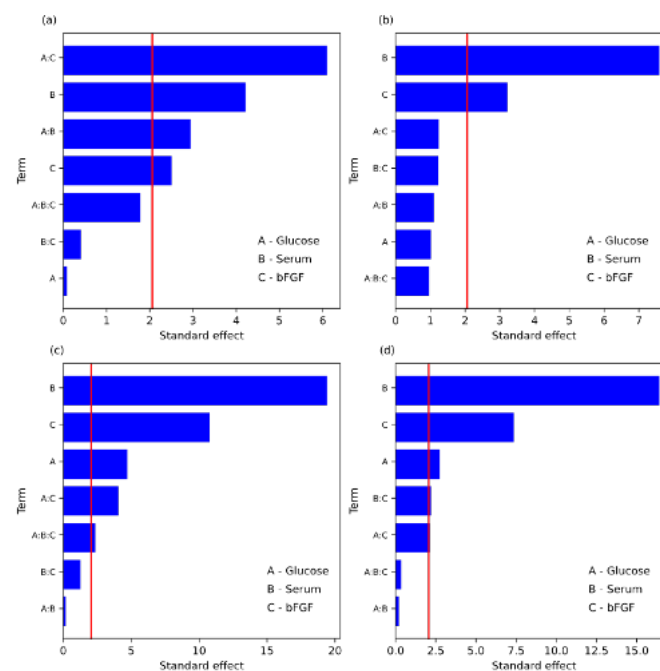
Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	3.56×10^4	17,818.31	289.42	61.57	6.22×10^{-28}
A	-5.89×10^2	-294.56	289.42	-1.02	3.19×10^{-1}
B	4.39×10^3	2196.69	289.42	7.59	7.91×10^{-8}
C	1.86×10^3	930.69	289.42	3.22	3.70×10^{-3}
A:B	6.38×10^2	318.81	289.42	1.10	2.82×10^{-1}
A:C	-7.18×10^2	-358.81	289.42	-1.24	2.27×10^{-1}
B:C	7.12×10^2	355.94	289.42	1.23	2.31×10^{-1}
A:B:C	-559.625	-279.81	289.42	-0.97	3.43×10^{-1}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
571.25	582.98	0.76	0.68		

Table 12. Estimated effects and coefficients for media components, day 7, cell line R2.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	4.15×10^4	20,728.22	155.25	133.51	5.63×10^{-36}
A	-1.47×10^3	-733.09	155.25	-4.72	8.42×10^{-5}
B	6.03×10^3	3013.72	155.25	19.41	3.52×10^{-16}
C	3.35×10^3	1672.72	155.25	10.77	1.12×10^{-10}
A:B	5.98×10^1	29.91	155.25	0.19	8.49×10^{-1}
A:C	-1.26×10^3	-632.09	155.25	-4.07	4.40×10^{-4}
B:C	3.91×10^2	195.72	155.25	1.26	2.20×10^{-1}
A:B:C	-730.1875	-365.09	155.25	-2.35	2.72×10^{-2}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
531.39	543.12	0.96	0.94		

Table 13. Estimated effects and coefficients for media components, day 10, cell line R2.

Term	Effect	Coefficient	SE Coef	t-Value	p-Value
Constant	5.41×10^4	27,029.34	306.69	88.13	1.18×10^{-31}
A	-1.69×10^3	−846.28	306.69	−2.76	1.09×10^{-2}
B	1.01×10^4	5033.34	306.69	16.41	1.51×10^{-14}
C	4.51×10^3	2254.59	306.69	7.35	1.36×10^{-7}
A:B	1.25×10^2	62.34	306.69	0.20	8.41×10^{-1}
A:C	-1.30×10^3	−651.53	306.69	−2.12	4.41×10^{-2}
B:C	1.35×10^3	677.34	306.69	2.21	3.70×10^{-2}
A:B:C	211.1875	105.59	306.69	0.34	7.34×10^{-1}
AIC	BIC	R ²	R ² _{adj}		
574.96	586.69	0.93	0.91		

**Figure 2.** Pareto chart for standard effect; cell line R2; (a)–3rd day, (b)–5th day, (c)–7th day, (d)–10th day. Red vertical line correspondences to a significance level of $\alpha = 0.05$.

The goodness of fit parameters, i.e., AIC, BIC, R², and R²_{adj} of R2 cell line, are presented in Tables 10–13 and shows better fit on the 7th and 10th days.

In addition, for an evaluation of models and the relationship between factors A, B, C and response and cube plots, as shown in Figures 3 and 4, were generated. In cell line R1 (Figure 3), the highest RFU value was obtained for bovine serum and 10 ng/mL bFGF and on the third and seventh days also for high glucose content. On day three, higher RFU values were obtained primarily for the higher level of component C—10 ng/mL bFGF ($p < 0.05$). The level of component B—the type of medium, where bovine serum gave higher values ($p < 0.05$), and the level of component A—glucose level—where high glucose content resulted in higher values also had a significant effect ($p < 0.05$). On days 5, 7, and 10, higher RFU values were observed primarily in the group with a higher value of component B—bovine serum ($p < 0.05$). An important component was also bFGF (component C), where using a higher dose—10 ng/mL—resulted in higher RFU values ($p < 0.05$). On day seven, a significant effect was also shown by the glucose level in the medium—component A, where higher glucose content resulted in higher RFU values ($p < 0.05$).

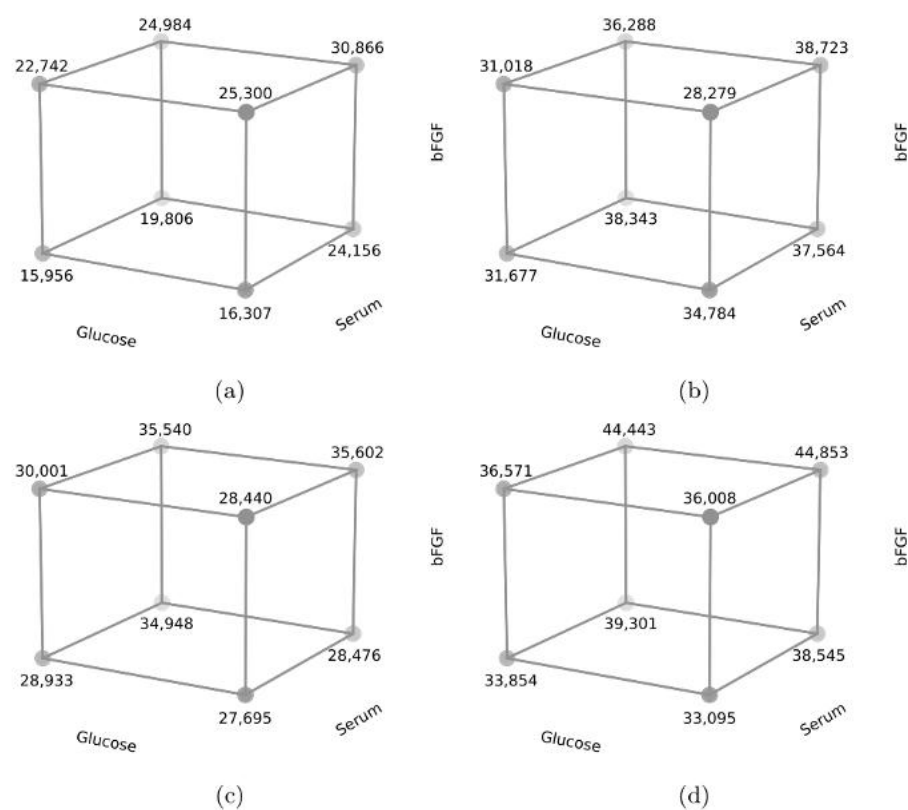


Figure 3. Cube plot for media components, cell line R1; (a)-3rd day, (b)-5th day, (c)-7th day, (d)-10th day.

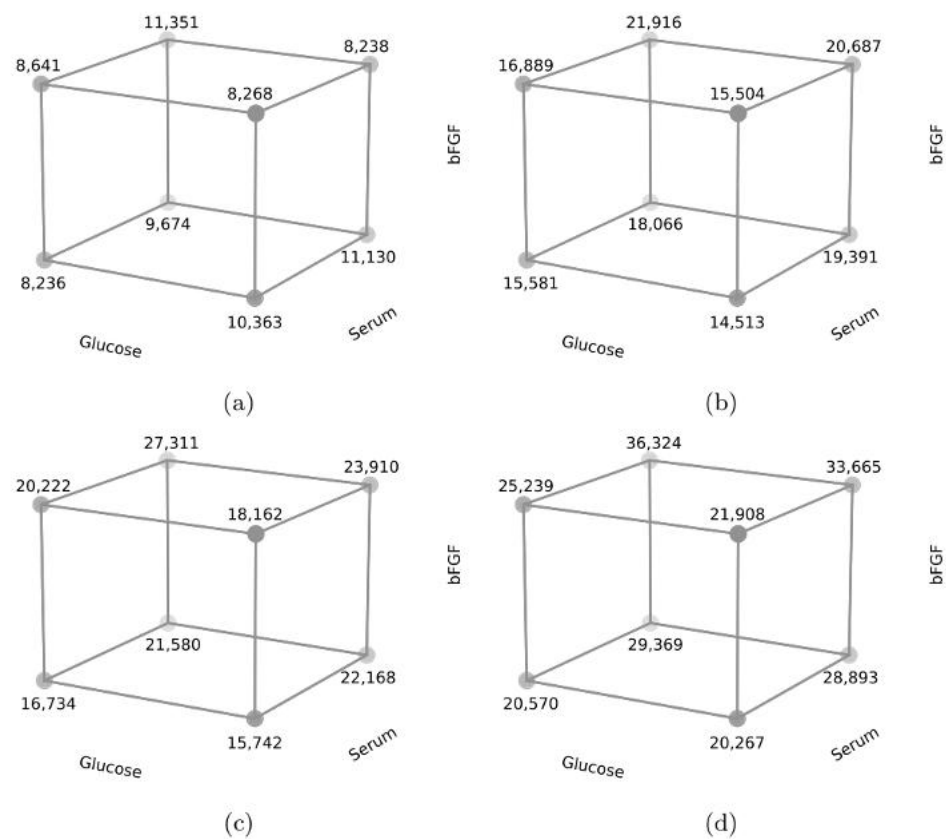


Figure 4. Cube plot for media components, cell line R2; (a)-3rd day, (b)-5th day, (c)-7th day, (d)-10th day.

In cell line R2 (Figure 4), the highest RFU value was obtained for bovine serum (component B) and 10 ng/mL bFGF (component C), and on days 7 and 10 also for low glucose content (component A). Higher RFU values were obtained mainly for component B—bovine serum ($p < 0.05$), but the level of component C also had a significant effect—bFGF—at the level of 10 ng/mL ($p < 0.05$). On days 7 and 10, component A—glucose content also had a significant effect, where lower levels resulted in higher RFU values ($p < 0.05$).

3.2. Microscopic Observations of Proliferating BSCs

Microscopic observation showed that in the group treated with bovine serum and 10 ng/mL bFGF addition, cell differentiation was lower than in the group with horse serum and 5 ng/mL bFGF addition (Figure 5). There formation of myotubes was observed already on the fifth day of the experiment.

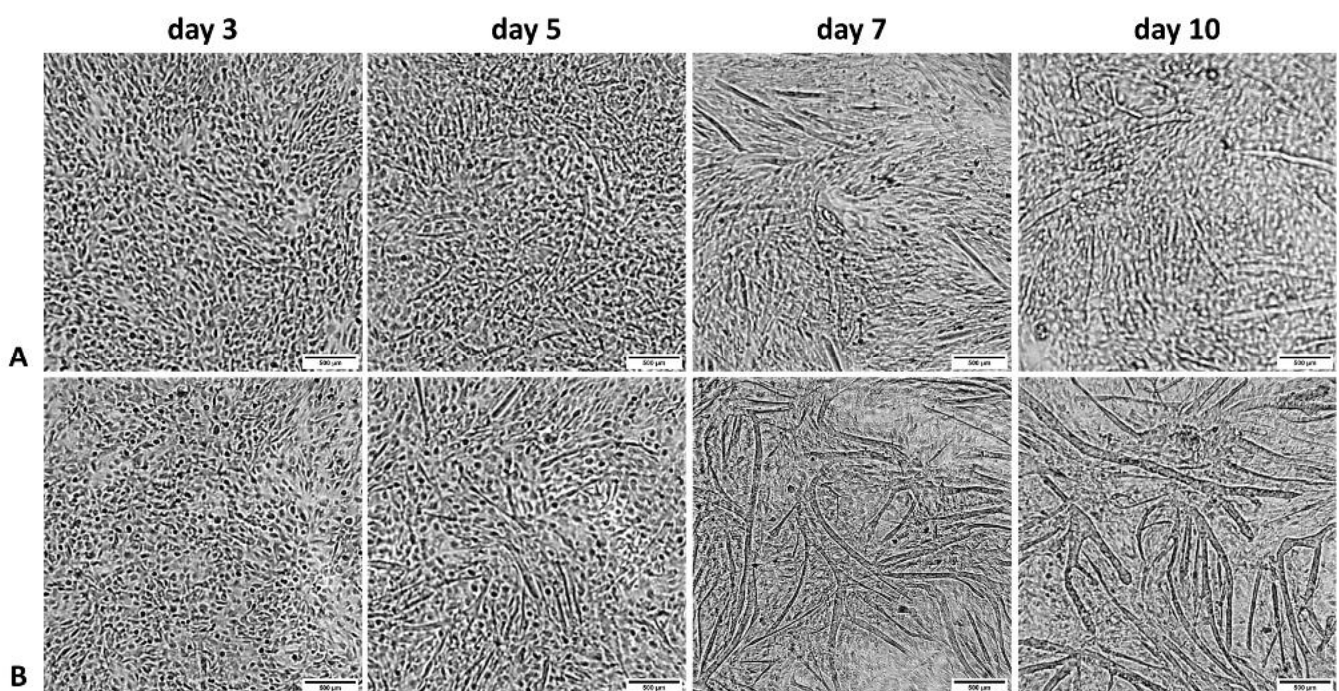


Figure 5. Microscopic observations of proliferating satellite cells (representative selection) (A)—satellite cells cultured in a medium with high glucose content, 20% addition of bovine serum, and 10 ng/mL bFGF; (B)—cell culture of satellite cells in a medium with low glucose content and 20% addition of horse serum. Scalebar represents 500 µm.

3.3. Gene Expression: Genes Involved in Myogenesis

For the groups differing in bFGF content, no significant differences were found in the relative expression of the examined genes on the third and fifth days (Figure 6). For groups differing in glucose content, significantly higher levels of relative expression of *Pax7* and *Myf5* genes—genes expressed at the early stage of myogenesis—were found in the group supplemented with lower glucose content on the third day ($p < 0.05$). On the fifth day, no significant differences in the relative expression of the tested genes were observed between the study groups (Figure 7). For the groups differing in the type of serum, no significant differences in the relative expression of the examined genes were found on the third day. However, large standard deviations were observed in the group treated with horse serum. On the fifth day, a significantly higher relative level of *Pax7* and *Myf6* gene expression was observed in the bovine serum-treated group and a significantly higher relative expression level of *Myf5* gene expression in the horse serum-treated group ($p < 0.05$) (Figure 8).

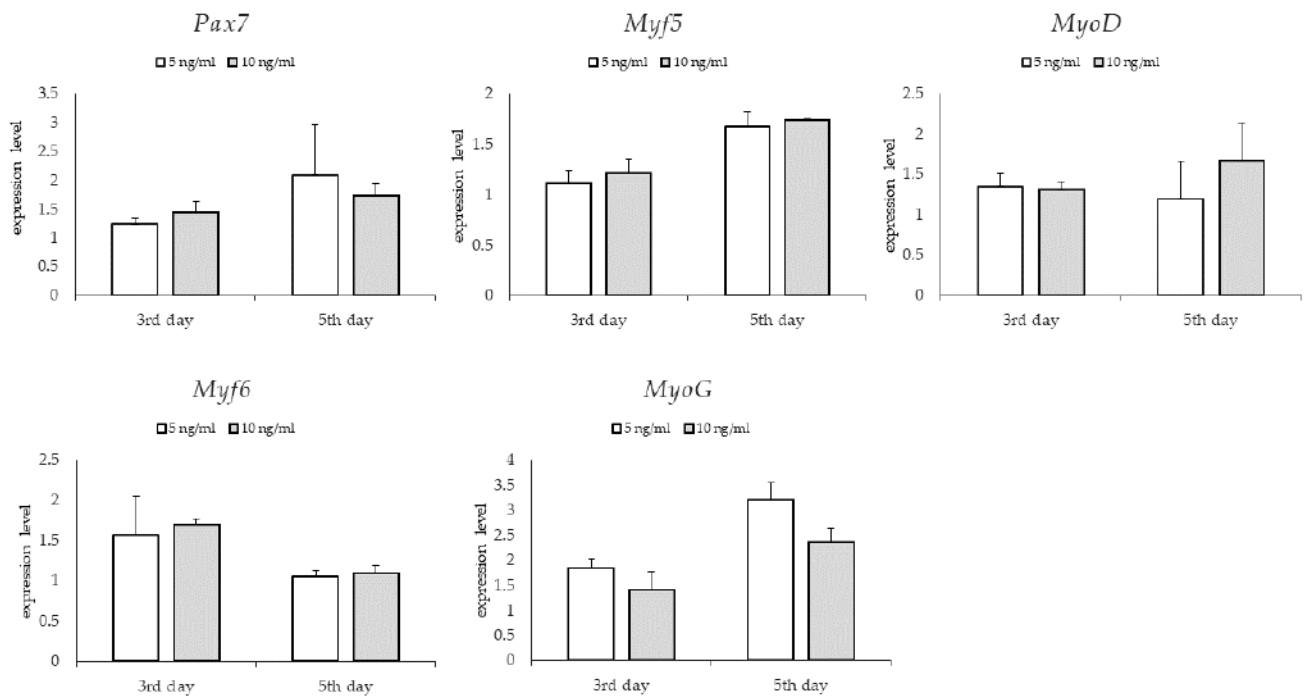


Figure 6. Quantitative PCR analysis of specific markers for muscle satellite cells maintenance in tested media differing in the amount of bFGF.

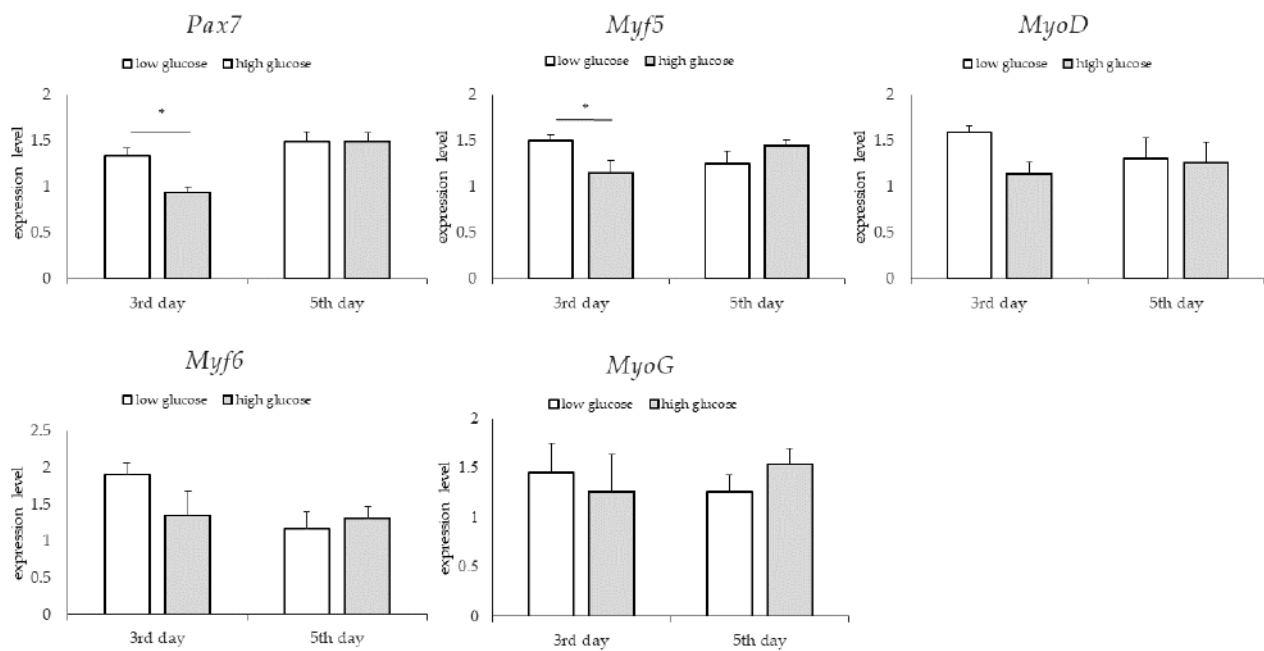


Figure 7. Quantitative PCR analysis of specific markers for muscle satellite cells maintenance in tested media differing in the amount of glucose; $p < 0.05$ *.

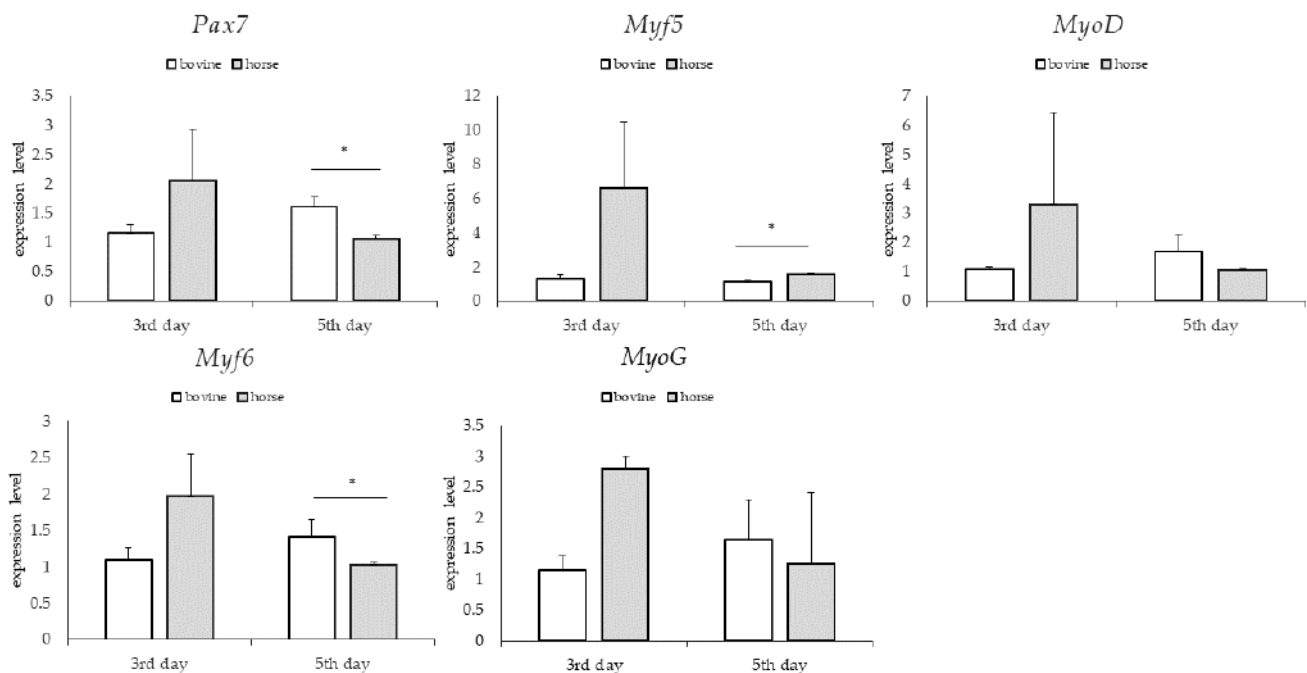


Figure 8. Quantitative PCR analysis of specific markers for muscle satellite cells maintenance in tested media differing in the type of serum; $p < 0.05$ *.

4. Discussion

Recreating the process of myogenesis in vitro requires the provision of relevant factors supporting the proliferation of satellite cells, which are contained in the culture medium. Our research aimed to develop the composition of the culture medium that would most efficiently support the proliferation of BSCs. The experimental design was set to measure the synergistic, co-stimulatory effect of three medium components: glucose content, type of serum (bovine or horse), and mitogenic factor—bFGF—content. Each observation (except observation for 3rd day, cell line R1) showed that the type of serum had the most robust effect on the proliferation rate of BSCs amongst tested components. The main effect of the tested component was statistically significant ($p < 0.05$), and in addition, in the majority of the observations, the interaction between component B (serum type) and component C (bFGF) was statistically significant ($p < 0.05$). In the present study, bovine serum was proven to stimulate the proliferation of BSCs to a greater extent than horse serum. Our observations are consistent with the study by Woods et al. [35], which showed a higher proliferation rate of BSCs in a medium supplemented with bovine serum than horse serum 24 h after cell seeding. Research by Franke et al. [25] focusing on comparing the effect of bovine and horse serum on the proliferation and differentiation of equine bronchial fibroblasts showed that bovine serum more efficiently supported the proliferation process of fibroblasts by maintaining normal cell morphology and increasing the number of passages. Similar observations were made in the case of equine mesenchymal stromal cells, where cells cultured in bovine serum proliferated faster and secreted much more, e.g., bFGF and interleukins (IL-4, IL-5, IL-17) [24]. Gene expression analysis did not provide conclusive information on which of the sera maintained the expression profile characteristic of the early stage of myogenesis. A statistically higher expression level of *Pax7* and *Myf6* genes was observed in the group treated with bovine serum ($p < 0.05$). *Pax7* and *Myf6* genes expression occur at different stages of myogenesis, in the early and late stages, respectively. Quiescent satellite cells express *Pax7*, which maintains cells in an undifferentiated state and regulates genes involved in the initiation of proliferation and inhibiting differentiation [8,36]. The expression of *Myf6* gene—supervises the inhibition of premature differentiation and is maintained at a state level [37,38]. However, it is worth noting that the standard deviations

within the group treated with horse serum were high, which may suggest that bovine serum provides more stable conditions for cell proliferation.

Basic fibroblast growth factor (bFGF) can regulate proliferation and myogenesis by stimulating or inhibiting muscle metabolic pathways [39]. Studies conducted on Jeju Black pig muscle cells showed that the presence of bFGF affected the rate of proliferation and, together with EGF, also the level of expression of the *MyoD* gene [40]. The present study confirmed the pro-mitogenic effect of bFGF on BSCs and after the serum type showed the most robust effect on the proliferation rate. Each observation showed that the factor's main influence was statistically significant ($p < 0.05$). Interactions between component C (bFGF) and component B (serum type) in most observations were statistically significant. In the R2 cell line, a statistically significant interaction between component A (glucose) and component C (bFGF) content was observed on the 3rd, 7th and 10th days ($p < 0.05$). In greater observations, the addition of 10 ng/mL bFGF resulted in a significantly higher rate of proliferation than the addition of 5 ng/mL. Higher concentrations of bFGF were not tested due to the need to select the two most commonly used levels by reason of the mathematical model used. Moreover, microscopic observations showed that in the group treated with bovine serum and 10 ng/mL bFGF differentiation was lower than in the group with horse serum and 5 ng/mL bFGF, which is consistent with the rest of the observations. This confirms the fact that using bovine serum together with bFGF at the level of 10 ng/mL more effectively supports the proliferation process.

Recent research shows that muscle cells' proliferative and self-renewal capacities are greater in a medium with a lower glucose content [41]. Moreover, high glucose concentrations may induce adipogenic differentiation in satellite cells [42]. This examination could be successfully used in a selection of the composition of the medium for co-cultures of satellite cells with adipocytes in seeking to obtain cultured meat. In this study, generally, we observed no significant effect associated with glucose content on the proliferation rate in BSCc compared to the other components. Notably, the expression of *Pax7* and *Myf5* genes—genes expressed at the early stages of myogenesis—was significantly higher in the group supplemented with lower glucose content on the third day. The observation is consistent with the research of Furuichi et al. [41] and proves the ability of satellite cells to self-renew in conditions of lower glucose content. These results would suggest using a medium with low glucose content, which provides higher expression levels of genes involved in the self-renewal of satellite cell populations.

It is worth noting that cell cultivation based on serum of animal origin is contrary to the ideology of cultured meat, raises many ethical controversies, and requires high financial investments. Research is still undertaken to find optimal substitutes for animal serum because serum-free cultures are still inefficient [43]. In 2022, Stout et al. [44] proposed the Beefy-9—B8 medium supplemented with recombinant albumin—which allowed the cultivation of BSCs for seven passages. Independently, in 2022, Kolkmann et al. [19] developed a serum-free medium (SFM) composition supporting proliferation almost as efficiently as the medium supplemented with animal serum. However, both solutions still require a lot of studies, although they optimistically approach us closer to serum-free cell cultivation, which is free of suffering for animals.

5. Conclusions

The component which most significantly affects the level of BSCs proliferation is the type of serum. Using bovine serum provides a higher rate of proliferation and based on qPCR analysis, it would seem that there are more stable growth conditions for cells than horse serum. The second significant component is bFGF, where adding 10 ng/mL significantly increased the proliferation rate. In most observations, glucose does not significantly affect the rate of proliferation. However, the low glucose content ensured the expression of crucial genes in the self-renewal of the satellite cell population, which is consistent with previous studies. The highest rate of proliferation measured as RFU value

was observed, supposing the addition of bovine serum and bFGF at the concentration of 10 ng/mL.

Author Contributions: Conceptualization, W.W. and K.Z.; methodology, W.W., K.Z. and A.O.-M.; software, A.O.-M., W.W. and K.Z.; validation, K.Z.; formal analysis, A.O.-M. and K.Z.; investigation K.Z. and W.W.; resources, W.W., K.Z. and K.P.; data curation, A.O.-M. and K.Z., writing—original draft preparation, K.Z. and A.O.-M.; writing—review and editing, W.W. and K.P.; visualization, K.Z., A.O.-M. and W.W.; supervision W.W. and K.P.; project administration, W.W.; funding acquisition, W.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Science Center (Poland), Miniatura 5—grant number 2021/05/X/NZ9/01365 id 523409.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data supporting reported results are in the possession of the authors (K.Z. and W.W.).

Acknowledgments: The authors thank Ewa Sosin for providing source material used in described experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

References

1. United Nations. World Population Prospects: The 2019 Revision. Population Database. Available online: <https://population.un.org/wpp/> (accessed on 29 May 2023).
2. FAO-FAOSTAT. Land Statistics and Indicators. Global, Regional and Country Trends, 2000–2020. Faostat Analytical Brief 48. 2022. Available online: <https://www.fao.org/3/cc0963en/cc0963e> (accessed on 20 January 2023).
3. FAO. Livestock's Long Shadow. In *Environmental Issues and Options*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2006.
4. Risner, D.; Kim, Y.; Nguyen, C.; Siegel, J.B.; Spang, E.S. Environmental impacts of cultured meat: A cradle-to-gate life cycle assessment. *bioRxiv* **2023**, 537778. [CrossRef]
5. Shapiro, P. Clean meat: How growing meat without animals will revolutionize dinner and the world. *Science* **2018**, *359*, 399.
6. Bhat, Z.F.; Fayaz, H. Prospectus of cultured meat—Advancing meat alternatives. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *48*, 125–140. [CrossRef]
7. Kumar, P.; Sharma, N.; Sharma, S.; Mehta, N.; Verma, A.K.; Chemmalar, S.; Sazili, A.Q. In-vitro meat: A promising solution for sustainability of meat sector. *J. Anim. Sci. Technol.* **2021**, *63*, 693–724. [CrossRef]
8. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1961**, *9*, 493–495. [CrossRef]
9. Chargé, S.B.P.; Rudnicki, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 209–238. [CrossRef]
10. Chal, J.; Pourquie, O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* **2017**, *144*, 2104–2122. [CrossRef]
11. Kuang, S.; Rudnicki, M.A. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 82–91. [CrossRef]
12. Will, K.; Schering, L.; Albrecht, E.; Kalbe, C.; Maak, S. Differentiation of bovine satellite cell-derived myoblasts under different culture conditions. *Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2015**, *51*, 885–889. [CrossRef]
13. Dodson, M.V.; Martin, E.L.; Brannon, M.A.; Mathison, B.A.; McFarland, D.C. Optimization of bovine satellite cell-derived myotube formation in vitro. *Tissue Cell.* **1987**, *19*, 159–166. [CrossRef]
14. Kowalski, K.; dos Santos, M.; Maire, P.; Ciemerych, M.A.; Brzoska, E. Induction of bone marrow-derived cells myogenic identity by their interactions with the satellite cell niche. *Stem Cell Res. Ther.* **2018**, *9*, 258. [CrossRef]
15. Musarò, A.; Barberi, L. Isolation and culture of mouse satellite cells. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *633*, 101–111.
16. Zhang, J.; Li, Q.; Yan, Y.; Sun, B.; Wang, Y.; Tang, L.; Wang, E.; Yu, J.; Nogoy, K.M.C.; Li, X.; et al. Effect of ciglitazone on adipogenic transdifferentiation of bovine skeletal muscle satellite cells. *J. Anim. Sci. Technol.* **2021**, *63*, 934–953. [CrossRef]
17. Guthridge, M.; Wilson, M.; Cowling, J.; Bertolini, J.; Hearn, M.T.W. The Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Skeletal Muscle Regeneration. *Growth Factors* **1992**, *6*, 53–63. [CrossRef]
18. Yasui, R.; Sekine, K.; Taniguchi, H. Clever Experimental Designs: Shortcuts for Better iPSC Differentiation. *Cells* **2021**, *10*, 3540. [CrossRef]
19. Kolkman, A.M.; Van Essen, A.; Post, M.J.; Moutsatsou, P. Development of a Chemically Defined Medium for in vitro Expansion of Primary Bovine Satellite Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 895289. [CrossRef]

20. Li, J.; Gonzalez, J.M.; Walker, D.K.; Hersom, M.J.; Ealy, A.D.; Johnson, S.E. Evidence of heterogeneity within bovine satellite cells isolated from young and adult animals. *J. Anim. Sci.* **2011**, *89*, 1751–1757. [\[CrossRef\]](#)
21. Lyu, P.; Settlege, R.E.; Jiang, H. Genome-wide identification of enhancers and transcription factors regulating the myogenic differentiation of bovine satellite cells. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 901. [\[CrossRef\]](#)
22. Dai, Y.; Wang, Y.M.; Zhang, W.R.; Liu, X.F.; Li, X.; Ding, X.B.; Guo, H. The role of microRNA-1 and microRNA-206 in the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells. *Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2016**, *52*, 27–34. [\[CrossRef\]](#)
23. Shahini, A.; Vydiam, K.; Choudhury, D.; Rajabian, N.; Nguyen, T.; Lei, P.; Andreadis, S.T. Efficient and high yield isolation of myoblasts from skeletal muscle. *Stem Cell Res.* **2018**, *30*, 122–129. [\[CrossRef\]](#)
24. Pezzanite, L.; Chow, L.; Griffenhagen, G.; Dow, S.; Goodrich, L. Impact of Three Different Serum Sources on Functional Properties of Equine Mesenchymal Stromal Cells. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 634064. [\[CrossRef\]](#)
25. Franke, J.; Abs, V.; Zizzadoro, C.; Abraham, G. Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10*, 119. [\[CrossRef\]](#)
26. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *7*, 676–682. [\[CrossRef\]](#)
27. CLAHE (Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization). Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/clahe/index.html> (accessed on 10 January 2023).
28. Van Rossum, G.; Drake, F.L. *Python 3 Reference Manual*; CreateSpace: Scotts Valley, CA, USA, 2009.
29. Harris, C.R.; Millman, K.J.; van der Walt, S.J.; Gommers, R.; Virtanen, P.; Cournapeau, D.; Wieser, E.; Taylor, J.; Berg, S.; Oliphant, T.E.; et al. Array programming with NumPy. *Nature* **2020**, *585*, 357–362. [\[CrossRef\]](#)
30. Virtanen, P.; Gommers, R.; Oliphant, T.E.; Haberland, M.; Reddy, T.; Cournapeau, D.; Burovski, E.; Peterson, P.; Weckesser, W.; Bright, J.; et al. SciPy 1.0. Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nat. Methods* **2020**, *17*, 261–272. [\[CrossRef\]](#)
31. Seabold, S.; Perktold, J. Statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. In Proceedings of the 9th Python in Science Conference, Austin, TX, USA, 28 June–3 July 2010; pp. 92–96.
32. McKinney, W. Data structures for statistical computing in python. In Proceedings of the 9th Python in Science Conference, Austin, TX, USA, 28 June–3 July 2010; Volume 445, pp. 56–61.
33. The Pandas Development Team. Pandas-Dev/Pandas: Pandas. Zenodo. 2020. Available online: <https://zenodo.org/record/7979740> (accessed on 30 January 2023).
34. Hunter, J.D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* **2007**, *9*, 90–95. [\[CrossRef\]](#)
35. Woods, T.L.; Smith, C.W.; Zeece, M.G.; Jones, S.J. Conditions for the culture of bovine embryonic myogenic cells. *Tissue Cell* **1997**, *29*, 207–215. [\[CrossRef\]](#)
36. Soleimani, V.D.; Punch, V.G.; Kawabe, Y.; Jones, A.E.; Palidwor, G.A.; Porter, C.J.; Cross, J.W.; Carvajal, J.J.; Kockx, C.E.M.; van IJcken, W.F.J.; et al. Transcriptional Dominance of Pax7 in Adult Myogenesis Is Due to High-Affinity Recognition of Homeodomain Motifs. *Dev. Cell.* **2012**, *22*, 1208–1220. [\[CrossRef\]](#)
37. Hinterberger, T.J.; Sassoon, D.A.; Rhodes, S.J.; Konieczny, S.F. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev. Biol.* **1991**, *147*, 144–156. [\[CrossRef\]](#)
38. Lazure, F.; Blackburn, D.M.; Corchado, A.H.; Sahinyan, K.; Karam, N.; Sharaneek, A.; Nguyen, D.; Lepper, C.; Najafabadi, H.S.; Perkins, T.J.; et al. Myf6/MRF4 is a myogenic niche regulator required for the maintenance of the muscle stem cell pool. *EMBO Rep.* **2020**, *21*, 12. [\[CrossRef\]](#)
39. Pawlikowski, B.; Vogler, T.O.; Gadek, K.; Olwin, B.B. Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Dev. Dyn.* **2017**, *246*, 359–367. [\[CrossRef\]](#)
40. Park, J.; Lee, J.; Song, K.D.; Kim, S.J.; Kim, D.C.; Lee, S.C.; Son, Y.J.; Choi, H.W.; Shim, K. Growth factors improve the proliferation of Jeju black pig muscle cells by regulating myogenic differentiation 1 and growth-related genes. *Anim. Biosci.* **2021**, *34*, 1392–1402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Furuichi, Y.; Kawabata, Y.; Aoki, M.; Mita, Y.; Fujii, N.L.; Manabe, Y. Excess Glucose Impedes the Proliferation of Skeletal Muscle Satellite Cells Under Adherent Culture Conditions. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 640399. [\[CrossRef\]](#)
42. Aguiari, P.; Leo, S.; Zavan, B.; Vindigni, V.; Rimessi, A.; Bianchi, K.; Franzin, C.; Cortivo, R.; Rossato, M.; Vettor, R. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1226–1231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Kolkman, A.M.; Post, M.J.; Rutjens, M.A.M.; van Essen, A.L.M.; Moutsatsou, P. Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology* **2020**, *72*, 111–120. [\[CrossRef\]](#)
44. Stout, A.J.; Mirliani, A.B.; Rittenberg, M.L.; Shub, M.; White, E.C.; Yuen, J.S.K., Jr.; Kaplan, D.L. Simple and effective serum-free medium for sustained expansion of bovine satellite cells for cell cultured meat. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 466. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.