

Зорин В.Л.<sup>1,2</sup>, Зорина А.И.<sup>2</sup>, Пулин А.А.<sup>1</sup>, Копнин П.Б.<sup>3</sup>, Еремин И.И.<sup>1</sup>

## **Перспективы использования стволовых клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Ч. 2. Популяции стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения**

<sup>1</sup> — ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

<sup>2</sup> — ОАО Институт стволовых клеток человека, 119333, Москва, ул. Губкина, д. 3, стр. 2

<sup>3</sup> — НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

*В статье дан обзор представленных в литературе исследований, посвященных изучению миогенного потенциала, характерных свойств, функций и фенотипических особенностей ряда популяций стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения, их способности участвовать в восстановлении физиологического гомеостаза скелетных мышц. Результаты научных изысканий позволяют с высокой степенью вероятности прогнозировать создание эффективной клеточной технологии лечения мышечных дистрофических заболеваний.*

**Ключевые слова:** мышечные дистрофии; клеточная терапия; стволовые клетки; клетки побочной популяции; мезоангиобласты; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; мышечные стволовые клетки с миогенным потенциалом; стволовые клетки немышечного происхождения с миогенным потенциалом

Zorin V.L.<sup>1,2</sup>, Zorina A.I.<sup>2</sup>, Pulin A.A.<sup>1</sup>, Kopnin P.B.<sup>3</sup>, Eremin I.I.<sup>1</sup>

## **Prospects for the Use of Cells Possessing Myogenic Potential in the Treatment of Skeletal Muscle Diseases: a Review of Research. Part 2 — Populations of stem cells of muscle and non-muscle origin**

<sup>1</sup> — A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center FMBA of Russia, 46 Zhivopisnaya Str., Moscow, 123182, Russia

<sup>2</sup> — Human Stem Cells Institute, 3/2 Gubkina Str., Moscow, 119333, Russia

<sup>3</sup> — N.N. Blokhin Cancer Research Center of RAMS, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

*The paper reviews research results of myogenic potential, specific properties, functions, and phenotypic features of a number of stem cells populations of muscle and non-muscle origin, their ability to participate in the restoration of the physiological homeostasis of skeletal muscle. The results of scientific research allow to predict with high probability the establishment of an effective cell technology to treat degenerative muscle diseases.*

**Keywords:** muscular dystrophy; cell therapy; stem cells; side population cells; mesoangioblasts; multipotent mesenchymal stromal cells; muscle stem cells with myogenic potential; stem cells of non-muscle origin with myogenic potential

Регенераторный потенциал скелетных мышц, как и большинства постнатальных тканей, поддерживается пулом взрослых резидентных стволовых клеток. За проявление этого потенциала главным образом отвечают сателлитные клетки (СК), расположенные между базальной пластиной и плазмолеммой миофибрилл [1, 2, 3]. В течение нескольких лет после откры-

тия СК их рассматривали как единственную клеточную популяцию, обеспечивающую рост и поддержание физиологического гомеостаза скелетных мышц. Однако прогресс в области клеточной биологии позволил выделить другие популяции стволовых клеток, как мышечного, так и немышечного происхождения, способные активно участвовать в миогенезе [4, 5].

В исследованиях было показано, что в самих скелетных мышцах миогенным потенциалом обладают не только СК, но и другие взрослые клетки-предшественники: мультипотентные стволовые мышечные клетки (MDSCs), стволовые мышечные клетки по-

**Для корреспонденции:** Еремин Илья Игоревич, канд. мед. наук, руководитель Центра биомедицинских технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: cd105@mail.ru

бочной популяции (SMSP) и клетки-предшественники CD133+. Наряду с ними был описан и ряд немышечных стволовых клеток взрослого организма с миогенным потенциалом: стволовые клетки, выделенные из костного мозга (ММСК<sub>км</sub>); клетки-предшественники CD133+, выделенные из крови; мезоангиобласты; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs).

Идентификация популяции стволовых клеток с наибольшей способностью к восстановлению утраченной структуры и функций скелетной мышечной ткани критически важна для дальнейшего развития методов клеточной терапии различных патологий скелетных мышц. Решению этой задачи посвящен целый ряд научных исследований в области клеточной, геной и молекулярной биологии и медицины [1, 6, 7].

*Цель обзора* — анализ на основе литературных данных характерных свойств, функций и фенотипических особенностей нескольких популяций стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения, обладающих миогенным потенциалом, а также возможности применения таких клеток в целях восстановления структуры и функций скелетных мышц.

### Стволовые клетки мышечного происхождения, обладающие миогенным потенциалом

#### *Мультипотентные мышечные стволовые клетки — MDSCs*

MDSCs (Muscle-Derived Stem Cells) — популяция стволовых клеток скелетной мышечной ткани, которые характеризуются фенотипом Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>. Они обладают способностью к самоподдержанию, высоким пролиферативным и мультипотентным дифференцировочным потенциалами, прежде всего способностью дифференцироваться в миогенном направлении, обеспечивают восстановление экспрессии дистрофина в мышечных волокнах [8—13]. Так, в исследовании Y. Torrente и соавт. (2001) выделенная ими из скелетных мышц mdx мышей субпопуляция MDSCs (с фенотипом Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>) после внутриартериальной трансплантации мигрировала из кровотока в скелетную мышечную ткань, где активизировала экспрессию дистрофина [8].

Z. Qu-Petersen и соавт. (2002) установили, что по своим характеристикам MDSCs ассоциированы с некоммутированными миогенными клетками-предшественниками. Авторы выделили из скелетных мышц здоровых мышей и описали субпопуляцию MDSCs (с фенотипом Sca-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>desmin<sup>+</sup>/m-cadherin<sup>-</sup>). Эти клетки показали высокую способность к самоподдержанию (сохраняли свой фенотип после 30 пассажей культивирования) и к пролиферации

(выдерживали более 30 пассажей, не меняя кариотипа) как *in vitro*, так и *in vivo*. Они проявляли мультипотентный дифференцировочный потенциал *in vivo* (дифференцировались в миогенном, нейрогенном и эндотелиальном направлениях), после трансплантации mdx мышцам вызывали длительную экспрессию дистрофина в их скелетных мышцах [12].

В этой же работе была отмечена значительная разница между MDSCs и СК по экспрессии транскрипционных факторов и по способности дифференцироваться в миогенном направлении, причем последняя была у MDSCs значительно выше, чем у СК, как *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Сравнение трансплантационных MDSCs и СК по жизнеспособности показало, что MDSCs обладают более высокой выживаемостью в мышцах: спустя 30 и 90 сут. после трансплантации равного количества MDSC и СК mdx мышцам регенераторный потенциал MDSC был в 10 раз выше, чем у СК. Этот факт, вероятно, связан с различным проявлением иммуогенных свойств исследуемых клеточных популяций: в исследовании авторы наблюдали значительно большую экспрессию антигена гистосовместимости MHC-1 на поверхности СК (63%) по сравнению с таковой на поверхности MDSCs (0,5%). Авторы пришли к выводу, что MDSCs и СК являются разными клеточными популяциями, взаимосвязь которых остается до конца не изученной [12].

Позднее, в 2011 г., K. Rouger и соавт. исследовали миогенный потенциал MDSCs и их связь с СК на другой субпопуляции MDSCs, выделенной ими из мышц здоровых собак и названной MuStem-cells (Muscle Stem cells). Эта субпопуляция фенотипически (Pax7<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>b-integrin<sup>+</sup>Myf5<sup>+</sup>MyoD<sup>+</sup>) соответствует ранним некоммутированным миогенным клеткам-предшественникам. MuStem-cells проявляли высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал *in vitro*. Авторами было выявлено, что внутриартериальная трансплантация MuStem-cells иммуносупрессивным собакам с мышечной дистрофией (GRMD) приводила к регенерации мышечных волокон и долговременной экспрессии в них дистрофина, а также к восстановлению пула СК и увеличению физической активности животных [13].

Перспективность применения MDSCs в клеточной терапии мышечных заболеваний обусловлена их высокой способностью к самоподдержанию, пролиферации и дифференцировке в миогенном направлении, к долговременной экспрессии дистрофина в поврежденных мышцах, а также высокой приживаемостью после трансплантации [12]. Важно также, что все выделенные из скелетных мышц субпопуляции MDSCs отличаются способностью мигрировать из кровотока в скелетные мышцы дистрофичных живот-

ных после системного введения. При этом в поврежденных мышцах обнаруживается более высокая концентрация этих стволовых клеток по сравнению с неповрежденной мышечной тканью [13-16].

Культированные MDSCs обладают мультипотентным дифференцировочным потенциалом: они не только спонтанно преобразуются в миотубы, но при соответствующей индукции могут дифференцироваться в остеобласты [17], хондробласты [18], гемопоэтические [19] и эндотелиальные клетки [6]. Некоторые субпопуляции MDSCs наряду с миогенными обладают кардио- и нейрогенными потенциальными [9, 20]. Таким образом, MDSCs можно использовать в качестве альтернативного источника плюрипотентных стволовых клеток при разработке клеточных препаратов, показанных к применению в различных областях регенеративной медицины.

#### *Мышечные стволовые клетки побочной популяции — SMSP*

Побочную популяцию (SP — Side Population) стволовых клеток взрослого организма первоначально идентифицировали среди клеток костного мозга, но в более поздних исследованиях они были выявлены и в других тканях [21]. Для SP-клеток характерны высокий уровень экспрессии ABCG2 и «невключение» витального красителя Hoechst 33342, с помощью которого осуществляют их сортировку [21, 22]. (ABCG2 — АТФ-связывающий кассетный белок G2, который, как полагают, определяет фенотип SP-клеток).

Из скелетных мышц была выделена побочная клеточная популяция — SMSP (Skeletal Muscle Side Population), клетки которой имеют сферическую форму и плохо адгезируются к поверхности культурального пластика [7]. SMSP характеризуются маркерами sca-1+, CD34+, CD45+/-, c-kit+/-, десмин [19, 23]. По мнению А. Burdzinska и соавт. (2008), фенотип этих клеток обусловлен не столько особенностями их происхождения, сколько низким уровнем дифференцировки [21].

Неспособность культивированных SMSP-клеток к спонтанной дифференцировке в миогенном направлении была отмечена А. Asakura и соавт. (2002): для реализации миогенного потенциала этих клеток необходимо присутствие в среде соответствующих индукционных факторов [23]. Так, обе выделенные субпопуляции SMSP-клеток: CD45<sup>-</sup> и CD45<sup>+</sup> — проявляли миогенный потенциал после сокультивирования с первичной культурой миобластов, выступающей в этом случае в роли индуктора. После трансплантации в дистрофичную мышечную ткань и та, и другая субпопуляция участвовали в образовании новых мышечных волокон, причем CD45<sup>-</sup> дифференцировалась в мышечные волокна в более высокой степени по сравнению с CD45<sup>+</sup> [23, 24].

Наряду с миогенным потенциалом в исследованиях, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, выявлена способность SMSP-клеток дифференцироваться в гемопоэтические [23, 25] и эндотелиальные (CD31<sup>+</sup>) клетки [26]. На их поверхности была выявлена экспрессия рецепторов Ang2 и Tie2, которые активируются ангиопоэтинами [27]. Можно полагать, что SMSP-клетки имеют общих предшественников как с гемопоэтическими, так и с эндотелиальными клетками.

В работах Е. Gussoni и соавт. (1999) было показано, что при внутривенном (системном) введении SMSP-клеток mdx мышам в их скелетных мышцах происходит образование дистрофин-позитивных мышечных волокон [7]. По наблюдениям других исследователей, при системном введении SMSP-клеток с фенотипом Pax7<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> они задерживаются в мышечной интерстиции в непосредственной близости к эндотелию [8, 23, 28, 29]. Способность SMSP-клеток (в противоположность СК и миобластам) мигрировать из кровотока в мышечную ткань является принципиально важным свойством: при их внутривенном введении есть вероятность восстановления всех скелетных мышц, а не только поверхностных, как при внутримышечном.

В ряде исследований ставился вопрос о взаимоотношениях SMSP-клеток и СК. Р. Seale и соавт. (2000) [30], А. Asakura и соавт. (2002) [23] отмечали, что в мышцах Pax7-дефицитных мышцей отсутствуют СК, а SMSP-клетки, напротив, присутствуют. Этот факт, по всей видимости, свидетельствует о том, что последние представляют собой популяцию мышечных стволовых клеток, отличную от СК. В исследовании А. Asakura, М. Rudnicki (2002) было показано, что при введении в мышцы mdx мышцей SMSP-клетки могут дифференцироваться в функциональные СК, экспрессирующие маркеры Pax7, Myf5 и десмин [27]. В более поздней работе К. Такака и соавт. (2009) выделенная ими субпопуляция SMSP-клеток продемонстрировала способность занимать нишу СК и давать начало новым СК [31].

Миогенный потенциал SMSP-клеток, их способность мигрировать через сосудистую стенку, возможность системного введения позволяют рассматривать применение SMSP-клеток как перспективный метод лечения пациентов с мышечными дистрофиями [4]. В настоящее время по этой теме проводятся интенсивные исследования.

#### *Мышечные стволовые клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup>*

Еще одну популяцию мышечных стволовых клеток, обладающих миогенным потенциалом, описали Y. Torrente и соавт. (2007) [32]. Из мышц здоровых людей и пациентов с DMD исследователи выделили

стволовые клетки, экспрессирующие на своей поверхности гликопротеин CD133 (маркер незрелых гемопоэтических клеток). Эти клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup> экспрессировали также маркеры CD34, CD45 и обладали способностью к дифференцировке в миогенном и эндотелиальном направлениях. Ранее были выделены стволовые клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup> костномозгового происхождения, также способные дифференцироваться в обоих этих направлениях [33, 34]. M. Gavina и соавт. (2006) описали стволовые свойства этих циркулирующих в крови клеток, их способность восстанавливать экспрессию дистрофина и пул СК в мышцах scid/mdx мышей после внутримышечного и внутриартериального введения [35].

Исследования, проведенные E. Negróni и соавт. (2009), показали, что стволовые клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup>, выделенные из скелетных мышц, экспрессируют маркер СК CD56 и обладают способностью к образованию миотуб с фенотипом MyHC<sup>+</sup>, содержащих тяжелую цепь миозина [36].

R. Venchaoui и соавт. (2007) отмечали, что клетки CD133<sup>+</sup>, выделенные из мышц человека, после трансплантации dmх мышцам способствовали экспрессии функционального дистрофина человека у мышей, образованию новых мышечных волокон, улучшению функциональных показателей дистрофичных мышц [37]. При этом клетки CD133<sup>+</sup> идентифицировались под базальной мембраной в нишах СК вдоль новообразованных мышечных волокон и экспрессировали M-кадгерин. Оба эти факта могут указывать на дифференцировку клеток CD133<sup>+</sup> в направлении СК. Об этом свидетельствуют также результаты исследований E. Negróni и соавт. (2009) [36].

Следующим шагом в исследовании стволовых клеток с фенотипом CD133<sup>+</sup>, выделенных из мышц пациентов с DMD, стало определение их способности к восстановлению экспрессии «короткого» и функционального дистрофина. С этой целью была осуществлена их генно-инженерная модификация посредством трансдукции лентивирусом (для исключения из транскрипции мутировавшего экзона 51) с последующей внутримышечной трансплантацией модифицированных клеток CD133<sup>+</sup> иммунодефицитным scid/mdx мышам. Результаты исследований продемонстрировали восстановление экспрессии дистрофина, регенерацию мышечных волокон и улучшение функциональных показателей дистрофичных скелетных мышц [32, 33, 37-40].

В этих же исследованиях выполняли системное (внутриартериальное) введение генно-модифицированных стволовых клеток с фенотипом CD133<sup>+</sup> больным DMD (миодистрофия Дюшена) — как следствие, наблюдали восстановление функциональной ак-

тивности мышц и повышение физической выносливости таких пациентов. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что трансплантированные культивированные мышечные стволовые клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup>, способны к хоумингу, могут мигрировать в поврежденные скелетные мышцы и восстанавливать их структуру и функции. А это дает надежду на возможность восстановления с их помощью всей скелетной мускулатуры у пациентов с DMD.

Представляет также несомненный интерес стратегия, предложенная C. Riviere и соавт. (2006), основанная на использовании модифицированных аутологичных CD133<sup>+</sup> клеток, полученных из мышц пациентов с DMD и трансплантированных внутриартериально [41]. (Модификацию CD133<sup>+</sup> клеток осуществляли путем введения гена, кодирующего функциональный дистрофин, или методом «пропуска экзона»).

Такой подход, как полагают исследователи, должен привести к восстановлению всех дистрофичных скелетных мышц организма без риска иммунологического отторжения трансплантированных клеток, наблюдаемого при введении аллогенных СК/миобластов.

Для лечения пациентов с DMD возможно применение как мышечных, так и выделенных из крови стволовых клеток с фенотипом CD133<sup>+</sup>. Их терапевтические возможности обусловлены способностью мигрировать в скелетные мышцы после системного введения, дифференцироваться не только в миогенном, но и в эндотелиальном направлении [34, 35], что приводит к усилению васкуляризации скелетных мышц [33]. После внутриартериальной трансплантации клетки CD133<sup>+</sup> участвуют в регенерации мышечных волокон, а также экспрессии не только функционального дистрофина, но и дистрофин-связанных белков  $\alpha$ - и  $\beta$ -саркогликанов. Однако сравнение клеточных популяций с фенотипом CD133<sup>+</sup>, выделенных из мышц и крови пациентов с DMD, показало, что генетически модифицированные клетки CD133<sup>+</sup> мышечного происхождения обладают более высоким регенераторным потенциалом по сравнению с клетками CD133<sup>+</sup>, выделенными из крови [37]. Двойные слепые клинические исследования (фаза I), проведенные Y. Togente и соавт. (2007), подтвердили безопасность применения аутологичных клеток с фенотипом CD133<sup>+</sup>, выделенных из мышечной ткани (данные клетки были внутримышечно введены 8 молодым пациентам с DMD; срок наблюдений составил 7 мес. [32]).

Следует подчеркнуть: прежде чем стволовые клетки с фенотипом CD133<sup>+</sup> могут быть использованы в медицинской практике, предстоит решить целый ряд вопросов. Необходимо, в частности, добиться по-

вышения пролиферативного потенциала клеток CD133<sup>+</sup>, выделенных из крови, с целью увеличения их экспансии; разработать условия криохранения клеток CD133<sup>+</sup> для последующего применения в повторных курсах терапии; изучить степень их участия в процессах мышечной регенерации и возможности полного замещения ими ниши резидентных СК [4, 33].

### Стволовые клетки немышечного происхождения, обладающие миогенным потенциалом

*Стволовые клетки, выделенные из костного мозга*

Из клеток немышечного происхождения в качестве инструмента для лечения мышечных дистрофий в первую очередь рассматривают костномозговые стволовые клетки. Выделяют два их типа — мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), экспрессирующие маркер CD45, и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК<sub>км</sub>), негативные по этому маркеру [42—44]. При патологии скелетной мышечной ткани костномозговые стволовые клетки способны мигрировать в поврежденные мышцы и участвовать в образовании новых мышечных волокон [45]. Принято считать, что в этом процессе могут участвовать и ГСК, и ММСК<sub>км</sub>. Так, E. Gussoni и соавт. (1992) показали, что при внутривенном введении ГСК mdx мышам происходит миграция этих клеток в скелетные мышцы, что приводит к частичному восстановлению экспрессии дистрофина в мышечных волокнах [46]. Десять лет спустя M. La Varge и соавт. (2002) продемонстрировали, что после введения ММСК<sub>км</sub> облученным мышам, аблятивным по СК, трансплантированные клетки идентифицировались в нише СК и участвовали в регенерации мышечных волокон [47].

Механизм мобилизации клеток из костного мозга и их последующей миграции в мышечную ткань до конца не изучен [25]. Полагают, что поврежденные мышцы продуцируют определенные лиганды — цито- и хемокины/факторы роста, которые за счет химического градиента «привлекают» циркулирующие в крови стволовые клетки в поврежденную скелетно-мышечную ткань [48, 49]. Рецепторы c-met, CXCR4, LIF-R, находящиеся на поверхности костномозговых стволовых клеток, позволяют им принимать сигналы от поврежденных мышц, в соответствии с которыми эти клетки мигрируют из костного мозга к областям с высокой концентрацией лигандов. Выявлено, что поврежденные мышцы содержат больше «пришлых» стволовых клеток, чем неповрежденные [22]. К настоящему времени известна роль в процессе миграции клеток костного мозга таких факторов, как HGF (фактор роста гепатоцитов), SDF-1 (стро-

мальный фактор-1), LIF (фактор ингибирования лейкемии), IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1) [48, 50]. (Замечено, что физиологические стрессы, которые испытывает здоровый организм в течение жизни, также активируют миграцию в мышцы циркулирующих в крови костномозговых стволовых клеток [51]).

Стволовые клетки костного мозга, мигрировавшие в мышечную ткань, под влиянием локальных сигналов, поступающих от миогенного микроокружения, постепенно изменяют и фенотип, и дифференцировочный потенциал [25]. S. McKinney-Freeman и соавт. (2003) провели сравнительный анализ фенотипов CD45<sup>+</sup> клеток, выделенных из костного мозга и из скелетных мышц (после их миграции в мышцы) [52]. Результаты исследований выявили существенное (более чем в 1000 раз) уменьшение содержания c-kit белков в «пришлых» клетках мышц и снижение (более чем в 22 раза) способности этих клеток дифференцироваться в гемопоэтическом направлении. Со временем костномозговые стволовые клетки локализуются в нишах СК и приобретают фенотип M-кадгерин+ [53].

T. Ichim и соавт. показали, что после трансплантации пациентам с DMD ММСК<sub>км</sub> сливаются с мышечными волокнами реципиента и увеличивают активность эндогенных стволовых клеток посредством паракринного эффекта [54]. В исследованиях была установлена способность ММСК<sub>км</sub> подавлять иммунновоспалительные реакции [55, 56]. K. Nemeth и соавт. (2009) показали, что культивированные ММСК<sub>км</sub> могут, модулируя активность макрофагов, ингибировать воспалительные процессы [57]. Это свойство служит весомым аргументом в пользу применения ММСК<sub>км</sub> в лечении больных с мышечной дистрофией — заболеванием, неизбежно сопровождающимся воспалением [5].

Большинство исследователей рассматривают именно эту популяцию костномозговых стволовых клеток в качестве наиболее перспективной для применения при лечении патологии скелетной мускулатуры. Однако следует отметить, что мнения ученых относительно величины миогенного потенциала популяции ММСК<sub>км</sub> неоднозначны. Часть исследователей полагает, что вся популяция ММСК<sub>км</sub> при соответствующей индукции способна дифференцироваться в миобласты, другие указывают лишь на какую-то одну из субпопуляций ММСК<sub>км</sub> [21].

В последнее время разработка методов индукции дифференцировки ММСК<sub>км</sub> в миогенном направлении стала одним из приоритетных направлений целого ряда исследований. M. Dezawa и соавт. (2005) предложили технологию, которая позволяет осуществить дифференцировку первичного пула ММСК<sub>км</sub> в мио-

генном направлении с результативностью до 89% [58]. Исследователи культивировали ММСК<sub>км</sub> в среде, содержащей цитокины и ростовые факторы (bFGF, PDGF, NRG-1), с последующей трансфекцией гена, кодирующего высвобождение внутриклеточного домена (NICD) рецептора Notch 1. В результате были получены клетки, описанные авторами как миогенные ММСК<sub>км</sub> (М-ММСК<sub>км</sub>), которые экспрессировали миогенные маркеры (Myo-D, миогенин) и обладали способностью к слиянию в миотубы (индекс слияния составил 20%). При этом М-ММСК<sub>км</sub> были позитивны по специфическим маркерам СК — фактору транскрипции Pax7 и c-met рецептору.

Альтернативный подход к индукции миогенеза в ММСК<sub>км</sub> базируется на контакте этих клеток с миогенным микроокружением [21]. В эксперименте J. Lee и соавт. (2005) ММСК<sub>км</sub>, сокультивированные с СК, демонстрировали способность дифференцироваться в миотубы [59], что подтверждает не только наличие у ММСК<sub>км</sub> миогенного потенциала, но и значимость непосредственного контакта между клетками. Однако степень дифференцировки клеток при таком способе индукции ограничена: только 1—2% многоядерных миотуб проявляли экспрессию GFP-специфического флуоресцентного белка, который предварительно метили клетки.

Вопрос о дальнейшем «поведении» ММСК<sub>км</sub> после их пересадки в скелетные мышцы рассматривали D. Shi и соавт. (2004) [60]. Оказалось, что после внутримышечного введения ММСК<sub>км</sub> способны дифференцироваться в миогенном направлении, но доля дифференцированных клеток (как и в условиях *in vitro*) невысока: всего 0,44% от всех трансплантированных ММСК<sub>км</sub> слились в миотубы.

В настоящее время проводятся клинические исследования терапевтических возможностей аутологичных ММСК<sub>км</sub> в лечении пациентов с DMD, в частности испытания I/II фазы с целью оценки безопасности и эффективности интраэпикального, внутривенного и внутримышечного применения таких клеток (NCT01834066; NCT02241434; NCT01834040; NCT0224192; NCT02245711 [70-74]).

Таким образом, результаты проведенных к сегодняшнему дню исследований подтверждают, что ММСК<sub>км</sub> представляют интерес как для терапии мышечных дистрофий, так и для других направлений регенеративной медицины, что обусловлено рядом факторов:

- ММСК<sub>км</sub> обладают мультипотентным потенциалом (способны дифференцироваться во все типы клеток (миобласты [58, 59], остеобласты, хондробласты, адипоциты [44, 61—64], кардиомиоциты [65, 66], эндотелиальные [55] и гладкомышечные клетки

[67]), происходящие из мезодермального зародышевого листка;

- отличаются уникальной способностью подавлять иммуно-воспалительные реакции [55, 56, 68];
- техника забора образца костного мозга относительно проста [69].

Однако для использования ММСК<sub>км</sub> как активной составляющей терапии миодегенеративных заболеваний необходимо решение таких задач, как усиление миогенного потенциала этого типа клеток, определение эффективности и безопасности их применения и др.

В качестве еще одного варианта рассматриваются возможности использования ММСК, полученных из других источников и характеризующихся более выраженным миогенными свойствами. В исследовании C. De Bari и соавт. (2003) описан высокий миогенный потенциал ММСК, выделенных из синовиальной оболочки взрослого человека: после внутримышечной трансплантации mdx мышам эти клетки активно формировали новые мышечные волокна, экспрессирующие дистрофин, и участвовали в пополнении пула СК в мышцах [75].

E. Gang и соавт. (2004) выделили из пуповинной крови ММСК, способные дифференцироваться в клетки скелетной мышечной ткани, экспрессирующие поздние миогенные маркеры, в частности MyoD [76].

Y. Choi и соавт. (2012) показали, что ММСК, выделенные из жировой ткани, обладают более высоким миогенным дифференцировочным потенциалом по сравнению с костномозговыми ММСК [77].

В исследовании В. Зорина и соавт. (2014) миогенный потенциал демонстрировали ММСК, выделенные из слизистой оболочки полости рта (десны) — легкодоступного источника клеточного материала. В этом случае получение образца ткани малотравматично, раневой дефект заживает быстро и без образования рубца, для получения требуемого количества клеток достаточно небольшого (2—3 мм<sup>3</sup>) объема биоптата [78]. Изолированная авторами субпопуляция ММСК характеризовалась высоким пролиферативным потенциалом (почти в два раза выше, чем у ММСК<sub>км</sub>). Миогенная индукция этих клеток в условиях *in vitro* приводила к образованию многоядерных миотуб, при этом эффективность миогенной дифференцировки, независимо от пассажа ММСК (вплоть до десятого), оставалась на неизменно высоком уровне.

Таким образом, с точки зрения миогенного потенциала наряду с ММСК<sub>км</sub> интерес представляют также и ММСК некостномозгового происхождения: будучи сравнимы по миогенным свойствам с ММСК<sub>км</sub>, они при этом имеют и ряд преимущ-

ществ. Необходимо дальнейшее изучение этих клеточных популяций и возможностей их применения в клеточной терапии патологии мышечной ткани.

### *Мезоангиобласты*

Мезоангиобласты представляют собой мультипотентные стволовые клетки мезодермального происхождения, ассоциированные с развивающейся сосудистой сетью [79]. Предполагается, что эти клетки являются одной из субпопуляций перицитов (мезенхимальных стволовых клеток, локализованных в стенках микрососудов) [80]. Они экспрессируют маркеры ранних эндотелиальных клеток (ангиобластов) — Sca-1, Flk-1, CD34, а также маркеры, характерные для всех клеток мезодермального происхождения [81]. Мезоангиобласты хорошо культивируются и при соответствующей индукции способны дифференцироваться в большинство типов клеток мезодермального происхождения, включая миогенные [79, 82].

M. Samraolesi и соавт. (2003) показали, что после внутриартериальной трансплантации мезоангиобластов взрослым мышам эти клетки способны продуцировать  $\alpha$ -саркогликан 2/2 [83] и занимать нишу СК [84]. G. Cossu и соавт. (2007) выявили, что трансплантация генномодифицированных мезоангиобластов, экспрессирующих микродистрофин человека, scid/mdx мышам и GRMD собакам способствовала образованию в мышцах животных дистрофин-позитивных миофибрилл [85]. При этом у собак наряду с высокой экспрессией дистрофина наблюдалось также улучшение функций скелетных мышц. В исследовании F. Tedesco и соавт. (2011) было отмечено, что после трансплантации scid/mdx мышам генномодифицированных мезоангиобластов, несущих полный локус гена дистрофина человека, происходит образование мышечных волокон, экспрессирующих дистрофин и пополнение пула СК [86].

Исследование M. Samraolesi и соавт. (2003) также показало способность мезоангиобластов к миграции в поврежденные мышцы после внутриартериального введения и восстановлению структуры и функций мышечной ткани. Эти наблюдения подтверждают возможность и целесообразность применения мезоангиобластов в системной терапии всех скелетных мышц организма [87].

Положительные результаты доклинических испытаний послужили основанием для инициации клинических исследований. В настоящее время A. Rini и соавт. проводят вторую фазу испытаний, в ходе которых изучается применение HLA-идентичных аллогенных мезоангиобластов в лечении DMD (EudraCT no. 2011-000176-33) [88].

Обобщая мнение многих исследователей, следует признать, что технология с применением мезоангиобластов может стать одной из наиболее эффективных в плане лечения мышечных дистрофий [86—90].

### *Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки — iPSCs*

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки — iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells), представляют собой фибробласты кожи человека, перепрограммированные посредством 4 специфических факторов — Oct3/4, Klf4, Sox2, c-myc (открыты S. Yamanaka и соавт.) в плюрипотентные стволовые клетки. Последние способны дифференцироваться в любой тип тканеспецифичных клеток, включая миогенные [91]. Так, из iPSCs уже успешно получены двигательные нейроны [92], гепатоциты [93], гемопоэтические клетки [94], кардиомиоциты [95], мезенхимальные стволовые клетки [96].

С целью активации в iPSCs миогенной программы используют индукторы основных миогенных регуляторов — Pax3, Pax7 и MyoD [97—101]. Доклинические исследования показали, что полученные скелетные миогенные клетки-предшественники хорошо приживались после внутримышечного введения mdx мышам, не вызывали образования тератом или какого-либо иных клеточных аномалий (срок наблюдений составил 146 недель) [99], способствовали улучшению функциональной активности мышц [97—99].

В исследовании Y. Mizuno и соавт. (2010) наблюдали iPSCs, сходные по своим свойствам с СК [102]. В 2012 г. A. Filareto и соавт. из iPSCs получили клетки с фенотипом Pax7<sup>+</sup>, которые после внутримышечной трансплантации mdx мышам активно продуцировали дистрофин и пополняли популяцию СК в мышцах [103].

Активно проводятся исследования по генетическому модифицированию полученных из iPSCs миогенных клеток с целью придания им определенных функций, необходимых для лечения мышечных дистрофий различных типов [97—103]. Так, R. Darabi и соавт. (2008) получили из iPSCs микро-атрофин — генетически модифицированные миогенные клетки, внутримышечная трансплантация которых мышам с двойным нокаутом (dKO) — по дистрофину и атрофину — способствовала улучшению функциональной активности мышц животных [97].

Группа ученых под руководством F. Tedesco (2012) провела исследования с наблюдением больных LGMD-2D (Limb-Girdle Muscular Dystrophy) — конечностно-поясной формой прогрессирующей мышечной дистрофии. Авторы получили из iPSCs мезоангиобласты, которые затем модифицировали посредством лентивируса, кодирующего ген  $\alpha$ -саркогликана

человека. Внутримышечная трансплантация таких генетически модифицированных мезоангиобластов иммунодефицитным мышам, у которых отсутствовал этот ген (*sarcoglycan-null* мышам), вызывала экспрессию  $\alpha$ -саркогликана в их мышечных волокнах [101].

Использование iPSCs в регенеративной медицине — направление с большим будущим: персональные клеточные линии, полученные у пациентов с мышечной дистрофией, можно будет применять не только для их лечения аутологичными клетками, но и для исследования механизмов данной патологии (путем создания «тканевых моделей» заболевания на основе клеток, полученных от самих пациентов) и скрининга лекарственных препаратов [5, 92, 104, 105]. Однако для реализации этих возможностей в медицинской практике необходимо предстоит провести еще множество доклинических и клинических исследований с тем, чтобы разработать абсолютно безопасный и максимально эффективный метод лечения мышечных дистрофий.

### Заключение

За последние два десятилетия усилиями ученых-специалистов в области клеточной медицины и биологии выявлено множество популяций клеток, обладающих миогенным потенциалом, как мышечного, так и немышечного происхождения, каждая из которых является привлекательным кандидатом на «участие» в клеточной терапии. Тем не менее о масштабном внедрении клеточных технологий в клиническую практику лечения мышечных заболеваний говорить еще рано, так как для этого необходимо решение большого ряда довольно непростых вопросов.

В процессах тканевой регенерации скелетных мышц активно участвует целый комплекс мышечных стволовых/прогениторных клеток (СК, MDSCs, CD133<sup>+</sup>, SMSF, среди которых главную роль исполняют СК, локализованные в мышечных волокнах в специфических, сложно устроенных нишах, четко регулирующих их функционирование. Все другие миогенные клетки, как полагают, являются составляющими локального микроокружения СК и также вносят определенный вклад в регенерацию скелетной мускулатуры [106, 107]. Как соотносятся между собой эти клетки-предшественники, содержащиеся в мышечной ткани? Являются ли они различными звеньями иерархической цепи, находящимися на разных стадиях дифференцировки? Происходят ли от общей недифференцированной стволовой клетки или имеют разных предшественников? Каковы их взаимоотношения с СК? Ответов на эти вопросы пока нет, но решить их — принципиально важно для разработки

наиболее эффективной клеточной стратегии лечения пациентов с мышечными заболеваниями.

Одновременно с мышечными стволовыми клетками идентифицированы также клетки «немышечного» происхождения, обладающие миогенным потенциалом, которые также вносят свой вклад в процесс регенерации скелетных мышц. В их число входят ММСК<sub>км</sub> (стволовые клетки костного мозга), циркулирующие в крови стволовые клетки CD133<sup>+</sup>, мезоангиобласты, iPSCs (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки). Но для использования данных клеточных популяций в медицинской практике еще предстоит решить ряд задач: в частности, определить наиболее эффективные методы индукции дифференцировки этих клеток в миогенном направлении, подтвердить безопасность и эффективность их применения, оценить степень их участия в процессах мышечной регенерации и возможность полного замещения ими ниши резидентных СК.

Решению всех этих вопросов сегодня посвящены многие научные изыскания в области клеточных технологий, перспективных в плане лечения мышечных дистрофий. Так, проводятся клинические исследования возможности использования некоторых клеток с миогенным потенциалом в терапии пациентов с DMD (в частности, I/II фаза исследований проблем безопасности и эффективности применения аутологичных ММСК<sub>км</sub> [70—74]; КИ I/II фазы — по применению HLA-идентичных аллогенных мезоангиобластов [88]).

Продолжаются поиски путей усовершенствования технологии, основанной на применении СК. Одним из наиболее перспективных считают биоинженерный подход к разработке способов культивирования популяции СК — имитация в условиях *in vitro* среды обитания клеток, что позволяет контролировать процесс их дифференцировки и сохранять миогенный потенциал в процессе культивирования [5, 108, 109].

L. Madden и соавт. (2015) удалось создать посредством биоинженерного метода функциональную модель скелетной мышцы человека (авторы использовали гидрогель (фибрин/матригель /3Dматрикс), специфические компоненты культуральной среды и первичные миогенные клетки, выделенные из мышц здоровых доноров). Полученная ими мышечная ткань представляет собой мышечные пучки (*myobundles*), состоящие из мультимерных поперечно-исчерченных мышечных волокон и СК с фенотипом Pax7<sup>+</sup>, desmin<sup>+</sup>, MyoD<sup>+</sup>. При воздействии электрическим током эти биомиметические мышечные пучки спонтанно отвечают подергиваниями и тетаническими сокращениями. Такая модель *in vitro* скелетной мышцы человека может быть использована вместо животной модели для доклинических исследований: тестирования



фармакологических препаратов, токсикологического скрининга и разработки новых терапевтических подходов к лечению различных мышечных заболеваний [110].

Особое внимание исследователей к СК вполне объяснимо: эти клетки и их ниша представляют собой оптимальную модель для изучения биологии взрослых тканеспецифических стволовых клеток. Выделение СК из ассоциированных с ними мышечных волокон, а также культивирование изолированных мышечных волокон в условиях *ex vivo* позволяют исследовать базисные биологические процессы в стволовых клетках, влияние внешних факторов на их пролиферацию, механизмы программирования клеток и их переход к миогенной дифференцировке. В связи с высокой гетерогенностью популяции СК большой интерес вызывает ее иерархическая организация [5]. Понимание всех этих процессов важно и в практическом плане — для разработки терапевтических подходов к лечению мышечных заболеваний.

Особые надежды ученые возлагают на инновационную технологию, связанную с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSCs), которую активно разрабатывают сегодня в ведущих лабораториях мира [91]. Ее создание открывает широкие перспективы для получения аутологичной клеточной популяции, обладающей высоким регенеративным потенциалом *in vivo*, — наиболее эффективной в лечении пациента с мышечной дистрофией. Плюрипотентный потенциал этих уникальных клеток дает возможность «заставить» их дифференцироваться в заданном направлении и получить нужную клеточную популяцию с высоким регенеративным потенциалом в необходимом для проведения терапии количестве.

Приведенные в настоящем обзоре результаты интенсивных научных изысканий позволяют сделать достаточно оптимистичный вывод: исследования клеточных популяций, обладающих миогенным потенциалом, функций СК и их микроокружения, технологии iPSCs, методов генного модифицирования используемых клеток с высокой степенью вероятности приведут к созданию эффективной стратегии лечения мышечных дистрофических заболеваний.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00166).*

## References

1. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1961; 9: 493-5.
2. Shi X., Garry D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006; 20: 1692-708.

3. Sambasivan R., Tajbaksh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007; 18: 870-82.
4. Farini A., Razini P., Erratico S., et al. Cell Based Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Cell. Physiol.* 2009; 221: 526-34.
5. Merregalli M., Farini A., Sitziaand G., Torrente Y. Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting. *Pathophysiology of skeletal muscle*. 2014; 5:1-12.
6. Arriero M., Brodsky S., Gealekman O., et al. Adult skeletal muscle stem cells differentiate into endothelial lineage and ameliorate renal dysfunction after acute ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287: 621-27.
7. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C., et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999; 401: 390-4.
8. Torrente Y., Tremblay J., Pisati F., et al. Intra-arterial injection of muscle-derived CD34(+) Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* 2001; 152: 335-48.
9. Sarig R., Baruchi Z., Fuchs O., et al. Regeneration and transdifferentiation potential of muscle-derived stem cells propagated as myospheres. *Stem Cells*. 2006; 24: 1769- 78.
10. Tamaki T., Okada Y., Uchiyama Y., et al. Clonal multipotency of skeletal muscle-derived stem cells between mesodermal and ectodermal lineage. *Stem Cells*. 2007; 25: 2283-90.
11. Alessandri G., Pagano S., Bez A., et al. Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet*. 2004; 364: 1872-83.
12. Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., et. al. J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 2002; 157: 851-64.
13. Rouger K., Larcher T., Dubreil L., et al. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am. J. Pathol.* 2011; 179: 2501-18.
14. Torrente Y., Camirand G., Pisati F., Belicchi M., et. al. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. *J Cell Biol.* 2003; 162: 511-20.
15. Deasy B., Jankowski R., Huard J. Muscle-derived stem cells: Characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001; 27: 924-33.
16. Deasy B., Gharaibeh B., Pollett J., Jones M., et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell*. 2005; 16: 3323-33.
17. Lee J., Qu-Petersen Z., Cao B., et. al. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol.* 2000; 150: 1085-100.
18. Kuroda R., Usas A., Kubo S., et. al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 433-42.
19. Sherwood R., Christensen J., Conboy I., et. al. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell*. 2004; 119:543-54.
20. Zuba-Surma E., Abdel-Latif A., Case J., et. al. Sca-1 expression is associated with decreased cardiomyogenic differentiation potential of skeletal muscle-derived adult primitive cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2006; 41: 650-60
21. Burdzinska A., Gala K., Pczek L. Myogenic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46(4): 401-12.

22. Scharenberg C., Harkey M., Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2002; 99: 507-12.
23. Asakura A., Seale P., Girgis-Gabardo A., et al. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol*. 2002; 159: 123-34
24. McKinney-Freeman S., Jackson K., Camargo F., et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 1341-6.
25. Jackson K., Mi T., Goodell M. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 14482-6.
26. Uezumi A., Ojima K., Fukada S., et al. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341: 864-73.
27. Asakura A., Rudnicki M. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol*. 2002; 30: 1339-45.
28. Kallestad K., McLoon L. Defining the heterogeneity of skeletal muscle-derived side and main population cells isolated immediately *ex vivo*. *J Cell Physiol*. 2010; 222: 676-84.
29. Tamaki T., Akatsuka A., Okada Y., et al. Growth and differentiation potential of main- and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp Cell Res*. 2003; 291, 83-90.
30. Seale P., Sabourin L., Girgis-Gabardo A., et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000; 102: 777-86.
31. Tanaka K., Hall J., Troy A., Cornelison D., et al. Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 217-25.
32. Torrente Y., Belicchi M., Marchesi C. et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant*. 2007; 16: 563-77.
33. Perault B., Rudnicki M., Torrente Y., et al. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007; 15: 867-77.
34. Torrente Y., Belicchi M., Sampaolesi M., et al. Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2004; 114: 182-95.
35. Gavina M., Belicchi M., Rossi B., et al. VCAM-1-expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood*. 2006; 108: 2857-66.
36. Negroni E., Riederer I., Chaouch S., et al. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol. Ther*. 2009; 17: 1771-8.
37. Benchaouir R., Meregalli M., Farini A., et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2007; 13: 646-57.
38. Goyenvallé A., Vulin A., Fougerousse F., et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*. 2004; 306: 1796-9.
39. Denti M., Rosa A., D'Antona G., et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther*. 2006; 17: 565-74.
40. Meng J., Chun S., Asfahani R., et al. Human skeletal muscle-derived CD133(+) cells form functional satellite cells after intramuscular transplantation in immunodeficient host mice. *Mol. Ther*. 2014; 22: 1008-17.
41. Riviere C., Danos O., Douar A. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immune competent adult mice. *Gene Ther*. 2006; 13: 1300-8.
42. Friedenstein A.J., Deriglasova U., Kulagina N., et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. 1974; 2 (2): 83-92.
43. Lennon D., Caplan A. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2006; 34: 1604-5.
44. Bianco P., Robey P., Simmons P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 313-19.
45. Ferrari G., Stornaiuolo A., Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature*. 2001; 411: 1014-15.
46. Gussoni E., Pavlath G., Lanctot A., Sharma K., et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*. 1992; 356:435-8.
47. LaBarge M., Blau H. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002; 111: 589-601.
48. Kucia M., Wojakowski W., Reza R., et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006; 54: 121-35.
49. Rosu-Myles M., Stewart E., Trowbridge J., et al. A unique population of bone marrow cells migrates to skeletal muscle via hepatocyte growth factor/c-met axis. *J Cell Sci*. 2005; 118: 4343-52.
50. Sacco A., Doyonnas R., La Barge M., et al. IGF-I increases bone marrow contribution to adult skeletal muscle and enhances the fusion of myelomonocytic precursors. *J Cell Biol*. 2005; 171: 483-92.
51. Palermo A., Labarge M., Doyonnas R., et al. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*. 2005; 279: 336-44.
52. McKinney-Freeman S., Majka S., Jackson K., et al. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2003; 31: 806-14.
53. Dreyfus P., Chretien F., Chazaud B., et al. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol*. 2004; 164:773-9.
54. Ichim T., Alexandrescu D., Solano F., et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol*. 2010; 260: 75-82.
55. Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004; 22 (3): 377-84.
56. Griffin M., Elliman S., Cahill E., et al. Concise review: adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: how well are we joining the dots? *Stem Cells*. 2013; 31: 2033-41.
57. Nemeth K., Leelahavanichkul A., Yuen P., et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandinE(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med*. 2009; 15: 42-9.

58. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y., et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005; 309: 314-7.
59. Lee J.H., Kosinski P.A., Kemp D.M. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res*. 2005;307: 174-82.
60. Shi D., Reinecke H., Murry C., Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood*. 2004; 104: 290-4.
61. Chaylakhyan R.K., Gerasimov Yu.V. Proliferative and differentiation potential of skeletal bone marrow colony-forming cells. *Cytology*. 1986; 28 (3): 341-9. (in Russian)
62. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res*. 1991; 9: 641-50.
63. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7 (2): 211-28.
64. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*. 2012; 14: 516-21.
65. Xu W., Zhang X., Qian H., et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229: 623-31.
66. Antonitsis P., Ioannidou-Papagiannaki E., Kaidoglou A., et al. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2007; 6: 593-7.
67. Hegner B., Weber M., Dragun D., Schulze-Lohoff E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Hypertens*. 2005; 23: 1191-202.
68. Markert C., Atala A., Cann J. et al. Mesenchymal stem cells: emerging therapy for Duchenne muscular dystrophy. *PM R*. 2009; 1: 547-59.
69. Bobis S., Jarocha D., Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44: 215-30.
70. *Study Safety and Efficacy of Bone Marrow Derived Autologous Cells for the Treatment of Muscular Dystrophy*. Available at: (Assessed 5 May 2015)
71. Stem Cell Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. Available at: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02241434> (Assessed 5 May 2015)
72. *Study Safety and Efficacy of BMMNC for the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy*. Available at: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01834040> (Assessed 5 May 2015)
73. Stem Cell Therapy in Muscular Dystrophy. Available at: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02241928> (Assessed 5 May 2015)
74. Cell Therapy in Limb Girdle Muscular Dystrophy. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02245711?term=NCT02245711&rank=1> (Assessed 5 May 2015)
75. De Bari C., Dell'acchio F., Vandenabeele F., et al. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J. Cell Biol*. 2003; 160: 909-18.
76. Gang E., Jeong J., Hong S., et al. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; 22: 617-24.
77. Choi Y., Vincent L., Lee A., Dobke M., et al. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2012; 33: 2482-91.
78. Zorin V.L., Eremin I.I., Rybko V.A. et al. Oral mucosa is a new source for myoblast derivation. *Genes and cells*. 2014; 9(3): 5-13. (in Russian)
79. Minasi M., Riminucci M., De Angelis L., et al. The mesoangioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002; 129: 2773-83.
80. Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R., et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol*. 2007; 9: 255-67.
81. Cossu G., Bianco P. Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 537-42.
82. Tagliafico E., Brunelli S., Bergamaschi A., et al. TGF beta/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts. *J. Cell Sci*. 2004; 117: 4377-88.
83. Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003; 301: 487-92
84. Galvez B., Sampaolesi M., Brunelli S., et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*. 2006; 174: 231-43.
85. Cossu G., Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol. Med*. 2007; 13: 520-6.
86. Tedesco F., Hoshiya H., D'antona G., et al. Stem cell mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med*. 2011; 3: 96ra78.
87. Sampaolesi M., Torrente Y., Innocenzi A., et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003; 301: 487-92.
88. Rini A., Sitzia C., et al. Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting. *Front Physiol*. 2014; 5:48.
89. Galvez B., Sampaolesi M., Brunelli S., et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*. 2006; 174: 231-43.
90. Cossu G., Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol. Med*. 2007; 13: 520-6.
91. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
92. Dimos J., Rodolfa K., Niakan K., et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321: 1218-21.
93. Song Z., Cai J., Liu Y., et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res*. 2009; 19: 1233-42.
94. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; 318: 1920-3.
95. Zwi L., Caspi O., Arbel G., et al. Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009; 120: 1513-23.
96. Lian Q., Zhang Y., Zhang J., Zhang H., et al. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced

pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*. 2010; 121: 1113-23.

97. Darabi R., Gehlbach K., Bachoo R., et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat. Med.* 2008; 14: 134-43.

98. Darabi R., Santos F., Filareto A., et al. Assessment of the myogenic stem cell compartment following transplantation of Pax3/Pax7-induced embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*. 2011; 29: 777-90.

99. Darabi R., Arpke R., Irion S., et al. Human ES and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 610-19.

100. Goudenege S., Lebel C., Huot N., Dufour C., et al. Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *Mol. Ther.* 2012; 20: 2153-67.

101. Tedesco F., Gerli M., Perani L., Benedetti S., et al., Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(140): 140ra89.

102. Mizuno Y., Chang H., Umeda K., et al. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* 2010; 24: 2245-53.

103. Filareto A., Darabi R., Perlingeiro R. Engraftment of ES-derived myogenic progenitors in a severe mouse model

of muscular dystrophy. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2012; 10(1). pii: S10-001.

104. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., et al. Drugs creening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4, 145ra104.

105. Park I., Zhao R., West J., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 451: 141-6.

106. Usas A., Huard J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. 2007; 28: 5401-6.

107. Judson R., Zhang R., Rossi F. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS Journal*. 2013; 280: 4100-8.

108. Lutolf M., Gilbert P., Blau H. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*. 2009; 462: 433-41.

109. Cosgrove B., Sacco A., Gilbert P., Blau H. A home away from home: challenges and opportunities in engineering *in vitro* muscle satellite cell niches. *Differentiation*. 2009; 78: 185-94.

110. Madden L., Juhas M., Kraus W.E., et al. Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *Elife*. 2015; 4:e04885.

Received 28.05.15

### Сведения об авторах:

Зорин Вадим Леонидович канд. биол. наук, зав. отд. регенеративной медицины, Институт стволовых клеток человека

Зорина Алла Ивановна, канд. мед. наук, гл. науч. сотр., Институт стволовых клеток человека

Пулин Андрей Алексеевич, канд. мед. наук, зав. криобанком Центра биомедицинских технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Копнин Павел Борисович, канд. мед. наук, зав. лаб. Цитогенетики, НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАН

Еремин Илья Игоревич, канд. мед. наук, руководитель Центра биомедицинских технологий, ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России