

УЧАСТИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЦ МЫШЕЙ mdx

© В. М. Михайлов, Е. В. Евтифеева, В. Б. Сериков,
А. Е. Переверзев, А. В. Карманова, В. В. Зенин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru

В предварительных опытах было показано, что мышцы мышей mdx, спасенных после рентгеновского облучения в дозе 7.5 Гр внутривенным введением клеток костного мозга мышей C57BL/6, через 2—3 мес обнаруживают признаки усиления дифференцировки поперечнополосатых мышечных волокон. Для доказательства участия стволовых клеток в этом явлении были поставлены эксперименты с клетками костного мозга трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих зеленый люминесцирующий белок GFP. Первая серия экспериментов была выполнена на химерных мышцах C57BL/6 и mdx. Химерных мышцей получали введением клеток костного мозга трансгенных мышей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP, мышцам C57BL/6 или mdx после рентгеновского облучения 5 в дозе Гр. Через 2 мес у мышцей-химер повреждали *M. quadriceps femoris* и еще через 4—5 нед изучали присутствие в мышце GFP-положительных мышечных волокон. У мышцей-химер C57BL/6 доли GFP-положительных мышечных волокон для опытной и контрлатеральной мышцей составили 0.3 ± 0.5 и 0.2 ± 0.3 % соответственно. У мышцей-химер mdx доли GFP-положительных мышечных волокон в опытной и контрольной группах были 1.7 ± 0.4 и 0.5 ± 0.3 % соответственно. Во второй серии экспериментов клетки костного мозга мышцей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP, после предварительного истощения вводили внутримышечно мышцам C57BL/6 и GFP. Предварительно клетки костного мозга выделяли на 63%-ном Перколле и затем эту фракцию истощали от дифференцированных гемопоэтических клеток магнитным способом на системе Dynal смесью антител против антигенов CD4, CD8, CD38, CD45R, Ter119, Ly-6G и F4/80. После истощения $2.5 \cdot 10^5$ — $4.0 \cdot 10^5$ клеток инъецировали в 8—9 точек *M. quadriceps femoris* мышцей C57BL/6 или mdx. Через 2—3 нед у мышцей C57BL/6 было обнаружено 0.15 ± 0.40 и 0.1 ± 0.2 % GFP-положительных мышечных волокон в опытной и контрлатеральной мышцей соответственно. У мышцей mdx доли GFP-положительных мышечных волокон составили 2.0 ± 0.8 и 1.2 ± 0.6 %. Результаты указывают на то, что участие стволовых клеток костного мозга в дифференцировке поперечнополосатых мышцей мышцей mdx может быть достигнуто после внутримышечной трансплантации клеток костного мозга при помощи инъекций.

Ключевые слова: GFP-экспрессирующие стволовые клетки костного мозга, дифференцировка, регенерация, скелетные мышцы, мышцей-химеры C57BL/6 и mdx.

Принятые сокращения: ППМВ — поперечнополосатые мышечные волокна, ГСКМП — гемопоэтические стволовые клетки мышечного происхождения, ККМ — клетки костного мозга.

При миодистрофии Дюшенна из-за мутации структурного гена нарушен синтез цитоскелетного белка дистрофина, что вызывает гибель поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ). Потеря ППМВ компенсируется образованием в мышце новых ППМВ. Поиск способов нормализации и стабилизации популяции ППМВ у больных миодистрофией представляет как практический, так и теоретический интерес. Исследования, проведенные на экспериментальной модели болезни Дюшенна — мышцах mdx, показали, что баллистическая трансфекция мышцей генома дистрофина нормализует структуру ППМВ только на короткое время (Михайлов и др., 1998, 2002). Скелетные мышцы мышцей mdx, как и мышцей C57BL/6, являются обновляющейся клеточной популяцией (Tidball et al., 1995), что исключает возможность достижения длительного терапевтического эффекта экспрессии дистро-

фина на структуру и функцию ППМВ, трансфицированных геном дистрофина.

При генетически обусловленной миодистрофии способом спасения скелетных мышцей от исчезновения из-за гибели ППМВ может быть замена мутантных стволовых клеток на нормальные при помощи трансплантации в мышцей стволовых клеток дикого типа. Эта идея послужила основанием для начала клеточной терапии миодистрофии Дюшенна у человека и мышцей mdx при помощи инъекций миобластов (клеток-сателлитов) от здоровых доноров (Partridge et al., 1989; Law et al., 1993; Ярыгин и др., 2003). Однако высокая гибель введенных клеток как у человека, так и у мышцей mdx в первые 24 ч после трансплантации (Fan et al., 1996; Gussoni et al., 1997) и низкий пролиферативный потенциал миобластов ограничивают эффективность использования этого типа кле-

ток-предшественников для коррекции состава ППМВ у мышей mdx (Lee-Pullen et al., 2004).

В настоящее время в скелетных мышцах обнаружена популяция гемопоэтических стволовых клеток, которая способна участвовать в регенерации ППМВ. Гемопоэтические стволовые клетки мышечного происхождения (ГСКМП) также дифференцируются в гемопоэтическом направлении (Seale, Rudnicki, 2000; Torrente et al., 2001; LaBarge, Blau, 2002; Qu-Petersen et al., 2002; Huard et al., 2003).

Более ранние исследования показали, что стволовые клетки костного мозга (СККМ) участвуют в регенерации ППМВ мышцей-химер mdx, облученных лучами Рентгена (Ferrari et al., 1998; Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999). При изучении способности стволовых клеток костного мозга участвовать в дифференцировке ППМВ мышцей mdx в качестве маркеров обычно используют или Y-хромосому, или CD-маркеры стволовых клеток, или экспрессию дистрофина. В настоящей работе представлены результаты исследования поведения трансплантированных клеток костного мозга (ККМ) мышцей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP, в организме мышцей-химер mdx и C57BL/6, а также после прямых инъекций в мышцы мышцей mdx и C57BL/6.

Материал и методика

Эксперименты были поставлены на половозрелых мышцах C57BL/6, трансгенных мышцах C57BL/6, являющихся носителем белка GFP (Jackson Laboratory, США; дар Оклендского детского госпиталя, Калифорния, США), и на мышцах mdx (дар проф. Партриджа, Великобритания) массой 20—25 г. Мышей содержали в виварии Института цитологии РАН на обычном питании и при стандартном световом режиме. При экспериментах по трансплантации учитывали половую принадлежность мышей.

Доноры ККМ, мыши C57BL/6 и реципиенты, мыши mdx, производные линии C57BL/10, не различаются между собой по главным локусам генов гистосовместимости (Медведев, 1968). До настоящего времени отсутствуют данные об иммунологической несовместимости колоний мышцей C57BL/6 и C57BL/10. По нашим наблюдениям, трансплантация мышцам mdx ККМ мышцей C57BL/6 не вызывает иммунологического конфликта.

У мышцей C57BL/6 возраста 8—12 нед ККМ вымывали из бедренных костей раствором Хэнкса, не содержащим ионов Са и Mg (GIBCO, Великобритания). Собранные в одну пробирку ККМ дополнительно диссоциировали при помощи шприца. При приготовлении химер облученным в дозе 5.0 или 7.5 Гр мышцам C57BL/6 или mdx в яремную вену вводили $10 \cdot 10^6$ — $16 \cdot 10^6$ нефракционированных ККМ трансгенных мышцей GFP(+) C57BL/6 в объеме 1 мл.

Для изучения участия ККМ в регенерации мышц у мышцей были использованы два экспериментальных подхода. При первом через 1—2 мес после приготовления мышцей-химер изучали распространение клеток, экспрессирующих GFP. Для создания регенерационной модели *M. quadriceps femoris* мышцей-химер повреждали сжатием мышцы зажимом Кохера в течение 5 мин. Через 1 мес как опытную, так и контрлатеральную, контрольную, мышцу изучали на присутствие GFP-положительных мышечных волокон с помощью конфокального микроскопа LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, ФРГ).

При втором экспериментальном подходе использовали предварительно фракционированные GFP(+) ККМ мышцей C57BL/6. Суспензию GFP(+) ККМ наслаивали на 63%-ный Перколл (Pharmacia, Швеция) в растворе Хэнкса без ионов Са и Mg и центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин (ускорение 1100 g) и комнатной температуре. Клетки, локализованные на границе раздела, отмывали от Перколла раствором Хэнкса и осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Фракцию ККМ, выделенную на 63%-ном Перколле, истошили от дифференцированных клеток костного мозга при помощи моноклональных антител к антигенам CD4, CD8^a, CD38, CD45R, Ter119 и F4/80 (Caltag, США) и магнитных частиц Dynabeads по протоколу фирмы DYNAL (Норвегия). В оставшейся клеточной суспензии концентрация стволовых клеток возрастала в 50—60 раз. После истощения $2.5 \cdot 10^5$ — $4.0 \cdot 10^5$ ККМ в объеме 100 мкл инъекцировали в 8—9 точек *M. quadriceps femoris*. Инъекции ККМ осуществляли при помощи шприца Люэра и игл № 27. В контрлатеральную мышцу вводили раствор Хэнкса.

Срезы из средней части *M. quadriceps femoris* толщиной 10 мкм получали на криостате Bright Co., Ltd. (Великобритания) после предварительного охлаждения мышц в жидком азоте. Срезы монтировали на предметные стекла по 10 штук. Подсушенные на воздухе срезы фиксировали 2 мин в этаноле или ацетоне при -20°C . Также использовали фиксацию срезов в 10%-ном формалине на забуференном солевом растворе (CP; 0.14 M NaCl и 0.01 M PO_4^{2-}) в течение 15 мин при комнатной температуре. Срезы изучали на конфокальном микроскопе SML 5 PASCAL. Ядра предварительно окрашивали 5 мин иодидом пропидия в концентрации 5 мкг/мл. Происхождение зеленого цвета на срезах тканей в результате люминесценции GFP контролировали при помощи кроличьих антител к GFP и антител против кроличьих IgG, меченных Cy3 (Sigma, США). Авторы благодарят чл.-кор. РАН Н. В. Томилина и д. б. н. В. А. Иванова за кроличьи антитела к GFP-протеину. Присутствие CD45(+)-клеток на срезах мышц было определено при помощи крысиных анти-CD45 антител и антител к IgG крыс, меченных Cy3 (BD, США).

Процедура иммуноморфологической окраски включала в себя несколько этапов. Это нанесение на срезы блокирующего раствора (3 % БСА, 0.1 % Твин 20 на $4 \times \text{SSC}$); отмывка в CP при комнатной температуре; экспозиция срезов с антителами в рабочем разведении при 37°C ; отмывка в CP, нанесение блокирующего раствора; отмывка в CP, нанесение на срезы вторичных антител при 37°C на 30 мин; отмывка в CP и заключение срезов в реагент, уменьшающий неспецифическую флуоресценцию (Anti-Fade Reagent, BioRad, США) (Serikov et al., 2004).

Для окраски на дистрофин использовали кроличьи антитела Р6 к С-концу молекулы дистрофина, любезно предоставленные д-ром Р. Strong и д-ром С. Sewry (Hammersmith Hospital, Великобритания), и метод ПАП (Sigma, США). Детали метода описаны ранее (Михайлов и др., 1998, 2002). Криостатные срезы фиксировали 1 мин при -20°C в метаноле или ацетоне. Антитела Р6 разводили 1 : 200 в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) на CP. С антителами Р6 срезы экспонировали ночь при 4°C , отмывали в 1%-ном БСА в CP и экспонировали с ослиными антикроличьими антителами (1 : 100; ИМЭ им. Гамалеи РАМН, Москва) и затем с раствором ПАП 2 ч при комнатной температуре. Перок-

сидазную активность определяли с использованием диаминобензидина («СПОФА», Чешская Республика) по методу Graham и Karnovsky (Луппа, 1980). После пероксидазной реакции препараты докрашивали красителем Романовского—Гимза. На препаратах определяли долю погибших ППМВ и долю ППМВ без центральных ядер. К погибшим ППМВ были отнесены мышечные волокна с поврежденной цитоплазмой и инфильтрированные лейкоцитами (Михайлов и др., 1998, 2002). В каждой мышце на срезах из средней части мышцы подсчитывали долю погибших ППМВ и вычисляли среднюю. Средние от группы мышц объединяли в группу, для которой вычисляли среднюю, принимая за N количество использованных в опыте мышц (мышей). По аналогичной схеме была вычислена доля дистрофин-положительных ППМВ [Д(+) ППМВ]. Подсчет ППМВ без центральных ядер [ЦЯ(-) ППМВ] делали на световых препаратах после окраски красителем Гимза. При подсчете на срезах GFP(+) ППМВ одновременно определяли наличие в саркоплазме ядер и рассчитывали долю ППМВ без центральных ядер. Различия между группами оценивали по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

После облучения мышей mdx в дозе 7.5 Гр и введения ККМ мышцей C57BL/6 в дозе $15 \cdot 10^6$ — $18 \cdot 10^6$ на 1 мышшь гибель облученных мышей mdx составила 50 % через 7—11 сут после облучения и 80 % через 1 мес после облучения. До 2 мес дожили не более 20 % мышей.

Гибель ППМВ через 2—3 нед после облучения у мышшей mdx, которым вводили клетки костного мозга, достигла 7.9 ± 4.1 % от общего числа мышечных волокон. К 5—9-й нед гибель снижалась до 2.3 ± 0.3 % (табл. 1). На 9-й нед гибель достигала минимальных значений для мышшей mdx — 1.2 ± 0.5 %. Таким образом, у мышшей-химер mdx, спасенных введением ККМ мышцей C57BL/6, гибель ППМВ на 5—9-й нед уменьшается до значений, характерных для необлученных мышшей mdx. Несмотря на уменьшение гибели ППМВ, в изученном периоде времени нам не удалось зарегистрировать у спасенных мышшей mdx достоверное увеличение доли Д(+) ППМВ. Полученные результаты сходны с описанными ранее дан-

Таблица 1

Динамика параметров мышечных волокон *M. quadriceps femoris* мышшей mdx после рентгеновского облучения

Группа животных ^a	Характеристика поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ), $\bar{x} \pm s_x$			
	для погибших ППМВ, %	дистрофин (+) ППМВ среди всех ППМВ, %	ЦЯ(-) ППМВ среди всех ППМВ, %	ЦЯ(-) ППМВ среди Д(+) ППМВ, %
Необлученные мышши (8)	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.1	8.1 ± 1.6	23 ± 3
2—3 нед после облучения (3)	7.9 ± 4.1	2.2 ± 0.3	Не исследовали	30 ± 5
5—9 нед после облучения (5)	2.3 ± 0.3	2.7 ± 0.5	6.9 ± 1.1	60 ± 2

^a Здесь и табл. 2 в скобках указано количество мышшей.

Таблица 2

Накопление GFP-положительных поперечнополосатых мышечных волокон в *M. quadriceps femoris* мышшей mdx при различных экспериментальных условиях

Мыши ^a	Эксперимент	GFP(+) поперечнополосатые мышечные волокна, % $\bar{x} \pm s_x$	
		опытная мышца	контрлатеральная мышца
Химерные GFP(+), C57BL/6(4)	Повреждение мышцы	0.25 ± 0.50	0.2 ± 0.3
Химерные GFP(+), mdx (5)	То же	1.7 ± 0.4	0.5 ± 0.3
C57BL (4)	Внутримышечные инъекции GFP(+) СККМ	0.15 ± 0.40	0.1 ± 0.7
mdx (6)	То же	2.0 ± 0.8	1.2 ± 0.6

ными (Gussoni et al., 1999). Обращает на себя внимание, что среди Д(+) ППМВ доля ЦЯ(-) ППМВ достоверно превышает уровень контрольных животных (23 ± 3 %), достигая 60 ± 2 % (табл. 1). Использование этого показателя не является новым и соответствует данным других авторов (Bornman et al., 1998). Иногда используется оценка доли ППМВ с центральными ядрами (Hoyte et al., 2004). У мышшей mdx дифференцировка ППМВ ограничена стадией мышечной трубочки, на которой ядра локализируются в центре ППМВ. Доля ЦЯ(-) ППМВ отражает долю ППМВ, достигших окончательной или полной дифференцировки (Михайлов и др., 1998, 2002). Повышение доли ЦЯ(-) ППМВ до 60 % среди Д(+) ППМВ через 5—9 нед после облучения указывает на прогресс дифференцировочного процесса в мышцах мышшей mdx (табл. 1). Наиболее вероятно, что увеличение доли окончательно дифференцированных ППМВ обусловлено слиянием трансплантированных клеток C57BL/6 с саркоплазмой ППМВ мышшей mdx, как это описано для клеток мышшей C57BL/6 (LaBarge, Blau, 2002), и последующим усилением синтеза дистрофина. Проникновение в саркоплазму ППМВ мутантных мышшей mdx ядер «дикого типа» должно приводить к усилению синтеза дистрофина, появление которого в саркоплазме сопровождается перемещением ядер ППМВ в периферическое положение, т. е. накоплением ППМВ без центральных ядер. С увеличением промежутка времени после облучения дифференцировочное состояние ППМВ у спасенных мышшей улучшается, о чем свидетельствует рост доли ЦЯ(-) ППМВ среди всех ППМВ на 12—13-й нед после облучения до 13.2 ± 1.6 %, что достоверно выше контрольного уровня — 8.1 ± 1.6 % ($P < 0.05$).

Для доказательства участия СККМ в регенерации скелетных мышц были использованы мышши-химеры mdx и C57BL/6, экспрессирующие GFP (GFP(+)-клетки). В этой серии опытов использовали сублетальную дозу рентгеновского облучения (5 Гр). Через 1 мес после создания химерных мышшей как у химер mdx, так и у химерных мышшей C57BL/6 GFP(+)-клетки постоянно встречаются в органах и тканях. Выбор срока (1—2 мес) был сделан на основании результатов предыдущей серии. На этом сроке в мышцах мышшей mdx уменьшается гибель

ППМВ до контрольного уровня. На таком фоне легче выявить участие СККМ в регенерации ППМВ. GFP(+)-клетки были обнаружены в скелетных мышцах (табл. 2), в сердце, печени, поджелудочной железе, легких, слизистой тонкой кишки, дерме, щитовидной железе и в крови. Их распространение имеет тканеспецифические особенности. Мы не обнаружили присутствия таких клеток в составе кожного эпителия или эпителия кишки (Михайлов и др., 2004).

Низкая частота встречаемости GFP(+) ППМВ заставила обратиться к дополнительным воздействиям на мышцы химерных мышей, которые способствовали бы участию СККМ в дифференцировке ППМВ.

Повреждение мышц увеличивало частоту появления GFP(+) ППМВ в мышцах химерных мышей как C57BL/6, так и mdx. Однако на мышцах-химерах C57BL/6 нам не удалось получить результат, который свидетельствовал бы о выраженном участии GFP(+) СККМ в дифференцировке ППМВ при регенерации мышц мышцей C57BL/6 (0.25 ± 0.50 %; табл. 2). Данные о низкой частоте обнаружения GFP(+) ППМВ у мышцей mdx совпадают с данными других авторов (Ferrari et al., 1998; Bittner et al., 1999). В опытах (LaBarge, Blau, 2002) у мышцей-химер C57BL/6 доля GFP(+) ППМВ, как и у нас, не превышала 0.1 %. Только после физических упражнений в течение 6 мес авторам удалось получить 3.5 % GFP(+) ППМВ. В наших опытах, также поставленных на мышцах C57BL/6, положительный результат — 0.25 ± 0.50 % GFP(+) ППМВ — был зафиксирован через 1 мес после повреждения мышц химерных мышцей C57BL/6.

У мышцей-химер mdx доля GFP(+) ППМВ в поврежденной мышце достигала 1.7 ± 0.4 %. Этот результат соответствует описанным ранее данным (Gussoni et al., 1999) и показывает, что СККМ донора участвуют в дифференцировке ППМВ мышцей-химер mdx. В неповрежденных мышцах доля GFP(+) ППМВ была в 3 раза меньше (0.5 ± 0.3 %). Функционирование ядер «дикого типа» индуцирует в ППМВ мышцей-химер mdx образование 39 ± 11 % ЦЯ(-) ППМВ среди GFP(+) ППМВ, что несколько выше уровня ЦЯ(-) ППМВ у контрольных мышцей mdx и соответствует доле ЦЯ(-) ППМВ среди Д(+)-ППМВ после баллистической трансфекции мышцей мышцей mdx геном минидистрофина в сочетании с антиапоптотическими генами *Bcl-xL* или пероксиредоксином V через 3 нед после трансфекции (Михайлов и др., 2002).

В следующей серии опытов была изучена возможность участия СККМ в дифференцировке ППМВ после трансплантации ККМ в мышцы необлученных мышцей при помощи инъекций. Инъекции сами по себе являются повреждающим воздействием. Было установлено, что в случае введения GFP(+) ККМ мышцей C57BL/6 мышцам C57BL/6 образование GFP(+) ППМВ через 2 нед после трансплантации было незначительным (0.15 ± 0.40 %; табл. 2). 2-недельный срок был выбран после предварительных экспериментов, и он соответствовал достоверному уровню накоплению GFP(+) ППМВ в мышцах нормальных мышцей. GFP(+) СККМ мышцей C57BL/6 принимали более интенсивное участие в дифференцировке ППМВ у мышцей mdx, чем у мышцей C57BL/6, способствуя образованию 2.0 ± 0.8 % GFP(+) ППМВ. В контрольных мышцах мышцей mdx доля GFP(+) ППМВ составляла 1.2 ± 0.6 %, что свидетельствует о распространении СККМ от места инъекций по кровеносным сосудам реципиента (рис. 1, 2).

Поступление ядер «дикого типа» в саркоплазму ППМВ мутантных мышцей mdx сопровождается улучшением дифференцировки ППМВ. По полученным данным, среди GFP(+) ППМВ доля ЦЯ(-) ППМВ достигает 78 ± 5 %, что значительно выше, чем доля ЦЯ(-) ППМВ среди Д(+)-ППМВ обычных мышцей mdx (23 ± 3 %; табл. 1). Величина 78 ± 5 % также превышает в 2 раза величину ЦЯ(-) ППМВ среди Д(+)-ППМВ у мышцей mdx после баллистической трансфекции мышцей генами минидистрофина и антиоксидантными генами (31 ± 7 %; Михайлов и др., 2002), а также среди GFP(+) ППМВ химерных мышцей mdx после сублетального облучения (39 ± 11 %). Величина 78 ± 5 % достоверно выше величины 60 ± 2 % ($P < 0.05$) (табл. 1), которая соответствует доле ЦЯ(-) ППМВ среди Д(+)-ППМВ у мышцей mdx, спасенных внутривенным введением ККМ мышцей C57BL/6 через 5 нед после летального облучения. Необходимо отметить, что величина 78 ± 5 % отмечена через 2 нед после внутримышечной трансплантации ККМ, тогда как у мышцей mdx, спасенных внутривенным введением ККМ после летального облучения, величина 60 ± 2 % зарегистрирована через 5—9 нед после облучения, а величина 39 ± 11 % отмечена у сублетально облученных мышцей mdx через 1 мес после внутривенного введения ККМ. Полученные данные показывают, что для улучшения дифференцировки ППМВ мышцей mdx трансплантация обогащенных стволовыми клетками ККМ непосредственно в мышцы более эффективна, чем внутривенная трансплантация ККМ после рентгеновского облучения или генная терапия мышцей генами минидистрофина вместе с антиапоптотическими генами.

Использование антител к GFP подтвердило донорское происхождение как экспрессии GFP в ППМВ, так и мелких GFP-положительных клеток. Часть немышечных клеток GFP(+) была CD45(+)-клетками (рис. 1, 2).

Показано, что СККМ после инъекции в мышцу не образуют новых ППМВ, а участвуют в дифференцировке ППМВ, восполняя пул клеток-сателлитов и затем сливаясь с ППМВ (LaBarge, Blau, 2002). Также признается прямое участие СККМ в регенерации ППМВ (Ferrari et al., 1998; Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999; Camargo et al., 2003). Выявленная нами способность трансплантированных СККМ более эффективно участвовать в дифференцировке ППМВ мышцей mdx отражает естественный механизм поддержания структурной целостности мышцей мутантных мышцей mdx при помощи эндогенных СККМ. У мышцей C57BL по сравнению с мышцами mdx необходимость интенсивного использования СККМ не столь выражена, возможно, потому, что сравнительно низкий уровень физиологической регенерации мышцей обеспечивается в первую очередь пулом клеток-сателлитов.

Можно предположить, что повреждение и гибель ППМВ после травмы или из-за отсутствия дистрофина у мышцей mdx усиливают переход СККМ в поврежденные мышцей. Представляет интерес изучение механизмов поступления СККМ из крови в ткани при различных функциональных состояниях организма или при повреждениях мышцей и других органов и тканей.

Использованная для трансплантации популяция ККМ была истощена от дифференцированных клеток и соответственно обогащена СККМ в 50—60 раз. Она содержала CD45(+)- (около 10 %) и CD45(+)-клетки, а также CD34(+)- и CD117(+)-клетки. Согласно данным, полученным на ГСКМП, стволовыми клетками, способными уча-

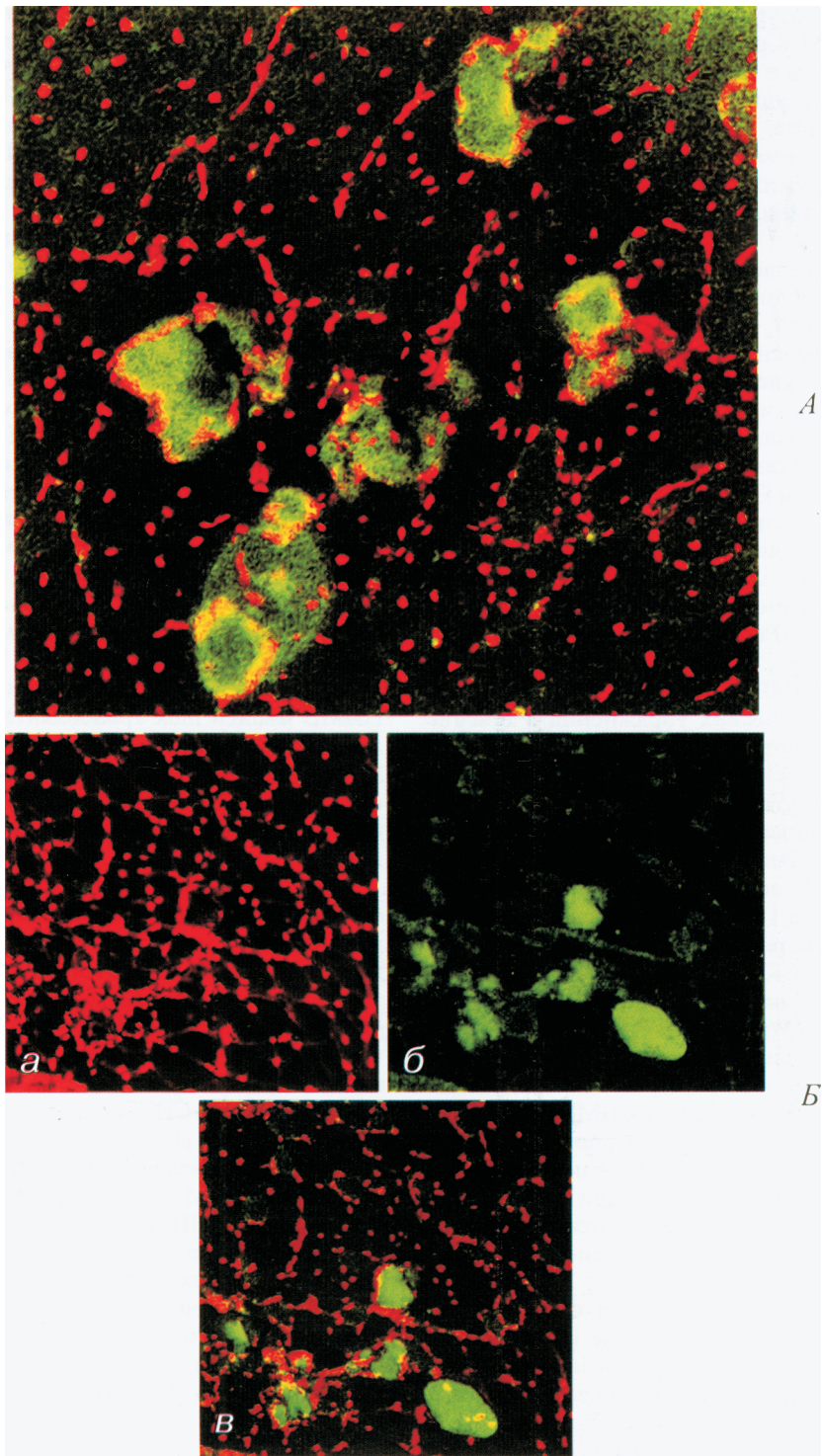


Рис. 1. Конфокальная микроскопия GFP-положительных мышечных волокон *M. quadriceps femoris* мышей mdx через 2 нед после трансплантации клеток костного мозга мышей C57BL/6, экспрессирующих белок GFP. Окраска ядер иодистым пропидием.

A — совмещенное изображение GFP(+) мышечных волокон при освещении среза гелий-неоновым и аргоновым лазерами. Об. 40×. Б — раздельное изображение GFP(+) мышечных волокон при освещении гелий-неоновым лазером (а), аргоновым лазером (б) и при совместном освещении (в).

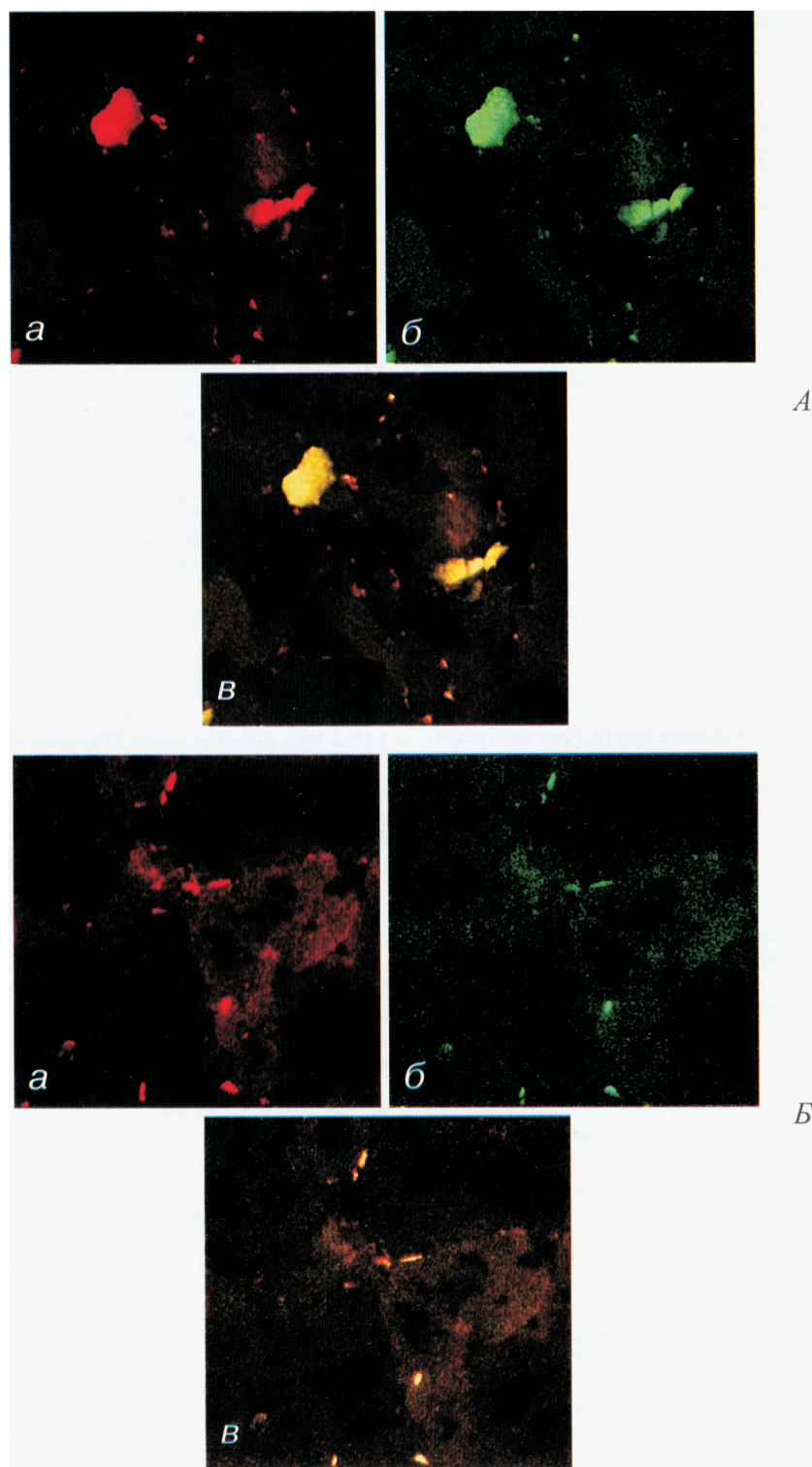


Рис. 2. Конфокальная микроскопия GFP(+)- и CD45(+)-клеток в мышцах мышей *mdx* через 2 нед после трансплантации GFP (+)-клеток костного мозга мышей C57BL/6 после окраски специфическими иммунными сыворотками.

A — GFP(+)-клетки в мышечных волокнах, выявленные при помощи анти-GFP-кроличьих антител и антител к кроличьим IgG, меченных Cy3: *a* — изображение при освещении гелий-неоновым лазером, *б* — при освещении аргоновым лазером, *в* — при совместном освещении. Об. 20×. *B* — CD45(+)-клетки в мышце мышей *mdx*, выявленные при помощи крысиных анти-CD45 антител и антител к IgG крыс, меченных Cy3; обозначения те же, что и на рис. 2, *A*.

ствовать в мышечной дифференцировке, являются как CD45(+)-, так и CD45(+)-клетки, а также CD34(+)- и Sca-1(+)-клетки (McKinney-Freeman et al., 2002; Camargo et al., 2003). Представляет интерес детальный анализ фенотипа(ов) СККМ, принимающих участие в дифференцировке ППМВ мышей mdx путем слияния с мышечными волокнами.

Полученные результаты указывают на перспективность изучения стволовых клеток костного мозга как источника стволовых клеток для регенерации скелетных мышц и других клеточных систем.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-49870 и 05-04-49609), а также программы «Заместительная клеточная терапия» (№ 01.2.00.314312).

Список литературы

- Луппа Х. 1980. Основы гистохимии. М.: Мир. 343 с.
- Медведев Н. Н. 1968. Практическая генетика. М.: Наука. 294 с.
- Михайлов В. М., Зеленин А. В., Штейн Г. И., Тарасенко О. А., Колесников В. А., Зеленина И. А., Шафеи Р. А., Баранов В. С. 1998. Дифференцировка мышечных волокон мышей mdx после баллистической трансфекции кДНК гена дистрофина человека. Цитология. 40 (5) : 394—400.
- Михайлов В. М., Кропотов А. В., Зеленин А. В., Крутилина Р. И., Колесников В. А., Зеленина И. А., Баранов А. Н., Штейн Г. И., Остапенко О. В., Томилин Н. В., Баранов В. С. 2002. Гены VCL-xL и ACR-1 способствуют дифференцировке и уменьшают гибель мышечных волокон мышей mdx. Генетика. 38 (11) : 1445—1450.
- Михайлов В. М., Сериков В. Б., Бабич П. С., Евтифеева Е. В., Переверзев А. Е., Суаришвили Н. З., Трунин Е. М., Зайчик А. М. 2004. Репопуляция органов мышей mdx и C57BL/6 клетками костного мозга, экспрессирующими белок GFP. Цитология. 46 (10) : 929—930.
- Ярыгин В. Н., Сухих Г. Т., Ситников В. Ф., Стенина М. А., Кузнецов А. Б., Полтавцева Р. А., Кривов Л. И., Влеводин Д. А., Савчук В. И., Ревущин А. В., Корочкин Л. И., Александрова М. А. 2003. Ксенотрансплантация эмбриональных предшественников миогенеза человека для коррекции дистрофинопатии у мышей с наследственной миодистрофией. Бюл. эксперим. биол. мед. 136 (7) : 100—105.
- Bittner R. E., Schofer C., Weipolshammer K. et al. 1999. Recruitment of bone-marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mice. Anat. Embryol. 199 : 391—396.
- Bornman L., Rossouw H., Gericke G. S., Polla B. S. 1998. Effect of iron deprivation on the pathology and stress expression in murine X-linked muscular dystrophy. Biochem. Pharmacol. 56 : 751—757.
- Camargo F. D., Green R., Capetanaki Y., Jackson K. A., Goodell M. A. 2003. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. Nat. Med. 9 : 1520—1527.
- Fan Y., Maley M., Beilharz M., Grounds M. 1996. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. Muscle Nerve. 19 : 853—860.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitus. Science. 279 : 1528—1530.
- Gussoni E., Blau H. M., Kunkel L. M. 1997. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. Nat. Med. 3 : 970—977.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M., Mulligan R. C. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature. 401 : 390—394.
- Hoyte K., Jayasinha V., Xia B., Martin P. T. 2004. Transgenic expression of dystroglycan does not inhibit muscular dystrophy in mdx mice. Amer. J. Pathol. 164 : 711—718.
- Huard J., Cao B., Qu-Petersen Z. 2003. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. Birth Defects Res. (Pt C). 69 : 230—237.
- LaBarge M. A., Blau H. M. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle fiber in response to injury. Cell. 111 : 589—601.
- Law P. K., Goodwin T. G., Fang Q., Deering M. D., Diggirala V., Larkin C., Florendo J. A., Kirby D. S., Li H. J., Chen M. 1993. Cell transplantation as experimental treatment for Duchenne muscular dystrophy. Cell Transplant. 6 : 195—198.
- Lee-Pullen T. F., Benner A. L., Beilharz M. W., Grounds M. D., Samuels L. M. 2004. Superior survival and proliferation after transplantation of myoblasts obtained from adult mice compared with neonatal mice. Transplantation. 78 : 1172—1176.
- McKinney-Freeman S. L., Jackson K. A., Camargo F. D., Ferrari C., Mavilio F., Goodell M. A. 2002. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 1341—1346.
- Partridge T. A., Morgan J. E., Coulton G. R., Hoffman E. P., Kunkel L. M. 1989. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblast. Nature. 337 : 176—179.
- Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., Ikesawa M., Cummins J., Prichnic R., Mytinger J., Cao B., Gates C., Wernig A., Huard J. 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle differentiation. J. Cell Biol. 157 : 851—864.
- Seale P., Rudnicki M. A. 2000. A new look at the origin, function and «stem cells» status of muscle satellite cells. Develop. Biol. 218 : 115—124.
- Serikov V. B., Choi H., Chmiel K. J., Wu R., Widdicombe J. H. 2004. Role of ERK in the increase in airway epithelial permeability during leucocyte transmigration. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 30 : 261—270.
- Tidball J. D., Albrecht D. E., Lokensgard B. E., Spencer M. J. 1995. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. J. Cell Sci. 108 : 2197—2204.
- Torrente Y., Tremblay J.-P., Pisati F., Belicchi M., Rossi B., Sironi M., Fortunato F., El Fahime M., D'Angelo M. G., Caron N. J., Constantin G., Paulin D., Scarlato G., Bresolin N. 2001. Intraarterial injection of muscle-derived CD34⁺ Sca-1⁺ stem cells restores dystrophin in mdx mice. J. Cell. Biol. 152 : 335—348.

Поступила 4 X 2005

PARTICIPATION OF BONE-MARROW STEM CELLS
IN THE DIFFERENTIATION OF mdx MICE STRIATED MUSCLE

V. M. Mikhailov, E. V. Eftifeeva, V. B. Serikov, A. E. Pereverzev, A. V. Karmanova, V. V. Zenin

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru

Two sets of experiments were carried out. The first one involved chimeric mice, obtained by intravenously injections of bone marrow derived cells taken from transgenic C57BL/6 mice, expressing GFP, to 5 Gy X-ray irradiated mdx or C57BL/6 mice. In 2 months *M. quadriceps femoris* of chimeric mice were destroyed by surgical clamp. Following the next 4—5 weeks, the same muscles were studied for the presence of GFP-positive striated muscle fibres. In the case of chimeric C57BL/6 mice GFP-positive striated muscle fibres were observed in 0.3 ± 0.5 and in 0.2 ± 0.3 % of destroyed muscle, and in lateral (control) muscle, consequently. In the case of chimeric mdx mice, positive results were observed in 1.7 ± 0.4 and in 0.5 ± 0.3 % of destroyed and control muscles, respectively. In the second set of experiments, the GFP-positive bone marrow cells were used for multiple intramuscular injections to *M. quadriceps femoris* of C57BL/6 or mdx mice in a dose of $2 \cdot 10^5$ — $5 \cdot 10^5$ cells per mouse. Before injection, GFP-positive bone marrow cells were fractionated in a 63 % Percoll solution and then were exhausted from differentiated cells by magnetic manner using CD4, CD8, CD38, CD45R, CD119, Ly-6G, and F4/80 antibodies. After 2—3 weeks, as many as 0.15 ± 0.40 and 0.1 ± 0.2 % of GFP-positive muscle fibres were found in injected and control muscles of C57BL/6 mice, respectively. In the case of mdx mice, the frequency of GFP-positive striated muscle fibres was 2.0 ± 0.8 and 1.2 ± 0.6 % for injected and control muscles, respectively. A conclusion is made that bone marrow stem cells can take part in differentiation of mdx mouse muscles after their delivery by needle injections.

Key words: Chimeric GFP-positive C57BL/6 and mdx mice, stem cells, skeletal muscle, regeneration, differentiation.
