ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МИОГЕНЕЗА КЛЕТКАМИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ДЕСНЫ

Д.П. Самчук [1], Е.Н. Лукьянова [2], И.И. Еремин [1], В.Л. Зорин [1,2], А.И. Зорина [2], О.С. Гринаковская [1], И.Н. Корсаков [1], Р.В. Деев [2,3], И.Р. Гильмутдинова [1], Н.Л. Лазарева [1], П.С. Еремин [1], А.П. Петрикина [1], А.Е. Гомзяков [1], Д.А. Тимашков [1], Н.К. Витько [1], К.В. Котенко [4], П.Б. Копнин [5], А.А. Пулин [1]

[1] Центральная клиническая больница с поликлиникой, Москва, Россия
[2] Институт стволовых клеток человека» Москва, Россия
[3] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
[4] Главное медицинское управление Управления делами Президента РФ, Москва, Россия
[5] Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Expression of myogenesis genes by gingiva derived cells

D.P. Samchuk [1], E.N. Lukyanova [2], I.I. Eremin [1], V.L. Zorin [1,2], A.I. Zorina [2], O.S. Grinakovskaya [1], I.N. Korsakov [1], R.V. Deev [2,3], I.R. Gilmutdinova [1], N.L. Lazareva [1], P.S. Eremin [1], A.P. Petrikina [1], A.E. Gomzyakov [1], D.A. Timashkov [1], N.K. Vit'ko [1], K.V. Kotenko [4], P.B. Kopnin [5], A.A. Pulin [1]

[1] Central Clinical Hospital with Outpatient Health Center, Moscow, Russia
[2] Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia
[3] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia
[4] Central Medical Authority of the Business Administration for the President of the Russian Federation, Moscow, Russia
[5] N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russia

Выявленная в наших предыдущих работах способность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) слизистой оболочки полости рта (десны) к миогенной дифференцировке, а также возможность их экспансии in vitro, открывают перспективы для применения этих клеток в регенеративной медицине с целью коррекции мышечной патологии. Подтверждением возможности дифференцировки МСК десны в миогенном направлении могут служить данные об изменениях экспрессии регуляторных факторов миогенеза в этих клетках.

Исследование проведено на культурах фибробластов кожи и МСК десны. При сравнении профилей экспрессии генов МСК десны и фибробластов кожи значимые изменения зарегистрированы для 153 генов. Из них нами отобраны 19 значимых дифференциально экспрессированных генов, для которых были проанализированы основные сигнальные пути.

При анализе транскриптомных профилей генома МСК десны выявлены данные, свидетельствующие о значимой активации/инактивации сигнальных путей и основных генов, которые были идентифицированы для популяции сателлитных клеток человека. Это относится к таким сигнальным путям как p38 MAPK, NOTCH и др., отвечающим за пролиферацию и дифференцировку в миогенном направлении, процессы самообновления или самоподдержания в популяции сателлитных клеток. В то же время полного совпадения в паттернах экспрессии генов между стабильной популяцией МСК десны и сателлитных клеток человека, проходящих миогенную дифференцировку, а также дифференцированных в миогенном направлении клеток, полученных из нетипичных источников, отмечено не было.

Данные настоящего эксперимента позволяют говорить о МСК десны как об отличной от миосателлитных клеток популяции, обладающей способностью дифференцироваться в миогенном направлении на фоне неканонического паттерна экспрессии миогенных регуляторных факторов.

Ключевые слова: десна, регенеративная медицина, мезенхимальные стромальные клетки десны, миогенная дифференцировка, микрочипы, CustomArray 12K, профиль экспрессии генов.

The ability of gingiva derived mesenchymal stromal cells (MSCs) to myogenic differentiation and the possibility of their expansion in vitro revealed in our previous work, open up prospects for their use in regenerative medicine for the correction of muscle pathology. Data on changes in the expression of myogenic regulatory factors in gingiva derived MSCs can serve as confirmation of the possibility of differentiation of these cells into the myogenic direction.

The study was conducted on cultures of gingiva derived MSCs and skin fibroblasts. When comparing gene expression profiles of gingiva derived MSCs and skin fibroblasts significant changes have been registered for 153 genes. Of these, we selected 19 significant differentially expressed genes, for which main signal pathways were analyzed.

Evidences of significant activation / inactivation of signaling pathways and key genes that have been identified for the population of human satellite cells were obtained during analysis of the genome transcriptome profiles of gingiva derived MSCs. This applies to such signaling pathways as the p38 MAPK, NOTCH and other groups responsible for the proliferation and differentiation in myogenic direction, the processes of self-renewal or self-maintenance in the population of satellite cells. At the same time full match in the patterns of gene expression between the stable population of gingiva derived MSCs and human satellite cells undergoing myogenic differentiation as well as cells derived from atypical sources and differentiated in the myogenic direction was not observed.

The data of our experiment suggests that the gingiva derived MSCs are distinct from satellite cells and could be considered as population with plateaued development, possessing the ability to differentiate into myogenic direction due to non-canonical expression pattern of myogenic regulatory factors.

Keywords: gingiva, regenerative medicine, gingiva derived mesenchymal stromal cells, myogenic differentiation, microarray, CustomArray 12K, genes expression profile.

Введение

Скелетная мышца является одной из наиболее высокоорганизованных структур организма, обеспечивая локомоцию и другие повседневные виды деятельности. У позвоночных развитие скелетных мышц начинается на эмбриональной стадии, а заканчивается, когда взрослый организм, полностью достигнув своих размеров, прекращает рост [1]. Уникальность

e-mail: andreypulin@gmail.com

поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани состоит в том, что ее структурно-функциональные единицы образуются в результате слияния одноядерных клеток-предшественниц — миобластов. Формирование мышечных трубочек в эмбриогенгезе начинается после выхода миобластов из митотического цикла и сопровождается экспрессией нескольких регуляторных факторов миогенеза. В процессе дифференцировки происходит экспрессия факторов, непосредственно связанных с миогистогенезом, обеспечивающих скоординированный ответ на входящие в мышцу нервные окончания [2–7]. В постнатальном периоде онтогенеза процессы рабдомиогистогенеза наблюдаются при регенерации поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани. Возможности скелетной мускулатуры к восстановлению были продемонстрированы в знаковых работах А.Н. Студицкого [8], а также ряда других авторов [9, 10].

В настоящее время согласно экспериментальным данным регенерация скелетных мышц у взрослых млекопитающих происходит за счет миосателлитных PAX7$^+$ клеток [11–13], которые активируются в ответ на воздействие повреждающих факторов [9]. Показано, что при экспансии in vitro они быстро теряют свою способность к пролиферации [14]. Кроме того, миосателлитоциты характеризуются низкой выживаемостью и ограниченной миграцией после трансплантации, отсутствием способности проникать через эндотелиальный барьер, что фактически исключает возможность их системного применения [15–17].

В то же время существует множество примеров неортодоксальной дифференцировки в миогенном направлении клеток, не относящихся к миосателлитным [16, 18–20], за счет активации альтернативных сигнальных путей, не ассоциированных с PAX7 [18]. При этом отмечена экспрессия такими клетками большого количества миогенных маркеров, а также способность интегрироваться в мышечные волокна [18, 21].

Показана принципиальная возможность использования широкого спектра клеток, обладающих миогенным потенциалом, для коррекции различных патологических процессов в мышечной ткани [22, 23]. Барьером на пути развития способов лечения заболеваний скелетных мышц, основанных на клеточных технологиях, в настоящее время является отсутствие эффективных методик, позволяющих получать достаточное для трансплантации число клеток с сохранным потенциалом к миогенной дифференцировке и самообновлению [14]. Кроме того, остается нерешенной проблема создания полноценной мышечной ткани de novo (в том числе с использованием ауто- или аллографтов) для восстановления дефектов большого объема или для коррекции генетически-обусловленной патологии, например, наследственных миодистрофий [8, 24–26].

В наших предыдущих работах были приведены свидетельства ранее неизвестной способности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) десны к дифференцировке в миогенном направлении [27]. МСК десны, берущие свое происхождение из клеток нервного гребня (ганглиозной пластинки), являются уникальной популяцией, способной к дивергентной дифференцировке вне закономерностей, характерных для стандартных программ зародышевых листков [28], что позволяет считать этот материал зародыша особым эмбриональным зачатком. Кроме того, нами установлена более высокая скорость пролиферации МСК десны в сравнении с МСК костного мозга. Показано, что культура МСК десны в отсутствие дифференцирующих стимулов не экспрессировала маркеры миогенной дифференцировки (Myogenin, MyoD, скелетно-мышечный актин и миозин) в течение более чем 10 пассажей [29]. Перечисленные выше факты открывают новые перспективы для применения аутогенных клеточных продуктов в лечении мышечных заболеваний различной этиологии, включая генетически обусловленные.

Подтверждением возможности дифференцировки МСК десны в миогенном направлении могут служить данные об изменениях экспрессии регуляторных факторов миогенеза в этих клетках. В связи с этим целью нашей работы явился анализ экспрессионных профилей МСК десны с использованием микрочипов.

Материал и методы

Биопсия. После подписания здоровыми донорами (n = 4, 1 женщина и 3 мужчины, средний возраст 34±3 лет) добровольного информированного согласия, в условиях хирургического стоматологического кабинета с соблюдением правил асептики под местным обезболиванием раствором Ультракаина 40 мг/мл (1,7 мл) выполнялась биопсия слизистой оболочки полости рта в ретромолярной области, а также под местным обезболиванием 2% раствором лидокаина проводили биопсию кожи заушной области.

Объем биоптата составлял 3–4 мм^3. Биоптаты помещали в стерильные пробирки (BD Falcon, США) с транспортировочной питательной средой: α-MEM (Sigma, США), 2% FBS (HyClone, США), 200 ед./мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 ед./мл амфотерицина (Stem Cell Technologies, США) — маркировали и доставляли в течение 2 ч. при температуре +4°С в лабораторию.

Получение МСК десны. Все манипуляции с биоматериалом были выполнены в соответствии со стандартами GTP (Good tissue practice), а также стандартными операционными процедурами, принятыми в Центре биомедицинских технологий ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» Управления делами Президента РФ.

Биоптат десны инкубировали при 4°С в течение 2–3 ч. в среде DMEM/F12 (StemCell Technologies, США) с добавлением 10% FBS (Biological Industries, Израиль), после чего подвергали ферментативной обработке 0,15% раствором коллагеназы II типа (Sigma, США) при 37°С в течение 12 ч. По окончании активность фермента терминировали добавлением эквивалентного объема FBS (Biological Industries, Израиль). Для получения первичной культуры МСК десны суспензию клеток дважды отмывали средой DMEM/F12 с добавлением 15% FBS и переносили в той же среде во флаконы в плотности 3×10^5 кл/см^2. По достижении конфлюэнтности клетки снимали с поверхности пластика при помощи 0,05% раствора трипсина/ЭДТА (StemCell Technologies, США). МСК культивировали при 37°С и 5% CO_2 до 3 пассажа с заменой среды каждые 3 сут. Для подсчета и оценки жизнеспособности клеток использовали автоматический счетчик клеток «Countess» (Invitrogen, США).

Получение фибробластов кожи. Ткани биоптатов подвергали ферментативной обработке 0,05% кол-

лагеназой II типа (Sigma, США) при температуре 37°С в течение 12 ч. Полученную суспензию клеток пипетировали с последующим центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали и полученные суспензии одиночных фибробластов культивировали при 37°С, 5% CO_2 в стандартной культуральной среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 20% сыворотки FBS Defined (HyClone, США), 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) в течение 14 сут. В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0,05% раствором трипсина/ЭДТА (StemCell Technologies, США) и пассировали с плотностью 10^4 кл/см^2 в той же культуральной среде, но с уменьшенным до 10% содержанием сыворотки. Клетки культивировали до 3 пассажа, пассировали при достижении культурой 80–90% монослоя. Замену среды осуществляли каждые 3 сут. В работе использовали культуральную посуду фирмы Corning-Costar (США).

Отбор проб для исследования. Культуры МСК десны и фибробластов кожи на 3 пассаже по достижении конфлюэнтности снимали с поверхности флаконов 0,05% раствором трипсина/ЭДТА (StemCell Technologies, США). После этого 5×10^5 клеток центрифугировали (250 g, 10 мин., 25°С), отбирали супернатант, добавляли к осадку 0,5 мл стабилизирующего раствора RNAlater (Thermo Fisher Scientific, США) и ресуспендировали. Образцы переносили в стерильные промаркированные пробирки, которые немедленно замораживались при -20°С.

Микрочиповый анализ. Из клеток при помощи набора DirectZol kit (Zymo Research, США) выделяли РНК. Приготовление библиотек осуществлялось с помощью набора Whole Transcriptome Amplification WTA2 Kit (Sigma, США). Синтез чипов, гибридизация и детекция гибридизации проводились по протоколу производителя (CustomArray, США). Первичная обработка данных осуществлялась стандартным программным пакетом ElectraSense, предназначенным для обработки данных с этого микрочипа. Данные были отфильтрованы и нормализованы с использованием стандартного пакета R Bioconductor [http://www.bioconductor.org].

Для идентификации дифференциально экспрессированых генов мы использовали алгоритм EdgeR [30]. Порог значимости по p-value был установлен равным 0,05. Порог значимости по уровню изменения экспрессии, равный логарифму по основанию 2 от отношения уровня экспрессии гена в фибробластах к уровню его экспрессии в МСК десны (log2FC), был установлен не менее 0,5 по модулю. Сведения о биологических процессах, сигнальных путях и каскадах, молекулярных функциях, а также о клеточной локализации экспрессии генов были взяты из открытых баз данных, таких как Gene Ontology [31], UniProt [32], ConsensusPathDB [33].

Результаты

При анализе данных из 3700 отфильтрованных генов (рис. 1) значимое изменение экспрессии при сравнении профилей МСК десны и фибробластов кожи зарегистрировано для 153 генов (рис. 2). Из них отобраны 19 значимых дифференциально экспрессированных генов, для которых были проанализированы основные сигнальные пути (рис. 3, табл.). Выделены 4 основных сигнальных каскада, которые отличают экспрессионный профиль МСК десны от фибробластов кожи.

1. p38-MAPK сигнальный путь. В него входят следующие гены с повышенным уровнем экспрессии в МСК десны: *MAPK13, MEF2B, UBE2N, YWHAG*. Активация данного сигнального пути связана с развитием иммунного ответа и запуском процессов воспаления, а также приводит к запуску программы диференцировки клеток в миогенном направлении даже в условиях высокого митогенного роста [14].

2. NOTCH сигнальный путь, инактивация которого приводит к дифференцировке мышечных клеток-предшественниц. Ген-маркер данного пути, который показал повышенную экспрессионную активность в МСК десны – *ITCH*, играет важную роль в регуляции иммунного ответа, запускает процесс деградации NOTCH1. Значительно сниженный уровень экспрессии в МСК десны показал ген *AGO1*, участвующий в ингибировании транскрипционной активности генов путем связывания с микроРНК и (или) короткой интерферирующей РНК и тем самым подавляя трансляцию комплементарной мРНК.

3. NCAM сигнальный путь и другие гены, отвечающие за формирование и рост нейронов. Необходимым условием миогенеза является дифференцировка клеток в нейрогенном направлении. В МСК десны отмечена гиперэкспрессия *NCAN, PTPRA, HRH1, ARHGAP32, GNG12*.

4. Группы сигнальных путей, в которых участвуют гены, отвечающие за мышечное сокращение, развитие и дифференцировку в миогенном направлении: *MYOG, MEF2B, SNW1, MYH10, IGF1, GAS8, NFE2L1, DYNLL1, FBN1*. Эти гены-маркеры показали повышенную экспрессионную активность в МСК десны.

Исследование профилей МСК десны показало также наличие экспрессии генов основных белков и поверхностных антигенов, характерных для МСК: NT5E (CD73), Endoglin (CD105), коллаген I и III типов, эластин, виментин. При этом в профилях экспрессии отсутствовали эпителиальные (CD324, цитокератины) и гемопоэтические (CD31, CD34, CD45) маркеры. Данный факт подтверждает, что изучаемая популяция МСК соответствует общепринятым критериям, применяющимся для идентификации этих клеток.

Обсуждение

Как и в любом другом типе тканей, изменения морфологии и функции клеток во время выполнения пре- или постнатальной программы миогистогенеза запускаются за счет ремоделирования клеточного транскриптома. Последнее происходит таким образом, что гены, необходимые для данного типа клеток или для обеспечения конкретной функции клеток (например, пролиферации, мышечного сокращения, ответа на повреждение и т.д.), экспрессируются на определенном и достаточном уровне [34]. Модификации в генах мышечных клеток-предшественниц достаточно обширны и выражаются не только в изменениях амплитуды экспрессии, но и в изменении числа одновременно регулирующихся генов. Например, в процессе дифференцировки миобластов в миосимпласты и мышечные трубочки одновременная экспрессия сотен эффекторных генов клеточного цикла снижается с высоких значений до нуля [35]. При этом необходимо, чтобы изменения экспрессии генов происходили упорядоченно и согласованно [36].

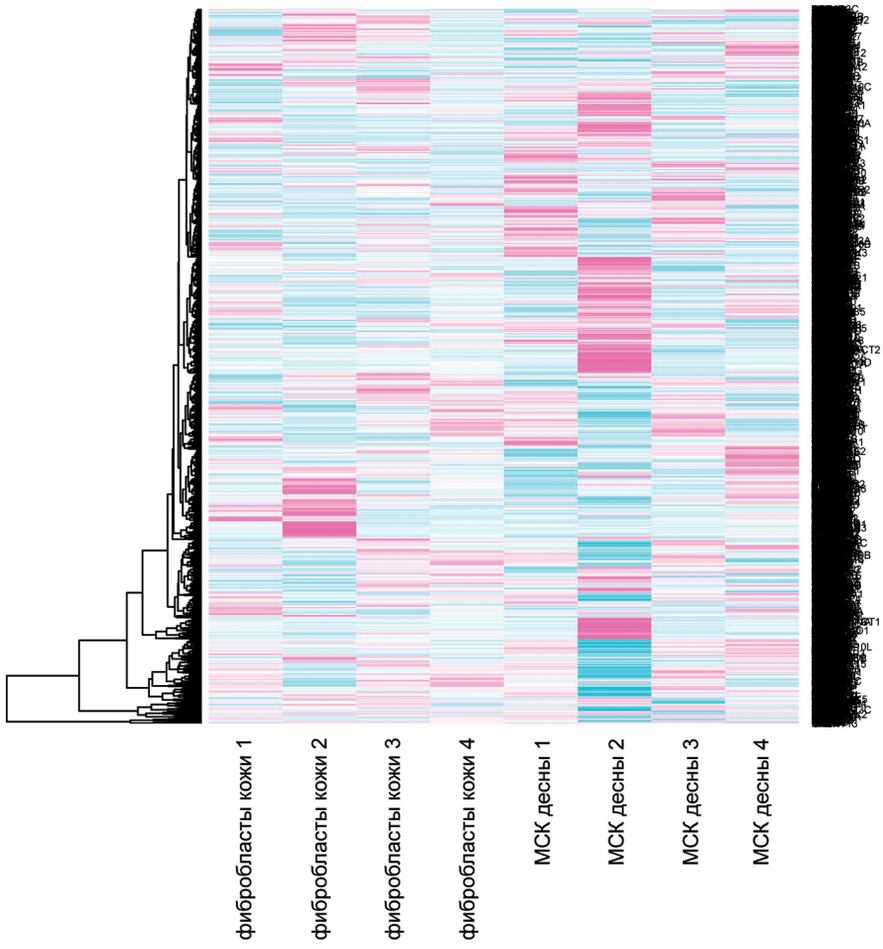

Рис. 1.
Тепловая карта профилей экспрессии 3700 генов, полученных при фильтрации данных микрочипового анализа

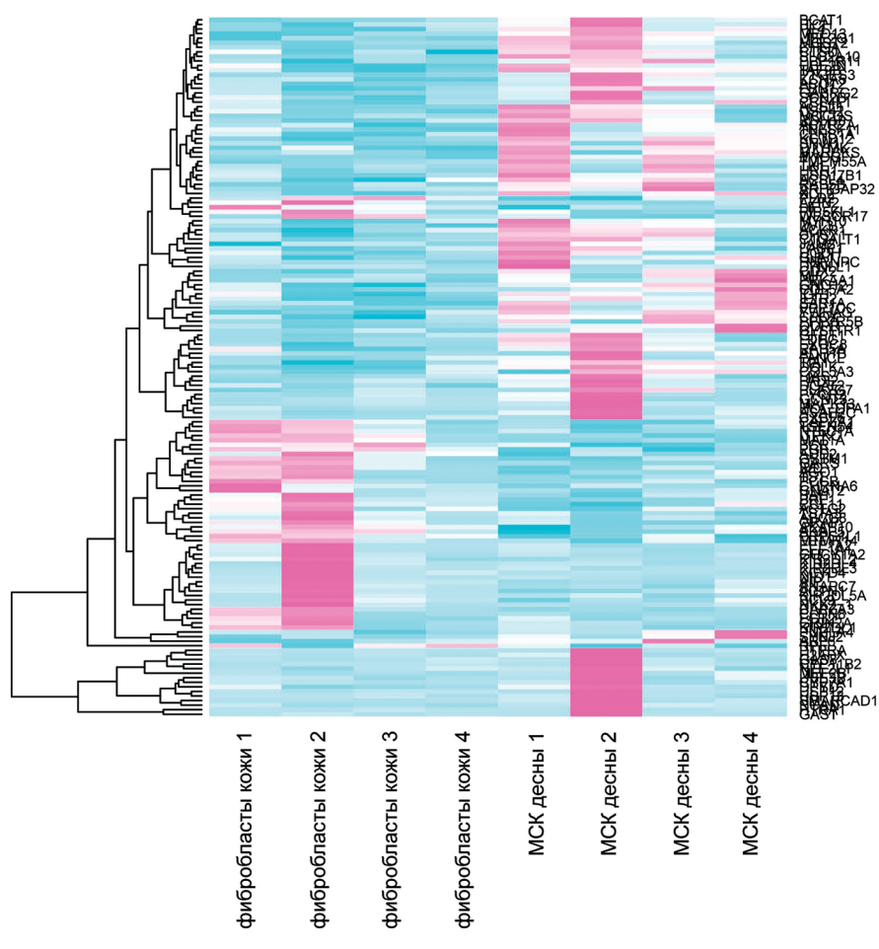

Рис. 2.
Тепловая карта профилей экспрессии 153 генов, которые дифференциально экспрессированы в МСК десны по сравнению с фибробластами кожи

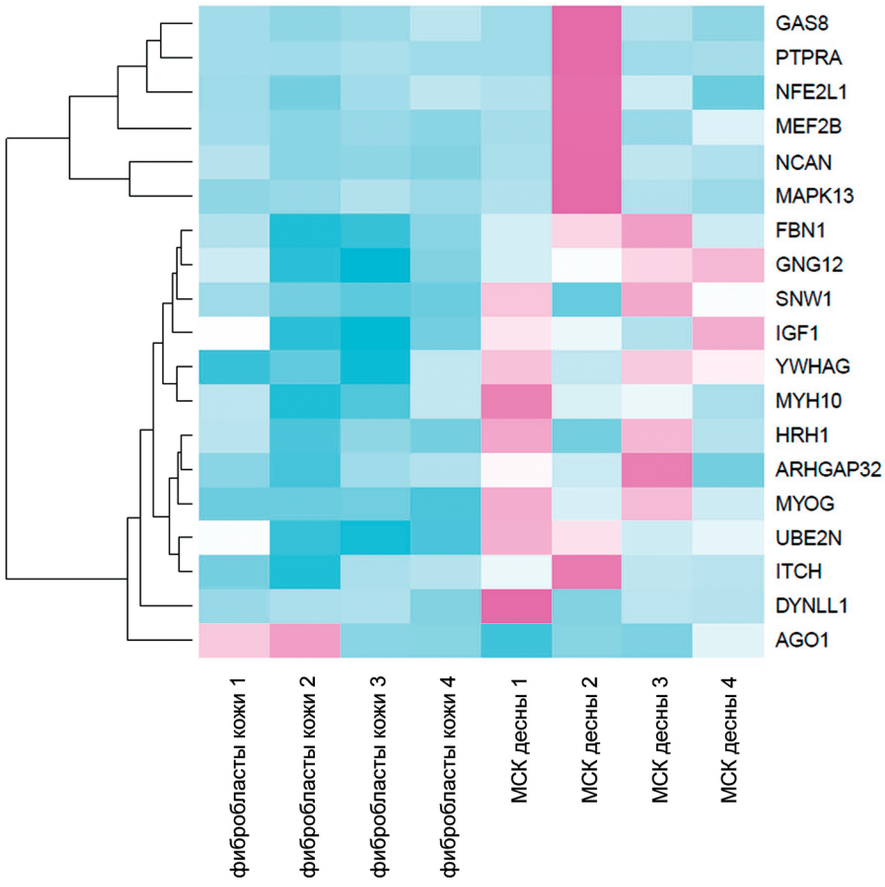

Рис. 3.
Тепловая карта профилей экспрессии 19 значимых дифференциально экспрессированных генов МСК десны, для которых проанализированы основные сигнальные пути

Таблица. **Список значимых дифференциально экспрессированных генов**

Ген	log2FC
NCAN	1,879129625
MYOG	1,658383834
GAS8	1,157149669
PTPRA	1,13594848
MAPK13	0,934931759
HRH1	0,933310382
ARHGAP32	0,903851765
DYNLL1	0,892839823
GNG12	0,829719846
FBN1	0,800615294
MEF2B	0,757194306
UBE2N	0,733028652
SNW1	0,729163894
YWHAG	0,642339164
MYH10	0,628740109
ITCH	0,584086128
IGF1	0,559622467
AGO1	-0,740596485
NFE2L1	0,996917023

Механизмы, по которым осуществляются как каноническая, так и неканоническая дифференцировка мультипотентных клеток в миогенном направлении, до конца не изучены. В настоящее время идентифицировано большое количество транскрипционных факторов, экспрессируемых элементами скелетной мышечной ткани на различных этапах ее развития или регенерации. Часть из них являются строго специфичными. Миогенные регуляторные факторы (МРФ) представляют собой группу из четырех основных связанных транскрипционных факторов семейства спираль-петля-спираль (helix-loop-helix): *MyoD, Myf5, Myog и MRF4* [37]. Следует отметить, что МРФ не действуют в одиночку, а реализуют свои эффекты при взаимодействии с множеством других белков, преимущественно экспрессируемых мышечной тканью [38-40]. Также известны факторы, тесно связанные с миогенезом, которые контролируют транскрипцию за счет множественной коактивации или репрессии генов [34, 41], ацетилирования гистонов [42], метилирования ДНК [34, 43, 44], влияния на экспрессию микроРНК [45] и МРФ [46]. Кроме этого, гены семейства МРФ играют неидентичную роль во взрослом и эмбриональном состоянии [47, 48].

Известно, что, транскрипционные факторы, образуемые МСК после слияния с мышечными волокнами, могут регулировать экспрессию генов в формирующемся мышечном волокне, и наоборот, мРНК мышечных волокон могут запускать миогенную программу в МСК [49, 50]. Показана возможность увеличения выхода функциональных клеток при сме-

шивании двух популяций [51]. Тем не менее еще не существует свидетельств полной регенерации мышечной ткани только за счет МСК [11, 52].

При анализе транскриптомных профилей генома МСК десны нами получены данные, свидетельствующие о значимой активации и (или) инактивации сигнальных путей и основных генов, идентифицированых для популяции миосателлитных клеток человека [14]. В частности, такие сигнальные пути как p38 MAPK, NOTCH и другие группы, отвечающие за пролиферацию и дифференцировку в рабдомиогенном направлении, процессы самообновления или самоподдержания в популяции сателлитных клеток.

В то же время полного совпадения в паттернах экспрессии генов между стабильной популяцией МСК десны и миосателлитных клеток человека, проходящих миогенную дифференцировку [47, 53], а также дифференцированных в миогенном направлении клеток, полученных из нетипичных источников [16, 18], отмечено не было. Можно полагать, что особенности поведения и специфическая эпигеномная модификация МСК десны, как и их фенотипические особенности связаны с эмбриональным происхождением из нервного гребня.

Гены, ассоциированные со скелетной мускулатурой

Установлены различия между МСК десны и фибробластами кожи по следующим группам сигнальных путей, в которых участвуют гены, отвечающие за мышечное сокращение, развитие и дифференцировку клеток в рабдомиогенном направлении: *MYOG, MEF2B, SNW1, MYH10, IGF1, GAS8, NFE2L1, DYNLL1, FBN1* (см. табл. 1). Эти гены-маркеры показали повышенную экспрессионную активность в МСК десны, что согласуется с установленной нами способностью клеток десны к дифференцировке в миогенном направлении. Для них в открытых базах данных [31–33] были найдены ассоциации со скелетной мускулатурой, однако в настоящее время детальное описание функций в литературных источниках имеется не для всех указанных генов.

Миогенин (myogenin, MYOG). Ген *MYOG* играет ключевую роль в терминальной дифференцировке коммитированных миобластов в состояние, предшествующее слиянию в миосимпласты, причем его активация требует скоординированного действия *MEF2* и *NF1*, но не *Myf5* или *MyoD* [54,55]. Более того, отмечается рост экспрессии *MYOG* и *MEF2C* вместе со снижением *Myf5* и *MyoD* после активации сателлитных клеток [14].

Пик экспрессии *MYOG* наблюдается при переходе от одноядерных мышечных клеток-предшественниц к миосимпластам и мышечным трубочкам с последующим постепенным снижением его уровня [47, 53]. Это подтверждают и наблюдения за процессами рабдомиогистогенеза у мутантных животных с выключеным *MYOG*. Так, у мышей с неактивным миогенином, продемострирована способность миобластов таргетно мигрировать и специализироваться во время эмбриогенеза, но при этом отмечено малое число слияний с образованием мышечных трубочек [56]. Кроме того, активация этого гена приводит к индукции рабдомиогистогенеза в различных типах клеток и тканей in vitro [57].

Следует отметить, что миогенная дифференцировка популяции МСК десны запускается путем снижения процентного содержания сыворотки в культуральной среде [27]. Результаты исследования, полученные A. Salminen с соавт. (1991), показали наличие обратной зависимости между концентрацией сыворотки и экспрессией миогененина [58]. Кроме этого, обращает на себя внимание факт повышенной экспрессии миогенина в МСК десны, при отсутствии экспрессии других генов МРФ, что возможно обусловлено остановкой программы миогенеза в данных клетках еще во время эмбриогенеза, по аналогии с обнаруженными S. Tajbakhsh с соавт. (1994) миогенными клетками в нервной трубке [59]. Необходимо отметить также, что нами установлена экспрессия миогенина в МСК десны посредством ПЦР-анализа (неопубликованные данные), однако при проведении иммунофлуоресцентного анализа данный маркер выявлен не был [27]. Этот факт, возможно, обусловлен пострансрипционной регуляцией экспрессии, что было описано, в частности, для *MyoD* [34, 43].

Миостимулирующий фактор 2 (MEF2B, myocyte enhancer factor-2). В нашей работе показано усиление экспрессии *MEF2B* (вместе с *MYOG*) в МСК десны. Группа генов *MEF2* повсеместно экспрессируется тканями взрослого организма [60], а также их постоянная экспрессия наблюдается в МСК [61].

Данные гены необходимы для миогенной дифференцировки и действуют как усилители транскрипционной активности группы МРФ [53]. T. Morisaki с соавт. (1997) указали на важную роль именно *MEF2B* в дифференцировке рабдомиогенных клеток-предшественниц во время эмбриогенеза [62]. Во взрослом состоянии гиперполяризация мембраны через входящий калиевый канал Kir2.1 и Ca^{2+} зависимый путь запускает экспрессию *MEF2* совместно с *MYOG*, во время дифференцировки миобластов [63]. Как было показано ранее, MEF2 является сильным трансактиватором, который связывается с теми же последовательностями, что и остальные члены семейства МРФ [64]. Кроме того, белок, кодируемый этим геном, связывается с гистоном HDACs (class II histone deacetylase) в кальций-зависимой манере и таким образом участвует в подавлении активности множества генов [65]. D.G. Edmondson с соавт. (1992) установили ауторегуляторную связь между *MYOG* и *MEF2*. Показано, что эти два гена индуцируют экспрессию друг друга, тем самым поддерживая миогенную дифференцировку [39].

SNW домен, кодирующий белок 1 (SNW Domain-Containing Protein 1, SNW1). Любопытная роль SNW1 обусловлена тем, что совместно с поли (A)-связывающим белком (Poly(A)-binding protein) он участвует в альтернативном сплайсинге генов МРФ, приводя к изменению их экспрессии. Помимо этого *SNW1* известен как регулятор действия семейства костных морфогенетических белков (bone morphogenic protein, BMP) в процессе дифференцировки клеток нервного гребня [66]. Следует отметить, что и МСК десны происходят из данного эмбрионального зачатка. Кроме того показано, что некоторые представители семейства BMP активно задействованы в регуляции рабдомиогистогенеза [53].

Тяжелая цепь B немышечного миозина II (non-muscle myosin II Heavy Chain-B, MYH10). MYH10 не участвует в построении сократительных элементов скелетной мускулатуры, но его экспрессия вместе с тяжелой цепью A немышечного миозина (*MYH9*) отмечается в миофибробластах, фибробластах и

МСК [67]. N.T. Swailes с соавт. (2006) с помощью антисмысловых олигонуклеотидов показали, что продукты данных генов играют роль в слиянии и изменении формы миобластов [68]. В работе C.M. Lo с соавт. (2004) выявлено также, что *MYH10* задействован в установлении направления движения клетки [69]. В МСК десны нами выявлен повышенный уровень экспрессии MYH10, однако уровень экспрессии MYH9 (который, как известно, участвует в формировании везикул между актиновыми филаментами стенок соприкасающихся миобластов и их слияния [70]), оставался без изменений.

Инсулиноподобный фактор роста-1 (Insulin-like growth factor 1, IGF-1). Нами отмечена повышенная экспрессия *IGF-1*. Этот ген, а также его транскрипционные изоформы активно задействованы в регенерации и гипертрофии мышечных волокон посредством регуляции процессов пролиферации и дифференцировки [71], синтеза белков [72]. J. Lu с соавт. (2000), изучая подавление экспрессии генов рабдомиогенной дифференцировки посредством взаимодействия с HDAC (class II Histone Deacetylases), установили, что увеличение концентрации IGF-1 приводит к активации дифференцировки миобластов с последующим образованием мышечных трубочек [73].

Показано также, что *IGF-1* играет важную роль в регуляции жизнедеятельности клеток. Согласно данным, полученным Y. Huang с соавт. (2012), добавление в культуральную среду IGF-1 в дозе 20 нг/мл приводило к снижению пролиферативной активности МСК на 20%, на фоне трехкратного увеличения миграционной активности и выработки C-X-C хемокинового рецептора 4 типа (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) – рецептора фактора роста стромальных клеток-1 (Stromal cell-derived factor-1, SDF-1) [74]. Отмечено, что эндогенная выработка IGF-1 МСК в дозе 100 нг/мл/сут. увеличивает их выживаемость вдвое [75]. При анализе иного типа сократительных структур, а именно – кардиомиоцитов, те же авторы указали на параллельное 20-кратное увеличение выработки SDF-1, что in vivo сопровождалось активной мобилизацией МСК в зону травмы и репарацией миокарда. Анализируя секреторный профиль МСК десны, мы выявили повышенную выработку SDF-1 этими клетками [76], что, по-видимому, может оказать положительный эффект на регенерацию скелетной мускулатуры при использовании для терапии данного типа клеток. В свою очередь A. Sacco с соавт. (2005) продемонстрировали, что при концентрации IGF-1 100 нг/мл наблюдается двукратное увеличение частоты слияния МСК с дифференцированными мышиными трубочками [77].

Протеин остановки роста специфический 8 (growth arrest-specific 8, GAS8). Данный белок встречается и активен во множестве тканей. Его роль в развитии скелетной мускулатуры практически не изучена. Установлено, что инактивация GAS8 во время эмбриогенеза у Danio rerio приводит к нарушению развития мышечных волокон медленного типа [78].

Ядерный (эритроид-вторичный 2)-подобный фактор 1 (nuclear factor, erythroid 2 like 1, NFE2L1). NFE2L1 у млекопитающих регулирует экспрессию генов, отвечающих за дифференцировку и развитие клеток, оксидативный стресс и воспаление. S.T. Zhang с соавт. (2013), оценивая динамику экспрессии *NFE2L1* после травмы, установили, что ее пик приходится на воспалительную фазу. Активность гена зарегистрирована в нейтрофилах, макрофагах, миофибробластах и мышечных трубочках, тем самым, по мнению авторов, *NFE2L1* участвует в регуляции ответа на оксидативный стресс и регенерацию после повреждения скелетной мускулатуры [79].

N. Furuya с соавт. (2014) установили, что транслокация *NFE2L1* посредством активации PARK2 опосредованной митофагии ответственна за активацию аутофагии в денервированых скелетных мышцах [80].

Легкая цепь динеина, LC8 тип 1 (dynein, light chain, LC8-type 1, DYNLL1). DYNLL1 относится к генам, отвечающим за метаболизм карбогидратов. Его экспрессия находится в прямой зависимости от физической нагрузки, так как *DYNLL1* входит в состав внутриклеточной транспортной системы и, по-видимому, активируется при необходимости повышенной утилизации глюкозы посредством GLUT-4 [81].

Фибриллин-1 (Fibrillin 1, FBRN-1). Фибриллин-1 не вырабатывается непосредственно скелетной мускулатурой, он обнаруживается в соединительной ткани. *FBRN-1* влияет на прикрепление мышечных фибрилл к эластическим волокнам, базальной мембране для передачи растягивающего усилия, необходимого для развития и поддержания полноценного морфофункционального статуса скелетной мускулатуры [82, 83].

Другие сигнальные пути

Помимо обнаруженных различий в экспрессии отдельных генов, задействованных в формировании мышечной ткани, анализ, проведенный нами, показал изменения в экспрессии генов сигнальных путей p38 MAPK и NOTCH, регулирующих дифференцировку и самоподдержание миогенных клеток, а также генов, участвующих в нейрональной дифференцировке.

p38-MAPK сигнальный путь. Нами обнаружен повышенный уровень экспрессии в МСК десны следующих генов p38 MAPK сигнального пути: *MAPK13, MEF2B, UBE2N, YWHAG*. Данное наблюдение особенно актуально, учитывая недавнее описание роли p38 MAPK в самоподдержании сателлитных клеток. G.W. Charville с соавт. (2015) установили, что активация данного пути приводит к запуску программы дифференцировки клеток в миогенном направлении даже в условиях сильного митогенного воздействия, что, в свою очередь, ведет к ограничению экспансии миосателлитных клеток in vitro. В то же время ингибирование данного пути способствует многократному повышению эффективности пролиферации миосателлитных клеток и, более того, приводит к четырехкратному увеличению доли прижившихся клеток после трансплантации [14]. На основании собственных наблюдений мы отмечаем, что МСК десны как минимум до 10 пассажа сохраняли способность к образованию миосимпластов в культуре с эффективностью около 20% [27]. Таким образом, несмотря на факт наличия экспрессии генов данного сигнального пути, на фоне отсутствия самостоятельной дифференцировки клеток активность p38 MAPK в МСК десны, по видимому, подавляется неизвестным фактором.

NOTCH – сигнальный путь. В нашем эксперименте зарегистрировано усиление экспрессии генов NOTCH-сигнального пути в МСК десны. Роль данного пути в формировании мышечной ткани примечательна, так как его активность тормозит программу миогенеза, в частности, во время эмбрионального

развития, препятствуя преждевременной дифференцировке клеток парааксиальной мезодермы [84, 85]. Мы отмечаем значительно сниженный уровень экспрессии гена *AGO1*, который играет важную роль в ингибировании транскрипционной активности генов путем связывания с микроРНК и (или) малой интерферирующей РНК, тем самым подавляя трансляцию комплементарной мРНК. В свою очередь, уровень *ITCH*, который участвует в запуске процесса деградации NOTCH1, наоборот, повышен. Известно, что инактивация NOTCH-сигнального пути приводит к дифференцировке мышечных клеток-предшественниц [86]. Более того, как показали Y. Wen с соавт. (2012), использование ингибитора NICD — внутриклеточного домена NOTCH1 рецептора, приводит к активации программы мышечной дифференцировки. Авторы установили также, что, что активность NICD опосредованная через транскрипционный фактор RBP-J стимулирует выработку PAX7 и способствует пролонгированному культивированию миосателлитных клеток [87].

Следует отметить, что с одной стороны в МСК десны наблюдается изменение активности p38 MAPK и NOTCH сигнальных путей, которые способствуют дифференцировке. С другой стороны культуры клеток находятся в стабильном состоянии и не вырабатывают миогенные маркеры спонтанно. Таким образом, можно заключить, что МСК десны имеют предрасположенность к рабдомиогенезу, но для запуска программы им необходимы дополнительные стимулы, которые в частности реализуются через *MEF2* [44, 88, 89] или *миогенин* [58].

Экспрессия генов нейронального направления

В МСК десны отмечены активация NCAM сигнального пути и повышенная экспрессия других генов, отвечающих за дифференцировку в нейрональном направлении: *NCAN, PTPRA, HRH1, ARHGAP32, GNG12.*

Данный факт, возможно, объясняется происхождением МСК десны из клеток нервного гребня, потомки которых обладают способностью к мультипотентной дифференцировке [90]. В рамках данной работы мы не можем установить, сохраняется ли данное свойство после проведения дифференцировки МСК десны в миогенном направлении или же оно характерно только для недифференцированных МСК.

Ключевая роль нейрогенной стимуляции в поддержании и регенерации скелетной мускулатуры экспериментально доказана. Так, в работе S.S. Jejurikar с соавт. (2002) продемонстрировано, что в денервированных мышцах количество миосателлитных клеток сначала увеличивается, но в течение 16–18 мес. их количество многократно снижается [91], полного восстановления денервированных мышц не происходит. Это обуславливается усилением апоптоза в миосателлитоцитах в условиях отсутствия иннервации [80, 91].

Показано, что использование биореакторов для тканевой инженерии, воздействующих на культивируемые МСК электрическим полем, а также оказывающих импульсную стимуляцию, не только приводит к упорядоченной параллельной пространственной ориентации МСК, но и к усилению их миогенной дифференцировки [61].

Потенциальная способность стимулировать нейрогенез вместе с ангио- и миогенезом может играть положительную роль в восстановлении скелетной мускулатуры.

Заключение

Несмотря на то, что пока не было описано случаев полной регенерации мышечной ткани (реституции) при помощи трансплантации клеток с рабдомиогенным потенциалом, отличных от миосателлитоцитов, достоверно доказан значимый вклад МСК в восстановление скелетной мускулатуры [16, 20, 21, 61]. Более того, в условиях отсутствия возможностей масштабной экспансии $PAX7^+$ клеток in vitro в объемах, достаточных для клинического применения, продолжаются поиски альтернативных источников клеточного материала [14, 15].

Выявленная нами способность МСК десны к миогенной дифференцировке на фоне неканонического паттерна экспрессии МРФ и стабильности популяции, а также возможность их экспансии in vitro открывают перспективы для применения этих клеток в регенеративной медицине с целью коррекции мышечной патологии. Данные настоящего эксперимента позволяют рассматривать МСК десны в качестве группы миогенных клеток с остановленной программой мышечной дифференцировки, которая подобна обнаруженным S. Tajbakhsh с соавт. (1994) миогенным клеткам в нервной трубке, «захваченных» ею во время гаструляции [59]. Мы планируем исследовать геномные профили дифференцированных в рабдомиогенном направлении МСК десны (в том числе их субпопуляций) в дальнейших работах.

Благодарности

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

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Meadows E., Cho J.-H., Flynn J.M., Klein W.H. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. Dev. Biol. 2008; 322(2): 406-14.
2. Olson E.N., Brennan T.J., Chakraborty T. et al. Molecular control of myogenesis: antagonism between growth and differentiation. Mol. Cell Biochem. 1991; 104(1-2): 7-13.
3. Mohun T. Muscle differentiation. Curr. Opin. Cell Biol. 1992; 4(6): 923-8.
4. Andrés V., Walsh K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. J. Cell Biol. 1996; 132(4): 657-66.
5. Moran J.L., Li Y., Hill A.A. et al. Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. Physiol. Genomics 2002; 10(2): 103-11.
6. Janot M., Audfray A., Loriol C. et al. Glycogenome expression dynamics during mouse C2C12 myoblast differentiation suggests a sequential reorganization of membrane glycoconjugates. BMC Genomics 2009;10: 483. doi: 10.1186/1471-2164-10-483.
7. Rajan S., Chu Pham Dang H., Djambazian H. et al. Analysis of early C2C12 myogenesis identifies stably and differentially expressed transcriptional regulators whose knock-down inhibits myoblast differentiation. Physiol. Genomics 2012; 44(2): 183-97.
8. Studitsky A.N. Free auto- and homografts of muscle tissue in experiments on animals. Ann. N.-Y. Acad. Sci. 1964; 120: 789-801.

9. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961; 9: 493-5.
10. Ehrhardt J., Morgan J. Regenerative capacity of skeletal muscle. Curr. Opin. Neurol. 2005; 18(5): 548-53.
11. Sambasivan R., Yao R., Kissenpfennig A. et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. Dev. 2011; 138(17): 3647-56.
12. Lepper C., Partridge T.A., Fan C.-M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Dev. 2011; 138(17): 3639-46.
13. Hawke T.J., Garry D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J. Appl. Physiol. 2001; 91(2): 534-51.
14. Charville G.W., Cheung T.H., Yoo B. et al. Ex Vivo Expansion and In Vivo Self-Renewal of Human Muscle Stem Cells. Stem cell reports 2015; 5(4): 621-32.
15. Tedesco F.S., Dellavalle A., Diaz-Manera J. et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. J. Clin. Invest. 2010; 120(1): 11-9.
16. Di Rocco G., Iachininoto M.G., Tritarelli A. et al. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. J. Cell Sci. 2006; 119(14): 2945-52.
17. Liu G., Sun X., Bian J. et al. Correction of diabetic erectile dysfunction with adipose derived stem cells modified with the vascular endothelial growth factor gene in a rodent diabetic model. PLoS One 2013; 8(8): e72790.
18. Xynos A., Corbella P., Belmonte N. et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells undergo myogenic differentiation following a Pax-7 independent pathway. Stem Cells 2010; 28(5): 965-73.
19. Catacchio I., Berardi S., Reale A. et al. Evidence for Bone Marrow Adult Stem Cell Plasticity: Properties, Molecular Mechanisms, Negative Aspects, and Clinical Applications of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Transdifferentiation. Stem Cells Int. 2013; 2013: 1-11. doi: 10.1155/2013/589139.
20. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 1998; 279(5356): 1528-30.
21. Dezawa M., Ishikawa H., Itokazu Y. et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. Science 2005; 309(5732): 314-7.
22. Зорин В.Л., Зорина А.И., Пулин А.А. и др. Перспективы использования клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Популяции стволовых клеток мышечного и немышечного происхождения. Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2015; 59(3): 106-17.
23. Зорин В.Л., Зорина А.И., Пулин А.А. и др. Перспективы использования клеток, обладающих миогенным потенциалом, в лечении заболеваний скелетных мышц: обзор исследований. Сателлитные клетки. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(2): 88-98.
24. Grogan B.F., Hsu J.R. Volumetric muscle loss. J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2011; 19 Suppl 1: S35-7.
25. Rizzi R., Bearzi C., Mauretti A. et al. Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. Muscle, Ligaments, Tendons J. 2012; 2(3): 230-4.
26. Luz M.A.M., Marques M.J., Santo Neto H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. Brazilian J. Med. Biol. Res. 2002; 35(6): 691-5.
27. Зорин В.Л., Еремин И.И., Рыбко В.А. и др. Слизистая оболочка полости рта - новый источник для получения миобластов. Гены и Клетки 2014; 9(3): 76-84.
28. Gilbert S.F. Developmental Biology. 10th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.; 2013.
29. Зорин В.Л., Зорина А.И., Еремин И.И. и др. Сравнительный анализ остеогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток слизистой оболочки полости рта и костного мозга. Гены и Клетки 2014; 9(1): 50-7.
30. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 2010; 26(1): 139-40.
31. Gene Ontology Consortium. Gene Ontology Consortium: going forward. Nucleic Acids Res. 2015; 43 (Database issue): D1049-56.
32. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res. 2015; 43 (Database issue): D204-12.
33. Kamburov A., Stelzl U., Lehrach H., Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. Nucleic Acids Res. 2013; 41 (Database issue): D793-800.
34. Blais A. Myogenesis in the genomics era. J. Mol. Biol. 2015; 427(11): 2023-38.
35. Shen X., Collier J.M., Hlaing M. et al. Genome-wide examination of myoblast cell cycle withdrawal during differentiation. Dev. Dyn. 2003; 226(1): 128-38.
36. Dilworth F.J., Blais A. Epigenetic regulation of satellite cell activation during muscle regeneration. Stem Cell Res. Ther. 2011; 2(2): 18.
37. Berkes C.A., Tapscott S.J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. Semin Cell Dev. Biol. 2005; 16(4-5): 585-95.
38. Liu Y., Chu A., Chakroun I. et al. Cooperation between myogenic regulatory factors and SIX family transcription factors is important for myoblast differentiation. Nucleic Acids Res. 2010; 38(20): 6857-71.
39. Edmondson D.G., Cheng T.C., Cserjesi P. et al. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. Mol. Cell Biol. 1992; 12(9): 3665-77.
40. Armand A.-S., Bourajjaj M., Martínez-Martínez S., et al. Cooperative synergy between NFAT and MyoD regulates myogenin expression and myogenesis. J. Biol. Chem. 2008; 283(43): 29004-10.
41. Yang Z.J.P., Broz D.K., Noderer W.L. et al. p53 suppresses muscle differentiation at the myogenin step in response to genotoxic stress. Cell Death Differ. 2015;22(4): 560-73.
42. Liu L., Cheung T.H., Charville G.W. et al. Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. Cell Rep. 2013; 4(1): 189-204.
43. Bharathy N., Ling B.M.T., Taneja R. Epigenetic regulation of skeletal muscle development and differentiation. Subcell Biochem. 2013; 61: 139-50.
44. Brand-Saberi B. Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. Ann. Anat. 2005; 187(3): 199-207.
45. Shenoy A., Blelloch R.H. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014; 15(9): 565-76.
46. Buckingham M., Rigby P.W.J. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. Dev. Cell 2014; 28(3): 225-38.
47. Bentzinger C.F., Wang Y.X., Rudnicki M.A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012; 4(2). doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
48. Cao Y., Kumar R.M., Penn B.H. et al. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. EMBO J. 2006; 25(3): 502-11.
49. Kirillova I., Gussoni E., Goldhamer D.J., Yablonka-Reuveni Z. Myogenic reprogramming of retina-derived cells following their spontaneous fusion with myotubes. Dev. Biol. 2007; 311(2): 449-63.
50. Asakura A. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. J. Cell. Biol. 2002; 159(1): 123-34.
51. Beier J.P., Bitto F.F., Lange C. et al. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with primary myoblasts. Cell. Biol. Int. 2011; 35(4): 397-406.
52. Gang E.J., Darabi R., Bosnakovski D. et al. Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. Exp. Cell. Res. 2009; 315(15): 2624-36.
53. Braun T., Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2011; 12(6): 349-61.
54. Johanson M., Meents H., Ragge K. et al. Transcriptional activation of the myogenin gene by MEF2-mediated recruitment of myf5 is inhibited by adenovirus E1A protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; 265(1): 222-32.
55. Valdez M.R., Richardson J.A., Klein W.H., Olson E.N. Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. Dev. Biol. 2000; 219(2): 287-98.
56. Myer A., Wagner D.S., Vivian J.L. et al. Wild-type myoblasts rescue the ability of myogenin-null myoblasts to fuse in vivo. Dev. Biol. 1997; 185(2): 127-38.
57. Ohkawa Y., Marfella C.G.A., Imbalzano A.N. Skeletal muscle specification by myogenin and Mef2D via the SWI/SNF ATPase Brg1. EMBO J. 2006; 25(3): 490-501.
58. Salminen A., Braun T., Buchberger A. et al. Transcription of the muscle regulatory gene Myf4 is regulated by serum components, peptide growth factors and signaling pathways involving G proteins. J. Cell. Biol. 1991; 115(4): 905-17.
59. Tajbakhsh S., Vivarelli E., Cusella-De Angelis G. et al. A population of myogenic cells derived from the mouse neural tube. Neuron 1994; 13(4): 813-21.
60. Satyaraj E., Storb U. Mef2 proteins, required for muscle differentiation, bind an essential site in the Ig lambda enhancer. J. Immunol. 1998; 161(9): 4795-802.
61. Bitto F.F., Klumpp D., Lange C. et al. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a newly developed neurotised AV-loop model. Biomed. Res. Int. 2013; 2013: 935046.
62. Morisaki T., Sermsuvitayawong K., Byun S.H. et al. Mouse Mef2b gene: unique member of MEF2 gene family. J. Biochem. 1997; 122(5): 939-46.
63. Konig S., Hinard V., Arnaudeau S. et al. Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. J. Biol. Chem. 2004; 279(27): 28187-96.
64. Molkentin J.D., Firulli A.B., Black B.L. et al. MEF2B is a potent transactivator expressed in early myogenic lineages. Mol. Cell. Biol. 1996; 16(7): 3814-24.

65. Han A., He J., Wu Y. et al. Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2. J. Mol Biol. 2005; 345(1): 91-102.

66. Wu M.Y., Ramel M.-C., Howell M., Hill C.S. SNW1 is a critical regulator of spatial BMP activity, neural plate border formation, and neural crest specification in vertebrate embryos. PLoS Biol. 2011; 9(2): e1000593.

67. Ngo M.A., Müller A., Li Y. et al. Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts. Mol. Cell. Biochem. 2014; 392(1-2): 187-204.

68. Swailes N.T., Colegrave M., Knight P.J., Peckham M. Non-muscle myosins 2A and 2B drive changes in cell morphology that occur as myoblasts align and fuse. J. Cell. Sci. 2006; 119(17): 3561-70.

69. Lo C.-M., Buxton D.B., Chua G.C.H. et al. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. Mol. Biol. Cell. 2004; 15(3): 982-9.

70. Duan R., Gallagher P.J. Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. Dev. Biol. 2009; 325(2): 374-85.

71. De Arcangelis V., Coletti D., Conti M. et al. IGF-I-induced differentiation of L6 myogenic cells requires the activity of cAMP-phosphodiesterase. Mol. Biol. Cell. 2003; 14(4): 1392-404.

72. Philippou A., Maridaki M., Halapas A., Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. In Vivo 2007; 21(1): 45-54.

73. Lu J., McKinsey T.A., Zhang C.-L., Olson E.N. Regulation of Skeletal Myogenesis by Association of the MEF2 Transcription Factor with Class II Histone Deacetylases. Mol. Cell. 2000; 6(2): 233-44.

74. Huang Y., Qiu R., Mai W. et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2012; 13(1): 20-8.

75. Haider H.K., Jiang S., Idris N.M., Ashraf M. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair. Circ. Res. 2008; 103(11): 1300-8.

76. Самчук Д.П., Пулин А.А., Еремин И.И. и др. Сравнительный анализ секреторного профиля мезенхимальных стромальных клеток десны человека, дифференцированных в миогенном направлении. Гены и Клетки 2015; 10(3): 94-105.

77. Sacco A., Doyonnas R., LaBarge M.A., et al. IGF-I increases bone marrow contribution to adult skeletal muscle and enhances the fusion of myelomonocytic precursors. J. Cell. Biol. 2005; 171(3): 483-92.

78. Evron T., Philipp M., Lu J. et al. Growth Arrest Specific 8 (Gas8) and G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) cooperate in the control of Smoothened signaling. J. Biol. Chem. 2011; 286(31): 27676-86.

79. Zhang S.-T., Zhao R., Ma W.-X. et al. Nrf1 is time-dependently expressed and distributed in the distinct cell types after trauma to skeletal muscles in rats. Histol. Histopathol. 2013; 28(6): 725-35.

80. Furuya N., Ikeda S.-I., Sato S. et al. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. Autophagy 2014; 10(4): 631-41.

81. Latouche C., Jowett J.B.M., Carey A.L. et al. Effects of breaking up prolonged sitting on skeletal muscle gene expression. J. Appl. Physiol. 2013; 114(4): 453-60.

82. Behan W.M.H., Longman C., Petty R.K.H. et al. Muscle fibrillin deficiency in Marfan's syndrome myopathy. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2003; 74(5): 633-8.

83. De Lisio M., Jensen T., Sukiennik R.A. et al. Substrate and strain alter the muscle-derived mesenchymal stem cell secretome to promote myogenesis. Stem Cell Res. Ther. 2014; 5(3): 74.

84. Kopan R., Nye J.S., Weintraub H. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. Dev. 1994; 120(9): 2385-96.

85. Hirsinger E., Malapert P., Dubrulle J. et al. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. Dev. 2001; 128(1): 107-16.

86. Wen F., Wong H.K., Tay C.Y. et al. Induction of myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured on Notch agonist (Jagged-1) modified biodegradable scaffold surface. ACS Appl. Mater. Interfaces 2014 ;6(3): 1652-61.

87. Wen Y., Bi P., Liu W. et al. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. Mol. Cell. Biol. 2012; 32(12): 2300-11.

88. Lu J., McKinsey T.A., Nicol R.L., Olson E.N. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. PNAS USA 2000; 97(8): 4070-5.

89. Suzuki E., Guo K., Kolman M. et al. Serum induction of MEF2/RSRF expression in vascular myocytes is mediated at the level of translation. Mol. Cell. Biol. 1995; 15(6): 3415-23.

90. Cossu G. Unorthodox myogenesis: possible developmental significance and implications for tissue histogenesis and regeneration. Histol. Histopathol. 1997; 12(3): 755-60.

91. Jejurikar S.S., Marcelo C.L., Kuzon W.M. Skeletal muscle denervation increases satellite cell susceptibility to apoptosis. Plast. Reconstr. Surg. 2002; 110(1):160-8.

Поступила: 10.09.2015