

УДК 611.73:591.169

## УЧАСТИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

© 2019 г. О. В. Паюшина<sup>1</sup>, \*, Е. И. Домарацкая<sup>1</sup>, О. Н. Шевелева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
Россия 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

\*E-mail: payushina@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2018 г.

После доработки 10.06.2018 г.

Принята в печать 03.07.2018 г.

Клеточная терапия с использованием мезенхимных стромальных клеток (МСК), в настоящее время рассматриваемых в качестве универсальных регуляторов тканевого гомеостаза, является перспективным подходом к восстановлению скелетных мышц после травм и заболеваний. За регенерацию мышц ответственны главным образом миосателлиты, однако в ней участвуют и МСК как резидентные, так и приходящие из костного мозга в ответ на повреждение. По некоторым данным, МСК способны к миогенной дифференцировке и слиянию с клетками мышц, однако ведущую роль в регенерации играет паракринная секреция ими регуляторных молекул. В поврежденной мышце МСК способствуют выживанию, пролиферации и дифференцировке миогенных клеток, стимулируют ангиогенез, оказывают противовоспалительное и антифибротическое действие. Способность к продукции разнообразных факторов, воздействующих на все стадии репаративного процесса, позволяет использовать МСК как средство комплексной доставки биологически активных молекул для ускорения регенерации. Возможность их применения для восстановления мышечной ткани показана на различных экспериментальных моделях, включая механическое и химическое повреждение, мышечную атрофию, ишемию конечностей, генетически обусловленную миодистрофию. Эффективность регенерации мышц с помощью МСК может быть повышена путем совершенствования способов доставки клеток в ткань, улучшения их выживаемости или усиления паракринной активности. В частности, для повышения концентрации МСК в месте повреждения разрабатываются методы их трансплантации на искусственных носителях, ультразвукового воздействия на мышцы, направленной доставки клеток с помощью магнитного поля. Для стимуляции паракринной активности МСК применяется их преколонизирование физическими, химическими и иными стимулами, что изменяет секреторный профиль клеток в необходимом направлении. Терапевтический потенциал МСК может быть также повышен путем их генетической модификации. Новым направлением регенеративной медицины становится использование продуцируемых МСК внеклеточных везикул и содержащихся в них регуляторных молекул, прежде всего микроРНК. Активацию паракринной функции МСК можно рассматривать как инструмент тканевой инженерии *in vivo*, стимулирующий регенерацию тканей за счет внутренних резервов.

DOI: 10.1134/S0044459619010044

Повреждение скелетных мышц может быть результатом таких воздействий, как сдавливание, порезы, проколы, отморожения, истощающие физические нагрузки и т.п. Следствием обширного посттравматического повреждения мышц является образование рубцов и значительное ухудшение сократительной способности. Существует несколько подходов к восстановлению мышц после травм или ишемии. Так, предпринимаются попытки физического воздействия на регенерирующую мышцу (термического, электростимуляции и т.п.) или введения в нее веществ, способствующих клеточной пролиферации, ангиогенезу и/или уменьшающих фиброз – напри-

мер, сурамина, инактивирующего участвующий в развитии фиброза трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGFB) (Garg et al., 2015). Другое перспективное направление, активно развивающееся в настоящее время – клеточная терапия. Большинство терапевтических стратегий направлено на активацию миосателлитов, являющихся основным клеточным источником регенерации мышц (McCarthy et al., 2011; Collins et al., 2005; Marg, 2014; Juhas, Bursac, 2014). Использование для восстановления мышечной ткани донорских сателлитных клеток не получило широкого распространения из-за их малого количества, неоднородности популяции и угасания миогенного

потенциала при культивировании (Montarras et al., 2005; Biressi, Rando, 2010). Однако полученные в последние годы экспериментальные данные свидетельствуют о том, что стимуляция регенерации поврежденных мышц может быть достигнута с помощью введения мезенхимных стромальных клеток (МСК) (Natsu et al., 2004; Shi et al., 2009; Winkler et al., 2012; Andrade et al., 2015). МСК находятся в фокусе современных исследований и рассматриваются как один из наиболее перспективных ресурсов для клеточной терапии. Они присутствуют практически во всех органах и тканях, мультипотентны, способны создавать микроокружение для тканеспецифических стволовых клеток и оказывать регуляторное влияние на ткань, продуцируя биологически активные молекулы (Caplan, 2009; Linder et al., 2010; Паюшина, 2015). МСК секретируют широкий спектр цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и молекул внеклеточного матрикса, которые участвуют в поддержании гомеостаза тканей, регулируют пролиферацию и ангиогенез, обладают противовоспалительным и цитопротекторным эффектом. Эти клетки имеют неиммуногенный фенотип, поскольку практически не экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости I и II классов. МСК секретируют ключевые молекулы, участвующие в иммуносупрессии – индолимин 2,3-диоксигеназу (IDO) и простагландин E2 (PGE2), подавляющие пролиферацию Т-клеток. МСК также блокируют пролиферацию В-клеток, влияют на их миграцию и продукцию иммуноглобулинов (Baraniak, McDevitt, 2010). Они экспрессируют toll-подобные рецепторы (TLRs), активация которых вызывает секрецию терапевтически значимых цитокинов (Mastri et al., 2014). Кроме того, МСК способны к выходу в кровотоки и направленной миграции в область повреждения (Ramirez et al., 2006; Hu et al., 2013). Все это делает их весьма привлекательным средством для клеточной терапии разнообразных патологических состояний, в том числе травм и заболеваний скелетных мышц.

#### ВКЛАД РЕЗИДЕНТНЫХ И ВНЕМЫШЕЧНЫХ МСК И БЛИЗКИХ К НИМ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ В РЕГЕНЕРАЦИЮ МЫШЦ

За регенеративный потенциал скелетных мышц ответственны главным образом сателлитные клетки (миосателлиты) – покоящаяся тканеспецифическая популяция клеток, расположенных между базальной мембраной и сарколеммой миофибрилл, идентифицируемая по экспрессии фактора транскрипции Pax7. При повреждении мышц сателлитные клетки активируются. В активированном состоянии они симметрично или асимметрично делятся, поддерживая размер популяции и обеспечивая образование коммитиро-

ванных миогенных предшественников с фенотипом Pax7<sup>+</sup>Myf5<sup>+</sup> и/или MyoD<sup>+</sup>. Миогенные предшественники способны асимметрично делиться или непосредственно дифференцироваться в миоциты (MyoD<sup>+</sup>), которые сливаются в многоядерные миотубы и образуют новые миофибриллы (Karalaki et al., 2009; Шевелева и др., 2012; Yin et al., 2013). Восстановлению мышечной ткани предшествует фаза дегенерации, включающая разрушение миофибрилл и инфильтрацию поврежденной мышцы воспалительными клетками, удаляющими клеточный детрит и активирующими миогенные клетки. Фаза регенерации включает пролиферацию сателлитных клеток, их дифференцировку и слияние образовавшихся миоцитов с поврежденными мышечными волокнами или друг с другом. Впоследствии новообразованные мышечные волокна увеличиваются в размере, их ядра перемещаются из центра на периферию, и восстановленная мышечная ткань становится морфологически и функционально идентична неповрежденной (Karalaki et al., 2009). Помимо наличия жизнеспособной популяции миосателлитов, необходимыми условиями регенерации мышц являются достаточное кровоснабжение и иннервация. В отсутствие последней регенерировавшие мышечные волокна атрофируются и впоследствии дегенерируют, замещаясь соединительной тканью (Bodine-Fowler, 1994).

Скелетные мышцы содержат также несколько популяций несателлитных клеток, участвующих в поддержании стабильного функционирования мышечной ткани и способных играть роль в ее восстановлении после повреждений. По своим фенотипическим и функциональным характеристикам многие из них близки к МСК. В частности, из мышечной ткани выделена популяция ранних мультипотентных предшественников, получившая название стволовых клеток мышечного происхождения. Эти клетки обладают иммунологической толерантностью, способностью к длительной пролиферации и самоподдержанию, а также широким спектром потенциалов: сообщалось о возможности их дифференцировки не только в миогенном, но и в остеогенном, адипогенном, хондрогенном, эндотелиальном, кровяном и нейральном направлениях (Qu-Petersen et al., 2002; Wu et al., 2010). В мышечной ткани, как и в костном мозге, на основе выведения красителя Hoechst 33344 идентифицированы клетки побочной популяции (SP) (Frank et al., 2006). Они экспрессируют ряд мезенхимных маркеров и способны к миогенной, адипогенной и остеогенной дифференцировке *in vitro*, а также к образованию миофибрилл после внутримышечной трансплантации (Uezumi et al., 2006) и выделению паракринных факторов, стимулирующих пролиферацию и миграцию миобластов (Motohashi et al., 2008).

Среди несателлитных клеток выделяют также мезенхимные предшественники, которые экспрессируют маркеры МСК – PDGFR $\alpha$  и виментин и лишены антигенов CD31 и CD45. Они не дифференцируются в миогенном направлении, однако образуют *in vitro* адипоциты (Uezumi et al., 2010). Сходная популяция, названная фиброадипогенными предшественниками (FAPs), обладает фенотипом lin<sup>-</sup> $\alpha$ 7-интегрин<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> и способна к адипогенной и фиброгенной дифференцировке. FAPs быстро вступают в цикл и пролиферируют вблизи миофибрилл, что предполагает их участие в миогенезе (Joe et al., 2010). Они рассматриваются как клетки, создающие временную нишу для мышечных предшественников, поскольку на высоком уровне секреторируют паракринные факторы, влияющие на восстановление мышц (IGF-1, интерлейкин-6, Wnt1, Wnt3A, Wnt5A), и, как показано в культуре, способствуют терминальной дифференцировке миобластов (Joe et al., 2010; Woppart et al., 2013). Среди несателлитных клеток мышц описаны также две субпопуляции интерстициальных клеток, экспрессирующих медиатор клеточного стресса PW1 (PIC). Большинство PIC близки по свойствам к FAPs: они экспрессируют PDGFR $\alpha$  и обладают фиброгенным и адипогенным потенциалом. Другая субпопуляция PIC лишена PDGFR $\alpha$  и способна дифференцироваться в миогенном направлении (Pannétes et al., 2013).

Особая роль в регенерации скелетных мышц принадлежит перицитам. Многие авторы отождествляют их с МСК, так как эти популяции клеток сходны по профилю экспрессии генов, наличию поверхностных антигенов CD44, CD73, CD90 и CD105 и способности к остео-, адипо- и хондрогенезу (Covas et al., 2008; Crisan et al., 2008; Corselli et al., 2010). В то же время у перицитов имеются и уникальные поверхностные маркеры, в частности NG2, CD146 и PDGFR $\beta$  (Crisan et al., 2008). Для перицитов, выделенных из скелетных мышц, показана способность формировать миотубы *in vitro* и участвовать в регенерации мышц после введения мышам с мышечной дистрофией mdx (Dellavalle et al., 2007) или мышам, мышцы которых повреждены инъекцией кардиотоксина (Crisan et al., 2008).

При травме в мышце в большом количестве появляются мультипотентные мезенхимные предшественники, сходные по ряду характеристик (скорости роста, поверхностному фенотипу и профилю экспрессии генов) с МСК костного мозга, но отличающиеся от них большей метаболической активностью и слабыми остео- и хондрогенными потенциальными при высокой способности к адипогенезу. Как и МСК костного мозга, эти клетки экспрессируют гены, связанные с регенерацией и иммунорегуляцией (IL6, IL10, HGF, TGF $\beta$ 3 и IFNG) и продуцируют фактор роста фибробла-

стов (FGF2), эпителиальный фактор роста (EGF) и фактор роста сосудистого эндотелия (VEGFA). Предполагается, что они являются активированными потомками перицитов, утратившими в результате травмы связь с сосудистой нишей и вступившими в пролиферацию (Jackson et al., 2011). Клетки с характерным для МСК фенотипом CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>, обладающие остео-, адипо- и хондрогенными потенциальными, могут быть выделены не только из поврежденных, но и из нормальных мышц (Sakaguchi et al., 2005; Gao et al., 2013; Downey et al., 2015). Предполагается, что содержащиеся в скелетных мышцах МСК могут участвовать в регенерации не только мышечной, но и прилегающей костной ткани (Lemos et al., 2015).

Очевидно, наряду с резидентной популяцией МСК мышечной ткани в восстановление поврежденных мышц вносят вклад и МСК, приходящие из костного мозга. При патологических состояниях мышечной ткани, таких как генетически обусловленная миодистрофия, острое и хроническое повреждение скелетных мышц, в том числе вызванное экстремальной физической нагрузкой, в кровеносном русле регистрируется увеличение численности МСК (Ramírez et al., 2006; Fujita et al., 2015).

Способность МСК к миграции из костного мозга в поврежденную мышечную ткань показана в экспериментах на химерных мышцах mdx, которым были трансплантированы меченные GFP донорские МСК (Fujita et al., 2015). О ней свидетельствуют также результаты экспериментов по системному введению МСК животным с повреждением мышц инъекцией кардиотоксина (Li et al., 2015a), механическим воздействием (Roth et al., 2012) или ишемией (Xiao et al., 2012). Не вполне ясно, однако, по какой причине МСК направляются из костного мозга в поврежденные мышцы, в которых имеются собственные, резидентные стволовые и родоначальные клетки, вовлеченные в заживление. Предположительно это связано с повышенным запросом на новые клетки, что приводит к уменьшению численности тканеспецифических стволовых клеток (возможно, не способных обеспечить полную репарацию), а также с острой потребностью в репарации ткани, что требует увеличения вклада клеток из костного мозга.

Направленная миграция МСК из костного мозга в область поражения мышц может быть связана с существующей в поврежденной ткани гипоксией, в условиях которой индуцированный гипоксией транскрипционный фактор (HIF-1) стимулирует экспрессию хемоаттрактантов (Liu et al., 2011). МСК экспрессируют огромный набор хемокиновых рецепторов и их лигандов. Важную роль в миграции МСК в область повреждения играют фактор стромы SDF-1 $\alpha$  и его рецептор CXCR4. Так, в системе *in vitro* было показано, что повышенная

продукция SDF-1 иммортализованными миобластами человека стимулирует миграцию к ним МСК, выделенных из костного мозга (Dmitriev et al., 2016), а в экспериментах по введению SDF-1 в поврежденную мышцу крысы наблюдалось усиление ее регенерации за счет мобилизации эндогенных стволовых клеток (в том числе немышечных), экспрессирующих CXCR4 (Brzoska et al., 2012).

Клетки, пришедшие в скелетную мышцу из костного мозга, первоначально располагаются интерстициально вблизи сосудов, но со временем занимают позицию миосателлитов (Dreyfus et al., 2004). Показано, что заселение мышечной ткани МСК костномозгового происхождения приводит к улучшению функциональных показателей мышц после травмы (Roth et al., 2012), а также частично корректирует мышечную патологию у дистрофичных мышцей mdx (Fujita et al., 2015).

### МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ МСК В РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

В качестве одного из возможных путей участия МСК в регенерации поврежденных мышц рассматривается их дифференцировка в миогенном направлении. При культивировании в присутствии некоторых индукторов, в частности, 5-азациитидина (Krupnick et al., 2004), стероидных гормонов (Warejcka et al., 1996; Gang et al., 2004; Liu et al., 2007), галектина-1 (Chan et al., 2006), инсулиноподобного фактора роста-1 (Park et al., 2016) МСК могут приобретать признаки дифференцировки в скелетные мышцы – экспрессировать специфические маркеры MyoD и миогенин и сливаться в многоядерные миотубы, содержащие десмин и миозин. Впрочем, способность МСК к миогенной дифференцировке в ответ на те или иные индукторы подтверждается не всеми авторами и, видимо, неодинакова для клеток из разных органов и на разных стадиях онтогенеза (Gang et al., 2004; Balana et al., 2006; Chan et al., 2006; Шевелева и др., 2011). Миогенная программа в МСК может быть активирована также сигналами от дифференцирующихся клеток мышц. Так, сообщалось о миогенезе в культурах МСК из различных источников в присутствии факторов, выделяемых в среду миобластами линии C2C12 (Salvatori et al., 1995; Wise et al., 1996; Chan et al., 2006). Кроме того, имеются данные об индукции миогенной дифференцировки МСК костного мозга при их культивировании в среде, кондиционированной химически поврежденными (но не нормальными) мышцами (Santa María et al., 2004).

МСК способны проявлять миогенные потенции не только в культуре, но и *in vivo* под влиянием микроокружения поврежденной мышечной ткани. В частности, образование миотуб донорского происхождения было отмечено после транс-

плантации МСК, полученных из эмбриональных стволовых клеток, в мышцы, подвергнутые механическому сдавливанию (Ninagawa et al., 2013), а также после введения МСК костномозгового происхождения в мышцы, поврежденные кардиотоксином (Li et al., 2015a), или животным с мышечной дистрофией (Shabbir et al., 2009). В регенерации мышц может играть роль и улучшение кровоснабжения поврежденной ткани вследствие дифференцировки в эндотелий кровеносных сосудов, показанной, в частности, для МСК из жировой ткани (Liu et al., 2007) и костного мозга (Shabbir et al., 2009; Li et al., 2015a).

Вносить некоторый вклад в восстановление мышечной ткани может и слияние МСК с миогенными клетками. Оно было показано как *in vitro* при сокультивировании МСК с миобластами (Shi et al., 2004; Garza-Rodea et al., 2012; Kulesza et al., 2016), так и *in vivo* при их трансплантации реципиентам с миодистрофией (Shabbir et al., 2009) или химическим повреждением мышц (Shi et al., 2004; Garza-Rodea et al., 2012). Однако по другим данным слияние МСК с клетками мышц происходит достаточно редко. Так, на модели регенерации скелетных мышц после повреждения кардиотоксином у мышцей, генетически дефектных по дистрофину, отмечались крайне малочисленные случаи слияния SP-клеток, представляющих близкородственную МСК популяцию, с миобластами (Motohashi et al., 2008), а при трансплантации МСК из пуповинной крови в ишемизированные мышцы длительного приживания введенных клеток обнаружено не было, хотя регенерация усиливалась (Koronen et al., 2007). По-видимому, слияние МСК с мышечными клетками, как и их дифференцировка в миогенном направлении, представляет собой нестабильное явление, роль которого в регенерации мышц едва ли может быть существенной.

В настоящее время можно считать общепринятой точку зрения, согласно которой ведущую роль в репарации тканевой играет способность МСК изменять тканевое микроокружение, секретирова разнообразие биологически активные факторы. При введении в поврежденные мышцы МСК способствуют их регенерации за счет активации местных стволовых клеток, прогениторных и сателлитных клеток (Sassoli et al., 2012a). Так, известна способность МСК стимулировать пролиферацию миобластов, выделяя фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) (Sassoli et al., 2012b) и сфингозин-1-фосфат (Sassoli et al., 2014a). Факторы, выделяемые МСК, усиливают экспрессию матриксных металлопротеиназ в миосателлитах, что ведет к стимуляции их мобилизации, дифференцировки и слияния (Sassoli et al., 2014b). Кроме того, под влиянием МСК в поврежденной мышечной ткани снижается экспрессия воспалительных цитокинов и окислительный стресс (Shabbir et al., 2009), а также уровень апоптоза (Li et al., 2016).

Продукция ими проангиогенных факторов, прежде всего VEGF, способна улучшать васкуляризацию регенерирующей мышцы (Kinnaird et al., 2004; Hoffmann et al., 2010). Стимулирующее влияние МСК на миогенез и ангиогенез в поврежденных мышцах опосредовано также микроРНК (в частности, miR-494), содержащимися в продуцируемых ими внеклеточных везикулах (Nakamura et al., 2015). Имеются данные об антифибротическом действии выделяемых МСК паракринных регуляторов, подавляющих дифференцировку фибробластов скелетных мышц в миофибробласты (Sassoli et al., 2014b). Впрочем, в ряде случаев (в частности, при миодистрофии) присутствующие в мышцах МСК могут играть и профибротическую роль, дифференцируясь в миофибробласты и откладывая избыточное количество белков внеклеточного матрикса (Judson et al., 2013).

Благодаря способности к паракринной секреции широкого спектра факторов, воздействующих на разные стадии восстановительного процесса, МСК рассматриваются как средство комплексной доставки биологически активных молекул для ускорения тканевой регенерации.

#### ЭФФЕКТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МСК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МЫШЦ

Введение МСК в поврежденные мышцы показало свою терапевтическую эффективность в многочисленных исследованиях, проводимых на различных экспериментальных моделях. Так, через четыре недели после трансплантации аутологичных МСК костного мозга в камбаловидную мышцу крысы, травмированную сдавливанием, отмечалось повышение силы ее сокращения. При этом эффект наблюдался при введении клеток как непосредственно после повреждения, так и спустя 7 сут и не сопровождался существенным уменьшением количества фиброзной ткани либо увеличением диаметра мышечных волокон и числа сосудов по сравнению с нелечеными животными (Winkler et al., 2012). В то же время в мышцах, регенерировавших в присутствии МСК, повышалась доля быстрых волокон, с чем, по-видимому, и было связано эффективное восстановление мышечной силы (Roth et al., 2013). Следует отметить, что к улучшению функционального состояния травмированной мышцы приводило не только локальное введение МСК, но и системное, преимущество которого состоит в лучшем распределении клеток и возможности их доставки в труднодоступные участки поврежденной ткани (Roth et al., 2012).

Благотворное влияние МСК на ход регенерации показано и при другом способе механического повреждения мышц – нанесении разрезом. В экспериментах на крысах введение МСК костного мозга в травмированную мышцу способ-

ствовало созреванию мышечных волокон и практически полному восстановлению функциональных показателей (Natsu et al., 2004), в том числе и после многократного травмирования (Andrade et al., 2015). Сходным образом действовали и МСК из периферической крови человека, трансплантированные бестимусным крысам; стимуляция ими регенерации была связана главным образом с регуляторным влиянием на экспрессию генов, контролирующих миогенез, фиброз и ангиогенез, в микроокружении поврежденной мышцы (Shi et al., 2009).

Для исследования регенеративного потенциала МСК применяется также модель химического повреждения мышц. Показано, в частности, что МСК, выделенные из различных тканей человека (костного мозга, жировой ткани, синовиальной мембраны), трансплантированные в поврежденные инъекцией кардиотоксина большеберцовые мышцы иммунодефицитных мышей NOD/SCID, участвуют в миогенезе, сливаясь с клетками реципиента в гибридные мышечные волокна (Garza-Rodea et al., 2012). Вклад донорских клеток в образование мышечных волокон обнаруживался и в случае системного введения МСК мышам, чьи мышцы были повреждены кардиотоксином (De Bari et al., 2003).

Сообщалось также о способности МСК препятствовать развитию атрофии скелетных мышц, индуцируемой различными экспериментальными воздействиями. Так, системное введение этих клеток мышам, содержащимся на высокожировой диете, уменьшало потерю мышечной массы и силы, снижало окислительный стресс, предотвращало уменьшение диаметра мышечных волокон и апоптоз отдельных ядер в их составе (Abrigo et al., 2016). При местном введении МСК крысам, у которых мышечная атрофия была вызвана длительной иммобилизацией конечностей, также отмечалось подавление миоядерного апоптоза и, кроме того, усиливалась пролиферация сателлитных клеток, хотя значительных отличий от контроля по массе и силе мышц обнаружено не было (Li et al., 2016).

Терапевтический эффект МСК показан также на модели ишемического повреждения мышц задней конечности, вызываемого перевязкой бедренной артерии (Kinnaird et al., 2004; Rahman et al., 2014) либо индукцией образования в ней тромба (Kang et al., 2016). Очевидно, в его основе лежит в первую очередь ангиогенное действие МСК: сообщалось, что после их введения повышается плотность сосудов в ишемизированной ткани и улучшается ее кровоснабжение, что сопровождается появлением множества мышечных волокон с центрально расположенными ядрами (Rahman et al., 2014), снижением площади фиброза и числа апоптотических клеток (Kang et al., 2016), а также восстановлением двигательных функций ко-

нечности (Kinnaird et al., 2004; Rahman et al., 2014) и снижением частоты ее самопроизвольной ампутации (Kinnaird et al., 2004; Kang et al., 2016).

Еще одной областью возможного применения МСК являются мышечные дистрофии – гетерогенная группа генетических заболеваний, которые характеризуются прогрессирующей дегенерацией скелетных мышц. Для моделирования одной из наиболее клинически значимых форм этих заболеваний – миодистрофии Дюшенна – используются мыши mdx с мутацией в гене дистрофина. В экспериментах на этих животных показано, что внутримышечная инъекция МСК различного происхождения способна восстанавливать нормальный уровень экспрессии дистрофина (De Bari et al., 2003; Jeong et al., 2014) и уменьшать дисфункцию мышц, ослабляя воспаление и стимулируя регенерацию (Fujita et al., 2015). Существуют и данные клинических испытаний, согласно которым трансплантация МСК из пуповины пациентам с миодистрофией Дюшенна предотвращала потерю мышечной силы в течение как минимум одного года после операции (Rajput et al., 2015). Для исследования эффекта трансплантации МСК применяются также мыши SJL с делецией в гене дисферлина, являющиеся моделью конечностно-поясной мышечной дистрофии 2В. При системном введении им МСК жировой ткани человека было отмечено слияние донорских клеток с мышечными волокнами реципиента и улучшение моторной функции (Vieira et al., 2008). В то же время МСК из пуповины человека, внутривенно введенные мышам SJL, мигрировали в мышцы, но не вносили вклада в миогенез. Однако даже в этом случае у животных предотвращалось снижение двигательной способности, вероятно, благодаря паракринным эффектам МСК (Zucconi et al., 2011).

#### ПОДХОДЫ К УСИЛЕНИЮ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА МСК

Для повышения эффективности использования МСК как ресурса для восстановления скелетных мышц разрабатываются различные подходы, направленные на совершенствование доставки клеток в поврежденную ткань, улучшение их выживаемости в организме реципиента или усиление паракринной активности. В частности, высокая концентрации МСК в месте повреждения может быть достигнута путем их трансплантации на искусственных носителях. В состав носителей могут быть включены ростовые факторы, длительное локальное воздействие которых на МСК усиливает их паракринное влияние на родоначальные клетки мышц (Pumberger et al., 2016) либо способствует длительному выживанию в микроокружении поврежденной ткани (Xu et al., 2016).

При внутривенном введении МСК усилению их миграции в мышцы способствует воздействие на

последние импульсами фокусированного ультразвука. На модели ишемии задних конечностей показано, что это усиливает локальную продукцию хемоаттрактантов и как следствие тропизм МСК к мышцам; кроме того, под влиянием измененного микроокружения МСК секретируют больше VEGF и интерлейкина-10, что в итоге способствует более эффективной стимуляции ангиогенеза, чем при введении МСК без обработки мышц ультразвуком (Tebebi et al., 2017). Известна также магнитная система доставки МСК, основанная на мечении вводимых клеток суперпарамагнитными наночастицами оксида железа и приложении внешнего магнитного поля к области повреждения. Есть данные, что в этом случае содержание донорских клеток в травмированной мышце оказывается выше, а ее структурное и функциональное восстановление эффективнее, чем после трансплантации МСК обычным образом (Nakabayashi et al., 2013).

Для стимуляции паракринной активности МСК применяется их прекодиционирование физическими, химическими и иными стимулами, которое вызывает комплексный ответ клеток и позволяет изменять их секреторный профиль в направлении, требуемом для усиления регенераторного потенциала. Так, культивирование МСК в условиях гипоксии индуцирует экспрессию сMet – рецептора ростового фактора HGF, являющегося ключевым медиатором их мобилизации и/или активации *in vivo* (Rosová et al., 2008), а также усиливает продукцию ангиогенных факторов (в частности, VEGF) (Hoffmann et al., 2010) и Wnt4, стимулирующего миграцию МСК и эндотелиальных клеток и дифференцировку миобластов (Leroux et al., 2010). Вследствие этого гипоксическое прекодиционирование МСК повышает их способность восстанавливать кровоснабжение и мышечную ткань в ишемизированных конечностях (Rosová et al., 2008; Hoffmann et al., 2010; Leroux et al., 2010).

Способность МСК к выживанию в поврежденной ткани и паракринной секреции биоактивных молекул может быть повышена обработкой клеток различными цитокинами, гормонами и фармакологическими агентами (Noiseux et al., 2012; Mastri et al., 2014). Этот подход применяется в том числе и для повышения эффективности регенерации скелетных мышц. Так, сообщалось, что прекодиционирование МСК с помощью фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) усиливает их адгезию к эндотелиальным клеткам и миграцию в область ишемического повреждения мышц (Xiao et al., 2012). Кроме того, секреция миогенных факторов зависит от адгезивных взаимодействий МСК с субстратом и может изменяться в ответ на механические воздействия. Показано, в частности, что растяжение МСК, выделенных из мышц, на ламинине или коллагене влияет на способность конди-

ционированной ими среды стимулировать пролиферацию миобластов (De Lisio et al., 2014).

Наконец, для повышения терапевтического потенциала МСК может быть использована их генетическая модификация. С помощью введения в МСК гена эритропоэтина (Li et al., 2015b) или основного фактора роста фибробластов (Zhang et al., 2014) либо гена PEP-1-CAT, защищающего клетки от окислительного стресса (Zhang et al., 2012), удалось улучшить результаты их трансплантации крысам с ишемией задних конечностей.

Одним из новых направлений использования МСК в регенеративной медицине становится использование внеклеточных везикул, продуцируемых этими клетками и содержащих биологически активные молекулы. Везикулы могут нести на своей поверхности цитокины и факторы роста, стимулирующие клетку-мишень через мембранные рецепторы, доставлять в нее белки, в том числе транскрипционные факторы, и переносить генетическую информацию (ДНК, мРНК, микроРНК). Поскольку паракринные эффекты МСК в значительной степени опосредованы секрецией внеклеточных везикул (Baglio et al., 2012), последние представляют собой перспективный источник регуляторных молекул для стимуляции регенерации тканей, в том числе и мышечной. Это подтверждается данными об усилении миогенеза и ангиогенеза в поврежденных кардиотоксином мышцах после введения везикул, выделенных из кондиционированной МСК среды (Nakamura et al., 2015). На этой модели показано, что внеклеточные везикулы не только вызывают усиление экспрессии в поврежденной ткани миогенных маркеров *Pax7*, *MyoD* и *eMyhc*, но и воздействуют на макрофаги, переключая их с провоспалительного фенотипа M1 на фенотип M2, для которого характерны иммуносупрессивные, ангиогенные и ремоделирующие свойства (Lo Sicco et al., 2017). Поскольку репаративный эффект внеклеточных везикул в отношении мышечной ткани связан в первую очередь с содержащимися в них микроРНК, в частности, miR-1, miR-133, miR-203 и miR-494, регулируемыми миогенез, и miR-21, оказывающей противовоспалительное действие (Nakamura et al., 2015), использование этих молекул также рассматривается в качестве перспективного направления терапии мышечных повреждений. Так, локальная инъекция miR-1, miR-133 и miR-203, известных как мощные регуляторы миогенеза, позволила ускорить регенерацию механически поврежденной мышцы крысы без необходимости трансплантации клеток или введения полученных от них внеклеточных везикул (Nakasa et al., 2010).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время МСК рассматриваются как универсальные регуляторы тканевого гомеостаза, обеспечивающие стабильное функционирование различных тканей главным образом за счет паракринного регуляторного влияния на резидентные клетки. Способность МСК к направленной миграции в область повреждения, широта спектра продуцируемых ими биоактивных молекул, неиммуногенность, несклонность к образованию опухолей, а также легкость выделения и культивирования делает их перспективным ресурсом для регенерации тканей, в том числе мышечной. В поврежденной мышце МСК способствуют выживанию, пролиферации и дифференцировке миогенных клеток, стимулируют ангиогенез, оказывают противовоспалительное и антифибротическое действие, обеспечивая полноценное структурное и функциональное восстановление. Однако применение МСК для регенерации мышц может быть затруднено преждевременной гибелью клеток в очаге поражения и возможностью проявления ими фиброгенных потенциалов. В качестве путей преодоления этих проблем рассматриваются введение в поврежденную ткань секреторных продуктов МСК (в частности, внеклеточных везикул) и различные воздействия на клетки с целью повышения их выживаемости и изменения секреторного профиля. Получение МСК с заданными свойствами, обеспечивающими эффективную доставку биологически активных молекул в область повреждения, в последние годы становится одной из активно разрабатываемых областей регенеративной медицины. Знание биологии МСК в перспективе позволит, используя специфические для ткани и клеток средства, влиять на миграцию МСК к месту повреждения и их трофическую активность. В этой связи активацию паракринной функции МСК можно рассматривать как инструмент тканевой инженерии *in vivo*, стимулирующей регенерацию тканей за счет внутренних резервов.

Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН (ИНГЗ № 0108-2018-0013).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Паюшина О.В., 2015. Локализация и функции мезенхимных стромальных клеток *in vivo* // Журн. общ. биологии. Т. 76. № 2. С. 161–172.
- Шевелева О.Н., Паюшина О.В., Старостин В.И., 2012. Клеточные и молекулярные основы гистогенеза скелетных мышц // Изв. РАН. Сер. биол. № 6. С. 579–588.
- Шевелева О.Н., Паюшина О.В., Кожевникова М.Н., Буторина Н.Н., Старостин В.И., 2011. Спонтанный и индуцированный миогенез при культивировании клеток из печени зародышей крысы // Цитология. Т. 53. № 11. С. 874–883.

- Abrigo J., Rivera J.C., Aravena J., Cabrera D., Simon F., Ezquer F., Ezquer M., Cabello-Verrugio C.*, 2016. High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation, and myonuclear apoptosis // *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2016. P. 9047821.
- Andrade B.M., Baldanza M.R., Ribeiro K.C., Porto A., Peçanha R. et al.*, 2015. Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model // *PLoS One.* V. 10. № 6. P. e0127561.
- Balana A., Nicoletti C., Zahanich I., Graf E.M., Christ T., Boxberger S., Ravens U.*, 2006. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells // *Cell Res.* V. 16. № 12. P. 949–960.
- Baglio S.R., Pegtel D.M., Baldini N.*, 2012. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy // *Frontiers in Physiology.* V. 3. Article 359.
- Baraniak P.R., McDevitt T.C.*, 2010. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration // *Regen. Med.* V. 5. № 1. P. 121–143.
- Biressi S., Rando T.A.*, 2010. Heterogeneity in the muscle satellite cell population // *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 21. № 8. P. 845–854.
- Bodine-Fowler S.*, 1994. Skeletal muscle regeneration after injury: an overview // *J. Voice.* V. 8. № 1. P. 53–62.
- Boppart M.D., De Lisio M., Zou K., Huntsman H.D.*, 2013. Defining a role for non-satellite stem cells in the regulation of muscle repair following exercise // *Front. Physiol.* V. 4. P. 310.
- Brzoska E., Kowalewska M., Markowska-Zagrajek A., Kowalski K., Archacka K. et al.*, 2012. Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells // *Biol. Cell.* V. 104. № 12. P. 722–737.
- Caplan A.I.*, 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight // *J. Pathol.* V. 217. № 2. P. 318–324.
- Chan J., O'Donoghue K., Gavina M., Torrente Y., Kennea N., Mehmet H., Stewart H., Watt D.J., Morgan J.E., Fisk N.M.*, 2006. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration // *Stem Cells.* V. 24. № 8. P. 1879–1891.
- Collins C.A., Olsen I., Zammit P.S., Heslop L., Petrie A., Partridge T.A., Morgan J.E.*, 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche // *Cell.* V. 122. № 2. P. 289–301.
- Corselli M., Chen C.-W., Crisan M., Lazzari L., Péault B.*, 2010. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 30. № 6. P. 1104–1109.
- Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., Silva W.A., Jr., Orellana M.D., Freitas M.C.C., Neder L., Santos A.R.D., Peres L.C., Jamur M.C., Zago M.A.*, 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts // *Exp. Hematol.* V. 36. № 5. P. 642–654.
- Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M. et al.*, 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // *Cell Stem Cell.* V. 3. № 3. P. 301–313.
- De Bari C., Dell'Accio F., Vandenabeele F., Vermeesch J.R., Raymackers J.-M., Luyten F.P.*, 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane // *J. Cell Biol.* V. 160. № 6. P. 909–918.
- De Lisio M., Jensen T., Sukiennik R.A., Huntsman H.D., Boppart M.D.*, 2014. Substrate and strain alter the muscle-derived mesenchymal stem cell secretome to promote myogenesis // *Stem Cell Res. Ther.* V. 5. № 3. P. 74.
- Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R., Tagliafico E., Sacchetti B. et al.*, 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells // *Nat. Cell Biol.* V. 9. № 3. P. 255–267.
- Dmitriev P., Kiseleva E., Kharchenko O., Ivashkin E., Pichugin A. et al.*, 2016. Dux4 controls migration of mesenchymal stem cells through the Cxcr4-Sdf1 axis // *Oncotarget.* V. 7. № 40. P. 65090–65108.
- Downey J., Lauzier D., Kloen P., Klarskov K., Richter M., Hamdy R., Faucheux N., Scimè A., Balg F., Grenier G.*, 2015. Prospective heterotopic ossification progenitors in adult human skeletal muscle // *Bone.* V. 71. P. 164–170.
- Dreyfus P.A., Chretien F., Chazaud B., Kirova Y., Caramelle P., Garcia L., Butler-Browne G., Gherardi R.K.*, 2004. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches // *Am. J. Pathol.* V. 164. № 3. P. 773–779.
- Frank N.Y., Kho A.T., Schatton T., Murphy G.F., Molloy M.J., Zhan Q., Ramoni M.F., Frank M.H., Kohane I.S., Gussone E.*, 2006. Regulation of myogenic progenitor proliferation in human fetal skeletal muscle by BMP4 and its antagonist Gremlin // *J. Cell Biol.* V. 175. № 1. P. 99–110.
- Fujita R., Tamai K., Aikawa E., Nimura K., Ishino S., Kikuchi Y., Kaneda Y.*, 2015. Endogenous mesenchymal stromal cells in bone marrow are required to preserve muscle function in mdx mice // *Stem Cells.* V. 33. № 3. P. 962–975.
- Gang E.J., Jeong J.A., Hong S.H., Hwang S.H., Kim S.W., Yang I.H., Ahn C., Han H., Kim H.*, 2004. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood // *Stem Cells.* V. 22. № 4. P. 617–624.
- Gao X., Usas A., Lu A., Tang Y., Wang B., Chen C.W., Li H., Tebbets J.C., Cummins J.H., Huard J.*, 2013. BMP2 is superior to BMP4 for promoting human muscle-derived stem cell-mediated bone regeneration in a critical-sized calvarial defect model // *Cell Transplant.* V. 22. № 12. P. 2393–2408.
- Garg K., Corona B.T., Walters T.J.*, 2015. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury // *Front. Pharmacol.* V. 21. № 6. P. 87.
- Garza-Rodea A.S., Velde-van Dijke I., Boersma H., Gonçalves M.A., Bekkum D.W., van, Vries A.A., de, Knaän-Shanzer S.*, 2012. Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources // *Cell Transplant.* V. 21. № 1. P. 153–173.
- Hoffmann J., Glassford A.J., Doyle T.C., Robbins R.C., Schrepfer S., Pelletier M.P.*, 2010. Angiogenic effects despite limited cell survival of bone marrow-derived mes-

- enchymal stem cells under ischemia // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* V. 58. № 3. P. 136–142.
- Hu C., Yong X., Li C., Lü M., Liu D., Chen L., Hu J., Teng M., Zhang D., Fan Y., Liang G., 2013. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair // *J. Surg. Res.* V. 183. № 1. P. 427–434.
- Jackson W.M., Lozito T.P., Djouad F., Kuhn N.Z., Nesti L.J., Tuan R.S., 2011. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue // *J. Cell. Mol. Med.* V. 15. № 11. P. 2377–2388.
- Jeong J., Shin K., Lee S.B., Lee D.R., Kwon H., 2014. Patient-tailored application for Duchene muscular dystrophy on mdx mice based induced mesenchymal stem cells // *Exp. Mol. Pathol.* V. 97. № 2. P. 253–258.
- Joe A.W.B., Yi L., Natarajan A., Le Grand F., So L., Wang J., Rudnicki M.A., Rossi F.M., 2010. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis // *Nat. Cell Biol.* V. 12. № 2. P. 153–163.
- Judson R.N., Zhang R.H., Rossi F.M., 2013. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? // *FEBS J.* V. 280. № 17. P. 4100–4108.
- Juhas M., Bursac N., 2014. Roles of adherent myogenic cells and dynamic culture in engineered muscle function and maintenance of satellite cells // *Biomaterials.* V. 35. № 35. P. 9438–9446.
- Kang W.C., Oh P.C., Lee K., Ahn T., Byun K., 2016. Increasing injection frequency enhances the survival of injected bone marrow derived mesenchymal stem cells in a critical limb ischemia animal model // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* V. 20. № 6. P. 657–667.
- Karalaki M., Fili S., Philippou A., Koutsilieris M., 2009. Muscle regeneration: cellular and molecular events // *In vivo.* V. 23. № 5. P. 779–796.
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E., 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms // *Circulation.* V. 109. № 12. P. 1543–1549.
- Koponen J.K., Kekalainen T., Heinonen S.E., Laitinen A., Nystedt J., Laine J., Ylä-Herttuala S., 2007. Umbilical cord blood-derived progenitor cells enhance muscle regeneration in mouse hindlimb ischemia model // *Mol. Ther.* V. 15. № 12. P. 2172–2177.
- Krupnick A.S., Balsara K.R., Kreisel D., Riha M., Gelman A.E., Estives M.S., Amin K.M., Rosengard B.R., Flake A.W., 2004. Fetal liver as a source of autologous progenitor cells for perinatal tissue engineering // *Tissue Eng.* V. 10. № 5–6. P. 723–735.
- Kulesza A., Burdzinska A., Szczepanska I., Zarychta-Wisniewska W., Pajak B., Bojarczuk K., Dybowski B., Paczek L., 2016. The mutual interactions between mesenchymal stem cells and myoblasts in an autologous coculture model // *PLoS One.* V. 11. № 8. P. e0161693.
- Lemos D.R., Eisner C., Hopkins C.I., Rossi F.M., 2015. Skeletal muscle-resident MSCs and bone formation // *Bone.* V. 80. P. 19–23.
- Leroux L., Descamps B., Tojais N.F., Séguéy B., Osés P. et al., 2010. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway // *Mol. Ther.* V. 18. № 8. P. 1545–1552.
- Li J.P., Wang D.W., Song Q.H., 2015b. Transplantation of erythropoietin gene-transfected umbilical cord mesenchymal stem cells as a treatment for limb ischemia in rats // *Genet. Mol. Res.* V. 14. № 4. P. 19005–19015.
- Li T.S., Shi H., Wang L., Yan C., 2016. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on satellite cell proliferation and apoptosis in immobilization-induced muscle atrophy in rats // *Med. Sci. Monit.* V. 22. P. 4651–4660.
- Li Y., Pan E., Wang Y., Zhu X., Wei A., 2015a. Flk-1<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> mesenchymal stem cells: functional characteristics *in vitro* and regenerative capacity *in vivo* // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* V. 8. № 9. P. 9875–9888.
- Linder U., Kramer J., Rohwedel J., Schlenke P., 2010. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? // *Transfus. Med. Haemathol.* V. 37. № 2. P. 75–83.
- Liu L., Yu Q., Lin J., Lai X., Cao W., Du K., Wang Y., Wu K., Hu Y., Zhang L., Xiao H., Duan Y., Huang H., 2011. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood // *Stem Cells Dev.* V. 20. № 11. P. 1961–1971.
- Liu Y., Yan X., Sun Z., Chen B., Han Q., Li J., Zhao R.C., 2007. Flk-1<sup>+</sup> adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice // *Stem Cells Dev.* V. 16. № 5. P. 695–706.
- Lo Sicco C., Reverberi D., Balbi C., Ulivi V., Principi E., Pascucci L., Becherini P., Bosco M.C., Varesio L., Franzin C., Pozzobon M., Cancedda R., Tasso R., 2017. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: endorsement of macrophage polarization // *Stem Cells Transl. Med.* V. 6. № 3. P. 1018–1028.
- Marg A., Escobar H., Gloy S., Kufeld M., Zacher J., Spuler A., Birchmeier C., Izsvák Z., Spuler S., 2014. Human satellite cells have regenerative capacity and are genetically manipulable // *J. Clin. Invest.* V. 124. № 10. P. 4257–4265.
- Mastri M., Lin H., Lee T., 2014. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy // *World J. Stem Cells.* V. 6. № 2. P. 82–93.
- McCarthy J.J., Mula J., Miyazaki M., Erfani R., Garrison K. et al., 2011. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle // *Development.* V. 138. № 17. P. 3657–3666.
- Montarras D., Morgan J., Collins C., Relaix F., Zaffran S., Cumano A., Partridge T., Buckingham M., 2005. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration // *Science.* V. 309. № 5743. P. 2064–2067.
- Motohashi N., Uezumi A., Yada E., Fukada S., Fukushima K., Imaizumi K., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., 2008. Muscle CD31(-)CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts // *Am. J. Pathol.* V. 173. № 3. P. 781–791.
- Nakabayashi A., Kamei N., Sunagawa T., Suzuki O., Ohkawa S., Kodama A., Kamei G., Ochi M., 2013. *In vivo* bioluminescence imaging of magnetically targeted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in skeletal muscle injury model // *J. Orthop. Res.* V. 31. № 5. P. 754–759.

- Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H., Matsuyama S., Nakasa T., Kamei N., Akimoto T., Higashi Y., Ochi M.*, 2015. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration // *FEBS Lett.* V. 589. № 11. P. 1257–1265.
- Nakasa T., Ishikawa M., Shi M., Shibuya H., Adachi N., Ochi M.*, 2010. Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model // *J. Cell. Mol. Med.* V. 14. № 10. P. 2495–2505.
- Natsu K., Ochi M., Mochizuki Y., Hachisuka H., Yanada S., Yasunaga Y.*, 2004. Allogenic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers // *Tissue Eng.* V. 10. № 7–8. P. 1093–1112.
- Ninagawa N.T., Isobe E., Hirayama Y., Murakami R., Komatsu K., Nagai M., Kobayashi M., Kawabata Y., Torihashi S.*, 2013. Transplanted mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells promote muscle regeneration and accelerate functional recovery of injured skeletal muscle // *Biores. Open Access.* V. 2. № 4. P. 295–306.
- Noiseux N., Borie M., Desnoyers A., Menaouar A., Stevens L.M. et al.*, 2012. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential // *Endocrinology.* V. 153. № 11. P. 5361–5372.
- Pannérec A., Formicola L., Besson V., Marazzi G., Sassoon D.A.*, 2013. Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials // *Development.* V. 140. № 14. P. 2879–2891.
- Park S., Choi Y., Jung N., Yu Y., Ryu K.H., Kim H.S., Jo I., Choi B.O., Jung S.C.*, 2016. Myogenic differentiation potential of human tonsil-derived mesenchymal stem cells and their potential for use to promote skeletal muscle regeneration // *Int. J. Mol. Med.* V. 37. № 5. P. 1209–1220.
- Pumberger M., Qazi T.H., Ehrentraut M.C., Textor M., Kueper J. et al.*, 2016. Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration // *Biomaterials.* V. 99. P. 95–108.
- Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., Ikezawa M., Cummins J. et al.*, 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration // *J. Cell Biol.* V. 157. № 5. P. 851–864.
- Rahman M.M., Subramani J., Ghosh M., Denninger J.K., Takeda K., Fong G.H., Carlson M.E., Shapiro L.H.*, 2014. CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle // *Front. Physiol.* V. 4. P. 402.
- Rajput B.S., Chakrabarti S.K., Dongare V.S., Ramirez C.M., Deb K.D.*, 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: safety and feasibility study in India // *J. Stem Cells.* V. 10. № 2. P. 141–156.
- Ramírez M., Lucia A., Gómez-Gallego F., Esteve-Lanao J., Pérez-Martínez A., Foster C., Andreu A.L., Martín M.A., Madero L., Arenas J., García-Castro J.*, 2006. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury // *Br. J. Sports Med.* V. 40. № 8. P. 719–722.
- Rosová I., Dao M., Capoccia B., Link D., Nolte J.A.*, 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* V. 26. № 8. P. 2173–2182.
- Roth P., von, Duda G.N., Radojewski P., Preininger B., Strohschein K., Röhrner E., Perka C., Winkler T.*, 2012. Intra-arterial MSC transplantation restores functional capacity after skeletal muscle trauma // *Open Orthop. J.* V. 6. P. 352–356.
- Roth P., von, Winkler T., Rechenbach K., Radojewski P., Perka C., Duda G.N.*, 2013. Improvement of contraction force in injured skeletal muscle after autologous mesenchymal stroma cell transplantation is accompanied by slow to fast fiber type shift // *Transfus. Med. Hemother.* V. 40. № 6. P. 425–430.
- Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T.*, 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source // *Arthritis Rheum.* V. 52. № 8. P. 2521–2529.
- Salvatori G., Lattanzi L., Coletta M., Aguanno S., Vivarelli E., Kelly R., Ferrari G., Harris A.J., Mavilio F., Molinaro M., Cossu G.*, 1995. Myogenic conversion of mammalian fibroblasts induced by differentiating muscle cells // *J. Cell Sci.* V. 108. Pt 8. P. 2733–2739.
- Santa María L., Rojas C.V., Minguell J.J.*, 2004. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells // *Exp. Cell Res.* V. 300. № 2. P. 418–426.
- Sassoli C., Zecchi-Orlandini S., Formigli L.*, 2012a. Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration // *Cells.* V. 1. № 4. P. 832–850.
- Sassoli C., Pini A., Chellini F., Mazzanti B., Nistri S., Nosi D., Saccardi R., Quercioli F., Zecchi-Orlandini S., Formigli L.*, 2012b. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF // *PLoS One.* V. 7. № 7. P. e37512.
- Sassoli C., Frati A., Tani A., Anderloni G., Pierucci F. et al.*, 2014a. Mesenchymal stromal cell secreted sphingosine 1-phosphate (S1P) exerts a stimulatory effect on skeletal myoblast proliferation // *PLoS One.* V. 9. № 9. P. e108662.
- Sassoli C., Nosi D., Tani A., Chellini F., Mazzanti B., Quercioli F., Zecchi-Orlandini S., Formigli L.*, 2014b. Defining the role of mesenchymal stromal cells on the regulation of matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells // *Exp. Cell Res.* V. 323. № 2. P. 297–313.
- Shabbir A., Zisa D., Leiker M., Johnston C., Lin H., Lee T.*, 2009. Muscular dystrophy therapy by nonautologous mesenchymal stem cells: muscle regeneration without immunosuppression and inflammation // *Transplantation.* V. 87. № 9. P. 1275–1282.
- Shi D., Reinecke H., Murry C.E., Torok-Storb B.*, 2004. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells // *Blood.* V. 104. № 1. P. 290–294.
- Shi M., Ishikawa M., Kamei N., Nakasa T., Adachi N., Deie M., Asahara T., Ochi M.*, 2009. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells // *Stem Cells.* V. 27. № 4. P. 949–960.
- Tebebi P.A., Kim S.J., Williams R.A., Milo B., Frenkel V., Burks S.R., Frank J.A.*, 2017. Improving the therapeutic

- efficacy of mesenchymal stromal cells to restore perfusion in critical limb ischemia through pulsed focused ultrasound // *Sci. Rep.* V. 7. P. 41550.
- Uezumi A., Fukada S., Yamamoto N., Takeda S., Tsuchida K., 2010. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle // *Nat. Cell Biol.* V. 12. № 2. P. 143–152.
- Uezumi A., Ojima K., Fukada S., Ikemoto M., Masuda S., Miyagoe-Suzuki Y., Takeda S., 2006. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 341. № 3. P. 864–873.
- Vieira N.M., Bueno C.R., Jr, Brandalise V., Moraes L.V., Zucconi E. et al., 2008. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression // *Stem Cells.* V. 26. № 9. P. 2391–2398.
- Warejcka D.J., Harvey R., Taylor B.J., Young H.E., Lucas P.A., 1996. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes // *J. Surg. Res.* V. 62. № 2. P. 233–242.
- Winkler T., Roth P., von, Radojewski P., Urbanski A., Hahn S., Preininger B., Duda G.N., Perka C., 2012. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* V. 6. Suppl. 3. P. s60–67.
- Wise C.J., Watt D.J., Jones G.E., 1996. Conversion of dermal fibroblasts to a myogenic lineage is induced by a soluble factor derived from myoblasts // *J. Cell. Biochem.* V. 61. № 3. P. 363–374.
- Wu X., Wang S., Chen B., An X., 2010. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy // *Cell Tissue Res.* V. 340. № 3. P. 549–567.
- Xiao Q., Wang S.K., Tian H., Xin L., Zou Z.G., Hu Y.L., Chang C.M., Wang X.Y., Yin Q.S., Zhang X.H., Wang L.Y., 2012. TNF- $\alpha$  increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues // *Cell Biochem. Biophys.* V. 62. № 3. P. 409–414.
- Xu Y., Fu M., Li Z., Fan Z., Li X. et al., 2016. A pro-survival and proangiogenic stem cell delivery system to promote ischemic limb regeneration // *Acta Biomater.* V. 31. P. 99–113.
- Yin H., Price F., Rudnicki M.A., 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche // *Physiol. Rev.* V. 93. № 1. P. 23–67.
- Zhang J.C., Zheng G.F., Wu L., Ou Yang L.Y., Li W.X., 2014. Bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing human basic fibroblast growth factor increase vasculogenesis in ischemic rats // *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 47. № 10. P. 886–894.
- Zhang L., Dong X.W., Wang J.N., Tang J.M., Yang J.Y., Guo L.Y., Zheng F., Kong X., Huang Y.Z., Chen S.Y., 2012. PEP-1-CAT-transduced mesenchymal stem cells acquire an enhanced viability and promote ischemia-induced angiogenesis // *PLoS One.* V. 7. № 12. P. e52537.
- Zucconi E., Vieira N.M., Bueno C.R., Jr, Secco M., Jazedje T. et al., 2011. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy // *J. Biomed. Biotechnol.* V. 2011. P. 715251.

## Participation of Mesenchymal Stromal Cells in Muscle Tissue Regeneration

O. V. Payushina<sup>a, \*</sup>, E. I. Domaratskaya<sup>a</sup>, O. N. Sheveleva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS  
Russia 119334 Moscow, Vavilova, 26

\*e-mail: payushina@mail.ru

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are considered as universal regulators of tissue homeostasis. Their use is promising for repair of skeletal muscles after injuries and diseases. The main participants of muscle regeneration are myosatellites, but resident MSCs also play a role in it. In addition, MSCs come from bone marrow to the injured muscle for its reparation. MSCs are capable of myogenic differentiation and fusion with muscle cells. However, paracrine secretion of regulatory molecules by MSCs is more important for regeneration. They promote survival, proliferation and differentiation of cells in the injured muscle. Factors secreted by MSCs affect all stages of reparative process. This allows using MSCs for complex delivery of bioactive molecules. Prospects for the use of MSCs have been demonstrated in various experimental models of muscle damage such as mechanical and chemical injuries, atrophy, ischemia, genetically determined muscular dystrophy. Improving the delivery of MSCs in the muscle can increase the efficiency of regeneration. Cell transplantation on artificial scaffolds allows to achieve this goal. Ultrasound treatment of muscles also concentrates MSCs at the site of injury. Magnetic delivery of the cells is another way to increase their concentration. The paracrine activity of MSCs can be enhanced by preconditioning them with different stimuli that changes the secretory profile of cells in the desired direction. Genetic modification of MSCs also increases their therapeutic potential. MSCs produce extracellular vesicles with regulatory molecules such as miRNAs. The use of these vesicles and molecules is a new area of regenerative medicine. Activation of MSCs stimulates tissue regeneration due to internal reserves and, therefore, can be considered as a tool of *in vivo* tissue engineering.