

СТРУКТУРА НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН У МЫШЕЙ MDX ПОСЛЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА

© А. В. Соколова,¹ В. В. Зенин, В. М. Михайлов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: avsokolova@inbox.ru

Мыши mdx являются животной моделью мышечной дистрофии Дюшенна, вызываемой мутацией в гене белка дистрофина. Для мышц мышей mdx характерны постоянно повторяющиеся циклы дегенерации-регенерации. Кроме того, структура нейромышечных соединений у мышей mdx нарушена. В работе исследовали изменение структуры нейромышечных соединений мышей mdx на фоне усиления дифференцировки после однократной внутримышечной трансплантации Lin(-)-стволовых клеток костного мозга мышей C57BL/6. Мышцы исследовали через 4, 8, 16 и 24 нед после трансплантации. Обнаружили, что уровень гибели поперечнополосатых мышечных волокон снижался начиная с 4-й нед после введения стволовых клеток костного мозга. Накопление поперечнополосатых мышечных волокон без центрально расположенных ядер начиналось с 8-й нед, а синтез дистрофина возрастал в течение 16-й и 24-й нед после трансплантации. На продольных срезах мышц в течение 4-й нед после трансплантации уменьшалось количество кластеров ацетилхолиновых рецепторов, составляющих нейромышечное соединение при одновременном увеличении их площади. Через 16 нед после трансплантации увеличивалась общая площадь нейромышечных соединений из-за роста площади кластеров ацетилхолиновых рецепторов и одновременного увеличения количества этих кластеров. Таким образом, однократное внутримышечное введение мышам mdx Lin(-)-стволовых клеток костного мозга усиливает процессы дифференцировки поперечнополосатых мышечных волокон и улучшает структуру нейромышечных соединений.

Ключевые слова: мыши mdx, клеточная терапия, нейромышечные соединения, Lin(-)-стволовые клетки костного мозга.

Принятые сокращения: АХР — ацетилхолиновые рецепторы, НМС — нейромышечное соединение, ППМВ — поперечнополосатые мышечные волокна, СККМ — стволовые клетки костного мозга, TMR- α -BTX — Tetramethylrhodamine- α -bungarotoxin.

Мышечные дистрофии — гетерогенная группа генетических расстройств, характеризующихся прогрессирующей потерей силы скелетных мышц. Одной из распространенных форм мышечной дистрофии является X-сцепленная рецессивная мышечная дистрофия Дюшенна (Dalkilic, Kunkel, 2003).

Экспериментальной моделью мышечной дистрофии Дюшенна являются мыши mdx с точечной мутацией в X-хромосоме, приводящей к блокаде синтеза мембранно-ассоциированного белка дистрофина (Sicinski et al., 1989). Обширные исследования мышей mdx показали, что с возрастом сначала диафрагма, а позже и другие мышцы подвергаются структурным и функциональным изменениям, сходным с теми, которые наблюдаются при мышечной дистрофии Дюшенна (Partridge, 1997). В мышечных волокнах мышей mdx развивается окислительный стресс (Niebrój-Dobosz, Hausmanowa-Petrusewicz, 2005; Tidball, Wehling-Henricks, 2007), приводящий к гибели мышечных волокон, протекающей по типу апоптоза (Matsuda et al., 1995; Tidball et al., 1995; Spencer et al., 1997; Михайлов и др., 1998). За гибелью мышечных волокон следует их регенерация. Таким образом, для мышц мышей mdx

характерны постоянно повторяющиеся циклы дегенерации—регенерации, которые приводят к тому, что в мышцах мышей mdx большая часть поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ) имеет центрально расположенные ядра (Torres, Duchon, 1987). Центральное расположение ядер указывает на то, что дифференцировка ППМВ заторможена на стадии мышечных трубочек (Михайлов и др., 1998). Кроме того, в скелетных мышцах мышей mdx наблюдаются нарушения структуры нейромышечных соединений (НМС) (Torres, Duchon, 1987; Kitaoka et al., 1997).

В настоящее время широко проводятся исследования, направленные на нахождение путей восстановления нормальной структуры ППМВ мышей mdx. В работах используют как фармакологические подходы, так и методы генной и клеточной терапии. Так как нарушение цитодифференцировки ППМВ мышей mdx развивается на фоне окислительного стресса, для ее восстановления необходимо не только синтез дистрофина, но и снятие состояния окислительного стресса. Опыты по баллистической трансфекции ППМВ мышей mdx мини-геном дистрофина в сочетании с генами *Vcl-xL* или *пероксиредоксина V* по-

казали, что трансфекция этими генами сопровождается более эффективной дифференцировкой, проявляющейся в значительном усилении синтеза дистрофина и роста доли ППМВ без центрально расположенных ядер. Однако эффект генной терапии кратковременен. В ППМВ, трансфицированных генами дистрофина или мини-дистрофина, не возникает их стабильной экспрессии, в первую очередь из-за отсутствия или слабой регуляции транскрипции векторных генетических конструкций (Михайлов и др., 2002). Поэтому представляется, что замена мутантных клеток на клетки дикого типа при помощи трансплантации стволовых клеток будет более эффективным и безопасным методом исправления генетических дефектов клеток и тканей.

Вхождение в состав мутантных ППМВ ядер стволовых клеток дикого типа способно исправить метаболизм ППМВ и превратить их в нормальные сократительные клетки, так как ядра дикого типа сохраняют ненарушенную систему регуляции экспрессии генов. Источниками стволовых клеток для трансплантации являются в первую очередь костный мозг (Ferrari et al., 1998; Bittner et al., 1999) и стволовые клетки мышечной ткани (Peault et al., 2007). Наиболее эффективными клетками оказались мезенгиобласты и перициты (Galvez et al., 2006; Dellavalle et al., 2007).

Тем не менее костный мозг остается наиболее доступным источником стволовых клеток для целей клеточной терапии. Другим преимуществом стволовых клеток костного мозга (СККМ) является отсутствие необходимости в культивировании их перед трансплантацией. Ранее нами было показано, что при внутримышечной трансплантации СККМ доноров, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (GFP), ядра этих клеток включались в ППМВ, что определялось по экспрессии GFP в ППМВ (Михайлов и др., 2006). Однако само включение ядер в мышечные волокна не говорит об изменении структуры ППМВ реципиента.

Поэтому целью данной работы было изучить влияние трансплантированных СККМ мышей C57BL/6 на дифференцировку ППМВ мышей mdx. Мы оценивали такие дифференцировочные события ППМВ мышей mdx, как экспрессия дистрофина и доля погибших ППМВ. Кроме того, определяли размеры мышечных волокон и долю ППМВ без центрально расположенных ядер, которые возрастают после терапии генами дистрофина (Михайлов и др., 1998, 2002). Так как достижение стабильной дифференцировки мышц возможно только при взаимодействии ППМВ с нервными окончаниями и формировании зрелого НМС, мы оценивали влияние клеточной терапии на структуру нейромышечных соединений на фоне других дифференцировочных событий.

Материал и методика

Животные. В ходе работы использовали мышей линии C57BL/6, полученных из государственного питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург). Мутантные мыши mdx являются даром проф. Т. А. Партриджа (Т. А. Partridge, Hammersmith Hospital, Великобритания). Мышей содержали в виварии Института цитологии РАН на обычном питании и при стандартном световом режиме.

Выделение Lin(-)-СККМ. Клетки костного мозга получали из бедренных и больших берцовых костей мышей линии C57BL/6. Мышей забивали под эфирным

наркозом, выделяли бедренные и большие берцовые кости; вымывали костный мозг из кости раствором Дальбекко без Ca^{2+} и Mg^{2+} (DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+}) (Биолот, Россия) и дополнительно разрушали костный мозг до однородной клеточной суспензии, пропуская его через иглу шприца.

Полученную суспензию клеток костного мозга наслаивали на 63%-ный Перколл, центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин, затем отбирали клетки на границе Перколла и буфера. Клеточную суспензию дважды отмывали, добавляя 7 мл того же буферного раствора и затем осаждая клетки при 700 g в течение 10 мин. Полученные клетки ресуспендировали в DPBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (10^6 клеток в 1 мл буфера). К суспензии клеток костного мозга добавляли антитела против мышечных антигенов CD3, CD8a, CD38, CD45R, Ter119, Ly-6G и F4/80 мыши (Caltag, США) из расчета 1 мкл каждого антитела на 10^6 клеток. Инкубировали при 10–12 °C в течение 30 мин, постоянно перемешивая. 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® 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 магнит 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 (Spangrude et al., 1988; Orlic et al., 2001).

Полученную суспензию Lin(-)-СККМ 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 клеток костного мозга 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. После очистки двукратно увеличивалось количество CD34-, CD117- и Sca-1-положительных клеток по сравнению с исходной суспензией клеток костного мозга.

Трансплантация Lin(-)-СККМ. Мышей mdx наркотизировали нембуталом (40 мг на 1 кг массы животного). Суспензию Lin(-)-СККМ вводили мышам mdx по $(0.5\text{--}0.8) \cdot 10^6$ клеток в 250 мкл в 7–9 точек четырехглавой мышцы бедра (m. quadriceps femoris). Мышцы, в которые вводили СККМ, исследовали через 4, 8, 16 и 24 нед после трансплантации.

Иммуногистохимия. 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 -20 °C или 30 мин при комнатной температуре в 10%-ном формалине (Bio Optica, Италия). Готовые срезы хранили при -20 °C.

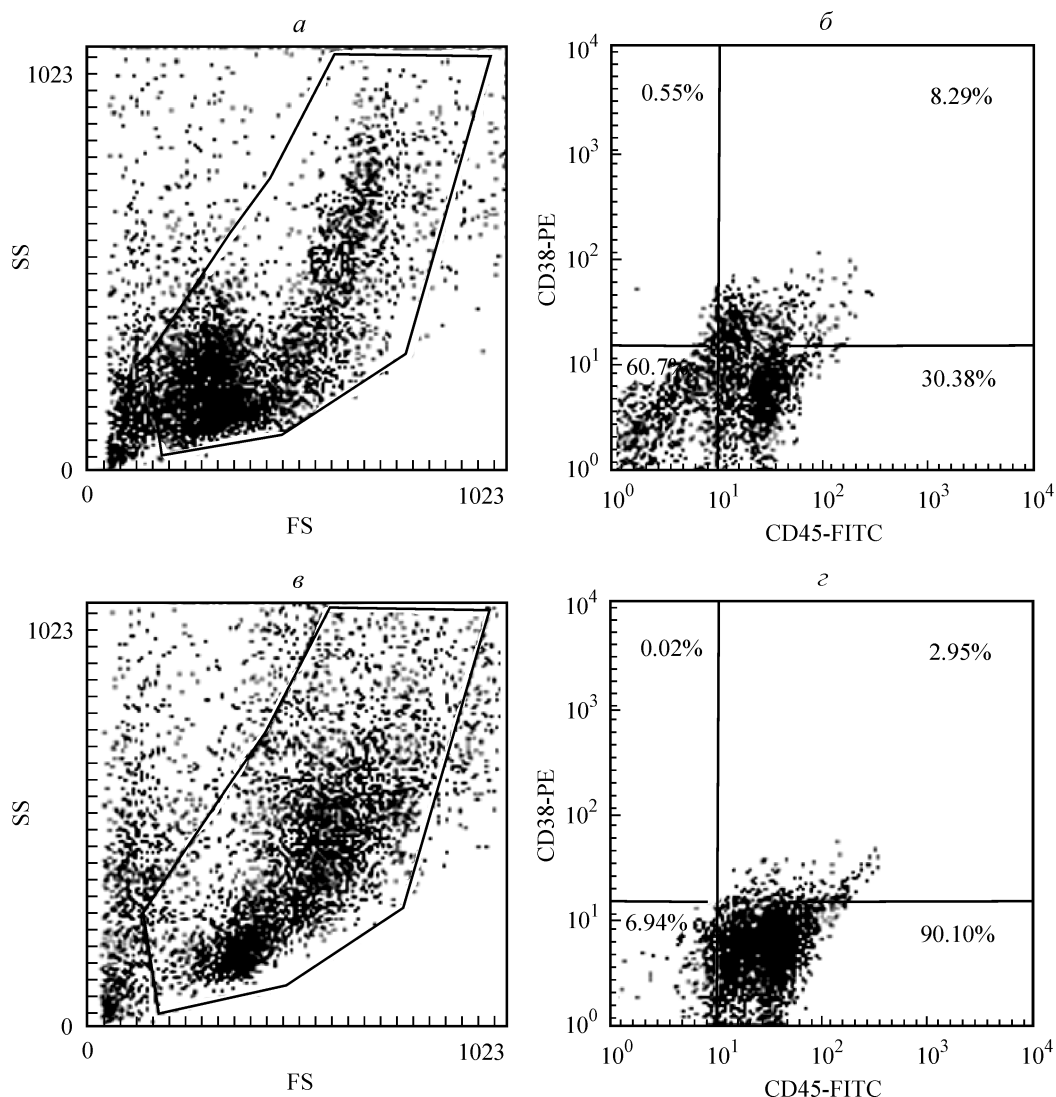


Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ клеток цельного костного мозга (а, б) и Lin(-)-CKKM (в, з).

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

Далее срезы окрашивали на дистрофин. Для этого на срезы, фиксированные в смеси этанола и карбинола, наносили 1%-ный бычий сывороточный альбумин (BSA) на 30 мин, затем срезы отмывали 5 мин в буферном растворе PBS (Биолот, Россия) и наносили поликлональные кроличьи антитела к дистрофину в разведении 1 : 100 (Abscam, США) на 1 ч. Срезы отмывали в PBS 3 раза по 5 мин и далее наносили вторичные антитела (goat anti-rabbit), меченные FITC, в разведении 1 : 150 (Sigma, США) на 1 ч. После последующей промывки в PBS 3 раза по 5 мин ядра докрашивали DAPI или иодидом пропидия и срезы заключали в глицерин. Полученные препараты исследовали на конфокальном микроскопе LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия). На срезах в центральной мышце подсчитывали количество ППМВ, содержащих дистрофин, и затем определяли долю дистрофин-положительных волокон в центральной мышце.

Для определения доли ППМВ, не содержащих центрально расположенных ядер, а также доли погибших ППМВ срезы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили через серию спиртов и ксилолов и заключали в канадский бальзам. Окрашенные срезы ис-

следовали на микроскопе AxioPhot (Zeiss, Германия), изображение получали с помощью камеры Baumer optronic и выводили на экран монитора. Далее с помощью программы ВидиоТест-Размер5.0 (Россия) измеряли площадь ППМВ.

Исследование НМС. На продольные и поперечные срезы мышц, фиксированные в формалине, наносили на 1 ч Tetramethylrhodamine- α -bungarotoxin (TMR- α -BTX) (Biotium, США) в концентрации 1 мкг/мл. TMR- α -BTX специфически связывается с ацетилхолиновыми рецепторами (АХР). Затем срезы промывали в PBS 3 раза по 5 мин и заключали в реагент, уменьшающий неспецифическую флуоресценцию (Biomedica Co., США). Приготовленные препараты просматривали на конфокальном микроскопе LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия) или Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). На полученных снимках отдельных НМС анализировали структуру НМС.

На снимках поперечных срезов мышц в программе ImageJ (National Institutes of Health, США) определяли площадь НМС. На продольных срезах ткани в той же программе ImageJ измеряли площадь, занимаемую НМС, на ППМВ, площади отдельных кластеров АХР, составляю-

щих НМС, и число таких кластеров в каждом НМС. Площадь НМС измеряли по минимальной внешней границе, заключающей все кластеры АХР, составляющих НМС. Соответственно в площадь НМС помимо площади самих кластеров АХР, составляющих НМС, также вошли и площади промежутков между отдельными кластерами.

Полученные данные статистически обрабатывали в программе Microsoft Excel. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты

Так как мыши mdx несут точечную мутацию в гене белка дистрофина, в результате которой возникает стоп-кодон, и дистрофин в клетках этих мышей не экспрессируется (Sicinski et al., 1989), для оценки эффективности клеточной терапии мы в первую очередь подсчитывали долю дистрофин-положительных ППМВ у контрольных мышей mdx и у мышей mdx после внутримышечной трансплантации СККМ. Известно, что, несмотря на дефект гена дистрофина, и у больных мышечной дистрофией Дюшенна (Nicholson et al., 1993), и у мышей mdx (Crawford et al., 2001) в мышцах присутствует небольшая доля ППМВ, содержащих дистрофин, так называемых ревертантных мышечных волокон. В нашем исследовании у контрольных мышей mdx, не подвергавшихся трансплантации СККМ, также были обнаружены отдельные небольшие группы ППМВ, экспрессирующие дистрофин (рис. 2, б). После введения Lin(-)-СККМ на сроках 4 и 8 нед увеличения доли дистрофин-положительных ППМВ мы не наблюдали (табл. 1). Однако на более длительных сроках после трансплантации (16 и 24 нед) (табл. 1) мы зарегистрировали нарастание доли ППМВ, содержащих дистрофин (рис. 2, в).

Отсутствие дистрофина приводит к развитию окислительного стресса в ППМВ у мышей mdx и дальнейшей ги-

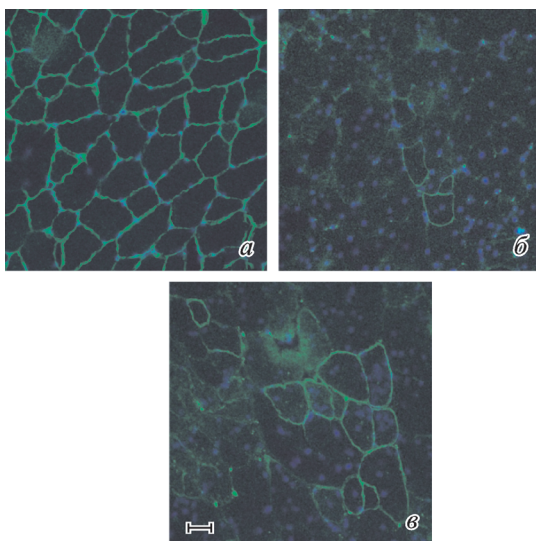


Рис. 2. Дистрофин-положительные ППМВ на поперечных срезах четырехглавых мышц бедра мышей C57BL/6 (а), mdx (б) и mdx через 16 нед после внутримышечной трансплантации СККМ (в).

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

Таблица 1

Характеристика ППМВ в четырехглавой мышце бедра контрольных мышей mdx и мышей mdx после внутримышечной трансплантации СККМ

Время после трансплантации СККМ, нед	Доля дистрофин-положительных ППМВ, %	Доля ППМВ, не имеющих центрально расположенных ядер, %	Доля погибших ППМВ, %
0 (контроль)	0.47 ± 0.09 (3)	10.5 ± 1.0 (11)	2.2 ± 0.3 (11)
4 (3)	0.69 ± 0.20	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 ± 0.30	18.1 ± 0.8	1.4 ± 0.2
24 (5)	1.79 ± 0.40	16.0 ± 1.2	0.95 ± 0.07

Примечание. В скобках указано количество животных.

бели этих волокон. За гибелью волокон следует их регенерация. Таким образом, в мышцах мышей mdx присутствует определенное количество погибших ППМВ (рис. 3, б). Снижение доли погибших ППМВ регистрируется начиная с 4-й нед после трансплантации (табл. 1) (рис. 3, в). Постоянно повторяющиеся циклы дегенерации—регенерации приводят к тому, что большая часть ППМВ у мышей mdx имеет центрально расположенные ядра (Torres, Duchenn, 1987) (рис. 3, з). Такое расположение ядер характерно для низкодифференцированных ППМВ, находящихся на стадии мышечных трубочек. Начиная с 8-й нед после трансплантации доля ППМВ без центрально расположенных ядер превышает характерную для мышей mdx долю (рис. 3, д) и не уменьшается на более поздних сроках после трансплантации (табл. 1).

Помимо присутствия большого количества погибших ППМВ и ППМВ с центрально расположенными ядрами для мышей mdx характерно уменьшение средних поперечных размеров мышечных волокон. Кроме того, у этих мышей наблюдается больший разброс диаметров ППМВ по сравнению с мышцами дикого типа (Torres, Duchenn 1987; Михайлов и др., 1998) (рис. 3, а, з). Так, у контрольных мышей mdx площадь поперечного сечения ППМВ составляет 2064.6 ± 195.3 мкм², через 4 и 16 нед после введения СККМ — 2263.2 ± 138.1 и 2429.7 ± 211.4 мкм² соответственно. У нормальных мышей C57BL/6 площадь поперечного сечения ППМВ составила 2615.6 ± 107.2 мкм².

Изменение структуры НМС мышей mdx после внутримышечного введения СККМ. Мы измерили площади НМС на поперечных срезах мышц у контрольных мышей mdx и мышей mdx после внутримышечной трансплантации СККМ, а также у нормальных мышей C57BL/6. У контрольных мышей mdx площадь НМС составила 78.4 ± 5.1 мкм². 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 нормальных для мышей C57BL/6 (102.8 ± 3.0 мкм²) и составляет 106.9 ± 3.4 мкм² (рис. 4). Через 8, 16 и 24 нед после трансплантации СККМ площадь НМС соответственно равна 91.6 ± 2.7 , 104.3 ± 10.5 и 97.2 ± 6.2 мкм², что не отличается от контроля ($P < 0.05$).

На продольных срезах мышц у мышей mdx НМС сформировано из отдельных кластеров АХР, имеющих

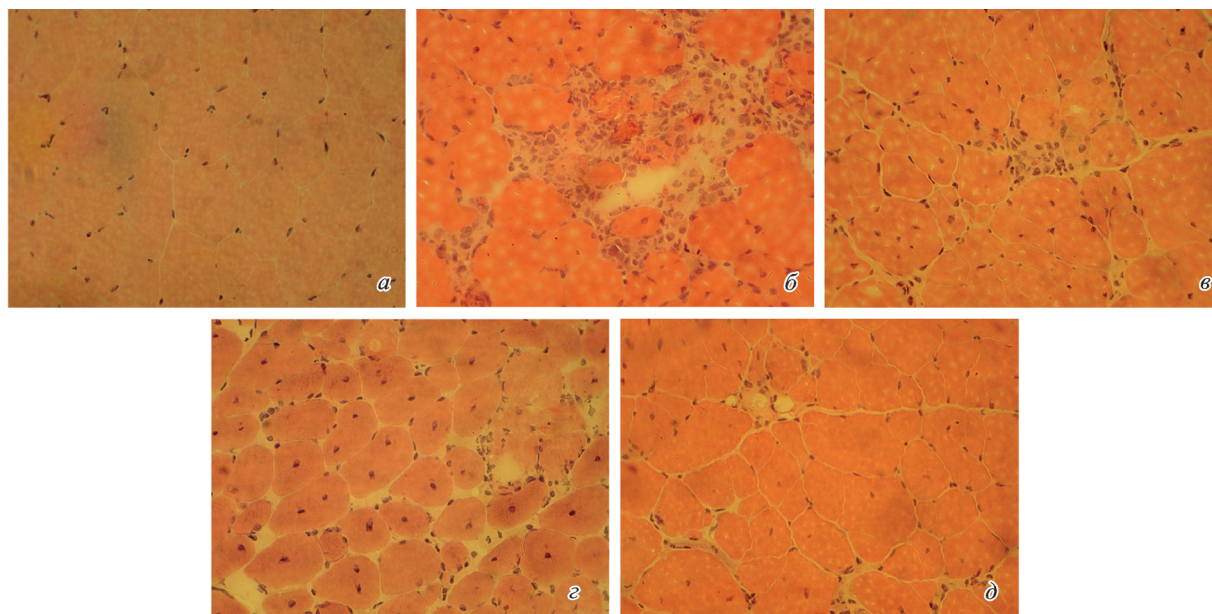


Рис. 3. Поперечный срез четырехглавой мышцы бедра мышей нормальных C57BL/6 (а), mdx (б, в) и mdx через 16 нед после внутримышечной трансплантации СККМ (г, д).

а — ППМВ одинакового размера 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. Об. 20×.

форму островков, что совпадает с данными литературы (Torres, Duchenn, 1987; Kong, Anderson, 1999; Rafael et al., 2000; Minatel et al., 2001; Marques et al., 2007a, 2007b). При этом число кластеров АХР, составляющих НМС, увеличено по сравнению с НМС дикого типа, а площадь отдельных кластеров снижена (табл. 2). Уже через 4 нед после трансплантации СККМ количество кластеров АХР, составляющих НМС, уменьшается. Одновременно их площадь увеличивается (табл. 2). Обращает на себя внимание, что увеличение размеров кластеров АХР не

сопровождается увеличением как величины общей площади НМС, так и суммарной площади кластеров АХР (рис. 5, в).

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. 2). Одновременно наблюдается рост общей площади НМС (рис. 5, г).

Таблица 2

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

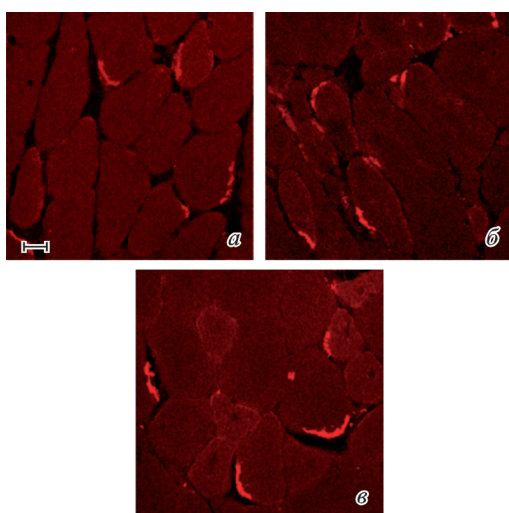


Рис. 4. Нейромышечные соединения на поперечных срезах четырехглавой мышцы бедра нормальных мышей C57BL/6 (а), мышей mdx в контроле (б) и через 4 нед после внутримышечного введения СККМ (в).

Окраска TMR-α-BTX. Масштабный отрезок — 20 мкм.

Исследуемые животные	Площадь отдельных кластеров АХР, мкм ²	Среднее число кластеров АХР в НМС	Площадь НМС, мкм ²	Сумма площадей кластеров АХР, составляющих НМС, мкм ²
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, через 4 нед после трансплантации СККМ (3)	80.0 ± 4.9	3.7 ± 0.1	364.2 ± 10.9	296.5 ± 12.9
mdx, через 16 нед после трансплантации СККМ (3)	93.9 ± 4.6	4.7 ± 0.1	666.0 ± 46.1	438.7 ± 13.7

Примечание. В скобках указано количество животных.

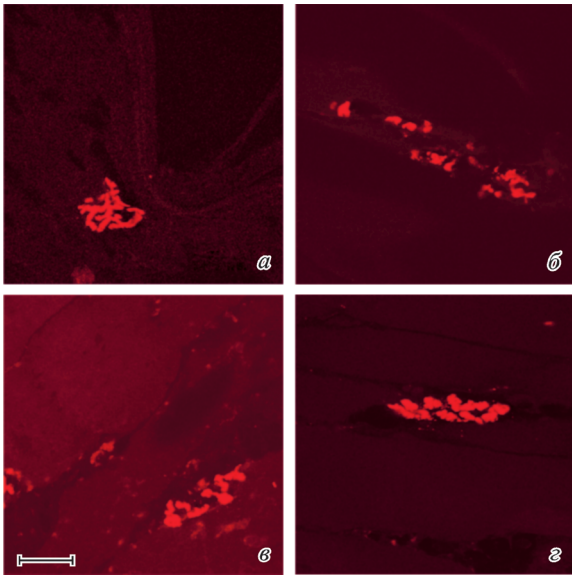


Рис. 5. Нейромышечные соединения на продольных срезах четырехглавой мышцы бедра мышей C57BL/6 (а), мышей mdx контрольных (б), через 4 (в) и 16 (з) нед после введения СККМ.

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. Окраска TMR- α -BTX. Масштабный отрезок — 37,5 мкм.

Обсуждение

По данным цитофлуориметрии, большая часть Lin(-)-СККМ (93 %) экспрессировала антиген CD45. Митогенный потенциал CD45-положительных стволовых клеток как мышечного, так и костномозгового происхождения, описан некоторыми авторами (McKinney-Freeman et al., 2002; Cao et al., 2003; Shi, Garry, 2006).

В наших предыдущих исследованиях по внутримышечному введению СККМ, экспрессирующих GFP (Михайлов и др., 2006), мы наблюдали GFP-положительные ППМВ уже через 2 нед после трансплантации. Присутствие GFP-положительных ППМВ свидетельствует о включении ядер введенных клеток в ППМВ мышей mdx. Однако после введения Lin(-)-СККМ мышей C57BL/6 увеличения доли дистрофин-положительных ППМВ мы не наблюдали ни через 4, ни через 8 нед после трансплантации. Эти результаты согласуются с данными о том, что включение клеток костного мозга в ППМВ недостаточно для усиления экспрессии дистрофина (Chretien et al., 2005). Отсутствие синтеза дистрофина в мышцах мышей mdx после трансплантации в них СККМ дикого типа отмечено многими авторами и, по мнению одного из них (Cossu, 2004), отражает блокаду экспрессии мышечных генов в ядрах дикого типа, включившихся в состав мутантных мышечных волокон. Тем не менее через 16 нед после трансплантации мы зарегистрировали нарастание доли ППМВ, содержащих дистрофин. Увеличение доли дистрофин-положительных ППМВ свидетельствует о начале экспрессии гена дистрофина донорских ядер в составе ППМВ мышей mdx и соответственно об усилении дифференцировки ППМВ (Михайлов и др., 1998).

Кроме того, об усилении дифференцировки ППМВ после внутримышечной трансплантации Lin(-)-СККМ свидетельствуют снижение доли погибших ППМВ и нарастание доли ППМВ без центрально расположенных ядер. Кроме того, по нашим данным, после введения СККМ у мышей mdx появляется тенденция к увеличению площади поперечного сечения ППМВ начиная с 4-й нед после трансплантации.

Таким образом, внутримышечная трансплантация Lin(-)-СККМ дикого типа усиливает дифференцировку ППМВ мышей mdx, но стабильная дифференцировка ППМВ невозможна без взаимодействия с нервной системой и образования дифференцированных НМС. Формирование НМС требует комплексного обмена сигналами между пресинаптическими мембранами моторных нейронов и мышечными волокнами, ведущего к накоплению белков, включая АХР, в постсинаптической мышечной мембране (Kim et al., 2008). Схема формирования постсинаптического аппарата НМС предполагает, что нервное окончание организует дифференцировку постсинаптической мембраны, высвобождая протеогликан, названный агрином. На поверхности мышечной трубочки агрин активизирует рецептор с тирозинкиназной активностью, названной мышечно-специфической киназой (MuSK). Функционирование MuSK ведет к образованию скоплений АХР и других постсинаптических компонентов путем ассоциации с цитоплазматическим белком рапсином (Sane, Lichtman, 2001; Burden, 2002; Liyanage et al., 2002; Witzemann, 2006). Кроме того, в формировании зрелого НМС принимают участие белки, составляющие утрофин (дистрофин)-ассоциированный комплекс (Jacobson et al., 2001; Banks et al., 2003).

В результате вышеописанных событий формируется зрелое НМС, которое у мышей C57BL/6 состоит из нескольких кластеров АХР. Эти кластеры имеют форму ветвей и однородно окрашиваются TMR- α -BTX. У мышей mdx структура НМС нарушена, что выражается в распаде больших кластеров АХР на более мелкие и приобретении ими формы отдельных островков, у которых периферическая часть интенсивно окрашена, а центральная часть темная (Marques et al., 2007b). Кроме того, у мышей mdx наблюдается уменьшение числа и глубины постсинаптических складок (Torres, Duchon, 1987; Banks et al., 2009). Известно также, что НМС мышей mdx имеют некоторое сходство с НМС нормальных мышей после денервации. Так, АХР в иннервированных мышцах мышей mdx деградируют так же, как при денервации (Xu, Salpeter, 1997). Кроме того, нервные терминалы влияют на пространственную организацию АХР в дистрофической мышце (Marques et al., 2007b).

Через 4 нед после трансплантации СККМ распространяются между ППМВ реципиентов клеток, а ядра СККМ проникают в саркоплазму мышечных волокон мышей mdx (Михайлов и др., 2006). Поэтому наблюдаемые проявления усиления дифференцировки ППМВ мышей mdx через 4 нед после трансплантации СККМ (уменьшение гибели ППМВ, увеличение размеров ППМВ) можно объяснить как функционированием ядер СККМ в составе саркоплазмы волокон мышей mdx, так и паракринным влиянием СККМ, локализованных в мышце между ППМВ. В это время снижается число кластеров АХР, составляющих НМС, и увеличивается их площадь. При этом увеличение размеров кластеров АХР не сопровождается увеличением как величины площади НМС, так и суммарной площади кластеров АХР. 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 нед после трансплантации является следствием паракринного влияния трансплантированных и прижившихся в мышце СККМ.

В настоящее время нет единой точки зрения на причины нарушения структуры НМС у мышей mdx. Есть мнение (Kong, Anderson, 1999) о том, что дистрофин непосредственно вовлечен в организацию больших агрегатов АХР из маленьких во время регенерации мышцы, хотя он не требуется для инициации первичной кластеризации АХР. Поэтому отсутствие именно дистрофина вызывает нарушения структуры НМС. Показано, что у мышей mdx, экспрессирующих ген мини-дистрофина, предотвращаются фрагментация НМС и потеря постсинаптических складок (Banks, 2009). Однако некоторые авторы считают, что дистрофин непосредственно не влияет на распределение АХР в НМС (Marques et al., 2007a) и что НМС мышей mdx имеют измененную структуру в связи с постоянными циклами дегенерации—регенерации (Minatel et al., 2001).

В наших опытах улучшение структуры НМС начинается на 4-й нед после трансплантации СККМ, когда доля дистрофин-положительных ППМВ находится на уровне контрольных мышей mdx. В то же время возникающее на 16-й нед увеличение числа кластеров АХР и их размеров коррелирует с усилением в ППМВ синтеза дистрофина. В соответствии с упомянутой выше гипотезой (Cossu, 2004) следует признать, что мышечные гены в трансплантированных ядрах начинают функционировать с 16-й нед после попадания в мышцы реципиентов. Наши данные показывают, что на ранних сроках трансплантация СККМ индуцирует слияние кластеров АХР, тогда как на более поздних сроках в мышцах происходит увеличение как размеров кластеров АХР, так и их числа.

Наши данные не позволяют сделать вывод о молекулярных механизмах связи синтеза дистрофина и увеличения размеров и количества кластеров АХР, а также их сближения на 16-й нед после трансплантации СККМ. Они только показывают, что увеличение числа и размеров кластеров АХР и их сближение коррелируют с усилением в мышце синтеза дистрофина.

Таким образом, однократная внутримышечная трансплантация Lin(–)-СККМ дикого типа вызывает частичное восстановление структуры НМС скелетных мышц у мутантных мышей mdx, приближая ее к структуре НМС ППМВ нормальных мышей C57BL/6. Улучшение структуры нейромышечных соединений мышей mdx после клеточной терапии СККМ происходит на фоне развития дифференцировки мутантных ППМВ, которое выражается в усилении экспрессии дистрофина и увеличении доли ППМВ без центрально расположенных ядер, а также в уменьшении доли погибших ППМВ. Восстановление структуры НМС можно использовать для оценки успеха клеточной терапии мутантных ППМВ у мышей mdx.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-46609 и 06-04-08338).

Список литературы

- 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.
- Михайлов В. М., Зеленин А. В., Штейн Г. И., Тарасенко О. А., Колесников В. А., Зеленина И. А., Шафеев 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 *BCL-xL* и *ACR-1* способствуют дифференцировке и уменьшают гибель мышечных волокон мышей mdx. Генетика. 38 (11) : 1445—1450.
- Banks G. B., Chamberlain J. S., Froehner S. C. 2009. Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure. Mol. Cell Neurosci. 40 : 433—441.
- Banks G. B., Fuhrer C., Adams M. E., Froehner S. C. 2003. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. J. Neurocytol. 32 : 709—726.
- Bittner R. E., Schöfer C., Weipoltshammer K., Ivanova S., Streubel B., Hauser E., Freilinger M., Höger H., Elbe-Bürger A., Wachtl F. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. Anat. Embryol. (Berlin). 199 : 391—396.
- Burden S. J. 2002. Building the vertebrate neuromuscular synapse. J. Neurobiol. 53 : 501—511.
- Caio B., Zheng B., Jankowski R. J., Kimura S., Ikezawa M., Deasy B., Cummins J., Epperly M., Qu-Petersen Z., Huard J. 2003. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. Nat. Cell Biol. 5 : 640—646.
- Chretien F., Dreyfus P. A., Christov C., Caramelle P., Lagrange J. L., Chazaud B., Gherardi R. K. 2005. In vivo fusion of circulating fluorescent cells with dystrophin-deficient myofibers results in extensive sarcoplasmic fluorescence expression but limited dystrophin sarcolemmal expression. Amer. J. Pathol. 166 : 1741—1748.
- Cossu G. 2004. Fusion of bone marrow-derived stem cells with striated muscle may not be sufficient to activate muscle genes. J. Clin. Invest. 114 : 1540—1543.
- Crawford G. E., Lu Q. L., Partridge T. A., Chamberlain J. S. 2001. Suppression of revertant fibers in mdx mice by expression of a functional dystrophin. Hum. Mol. Genet. 10 : 2745—2750.
- Dalkic L., Kunkel L. M. 2003. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. Curr. Opin. Gen. Develop. 13 : 231—238.
- Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R., Tagliafico E., Sacchetti B., Perani L., Innocenzi A., Galvez B. G., Messina G., Morosetti R., Li S., Belicchi M., Peretti G., Chamberlain J. S., Wright W. E., Torrente Y., Ferrari S., Bianco P., Cossu G. 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. Nat. Cell Biol. 9 : 255—267.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 279 : 1528—1530.
- Galvez B. G., Sampaolesi M., Brunelli S., Covarello D., Gavina M., Rossi B., Constantin G., Torrente Y., Cossu G. 2006. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. J. Cell Biol. 174 : 231—243.
- Jacobson C., Côté P. D., Rossi S. G., Rotundo R. L., Carbonetto S. 2001. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. J. Cell Biol. 152 : 435—450.
- Kim N., Stiegler A. L., Cameron T. O., Hallock P. T., Gomez A. M., Huang J. H., Hubbard S. R., Dustin M. L., Burden S. J. 2008. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. Cell. 135 : 334—342.

- Kitaoka K., Matsuda Y., Desaki J., Oki S., Nagano Y., Shibata T. 1997. Topographic comparison of subneural apparatuses at neuromuscular junctions in normal and dystrophic (mdx) mice: a scanning electron microscope study. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 46 : 193—197.
- Kong J., Anderson J. E. 1999. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Res.* 839 : 298—304.
- Liyanage Y., Hoch W., Beeson D., Vincent A. 2002. The agrin/muscle-specific kinase pathway: new targets for autoimmune and genetic disorders at the neuromuscular junction. *Muscle Nerve*. 25 : 4—16.
- Marques M. J., Perville A., Carvalho C. L., Santo Neto H. 2007a. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 290 : 846—854.
- Marques M. J., Taniguti A. P., Minatel E., Neto H. S. 2007b. Nerve terminal contributes to acetylcholine receptor organization at the dystrophic neuromuscular junction of mdx mice. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 290 : 181—187.
- Matsuda R., Nishikawa A., Tanaka H. 1995. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J. Biochem.* 118 : 959—964.
- McKinney-Freeman S. L., Jackson K. A., Camargo F. D., Ferrari G., Mavilio F., Goodell M. A. 2002. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 1341—1346.
- Minatel E., Neto H. S., Marques M. J. 2001. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. *Muscle Nerve*. 24 : 410—416.
- Nicholson L. V., Johnson M. A., Bushby K. M., Gardner-Medwin D. 1993. Functional significance of dystrophin positive fibres in Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Dis. Child.* 68 : 632—636.
- Niebrój-Dobosz I., Hausmanowa-Petrusewicz I. 2005. The involvement of oxidative stress in determining the severity and progress of pathological processes in dystrophin-deficient muscles. *Acta biochim. Pol.* 52 : 449—452.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 410 : 701—705.
- Partridge T. A. 1997. Models of dystrophinopathy, pathological mechanisms and assessment of therapies. In: *Dystrophin — gene, protein and cell biology*. Cambridge: Univ. Press. 310—327.
- Péault B., Rudnicki M., Torrente Y., Cossu G., Tremblay J. P., Partridge T., Gussoni E., Kunkel L. M., Huard J. 2007. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* 15 : 867—877.
- Rafael J. A., Townsend E. R., Squire S. E., Potter A. C., Chamberlain J. S., Davies K. E. 2000. Dystrophin and utrophin influence fiber type composition and post-synaptic membrane structure. *Hum. Mol. Genet.* 9 : 1357—1367.
- Sanes J. R., Lichtman J. W. 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2 : 791—805.
- Shi X., Garry D. J. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Develop.* 20 : 1692—1708.
- Sicinski P., Geng Y., Ryder-Cook A. S., Barnard E. A., Darlington M. G., Barnard P. J. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*. 244 : 1578—1580.
- Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman I. L. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241 : 58—62.
- Spencer M. J., Walsh C. M., Dorshkind K. A., Rodriguez E. M., Tidball J. G. 1997. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 99 : 2745—2751.
- Tidball J. G., Albrecht D. E., Lokensgard B. E., Spencer M. J. 1995. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell Sci.* 108 : 2197—2204.
- Tidball J. G., Wehling-Henricks M. 2007. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.* 102 : 1677—1686.
- Torres L. F., Duchon L. W. 1987. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*. 110 : 269—299.
- Witzemann V. 2006. Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res.* 326 : 263—271.
- Xu R., Salpeter M. M. 1997. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *J. Neurosci.* 17 : 8194—8200.

Поступила 23 XI 2009

STRUCTURE OF NEUROMUSCULAR JUNCTIONS AND DIFFERENTIATION OF STRIATED MUSCLE FIBERS OF MDX MICE AFTER BONE MARROW STEM CELLS THERAPY

A. V. Sokolova,¹ V. V. Zenin, V. M. Mikhailov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: avokolova@inbox.ru

Mdx mice are a model of Duchenne muscular dystrophy caused by deficiency of dystrophin. Muscles of mdx mice are characterized by high levels of striated muscle fibers death and, accordingly, by a high level of its regeneration. Moreover, the structure of neuromuscular junctions in mdx mice is altered. Changes in the structure of mdx mice neuromuscular junctions against a background of increasing differentiation of striated muscle fibers after C57BL/6 Lin (–) bone marrow stem cells transplantation were investigated. The muscles were studied in 4, 8, 16 and 24 weeks after transplantation. We observed that the level of striated muscle fibers loss was decreased from the 4th week after transplantation of bone marrow stem cells. Accumulation of muscle fibers without centrally located nuclei began from the 8th week, and dystrophin synthesis was increased at the 16th and 24th weeks after bone marrow stem cells transplantation. Longitudinal sections of quadriceps muscles of mdx mice showed decrease in the number of acetylcholine receptors clusters in neuromuscular junctions and a simultaneous increase in acetylcholine receptor clusters area during the 4th week after transplantation. In 16 weeks after bone marrow stem cells transplantation, total neuromuscular junction area was increased due to increase in the area of acetylcholine receptors clusters and to increase in their number as well. Thus, single intramuscular transplantation of C57BL/6 Lin (–) bone marrow stem cells induces an increase in differentiation of mdx mice striated muscle fibers and improves the structure of neuromuscular junctions.

Key words: mdx mice, cell therapy, neuromuscular junctions, Lin (–) bone marrow stem cells.