

Редька Иоанна Витальевна, студент,

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО

«КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь

Василенко Светлана Анатольевна, ассистент,

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО

«КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь

Шелена Елена Дмитриевна, кандидат медицинских наук, доцент,

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО

«КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ КАК МЕТОД РЕГЕНЕРАЦИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Аннотация: В настоящее время терапия мезенхимальными стромальными стволовыми клетками (МССК) является многообещающим подходом к лечению заболеваний скелетного мышечного волокна, которое повреждается из-за механических нагрузок, испытываемых во время физической активности, хрупкости мышц, обусловленной генетическими заболеваниями или старением организма. Данные клетки обладают рядом уникальных биологических параметров, способствуют восстановлению миофибрилл за счёт собственных резервов организма, оказывая противовоспалительное, антифибротическое действие, выделяя различные факторы роста и цитокины. Применение аутологичных клеток пациента минимизирует вероятность отторжения. Активно исследуются методы, позволяющие повысить регенераторный потенциал мезенхимальных стромальных клеток за счет увеличения их секреторной активности и модификации систем доставки. В этих целях на клетки воздействуют

различными химическими и физическими факторами, применяют генную инженерию и внедряют инновационные методы транспорта МСК к месту повреждения, в частности, использование клеточно-адгезивных микроносителей с применением импульсного сфокусированного ультразвука низкой интенсивности и магнитную систему доставки. Новым подходом к регенерации повреждённой мышечной ткани является использование внеклеточных везикул, продуцируемых МСК – экзосом, способных обеспечить доставку различных биомолекул к клетке-мишени. Эффективность терапии мезенхимальными стромальными клетками была доказана в многочисленных опытах с экспериментально повреждённой мышечной тканью мышей. Наблюдалось снижение явлений окислительного стресса, воспаления, митохондриальной дисфункции. В настоящий момент изучается возможность регенерации мышечной ткани при возрастной саркопении. Исследования показали большой потенциал терапии МССК, однако необходимо время для оптимизации условий культивирования, изучения механизма действия и получения достоверных данных о безопасности данного подхода.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные стволовые клетки, скелетная мышечная ткань.

Annotation: Nowadays, mesenchymal stromal stem cell (MSSC) therapy is a promising approach for the treatment of diseases of the skeletal muscle fiber, which is damaged due to the mechanical stress experienced during physical activity, muscle fragility due to genetic diseases, or aging. These cells have a number of unique biological parameters, contribute to the restoration of myofibrils due to the body's own reserves, providing anti-inflammatory, antifibrotic effects, releasing various growth factors and cytokines. It is possible to use autologous cells of the patient, which minimizes of the rejection. Methods are being actively explored to increase the regenerative potential of mesenchymal stromal cells by increasing their secretory activity and modifying delivery systems. For this purpose, cells are exposed to

various chemical and physical factors, genetic engineering is used, and innovative methods of transporting MSSCs to the site of damage are introduced, in particular, the use of cell-adhesive microcarriers with low-intensity pulsed focused ultrasound and a magnetic delivery system. A new approach to the regeneration of damaged muscle tissue is also the use of extracellular vesicles produced by MSSCs – exosomes, capable of delivering various biomolecules to the target cell. The effectiveness of therapy with mesenchymal stromal stem cells has been proven in numerous experiments with experimentally damaged mouse muscle tissue. A decrease in the phenomena of oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction was observed. Currently, the possibility of regeneration of muscle tissue in age-related sarcopenia is being studied. Researches have shown a great potential for MSCS therapy, however, time is needed to optimize cultivation conditions, study the mechanism of action and obtain reliable data on the safety of this approach.

Keywords: mesenchymal stromal stem cells, skeletal muscle tissue.

Скелетные мышцы относят к одной из наиболее крупных систем человеческого организма – ее вес составляет приблизительно 30-40 % массы тела [1]. Они играют решающую роль в совершении произвольных движений и осуществляют депонирующую и защитную функции. Патология мышечной системы значительно ухудшает качество жизни пациентов и в ряде случаев приводит к инвалидности. Заболевания мышечной системы могут быть наследственными, обусловленными дефектами в одном или нескольких генах, врождёнными, связанными с нарушениями внутриутробного развития и приобретёнными в результате аутоиммунных нарушений, воспалительных процессов или травм. В настоящее время проводятся многочисленные исследования, направленные на поиск новых методов лечения заболеваний мышечной системы, в частности, предложена терапия мезенхимальными стромальными стволовыми клетками (МССК), имеющими высокий регенеративный потенциал.

Скелетные мышцы имеют собственную популяцию стволовых клеток, это так называемые клетки-сателлиты, локализованные под базальной мембраной мышечного волокна [2]. Данные клетки экспрессируют гены гомеобокса Pax3, Pax7, ген миогенного регуляторного фактора (MRF), Myf5 и в норме находятся в состоянии покоя [3]. При повреждении мышечного волокна сателлитные клетки активируются и подвергаются асимметричному делению. При этом одна дочерняя клетка остается стволовой, а вторая становится детерминированной, осуществляет специфическую дифференцировку, сливается с другими миогенными предшественниками, образуя миотубулы и затем мышечные волокна. Однако регенеративный потенциал клеток-сателлитов уменьшается при физиологическом старении и патологических процессах, что обусловлено как внешними, так и внутренними клеточными факторами, такими как окислительный стресс, повреждение структуры ДНК и белков.

Кроме сателлитных клеток в регенерации мышечной ткани также участвуют МССК, мультипотентные клетки, характеризующиеся возможностью дифференцировки в различные клеточные линии: адипоциты, хондробласты, остеобласты и миоциты. В качестве обязательных признаков МССК комитет по мезенхимальным и тканевым стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии определил экспрессию данными клетками поверхностных антигенов CD105, CD73, CD90, отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79/CD19 и HLA-DR и адгезию к пластику при содержании в стандартных условиях культивирования [4]. МССК обладают уникальными биологическими свойствами, делающими их особо привлекательными для клеточной терапии. Данные клетки выделяют большое количество регуляторных молекул, стимулирующих регенерацию тканей, локализуются практически во всех органах, легко извлекаются, культивируются *in vitro* и имеют широкий спектр дифференцировки. Особенностью применения МССК является использование аутологических клеток пациента, и, как следствие, низкая вероятность их отторжения. МССК образуют временную нишу для

мышечных клеток-предшественников, а также выделяют биологически активные вещества (БАВ), обеспечивающие их пролиферацию и дифференцировку. Кроме резидентных МССК в мышечную ткань под воздействием хемоаттрактантов мобилизируются МССК красного костного мозга. В ходе экспериментов, проведённых на животных с повреждением мышечной ткани, было выявлено, что МССК способны дифференцироваться в миогенном направлении под воздействием микроокружения. Кроме того, введение МССК в поврежденную мышечную ткань способствует ускорению регенерации за счет БАВ, вырабатываемых МССК. К ним относятся противовоспалительные цитокины (IL-10), различные факторы роста (VEGF-фактор роста эндотелия сосудов, FGF-фактор роста фибробластов, PDGF-тромбоцитарный фактор роста), иммуномодулирующие факторы (например, простогландин 2), увеличивающие синтез иммунотолерантных цитокинов и способствующие трансформации провоспалительных макрофагов (M1) в противовоспалительные (M2) [3]. Проведены многочисленные исследования, в ходе которых мышечную ткань животных (преимущественно крыс и мышей) повреждали различными способами: механически, токсическими агентами, моделируя нарушение кровоснабжения, жировую мышечную дистрофию, а также генетически обусловленную мышечную дистрофию. Было обнаружено, что внутримышечная трансплантация МСК крысам с тяжелым повреждением мышц способствовала заживлению скелетной мускулатуры за счет снижения уровня воспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6, TNF- α и IFN- α) и индукции противовоспалительных цитокинов (IL-10), что сопровождалось снижением некроза и фиброза [4]. Отмечено, что по сравнению с контрольной группой, мышечные волокна после введения МСК характеризовались наличием регенерирующих миофибрилл и восстановлением ангиогенеза. Зафиксировано увеличение размеров мышечного волокна более, чем на 30% (с 103 ± 22 мкм² в контрольной группе до 136 ± 24 мкм² в экспериментальной) [5].

Увеличение регенераторного потенциала МССК возможно за счет

повышения их секреторной активности. С этой целью на клетки воздействуют специфическими агентами: пониженным содержанием кислорода, механическим натяжением, гормонами и т.д. Предложен также метод генной инженерии, при котором в МССК вводятся гены, увеличивающие их секреторную активность. Еще одним активно разрабатываемым методом ускорения полноценной регенерации повреждённой ткани является введение в неё не самих стволовых клеток, а везикул клеточного происхождения - экзосом. Согласно мультиомным исследованиям, экзосомы содержат различные типы биомолекул, включая определенные наборы белков (в частности, белок главного комплекса гистосовместимости - МНС), липидов и нуклеиновых кислот. Эти везикулы обладают рядом привлекательных для регенеративной терапии свойств: небольшим размером, низкой иммуногенностью и простотой получения. Экзосомы взаимодействуют с клеткой-мишенью через мембранные рецепторы или, непосредственно сливаясь с ней и выделяя своё содержимое в цитоплазму. В ходе исследований было выявлено, что экзосомы МССК значительно стимулируют миогенез и ангиогенез повреждённой мышечной ткани, а также оказывают противовоспалительное действие [6].

Продолжается поиск средств, направленных на модификацию системы доставки МССК к повреждённой области и улучшение выживаемости в организме реципиента. В частности, одной из важнейших задач является повышение концентрации МССК в месте повреждения. Для этого предлагается использование клеточно-адгезивных микроносителей с применением импульсного сфокусированного ультразвука низкой интенсивности (pFUS) [7]. Его воздействие на повреждённую мышцу увеличивает активность хемоаттрактантов и молекул клеточной адгезии (САМ) в этой области, что индуцирует усиленную миграцию в неё МССК. Кроме того, активно исследуется магнитная система доставки МССК. В данном методе наночастицы суперпарамагнитного оксида железа (СПИО) используются для магнитной маркировки клеток, после чего МСК локально вводятся в зону дефекта и

контролируются с помощью внешнего магнитного поля [8]. Это способствует накоплению и адгезии трансплантированных клеток в поврежденной ткани.

Терапевтический эффект МССК был изучен у пациентов с мышечными дистрофиями, в частности, с мышечной дистрофией Дюшена (МДД), генетическом заболевании, характеризующемся отсутствием в саркомере белка дистрофина и, как следствие, нарушением структуры мембраны, дегенерацией органелл, гибелью миофибрилл [9]. Это в свою очередь провоцирует воспаление мышц с последующим развитием фиброза. Пациенты с МДД обычно имеют прогрессирующую слабость мышц конечностей, туловища и диафрагмы, что приводит к истощению, кифосколиозу, тяжелым дыхательным проблемам и психическим расстройствам. Большинство пациентов умирают на третьем десятилетии жизни из-за респираторных осложнений или сердечной недостаточности [10]. В настоящее время терапия МДД направлена на устранение симптомов и замедление прогрессирования заболевания. Широкий спектр терапевтических свойств МССК может уменьшить явления окислительного стресса, воспаления, митохондриальной дисфункции и некроза. В недавних исследованиях сообщалось о положительных эффектах внутривенной инъекции МСК на модели мышей mdx. Уменьшение фиброза и процентного содержания некротических волокон происходило за счет слияния МССК с мышечными волокнами реципиента и выработки трофических факторов, стимулирующих активность эндогенных клеток. Кроме того, было показано, что матриксная металлопротеиназа-1 (ММП-1) имела решающее значение для описанного антифибротического эффекта МСК [11]. Еще одним положительным эффектом МСК явилась их способность восстанавливать экспрессию дистрофина.

Изучается способность МССК улучшать регенерацию стареющих мышц при возрастной саркопении, характеризующейся потерей мышечной массы, силы сокращения и, соответственно, функции мышц. Заболевание сопровождается хроническим воспалением, снижением числа мотонейронов,

окислительным стрессом, уменьшением количества сателлитных клеток и их способности к пролиферации и дифференцировке, гормональным дисбалансом, гиподинамией, снижением митохондриальной активности и другими факторами [12]. Эксперименты с мышами, страдающими саркопенией, продемонстрировали высокий потенциал клеточной терапии. Трансплантация МССК увеличивала мышечную массу, силу и площадь поперечного сечения мышечных волокон, ингибировала хроническое воспаление путём подавления экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 и увеличения IL-4 и IL-10, уменьшала апоптоз, активировала резидентные сателлитные клетки и в целом улучшала физическое состояние мышечной ткани реципиентов по сравнению с контрольной группой [13].

Таким образом, уникальные биологические свойства МССК определены их способностью к мультипотентной дифференцировке, в том числе в миогенном направлении, а также обусловлены их паракринной активностью. Увеличение регенеративного потенциала МССК связано с поиском средств, направленных на повышение их секреторной активности и оптимизацией средств доставки МССК в поврежденную ткань для достижения высокой концентрации в зоне дефекта. Использование МССК имеет большие перспективы для предупреждения физиологического старения и терапии заболеваний мышечной системы.

Библиографический список:

1. Yamakawa H., Kusumoto D., Hashimoto H., Yuasa S. Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21. No. 5. doi: 10.3390/ijms21051830.
2. Sassoli C., Zecchi-Orlandini S., Formigli L. Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration//Cells. 2012. Vol. 1. No. 4. doi: 10.3390/cells1040832.
3. Klimczak A., Kozłowska U., Kurpisz M. Muscle stem/progenitor cells

and mesenchymal stem cells of bone marrow origin for skeletal muscle regeneration in muscular dystrophies//Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 2018. Vol. 66. No. 5. doi: 10.1007/s00005-018-0509-7.

4. Sandona M., Di Pietro L., Esposito F., Ventura A., Silini A. R., Parolini O. Mesenchymal stromal cells and their secretome: new therapeutic perspectives for skeletal muscle regeneration//Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. No. 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.652970.

5. Świątkowska- Flis B., Zdolińska- Malinowska I., Sługocka D., Boruczkowski D. The use of umbilical cord- derived mesenchymal stem cells in patients with muscular dystrophies: Results from compassionate use in real- life settings// Stem Cells Translational Medicine. 2021. Vol. 10. No. 10. doi: 10.1002/sctm.21-0027.

6. Yue B., Yang H., Wang J., Ru W., Wu J., Huang Y., Lan X., Lei C., Chen H. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis// Cell Proliferation. 2020. Vol. 53. No. 7. doi: 10.1111/cpr.12857.

7. Tebebi P.A., Burks S.R., Kim S.J., Williams R.A., Nguyen B.A., Venkatesh P. Cyclooxygenase-2 or tumor necrosis factor- α inhibitors attenuate the mechanotransductive effects of pulsed focused ultrasound to suppress mesenchymal stromal cell homing to healthy and dystrophic muscle//Stem Cells. 2015. Vol. 33. No. 4. doi: 10.1002/stem.1927.

8. Kamei N., Adachi N., Ochi M. Magnetic Cell Delivery for the Regeneration of Musculoskeletal and Neural Tissues//Regenerative Therapy. 2018. Vol. 9. doi: 10.1016/j.reth.2018.10.001.

9. Shen O.Y., Chen Y.F., Xu H.T., Lee C.W. The Efficacy of Naïve versus Modified Mesenchymal Stem Cells in Improving Muscle Function in Duchenne Muscular Dystrophy: A Systematic Review//Biomedicines. 2021. Vol. 9. No. 9. doi: 10.3390/biomedicines9091097.

10. Biressi S., Filareto A., Rando T.A. Stem cell therapy for muscular

dystrophies//The Journal of Clinical Investigation. 2020. Vol. 130. No.11. doi: 10.1172/JCI142031.

11. Choi A., Park S.E., Jeong J.B., Choi S.J., Oh S.Y., Ryu G.H., Lee J., Jeon H.B., Chang J.W. Anti-Fibrotic Effect of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells on Skeletal Muscle Cells, Mediated by Secretion of MMP-1//International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21. No. 17. doi: 10.3390/ijms21176269.

12. Zhu Y., Ge J., Huang C., Liu H., Jiang H. Application of mesenchymal stem cell therapy for aging frailty: From mechanisms to therapeutics//Theranostics. 2021. Vol.11. No. 12. doi: 10.7150/thno.46436.

13. Wang Q.-Q., Jing X.-M., Bi Y.-Z., Cao X.-F., Wang Y.-Z., Li Y.-X., Qiao B.-J., Chen Y., Hao Y.-L., Hu J. Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stromal Cells May Attenuate Sarcopenia in Aged Mice Induced by Hindlimb Suspension//Medical Science Monitor. 2018. Vol. 24. doi: 10.12659/MSM.913362.