

*На правах рукописи*

**СОКОЛОВА**

**Анастасия Владимировна**

**ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И РЕГЕНЕРАЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШЕЙ  
mdx ПОСЛЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ  
КОСТНОГО МОЗГА**

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург  
2010**

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институт цитологии  
РАН

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Михайлов Вячеслав Михайлович,**  
Институт цитологии РАН

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Михельсон Виктор Михайлович,**  
Институт цитологии РАН

член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук, профессор  
**Баранов Владислав Сергеевич,**  
Учреждение Российской академии  
медицинских наук Научно-исследовательский  
институт акушерства и гинекологии  
им. Д.О. Отта СЗО РАН

**Ведущая организация:** Санкт-Петербургский государственный  
Университет. Биолого-почвенный факультет

Защита состоится 28 мая 2010 года в \_\_ часов на заседании Диссертационного совета  
Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург,  
Тихорецкий пр., д.4.

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>;

адрес электронной почты института: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru);

факс института: (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан \_\_ апреля 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Мышечные дистрофии представляют собой гетерогенную группу генетических расстройств, характеризующихся прогрессирующей потерей силы скелетных мышц. Одной из самых распространенных и тяжелых форм мышечной дистрофии является X-сцепленная рецессивная мышечная дистрофия Дюшенна (МДД; см. список сокращений на с. 7) [1]. Для исследования возможностей лечения МДД используют различных животных, являющихся моделью этого заболевания [2, 3]. Наиболее широко используемой экспериментальной моделью МДД являются мыши mdx с точечной мутацией в X-хромосоме, приводящей к блокаде синтеза связанного с мембраной белка дистрофина [4, 5]. Обширные исследования мышей mdx показали, что с возрастом их скелетные мышцы подвергаются структурным и функциональным изменениям, сходным с теми, которые наблюдаются при МДД [6]. В настоящее время в качестве основных патогенетических механизмов, лежащих в основе повреждения мышечных волокон в отсутствие дистрофина и ассоциированного с ним белкового комплекса, рассматриваются: 1) ослабление сарколеммы в результате потери механической поддержки, обеспечиваемой дистрофином; 2) не соответствующий нормальному уровню приток кальция в клетки; 3) нарушение передачи сигналов клетками; 4) окислительный стресс; 5) периодически повторяющаяся ишемия мышц [7, 8]. Так, показано, что развивающийся в поперечнополосатых мышечных волокнах (ППМВ) мышей mdx окислительный стресс [9, 10] приводит к гибели ППМВ. Гибель мышечных волокон протекает преимущественно по типу апоптоза [11, 12, 13, 14]. За гибелью ППМВ следует регенерация. Постоянно повторяющиеся циклы дегенерации—регенерации, приводят к тому, что большая часть ППМВ имеет центрально расположенные ядра [15], указывающие на то, что дифференцировка ППМВ заторможена на стадии мышечных трубочек [14]. Кроме того, в скелетных мышцах мышей mdx наблюдаются нарушения структуры нейромышечных соединений (НМС) [15, 16].

В настоящее время проводятся интенсивные исследования, направленные на поиски путей восстановления нормальной структуры ППМВ мышей mdx. В работах используют как фармакологические подходы, так и методы генной [17] и клеточной терапии [18]. Широкое распространение также получило изучение возможностей

клеточной терапии с использованием стволовых клеток. Предполагается, что вхождение в состав мутантных ППМВ ядер стволовых клеток дикого типа с нормальным генотипом способно исправить метаболизм ППМВ и превратить их в нормальные сократительные клетки. В качестве источников стволовых клеток для трансплантации предлагают, в первую очередь, костный мозг [19, 20], мышечную ткань [21]. По литературным данным, наиболее эффективными клетками оказались мезоангиобласты и перициты [22, 23]. Однако, несмотря на разнообразие источников стволовых клеток, для которых показана способность дифференцироваться в миогенном направлении, и которые, соответственно, могут использоваться для клеточной терапии мышечных дистрофий, костный мозг остается наиболее доступным источником. Кроме того, до настоящего времени не достаточно изучено влияния на дифференцировку ППМВ полной замены мутантных клеток костного мозга (ККМ) мышей mdx на стволовые клетки костного мозга (СККМ) дикого типа. В частности, не получено объяснения низкой функциональной активности ядер СККМ, включившихся в состав ППМВ после такой замены. В качестве возможных агентов, стимулирующих экспрессию специфических для мышц генов с ядер трансплантированных клеток, могут, по-видимому, рассматриваться воздействия, влияющие на регенерацию тканей. В частности, способность значительно усиливать рост и регенерацию различных тканей показана для слабых комбинированных магнитных полей, настроенных на ион-параметрический резонанс для  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -КМП) [24, 25, 26, 27].

Таким образом, изучение участия СККМ, трансплантированных мышам mdx, в регенерации и дифференцировке ППМВ мышей mdx представляется актуальной задачей, как с точки зрения изучения регенерации скелетных мышц, так и с точки зрения разработки методов лечения МДД, моделью которой и являются мышцы mdx.

**Цели и задачи исследования.** Цель данной работы заключалась в изучении влияния трансплантированных местно или внутривенно стволовых клеток костного мозга мышей C57BL/6 на дифференцировку и регенерацию поперечнополосатых мышечных волокон мутантных мышей mdx. Для достижения данной цели решались следующие задачи:

1. Оценить участие стволовых клеток костного мозга дикого типа, трансплантированных внутримышечно или внутривенно, в регенерации поперечнополосатых мышечных волокон мышей mdx в сингенных условиях.

2. Оценить влияние внутримышечной трансплантации Lin(-) популяции стволовых клеток костного мозга дикого типа на структуру нейромышечных соединений скелетных мышц мышей mdx.

3. Исследовать изменение дифференцировки поперечнополосатых мышечных волокон мышей mdx на разных сроках после внутримышечной трансплантации Lin(-) стволовых клеток костного мозга нормальных мышей C57BL/6 по таким признакам, как уровень гибели поперечнополосатых мышечных волокон, изменение доли поперечнополосатых мышечных волокон без центрально расположенных ядер и экспрессия дистрофина.

4. Исследовать дифференцировку поперечнополосатых мышечных волокон радиационных химер mdx, полученных после облучения в дозе 5 Гр, и возможность усиления дифференцировочных процессов в мышцах этих мышей под действием слабых комбинированных магнитных полей, настроенных на ион-параметрический резонанс для Ca<sup>2+</sup>.

5. Исследовать дифференцировку поперечнополосатых мышечных волокон после сингенной внутривенной трансплантации клеток костного мозга дикого типа облученным в дозе 3 Гр мышам mdx.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. СККМ мышей C57BL/6 участвуют в регенерации ППМВ мутантных мышей mdx как после внутримышечной трансплантации, так и после внутривенного введения предварительно облученным животным.

2. Трансплантированные внутримышечно Lin(-) стволовые клетки костного мозга (Lin(-)-СККМ) мышей C57BL/6 усиливают дифференцировку ППМВ мышей mdx, что выражается в усилении синтеза дистрофина, увеличении доли ППМВ без центрально расположенных ядер (ЦЯ (-)), а также в снижении уровня гибели ППМВ.

3. Внутримышечная трансплантация Lin(-)-СККМ мышей C57BL/6 изменяет распределение кластеров (АХР) в НМС мышей mdx так, что приближает структуру НМС мышей mdx к структуре НМС нормальных мышей C57BL/6.

4. Внутривенная трансплантация ККМ мышей C57BL/6 мышам mdx, предварительно облученным рентгеновыми лучами в дозе 5 Гр, не приводит к нарастанию синтеза дистрофина в ППМВ. Воздействие  $Ca^{2+}$ -КМП усиливает дифференцировку и синтез дистрофина в скелетных мышцах радиационных химер мышей mdx, полученных путем внутривенной трансплантации ККМ мышам mdx, облученным в дозе 5 Гр.

5. Сингенная внутривенная трансплантация ККМ дикого типа после рентгеновского облучения в дозе 3 Гр вызывает усиление синтеза дистрофина в ППМВ, увеличивает долю ЦЯ (-) ППМВ и снижает долю погибших ППМВ у мышей mdx.

**Научная новизна работы.** Впервые показано, что внутримышечная трансплантация Lin(-)-СККМ дикого типа приводит к изменениям структуры НМС мышей mdx, которые приближают ее к структуре НМС нормальных мышей C57BL/6.

Впервые показано, что  $Ca^{2+}$ -КМП способно влиять на функционирование ККМ, внутривенно трансплантированных мышам mdx, облученным в дозе 5 Гр, и вызывать усиление синтеза дистрофина в ППМВ этих мышей через 2 мес после трансплантации.

Впервые показано, что внутривенная трансплантация ККМ мышам mdx, облученным в дозе 3 Гр, приводит к увеличению доли дистрофин-положительных ППМВ и усилению дифференцировки ППМВ этих мышей на длительных сроках наблюдения (6 мес).

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные результаты вносят вклад в понимание участия ККМ в регенерации ППМВ. Данные, свидетельствующие о влиянии трансплантированных внутримышечно СККМ на структуру НМС мышей mdx, могут служить основой для дальнейших исследований возможности применения трансплантации СККМ для лечения дегенеративных нейромышечных заболеваний. Кроме того, данные об усилении синтеза дистрофина у радиационных химер mdx, полученных путем внутривенной трансплантации ККМ дикого типа мышам mdx, облученным в дозе 3 Гр, и данные об усилении синтеза дистрофина у радиационных химер mdx, полученных после облучения в дозе 5 Гр и дополнительно подвергавшихся действию  $Ca^{2+}$ -КМП, позволяют предлагать эти воздействия для

дальнейшей разработки способов лечения мышечной дистрофии мышей mdx и, в последующем, МДД у людей.

**Апробация работы.** Основные положения работы были представлены на конференции «Молекулярная и структурная биология» Политехнического симпозиума «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона» (Санкт-Петербург, 2006), Всероссийской школе-конференции «Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения» (Москва, 2008), XIV Международном конгрессе Мирового мышечного общества (Женева, Швейцария, 2009). Всероссийской научной школе-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009), Всероссийском симпозиуме по биологии клетки в культуре «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 2009), II Конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2010). Материалы диссертации докладывались и обсуждались на научных семинарах группы генетики клеточных популяций Института цитологии РАН.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего \_\_\_ ссылок. Диссертация изложена на \_\_\_ страницах и иллюстрирована \_\_\_ рисунками и \_\_\_ таблицами.

#### **Список основных сокращений**

**АХР** – ацетилхолиновый рецептор, **ККМ** – клетки костного мозга, **МДД** – мышечная дистрофия Дюшенна, **НМС** – нейромышечное соединение, **ППМВ** – поперечнополосатые мышечные волокна, **Ca<sup>2+</sup>-КМП** - комбинированное магнитное поле, настроенное на ион-параметрический резонанс для Ca<sup>2+</sup>, **СККМ** – стволовые клетки костного мозга, **ЦЯ (-)** – не имеющие центрально расположенных ядер; **GFP** - зеленый флуоресцирующий белок, **BSA** - бычий сывороточный альбумин, **TMR- $\alpha$ -ВТХ** - tetramethylrhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Животные.** В ходе работы использовали мышей линии C57BL/6, полученных из государственного питомника Рапполово (Санкт-Петербург), мутантных мышей mdx, являющихся даром проф. Партриджа (T.A Partridge, Hammersmith Hospital, Великобритания), и трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих зеленый

флуоресцирующий белок (GFP) (Jackson Laboratory, США; дар Оклендского детского госпиталя, Калифорния, США). Мыши содержались в виварии Института цитологии РАН на обычном питании и при стандартном световом режиме.

**Выделение ККМ.** Мышей линии C57BL/6 или трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих GFP, забивали под эфирным наркозом, выделяли бедренные и большие берцовые кости; вымывали костный мозг из кости раствором Дальбекко без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (DPBS без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) (БиолоТ, Россия) и дополнительно разрушали костный мозг до однородной клеточной суспензии, пропуская его через иглу шприца.

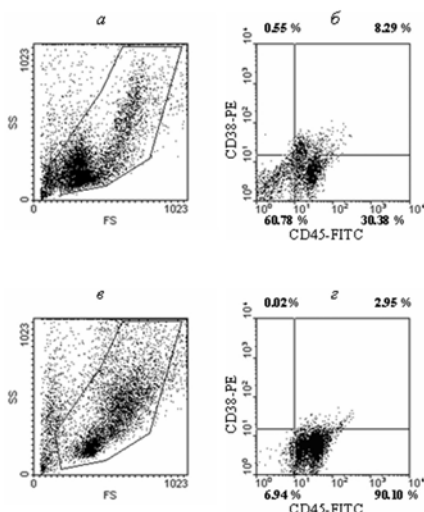
**Выделение Lin(-)-СККМ.** Полученную суспензию ККМ наслаивали на 63 %-ный Перколл, центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин. Отбирали клетки на границе Перколла и буфера и клеточную суспензию дважды отмывали, добавляя 7 мл того же буферного раствора и затем осаждая при 700 g в течение 10 мин. Полученные клетки ресуспендировали в DPBS без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  ( $10 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл буфера). К суспензии ККМ добавляли антитела против мышиных антигенов CD3, CD8a, CD38, CD45R, Ter119, Ly-6G и F4/80 (Caltag, США) из расчета 1 мкл каждого антитела на  $10^6$  клеток. Инкубировали при 10-12 °C в течение 30 мин, постоянно перемешивая. Далее осаждали клетки при 300 g, убирали супернатант и ресуспендировали клетки в прежнем объеме буфера. К суспензии клеток добавляли магнитные шарики покрытые антителами к крысиным антигенам (Dynabeads<sup>®</sup> Sheep anti-Rat IgG (DynaL Biotech ASA, Норвегия)), предварительно отмытые в соответствии с фирменной прописью. Суспензию клеток вместе с шариками инкубировали при 10–12 °C в течение 30 мин, постоянно перемешивая. Далее помещали суспензию клеток в магнитный штатив на 2 мин и отбирали жидкость, содержащую клетки, не связавшиеся с шариками. Таким образом, получали клетки, у которых отсутствует экспрессия lineage маркеров (маркеров дифференцированных клеток) и которые называют Lin(-)-СККМ [28, 29].

**Цитофлуориметрический анализ Lin(-)-СККМ.** Полученную суспензию Lin(-)-СККМ и суспензию клеток цельного костного мозга исследовали на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Клетки окрашивали в течение 30 мин антителами к антигенам CD38, CD34, CD117, Sca-1, конъюгированными с фикоэритрином (PE), и антителами к CD45, конъюгированными с FITC. Удаление из суспензии ККМ дифференцированных клеток контролировали по экспрессии



антигена CD38. Данные цитометрического анализа показывают, что в суспензии Lin(-)-СККМ клетки, экспрессирующие антиген CD38, практически отсутствуют (рис. 1). Следовательно, можно предположить, что клетки, экспрессирующие другие антигены, антитела к которым мы использовали при очистке, также отсутствуют. Кроме того, примерно 93 % полученных СККМ экспрессируют CD45 (рис. 1). После

очистки двукратно увеличивалось количество CD34-, CD117- и Sca-1-положительных клеток по сравнению с исходной суспензией ККМ.



**Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ клеток цельного костного мозга (а, б) и Lin(-)-СККМ (в, з).**

По горизонтали – FS, малоугловое светорассеяние (а, в) или флуоресценция клеток, связавших FITC-меченные антитела против CD45 (б, з); по вертикали – SS, боковое светорассеяние (а, в) или флуоресценция клеток, связавших PE-меченные антитела против CD38 (б, з).

### **Внутримышечная трансплантация Lin(-)-СККМ.**

Мышей mdx и C57BL/6 наркотизировали нембуталом (40 мг на 1 кг веса животного). Суспензию GFP-положительных Lin(-)-СККМ вводили мышам mdx по  $(0.5-0.8) \cdot 10^6$  клеток в 250 мкл в 7–9 точек одной из четырехглавых мышц бедра (m. quadriceps femoris). В контрлатеральную мышцу вводили только буфер. Мышцы исследовались через 2 нед после трансплантации. Суспензию Lin(-)-СККМ мышей C57BL/6 вводили мышам mdx по  $(0.5-0.8) \cdot 10^6$  клеток в 250 мкл в 7–9 точек обеих четырехглавых мышц бедра. Мышцы, в которые водили СККМ, исследовали через 4, 8, 16 и 24 нед после трансплантации.

**Создание радиационных химер mdx.** Мышей mdx облучали на рентгеновском аппарате РУМ-17 (U=200 кВ, I=13 мА; фильтр 0.5 мм Cu + 1 мм Al, мощность 45 Р/мин) в дозе 5 или 3 Гр. Через сутки после облучения мышам mdx, наркотизированным нембуталом, вводили в яремную вену по  $(15-20) \cdot 10^6$  ККМ трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих GFP, полученных, как было описано выше. Было показано, что через 2 мес после трансплантации в костном мозгу химер mdx 5 Гр присутствовало  $71.1 \pm 4.0$  % клеток, экспрессирующих GFP, что подтверждает замену мутантных ККМ на трансплантированные стволовые клетки.

**Облучение радиационных химер mdx слабым комбинированным магнитным полем.**  $Ca^{2+}$ -КМП создавали с помощью установки, сконструированной

Г.В. Соколовым (ЦНИИ им. акад. А.Н. Крылова), описанной в работе [30]. В работе использовали комбинированное магнитное поле, где постоянная составляющая магнитного поля складывалась из модуля индукции магнитного поля Земли (МПЗ) и вертикальной составляющей постоянного магнитного поля индуктора, которые создавали суммарный модуль индукции магнитного поля, равный 65.7 мкТл. Переменная компонента поля частотой  $f_{ac}=50$  Гц создавалась индуктором и была направлена вертикально, амплитуда магнитной индукции переменной компоненты –  $B_{ac}=90$  мкТл. Радиационных химер  $mdx$  5 Гр подвергали воздействию  $Ca^{2+}$ -КМП каждый день (кроме выходных) по 30 мин в течение 4 нед. Данное воздействие начинали производить через 4 нед после трансплантации ККМ. Контрольные животные находились в МПЗ ( $B_{dc} = 48$  мкТл).

#### **Гистологические и иммуногистохимические методы.**

**Приготовление срезов мышц.** Поперечные и продольные срезы четырехглавых мышц бедра толщиной 10 мкм получали на криостате Bright Co Ltd (Великобритания) после предварительного охлаждения мышцы в жидком азоте. Подсушенные срезы фиксировали 1 мин в смеси этанола и карбинола (1:1) при температуре  $-20$  °С или 30 мин при комнатной температуре в 10%-ном формалине (Bio Optica, Italy).

**Оценка экспрессии GFP после трансплантации СККМ** от GFP-положительных доноров осуществляли по собственной флуоресценции GFP. Ядра окрашивали пропидий иодидом в течение 5 мин. Срезы промывали PBS и заключали в глицерин. Полученные препараты исследовали на конфокальном микроскопе LSM 5 Pascal (Carl Zeiss) или на конфокальном микроскопе Leica TCS SL (Leica Microsystems).

**Иммуногистохимия.** На срезы, толщиной 10 мкм, фиксированные в смеси этанола и карбинола, наносили 1%-ный бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США) на 30 мин. Срезы отмывали 5 мин в PBS (Биолот, Россия). Наносили поликлональные кроличьи антитела к дистрофину (Abcam, США) в разведении 1:100 на 1 ч. На часть срезов вместо антител наносили PBS для последующего контроля неспецифического связывания вторичных антител. Срезы отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Наносили вторичные антитела (goat anti-rabbit), меченные FITC (Sigma, США), в разведении 1:150 на 1 ч. Промывали срезы в PBS 3 раза по 5 мин. Ядра докрасивали DAPI или иодидом пропидия, и срезы заключали в глицерин. Полученные препараты исследовали на конфокальном микроскопе LSM 5 Pascal (Carl Zeiss).

На срезы, толщиной 10 мкм, фиксированные в смеси этанола и карбинола, наносили 1%-ный BSA на 30 мин. Срезы отмывали 5 мин в PBS и инкубировали или с поликлональными кроличьими антителами к дистрофину (Abcam, США) в разведении 1:100, или с кроличьими антителами к GFP (Sigma, США) в разведении 1:100 при +4 °С в течение ночи. На часть срезов вместо антител наносили PBS для последующего контроля неспецифического связывания вторичных антител. Далее наносили раствор 0.03 %-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 30 мин. Для уменьшения неспецифического связывания стрептоавидина с эндогенным биотином на срезы наносили реагенты Avidin/Biotin Blocking Kit (Zymed Laboratories Inc., Invitrogen, США) согласно фирменной прописи. Затем наносили вторичные анти-кроличьи антитела, меченные биотином в разведении 1:100 (Sigma, США) на 1 ч. На срезы наносили стрептоавидин, конъюгированный с пероксидазой, в разведении 1:200 (Sigma, США) на 30 мин. После каждого описанного этапа срезы промывали в PBS 3 раза по 5 мин. Далее наносили диаминобензидин (10 мг диаминобензидина растворяли в 10 мл PBS и смешивали с 0.5 мл 0.1%-ного раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в PBS) на 5 мин. Затем промывали в проточной воде. При слабой реакции срезы дополнительно инкубировали в диаминобензидине с ацетатом кобальта в течение 5 мин и далее отмывали в проточной воде [31]. Ядра докрашивали красителем Гимза. Далее срезы обезвоживали в этанолах возрастающей концентрации, проводили через 3 порции ксилола и заключали в канадский бальзам.

**Окраска гематоксилином и эозином** производили по общепринятой методике.

**Определение площади ППМВ.** Срезы, окрашенные гематоксилином-эозином, исследовали на микроскопе AxioPhot (Zeiss), изображение получали с помощью камеры Ваumer optronic и выводили на экран монитора, далее с помощью программы ВидиоТест-Размер5.0 (Россия) измеряли площадь ППМВ.

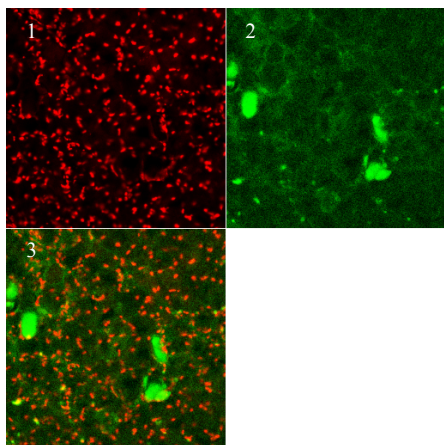
**Исследование нейромышечных соединений.** На продольные и поперечные срезы мышц, фиксированные в формалине, наносили tetramethylrhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin (TMR- $\alpha$ -BTX) (Biotium, США) в концентрации 1 мкг/мл. TMR- $\alpha$ -BTX специфически связывается с АХРами. Затем срезы промывали в PBS 3 раза по 5 мин и заключали в реагент, уменьшающий неспецифическую флуоресценцию (Biomedica corp, США). Приготовленные препараты просматривали на конфокальных микроскопах LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия) или Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). На

полученных снимках поперечных срезов мышц в программе ImageJ (National Institutes of Health, США) определяли площадь НМС. На продольных срезах ткани также в программе ImageJ измеряли общую площадь, занимаемую НМС на ППМВ, площади отдельных кластеров АХР, составляющих НМС, и количество таких кластеров в каждом НМС. Измерение общей площади производили по минимальной внешней границе, заключающей все кластеры АХР, составляющих НМС.

Полученные данные статистически обрабатывали в программе MS Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

**Участие Lin(-)-СККМ в регенерации ППМВ мышей mdx после внутримышечной трансплантации.** В настоящее время широко исследуются возможности применения клеточной терапии для лечения МДД. В наших экспериментах источником клеток для клеточной терапии мышей mdx служил костный мозг. В первой части работы изучали влияние трансплантированных внутримышечно ККМ, не содержащих дифференцированных клеток (Lin(-)-СККМ), на регенерацию и дифференцировку мышц мышей mdx. Показано, что после внутримышечной трансплантации Lin(-)-СККМ трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих GFP, мышам mdx и мышам C57BL/6 в течение 2 нед введенные клетки сохраняются в мышце. Кроме того, наблюдается присутствие GFP-положительных (GFP (+)) ППМВ как у мышей mdx, так и у мышей C57BL/6 (рис. 2, табл. 1). Присутствие GFP (+) ППМВ свидетельствует о том, что данные волокна содержат ядра донорского происхождения и что, соответственно, трансплантированные клетки участвовали в регенерации этих ППМВ. Количество



GFP (+) ППМВ значительно выше у мышей mdx по сравнению с мышами дикого типа (табл. 1). Это, вероятно, связано с тем, что для мышей mdx

**Рис. 2. Экспрессия GFP в ППМВ мышей mdx через 2 недели после внутримышечной трансплантации Lin(-)-СККМ.**

Ядра окрашены иодидом пропидия. Об. 20×

1. – окраска ядер иодидом пропидия; 2. – естественная флуоресценция GFP; 3 – совмещенное изображение.

характерен высокий уровень гибели ППМВ и, соответственно, высокий уровень регенерации. Постоянно протекающая в мышце регенерация приводит к значительно более высокому потреблению мышцей стволовых клеток.

**Таблица 1.** Экспрессия GFP в ППМВ мышей C57BL/6 и mdx после внутримышечной трансплантации Lin(-)- GFP (+) СККМ

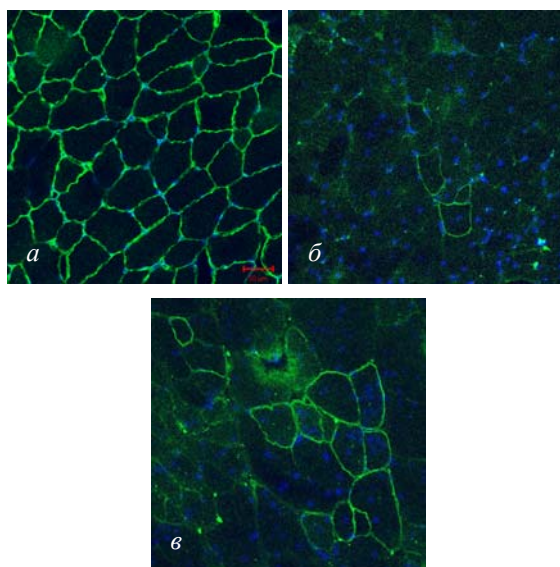
Исследуемое животное	GFP (+) ППМВ, %	
	Опытная мышца	Контрлатеральная мышца
C57BL/6 (4)	0.2±0.1	0.10±0.05
mdx (6)	2.0±0.8	1.2±0.6

Примечание: в этой и табл. 2, 3, 4, 5 в скобках указано количество животных в каждой группе.

Кроме того, GFP (+) клетки и GFP (+) ППМВ были обнаружены и в контрлатеральной мышце, в которую вместо клеток вводили только буфер (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что после локального введения СККМ способны покидать область трансплантации и распространяться в другие органы и ткани, что говорит о необходимости более тщательного контроля поведения СККМ даже в условиях местного воздействия.

**Внутримышечное введение Lin(-)-СККМ вызывает усиление дифференцировки ППМВ мышей mdx.** Как уже было описано выше, в ППМВ мышей mdx отсутствует белок дистрофин. Поэтому для оценки эффективности клеточной терапии мы в первую очередь подсчитывали долю дистрофин-положительных (дистрофин (+)) ППМВ у контрольных мышей mdx и у мышей mdx после внутримышечной трансплантации СККМ. Известно, что, несмотря на дефект гена дистрофина у мышей mdx в мышцах присутствует небольшая доля ППМВ, содержащих дистрофин, так называемых ревертантных мышечных волокон [32]. В нашем исследовании у контрольных мышей mdx, не подвергавшихся трансплантации СККМ, также были обнаружены отдельные небольшие группы ППМВ, экспрессирующие дистрофин (рис. 3, б).

В исследованиях по внутримышечному введению СККМ, экспрессирующих GFP, мы наблюдали GFP (+) ППМВ уже через 2 нед после трансплантации, что свидетельствует о включении ядер введенных клеток в ППМВ мышей mdx. Однако мы не наблюдали увеличения доли дистрофин (+) ППМВ ни через 4, ни через 8 нед после трансплантации (табл. 2), что согласуется с данными других авторов [33].



**Рис. 3. Дистрофин-положительные ППМВ на поперечных срезах четырехглавых мышц бедра мышей C57BL/6 (а), mdx (б) и mdx через 16 нед после внутримышечной трансплантации СККМ (в).**

Волокна мечены антителами к дистрофину, вторичные – FITC. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Масштабный отрезок 50 мкм.

Отсутствие синтеза дистрофина в мышцах мышей mdx после трансплантации им СККМ дикого типа, по мнению одного из них [34], отражает блокаду экспрессии мышечных генов

в ядрах дикого типа, включившихся в состав мутантных ППМВ.

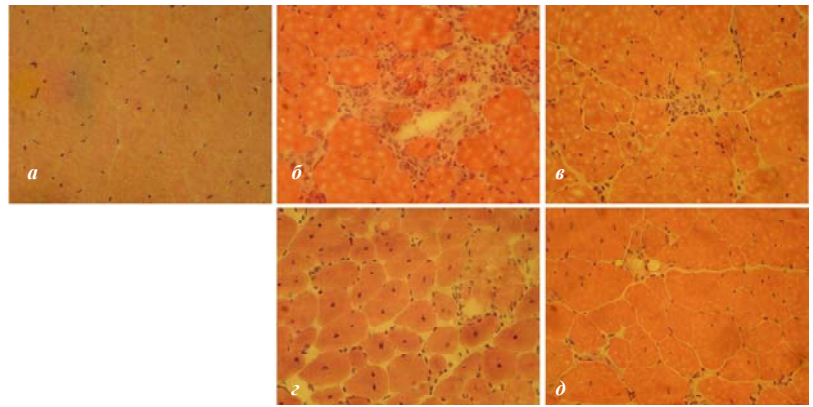
**Таблица 2.** Характеристика ППМВ в четырехглавой мышце бедра контрольных мышей mdx и мышей mdx после внутримышечной трансплантации СККМ

Время после трансплантации СККМ, нед	Дистрофин (+) ППМВ, %	ЦЯ (-) ППМВ, %	Погибших ППМВ, %
0 (контроль)	0.47 ± 0.09 (3)	10.5 ± 1.0 (11)	2.2 ± 0.3 (11)
4 (3)	0.69 ± 0.2	12.5 ± 1.8	1.0 ± 0.2
8 (5)	0.57 ± 0.07	18.0 ± 1.0	1.2 ± 0.2
16 (6)	1.69 ± 0.3	18.1 ± 0.8	1.4 ± 0.2
24 (5)	1.79 ± 0.4	16.0 ± 1.2	0.95 ± 0.07

Тем ни менее, через 16 и 24 нед после трансплантации мы зарегистрировали нарастание доли ППМВ, содержащих дистрофин (табл. 2, рис. 3, в). Увеличение доли дистрофин (+) ППМВ свидетельствует о начале экспрессии гена дистрофина донорских ядер в составе ППМВ мышей mdx и, соответственно, об усилении дифференцировки ППМВ [14].

Так как отсутствие дистрофина приводит к гибели ППМВ у мышей mdx, то для мышц мышей mdx характерно присутствие определенного количества погибших ППМВ (рис. 4, б). Снижение доли погибших ППМВ регистрируется, начиная с 4-й недели после трансплантации (табл. 2), (рис. 4, в). Кроме того, большая часть ППМВ у мышей mdx имеют центрально расположенные ядра (рис. 4, з). Начиная с 8-й недели после трансплантации, доля ЦЯ (-) ППМВ превышает характерную для мышей mdx долю (рис. 4, д), и не уменьшается на более поздних сроках (табл. 2). Для мышей mdx, так же характерно уменьшение средних поперечных размеров

**Рис. 4. Поперечный срез четырехглавой мышцы бедра мышцей нормальных C57BL/6 (а), mdx (б, в) и mdx через 16 нед после внутримышечной трансплантации СККМ (в, д).**



*а* – ППМВ с периферически расположенными ядрами; *б* – очаг гибели ППМВ; *в* – уменьшение области дегенерации ППМВ через 16 нед после трансплантации СККМ; *г* – центральное расположение ядер у основной части ППМВ; *д* – возрастание числа ППМВ без центрально расположенных ядер через 16 нед после трансплантации СККМ. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.: об 20×.

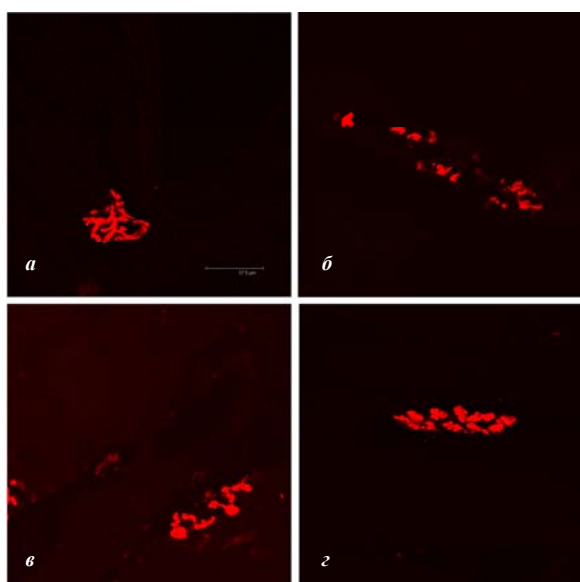
мышечных волокон и больший разброс диаметра ППМВ по сравнению с мышами дикого типа [14, 15] (рис. 4, *а* и *г*). После трансплантации Lin(-)-СККМ наблюдается тенденция к увеличению

площади поперечного сечения ППМВ. Так, у контрольных мышцей mdx площадь поперечного сечения ППМВ составляет  $2064.6 \pm 195.3 \text{ мкм}^2$ , через 4 нед и 16 нед после введения СККМ –  $2263.2 \pm 138.1 \text{ мкм}^2$  и  $2429.7 \pm 211.4 \text{ мкм}^2$  соответственно, и у нормальных мышцей C57BL/6 -  $2615.6 \pm 107.2 \text{ мкм}^2$ .

**Изменение структуры НМС мышцей mdx после внутримышечного введения Lin(-)-СККМ.** Как было описано выше, внутримышечная трансплантация Lin(-)-СККМ дикого типа усиливает дифференцировку ППМВ мышцей mdx, однако стабильная дифференцировка ППМВ невозможна без взаимодействия с нервной системой и образования дифференцированных НМС. Как и описано в литературе [15, 35, 36, 37, 38, 39], распределение АХРов в НМС мышцей mdx изменено по сравнению с мышами дикого типа. Если НМС мышцей C57BL/6 состоят из нескольких кластеров АХРов, и при окраске продольных срезов TMR- $\alpha$ -ВТХ эти кластеры имеют форму ветвей (рис. 5, *а*), то у мышцей mdx структура НМС нарушена, что выражается в распаде больших кластеров АХР на более мелкие и в приобретении ими формы отдельных островков (рис. 5, *б*). При этом число кластеров АХР, составляющих НМС, у мышцей mdx увеличено по сравнению с НМС дикого типа, а площадь отдельных кластеров снижена (табл. 3).

Уже через 4 нед после трансплантации Lin(-)-СККМ количество кластеров АХР, составляющих НМС, уменьшается. Одновременно их площадь увеличивается (табл. 3). При этом увеличение размеров кластеров АХР не сопровождается увеличением





**Рис. 5.** НМС на продольных срезах четырехглавой мышцы бедра мышей C57BL/6 (а), мышей mdx контрольных (б), через 4 (в) и 16 (з) нед после введения СККМ.

Окраска TMR-α-BTX. Масштабный отрезок 37.5 мкм.

а – у нормальных мышей C57BL/6 НМС состоит из кластеров АХР, имеющих форму протяженных ветвей; б – разрушение больших кластеров АХР в НМС мышей mdx на более мелкие, имеющие форму отдельных островков; в – через 4 нед после трансплантации СККМ уменьшается число кластеров АХР в НМС и возрастает их площадь; з – через 16 нед после трансплантации СККМ площадь кластеров АХР возрастает, а их количество увеличивается, что приводит к росту общей площади НМС.

как величины общей площади НМС,

так и суммарной площади кластеров АХР (рис. 5, в). Можно заключить, что увеличение размеров кластеров АХР в ранних сроках после клеточной терапии происходит за счет слияния АХР в пространстве НМС. Наиболее вероятно, что наблюдаемое нами увеличение размеров отдельных кластеров АХР на 4-й неделе после трансплантации является следствием паракринного влияния трансплантированных и прижившихся в мышце СККМ.

**Таблица 3.** Характеристика НМС по продольным срезам мышц нормальных мышей C57BL/6 и мышей mdx после клеточной терапии

Исследуемые животные	Площадь отдельных кластеров АХР, мкм <sup>2</sup>	Среднее число кластеров АХР в НМС	Площадь НМС, мкм <sup>2</sup>	Сумма площадей кластеров АХР, составляющих НМС, мкм <sup>2</sup>
C57BL/6 (3)	129.2 ± 23.1	2.22 ± 0.04	403.8 ± 77.1	291.5 ± 50.3
mdx (контроль), (3)	58.0 ± 3.9	4.7 ± 0.3	385.4 ± 51.6	273.6 ± 30.5
mdx, 4 нед после трансплантации СККМ (3)	80.0 ± 4.9	3.7 ± 0.1	364.2 ± 10.9	296.5 ± 12.9
mdx, 16 нед после трансплантации СККМ (3)	93.9 ± 4.6	4.7 ± 0.1	666.0 ± 46.1	438.7 ± 13.7

Через 16 нед после трансплантации СККМ количество кластеров АХР, составляющих НМС, возрастает до уровня, характерного для контрольных мышей



mdx, и при этом площадь отдельных кластеров АХР остается выше площади кластеров АХР у контрольных мышей mdx (табл. 3). Одновременно наблюдается рост общей площади НМС (рис. 5, з). Эти изменения в НМС коррелируют с усилением в ППМВ синтеза дистрофина.

Для оценки изменения структуры НМС мышей mdx после клеточной терапии Lin(-)-СККМ дикого типа мы также измерили площади НМС на поперечных срезах мышц. У контрольных мышей mdx площадь НМС составила  $78.4 \pm 5.1$  мкм<sup>2</sup>. После внутримышечного введения СККМ на сроке 4 нед после трансплантации площадь НМС превышает значение ( $p < 0.05$ ), полученное для контрольных мышей mdx, приближается к соответствующему значению для нормальных мышей C57BL/6 ( $102.8 \pm 3.0$  мкм<sup>2</sup>) и составляет  $106.9 \pm 3.4$  мкм<sup>2</sup>. Через 8, 16 и 24 нед после трансплантации СККМ площадь НМС соответственно равна  $91.6 \pm 2.7$ ,  $104.3 \pm 10.5$  и  $97.2 \pm 6.2$  мкм<sup>2</sup>, что не отличается от контрольных животных ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, однократная внутримышечная трансплантация Lin(-)-СККМ дикого типа вызывает частичное восстановление структуры НМС скелетных мышц у мутантных мышей mdx, приближая её к структуре НМС ППМВ нормальных мышей C57BL/6. Улучшение структуры НМС мышей mdx после клеточной терапии СККМ происходит на фоне развития дифференцировки мутантных ППМВ, которое выражается в усилении синтеза дистрофина и увеличении доли ЦЯ (-) ППМВ, а также в уменьшении доли погибших ППМВ.

**Участие СККМ в регенерации и дифференцировке ППМВ радиационных химер mdx.** В ходе опытов мыши mdx и C57BL/6 облучали в дозе 5 Гр, через сутки облученным мышам внутривенно вводили ККМ трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих GFP. Через 2–3 мес после трансплантации GFP (+) клетки были обнаружены в костном мозге, крови, поперечнополосатых мышцах, в миокарде, печени, надпочечниках, щитовидной железе, почке мышей-реципиентов. Таким образом, экспериментальные животные представляли собой радиационных химер, содержащих как собственные клетки, так и клетки GFP-положительных доноров.

Как и после внутримышечного введения СККМ, в мышцах радиационных химер mdx присутствовали GFP (+) ППМВ, однако усиления экспрессии дистрофина в ППМВ мы не наблюдали. Так, через 2 мес после замены костного мозга доля дистрофин (+) ППМВ оставалась на уровне контрольных мышей mdx и составляла

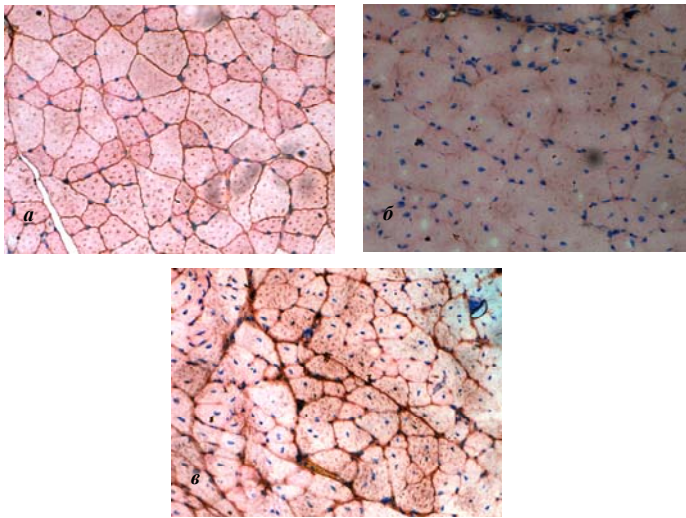
порядка 1 % . Кроме того, у химер mdx не наблюдалось значительного снижения доли погибших ППМВ и нарастания доли ЦЯ (-) ППМВ. Таким образом, несмотря на то, что замена костного мозга позволяет доставлять стволовые клетки дикого типа в скелетные мышцы и доказано их участие в регенерации ППМВ, низкая эффективность такой трансплантации для мышц, регистрируемая по незначительному нарастанию экспрессии дистрофина, не позволяет использовать данный подход в качестве эффективного способа лечения МДД. По-видимому, для повышения экспрессии дистрофина после тотальной замены костного мозга необходимы дополнительные воздействия на мышей-реципиентов с целью усиления функциональной активности трансплантированных стволовых клеток дикого типа.

**Влияние  $Ca^{2+}$ -КМП на участие СККМ в дифференцировке ППМВ химерных мышей mdx.** Известно, что слабые магнитные поля влияют на биологические объекты [24]. Так, показано, что воздействие  $Ca^{2+}$ -КМП значительно усиливает рост и регенерацию костей [25, 26]. Кроме того, описано, что  $Ca^{2+}$ -КМП ускоряет регенерацию головы у планарий [27]. В связи с этим нами было исследована возможность использования  $Ca^{2+}$ -КМП в качестве фактора, стимулирующего регенерацию и дифференцировку ППМВ химерных мышей mdx.

Показано, что у радиационных химер mdx после воздействия  $Ca^{2+}$ -КМП в течение 1 мес, наблюдалось значительное возрастание доли дистрофин (+) ППМВ по сравнению с контрольными группами (табл. 4, рис. 6). Доля ЦЯ (-) ППМВ также нарастала (табл. 4). При этом уровень гибели ППМВ во всех группах животных не изменялся (табл. 4).

**Таблица 4** Характеристика ППМВ в четырехглавой мышце бедра контрольных мышей mdx и мышей mdx после облучения в дозе 5 Гр и внутривенного введения ККМ и воздействия  $Ca^{2+}$ -КМП

Исследуемое животное	Дистрофин (+) ППМВ, %	Погибшие ППМВ, %	ЦЯ (-) ППМВ, %
mdx, контроль (3)	1.1±0.4	2.2±0.6	10.5±1.0
mdx, 2 мес после облучения в дозе 5 Гр и введения ККМ (3)	1.2±0.6	1.6±0.2	11.2±1.5
mdx, 2 мес после облучения в дозе 5 Гр, введения ККМ и воздействия $Ca^{2+}$ -КМП (5)	15.8±3.8	2.1±0.6	22.8±3.0



**Рис. 6. Дистрофин (+) ППМВ у мышей C57BL/6 (а), mdx контрольных (б) и химеры mdx после воздействия Ca<sup>2+</sup>-КМП (в).**

ППМВ мечены антителами к дистрофину, вторичные антитела мечены пероксидазой. Ядра окрашены красителем Гимза. Ув.: об. 20×.

Таким образом, воздействие Ca<sup>2+</sup>-КМП значительно повышает эффективность трансплантации ККМ мышам mdx после облучения в дозе

5 Гр. Данный физический фактор вероятно может или интенсифицировать функционирование донорских ядер, включившихся в состав ППМВ, или усиливать регенерацию, осуществляющуюся за счет ККМ, заменяя большее количество мутантных ядер ППМВ мышей mdx на ядра дикого типа из костного мозга.

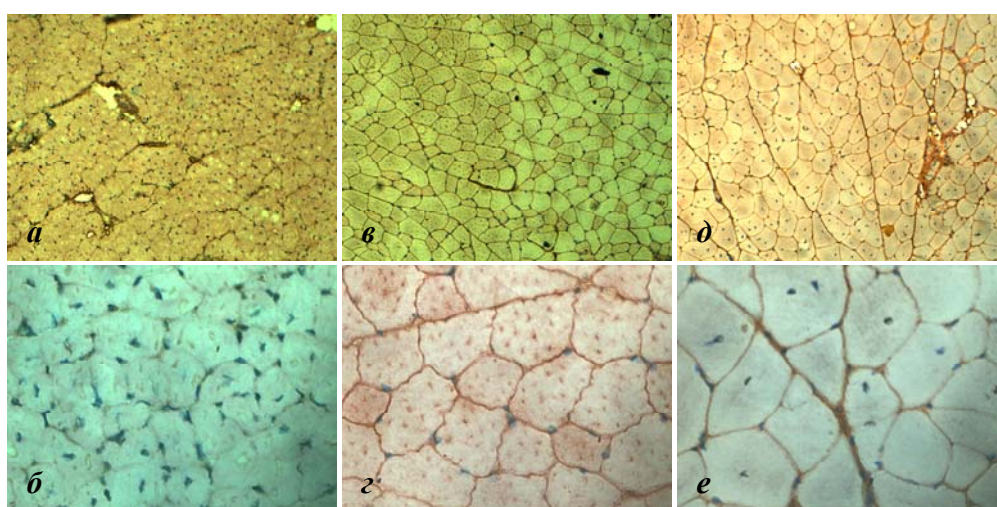
**2.3. Влияние замены костного мозга на фоне рентгеновского облучения в дозе 3 Гр на дифференцировку ППМВ мышей mdx.** Основную часть исследований участия ККМ в регенерации скелетных мышц мышей mdx производили на радиационных химерах, полученных путем введения ККМ мышам, предварительно облученным летальными дозами или рентгеновского, или  $\gamma$ -излучения [19, 33]. В свою очередь показано, что донорский химеризм в костном мозге мышей после трансплантации ККМ наблюдается и в случае, если клетки трансплантировались животным, предварительно облученным в дозе 3 Гр, 1.6 Гр [40] и даже необлученным мышам [41]. В связи с этим было принято решение о снижении дозы облучения до 3 Гр при приготовлении химер mdx. Оказалось, что, в соответствии с литературными данными [40], у мышей, облученных в такой дозе, наблюдается присутствие значительного количества GFP (+) в костном мозге. Так же, как и у облученных большими дозами животных, введенные клетки распространялись по организму животного, и их присутствие наблюдалось в мышцах, сердце, надпочечнике и других органах.

Как и в предыдущих экспериментах, в мышцах химер мышей mdx имелись как ППМВ, экспрессирующие GFP, так и отдельные GFP (+) клетки. Обнаружено, что доля дистрофин (+) ППМВ нарастает с течением времени у химер mdx, полученных при облучении в дозе 3 Гр (табл 5. рис. 7). Кроме того, после трансплантации ККМ

мышам mdx, облученным в дозе 3 Гр, наблюдалось снижение уровня гибели ППМВ и нарастание доли ЦЯ (-) ППМВ (табл 5).

**Таблица 5.** Характеристика ППМВ в четырехглавой мышце бедра контрольных мышцей mdx и мышцей mdx после облучения в дозе 3 Гр и внутривенного введения ККМ.

Время после трансплантации ККМ, мес	Дистрофин(+) ППМВ, %	Погибших ППМВ, %	ЦЯ (-) ППМВ, %
0, контроль	1.1±0.4 (3)	2.2±0.6 (3)	10.5±1.0 (3)
2	4.1±0.9 (3)	1.4±0.3 (4)	16.1±1.7 (4)
6	27.6±6.7 (5)	0.7±0.1 (5)	22.6±1.9 (5)



**Рис. 7.** Дистрофин (+) ППМВ на поперечных срезах четырехглавой мышцы бедра мышцей mdx (а, б), нормальных C57BL/6 (в, г) и химеры mdx 3 Гр, через 6 мес после трансплантации ККМ (д, е).

Окраска на дистрофин. Вторичные антитела, меченные пероксидазой. Ядра окрашены красителем Гимза. а, в, д – ув.: об. 10×. б, г, е – ув.: об. 40×.

Таким образом, мы наблюдали значительное усиление дифференцировки ППМВ химерных мышцей mdx через 6 мес после трансплантации ККМ. Следовательно, снижение дозы облучения повышает эффективность участия введенных СККМ в регенерации ППМВ. Так, по литературным данным [33], введение ККМ мышам mdx, облученным в дозе 9 Гр, не вызывает достоверного усиления экспрессии дистрофина ни на ранних сроках (1, 3 мес), ни на рассматриваемом нами сроке 6 мес. Аналогичное отсутствие нарастания синтеза дистрофина мы наблюдали и в наших экспериментах на химерах, полученных после облучения в дозе 5 Гр.

## Выводы

1. Стволовые клетки костного мозга мышей C57BL/6 участвуют в регенерации поперечнополосатых мышечных волокон мышей mdx как после внутримышечной, так и после внутривенной трансплантации.

2. Внутримышечная сингенная трансплантация Lin(-) стволовых клеток костного мозга мышей C57BL/6 усиливает дифференцировку поперечнополосатых мышечных волокон мышей mdx; при этом, в первую очередь, уменьшается доля погибших поперечнополосатых мышечных волокон, на более длительных сроках наблюдения увеличивается доля поперечнополосатых мышечных волокон, не имеющих центрально расположенных ядер, и возрастает доля дистрофин-положительных поперечнополосатых мышечных волокон.

3. Сингенная внутримышечная трансплантация Lin(-) популяции стволовых клеток дикого типа мышам mdx частично улучшает структуру нейромышечных соединений скелетных мышц, приближая её к структуре нейромышечных соединений скелетных мышц нормальных мышей C57BL/6.

4. Воздействие слабых комбинированных магнитных полей, настроенных на ион-параметрический резонанс для  $Ca^{2+}$  усиливает дифференцировку поперечнополосатых мышечных волокон и синтез дистрофина в скелетных мышцах радиационных химер mdx.

5. Сингенная внутривенная трансплантация клеток костного мозга дикого типа мышам mdx, облученных в дозе 3 Гр, усиливает дифференцировку и синтез дистрофина в поперечнополосатых мышечных волокон мышей mdx.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Михайлов В.М., Евтифеева Е.В., Переверзев А.Е., Зенин В.В., Карманова А.В.<sup>\*</sup>, Сериков В.Б. 2005. Различная степень участия GFP-положительных стволовых клеток костного мозга в регенерации скелетных мышц мышей mdx и C57BL/6. Онтогенез. 36 (5): 384-385.

2. Михайлов В.М., Евтифеева Е.В., Сериков В.Б., Переверзев А.Е., Карманова А.В., Зенин В.В. 2006. Участие стволовых клеток костного мозга в дифференцировке поперечнополосатых мышц мышей mdx. Цитология. 48 (5): 410-417.

3. Карманова А.В., Михайлов В.М. 2006. Влияние клеточной терапии на дифференцировку скелетных мышц мышей mdx. Молодые ученые – промышленности

Северо-Западного региона: Материалы конференций политехнического симпозиума. Декабрь 2006 года. 1:193.

4. Михайлов В.М., Карманова А.В., Зенин В.В., Сериков В.Б. 2006. Генно-клеточная терапия скелетных мышц мышей mdx. Клеточные культуры: информационный бюллетень. СПб.: Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН. 21: 17-26.

5. Карманова А.В., Михайлов В.М. 2007. Изменения структуры нейромышечных соединений мышц mdx после клеточной терапии стволовыми клетками костного мозга. Клеточные культуры: информационный бюллетень. СПб.: Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН. 22: 10-16.

6. Михайлов В.М., Соколова А.В., Зенин В.В., Кузоватов С.Н., Каминская Е.В. 2008. Внутривенная трансплантация стволовых клеток костного мозга «дикого типа» облученным мышам mdx стимулирует дифференцировку поперечно-полосатых мышечных волокон. Клеточные культуры: информационный бюллетень. СПб.: Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Институт цитологии РАН. 23: 30-35.

7. Соколова А.В., Зенин В.В., Михайлов В.М. 2008. Клеточная терапия Lin(-) стволовыми клетками костного мозга мышей C57Bl/6 усиливает дифференцировку поперечнополосатых мышечных волокон мышей mdx. Материалы Всероссийской школы-конференции: «Аутологичные стволовые и прогениторные клетки: экспериментальные и клинические достижения», Москва, 9-11 июня 2008 г. 1: 50.

8. Sokolova A.V., Zenin V.V., Mikhailov V.M. 2008. Size of neuromuscular junction as mark of success of mdx mice striated muscle fibers differentiation after bone marrow stem cells therapy. Abstracts of the Keystone Symposia on Molecular and cellular Biology: Stem Cells, Cancer and Aging, September 29 - October 4, 2008, Singapore. 1:78.

9. Sokolova A., Zenin V, Mikhailov V. 2008. Lin(-) Bone marrow stem cells transplantation restores normal structure of mdx mice neuromuscular junctions. Abstracts of the AABV Annual Meeting and TXPO. October 4-8, 2008. Montreal, Quebec, Canada, Transfusion. 48(Suppl 2): 140.

10. Соколова А.В., Зенин В.В., Михайлов В.М. 2009. Восстановление структуры нейромышечных соединений скелетных мышц мышей mdx после клеточной терапии стволовыми клетками костного мозга. Материалы Всероссийской научной школы-конференции: «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования», Москва, 21-26 сентября 2009 г. 1: 67-68.

11. Sokolova A.V., Zenin V.V., Mikhailov V.M. 2009. Lin(-) bone marrow stem cells transplantation repairs structure of mdx mice neuromuscular junctions. Abstracts of the 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland, 9th - 12th September 2009. Neuromuscular Disorders 19(8-9): 634

12. Михайлов В.М., Арсеньев А.В., Белова Н.А., Дудин М.Г., Соколова А.В., Соколов Г.В. 2009. Магниточувствительности клеточных популяций костно-хрящевой ткани и перспективы использования слабых магнитных полей в вертебрологии. Материалы Республиканской научно-практической конференции: «Развитие вертебрологии на современном этапе», Минск, 1-2 октября 2009 года. 1: 225-227

13. Соколова А. В., Зенин В. В., Михайлов В. М. 2009. Трансплантация Lin(-) стволовых клеток костного мозга дикого типа улучшает дифференцировку поперечнополосатых мышечных волокон мутантных мышей mdx. Цитология. 51 (9):786-787.
14. Соколова А.В., Зенин В.В., Михайлов В.М. 2010. Структура нейромышечных соединений и дифференцировка поперечнополосатых мышечных волокон у мышей mdx после клеточной терапии стволовыми клетками костного мозга. Цитология. 52 (5):399-406.
15. Соколова А.В., Михайлов В.М. 2010. Трансплантация стволовых клеток костного мозга как способ лечения миодистрофии мышей mdx. Цитология. 52(5): 451.

\* – с 08.2007 г. – Соколова А.В.

### СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dalkilic I., Kunkel L.M. 2003. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 231-238. 2. Watchko J.F. et al. 2002. *J. Appl. Physiol.* 93: 407-417. 3. Collins C.A., Morgan J.E. 2003. *Int. J. Exp. Pathol.* 84: 165-172. 4. Bulfield G. et al. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1189-1192. 5. Sicinski P. et al. 1989. *Science.* 244: 1578-1580. 6. Partridge T.A. 1997. In: *Dystrophin – gene, protein and cell biology.* Cambridge: University Press. 1: 310-327. 7. Petrof B.J. 2002. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 81: S162-174. 8. Dudley R.W. et al. 2006. *Am. J. Pathol.* 168: 1276-1287. 9. Niebrój-Dobosz I., Hausmanowa-Petrusewicz I. 2005. *Acta Biochim. Pol.* 52: 449-452. 10. Tidball J.G., Wehling-Henricks M. 2007. *J. Appl. Physiol.* 102: 1677-1686. 11. Matsuda R. et al. 1995. *J. Biochem.* 118: 959-964. 12. Tidball J.G. et al. 1995. *J. Cell Sci.* 108: 2197-2204. 13. Spencer M.J. et al. 1997. *J. Clin. Invest.* 99: 2745-2751. 14. Михайлов В.М. и др. 1998. *Цитология.* 40(5): 394-400. 15. Torres L.F., Duchon L.W. 1987. *Brain.* 110: 269-299. 16. Kitaoka K. et al. 1997. *J. Electron. Microsc. (Tokyo).* 46: 193-197. 17. Chamberlain J.S. 2002. *Hum. Mol. Genet.* 11(20): 2355-2362. 18. Farini A. et al. 2009. *J. Cell Physiol.* 221(3): 526-534. 19. Bittner R.E. et al. 1999. *Anat. Embryol. (Berl).* 199: 391-396. 20. Gussoni E. et al. 1999. *Nature.* 401: 390-394. 21. Péault B. et al. 2007. *Mol. Ther.* 15: 867-877. 22. Galvez B.G. et al. 2006. *J. Cell Biol.* 174: 231-243. 23. Dellavalle A. et al. 2007. *Nat. Cell Biol.* 9: 255-267. 24. Леднев В.В. 1996. *Биофизика.* 1: 224-232. 25. Liboff A.R. et al. Patent 4.932.951 USA. Date of patent 12.06.1990 – p. 17. 26. Арсеньев А.В. и др. 2007. *Травматология и ортопедия России, приложение.* 3(45): 12. 27. Тирас Х.П. и др. 1996. *Биофизика.* 41(4): 826-831. 28. Spangrude G.J. et al. 1988. *Science.* 241: 58-62. 29. Orlic D. et al. 2001. *Nature.* 410: 701-705. 30. Дудин М.Г. и др. Патент 2212258 РФ. опубл. 20.09.2003, Бюл. № 26. – 20 с. 31. Полак Дж., Ван Норден С. 1987. Пер. с англ. – М.: Мир. – 74 с. 32. Lu Q.L. et al. 2000. *J. Cell Biol.* 148: 985-996. 33. Chretien F. et al. 2005. *Am. J. Pathol.* 166: 1741-1748. 34. Cossu G. 2004. *J. Clin. Invest.* 114: 1540-1543. 35. Kong J., Anderson J.E. 1999. *Brain Res.* 839: 298-304. 36. Rafael J.A. et al. 2000. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1357-1367. 37. Minatel E. et al. 2001. *Muscle Nerve.* 24: 410-416. 38. Marques M.J. et al. 2007. *Anat. Rec.* 290: 846-854. 39. Marques M.J. et al. 2007. *Anat. Rec.* 290: 181-187. 40. Goebel W.S. et al. 2002. *Exp. Hematol.* 30: 1324-1332. 41. Stewart F.M. et al. 1993. *Blood.* 81: 2566-2571.