

**СЛАБОЕ КОМБИНИРОВАННОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ,  
НАСТРОЕННОЕ НА ИОН-ПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ РЕЗОНАНС ДЛЯ  $Ca^{2+}$ ,  
ИНТЕНСИФИЦИРУЕТ СИНТЕЗ ДИСТРОФИНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ MDX  
ПОСЛЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

© А. В. Соколова,<sup>1,\*</sup> Г. В. Соколов,<sup>2</sup> В. М. Михайлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,  
и <sup>2</sup> Крыловский государственный научный центр, Санкт-Петербург, 196159;  
\* электронный адрес: avsookolova@inbox.ru

В настоящее время активно исследуется возможность использования стволовых клеток костного мозга для коррекции мышечной дистрофии Дюшенна (МДД). Самой распространенной лабораторной моделью МДД являются мыши mdx. Одним из подходов клеточной терапии мышечной дистрофии мышей mdx является замена костного мозга после облучения мышей рентгеновскими лучами. Этот метод, однако, не позволяет значительно увеличить синтез дистрофина в мышечных волокнах мышей mdx. Мы дополнительно воздействовали слабым комбинированным магнитным полем, настроенным на ион-параметрический резонанс для  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -КМП), на мышей mdx после трансплантации клеток костного мозга для интенсификации участия трансплантированных клеток в регенерации мышц. Обнаружено, что у радиационных химер mdx 3 Гр и 5 Гр, дополнительно подвергавшихся в течение 1 мес воздействию  $Ca^{2+}$ -КМП, наблюдалось достоверное нарастание доли дистрофин-положительных мышечных волокон до 15.8 и 18.3 % соответственно по сравнению с контрольными группами. Также возросла доля мышечных волокон без центрально расположенных ядер. По-видимому, магнитное поле с данными параметрами может интенсифицировать функционирование ядер донорских клеток, включившихся в состав мышечных волокон.

**Ключевые слова:** мыши mdx, дистрофин, стволовые клетки костного мозга, слабое комбинированное магнитное поле, настроенное на ион-параметрический резонанс для  $Ca^{2+}$ .

**Принятые сокращения:** ККМ — клетки костного мозга, МДД — мышечная дистрофия Дюшенна, МПЗ — магнитное поле Земли, ППМВ — поперечнополосатые мышечные волокна,  $Ca^{2+}$ -КМП — слабое комбинированное магнитное поле, настроенное на ион-параметрический резонанс для  $Ca^{2+}$ .

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой одну из самых распространенных и тяжелых форм мышечной дистрофии (Dalkic, Kunkel, 2003). Развитие МДД связано с дефектом гена структурного белка дистрофина. Наиболее активно используемой лабораторной моделью МДД являются мыши mdx с точечной мутацией в X-хромосоме, приводящей к блокаде синтеза дистрофина (Bulfield et al., 1984; Sicinski et al., 1989). Для мышц мышей mdx характерен высокий уровень гибели поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ) и соответственно высокий уровень их регенерации. В результате в скелетных мышцах мышей mdx преобладают ППМВ с центрально расположенными ядрами, указывающими на то, что дифференцировка ППМВ заторможена на стадии мышечных трубочек. Одной из причин остановки дифференцировки считают окислительный стресс в мышцах мышей mdx (Tidball, Wehling-Henrics, 2006). Таким образом, некроз и регенерация ППМВ, а также присутствие в них центрально расположенных ядер, указывающее на нарушение дифференцировки, являются основными чертами патологии скелетных мышц у мышей mdx (Torres, Duchon, 1987).

Для коррекции МДД активно изучаются возможности использования клеточной терапии стволовыми клетками. В качестве источников стволовых клеток для целей клеточной терапии МДД рассматриваются клетки-сателлиты, стволовые клетки мышечного происхождения, стволовые клетки крови и мышечной ткани, перicyты, мезангиобласты и др. (Galvez et al., 2006; Dellavalle et al., 2007; Réault et al., 2007; Otto et al., 2009). Одним из основных подходов к использованию костного мозга для целей клеточной терапии МДД является замена костного мозга после облучения лучами Рентгена (Ferrari et al., 1998; Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999; Михайлов и др., 2006). Основная часть описанных опытов проводилась на химерах, полученных путем облучения мышей mdx летальными дозами ионизирующего излучения с последующей трансплантацией клеток костного мозга (ККМ). Трансплантированные ККМ дикого типа замещают костный мозг у облученных мышей mdx, спасая тем самым их от гибели, а также интегрируются в саркоплазму их ППМВ. Однако при этом экспрессия дистрофина или саркогликана не активируется (Gussoni et al., 1999; Lapidus et al., 2004; Chretien et al., 2005; Wernig et al.,

2005; Михайлов и др., 2006). Возможно, что окислительный стресс блокирует экспрессию генов «дикого» типа донорских ядер, проникших в саркоплазму ППМВ мышей mdx. Так как, несмотря на включение донорских ядер в ППМВ мышей mdx усиление синтеза дистрофина незначительно, вероятно, что для активации экспрессии донорских ядер требуется дополнительное воздействие. В качестве такого воздействия нами было выбрано слабое комбинированное магнитное поле, настроенное на ион-параметрический резонанс для  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -КМП). Обширные исследования, в частности отечественных ученых, показали, что магнитные поля — как постоянные и переменные, так и комбинированные — способны оказывать влияние на различные биологические системы (Zhadin, 2001). Особое внимание было сконцентрировано на взаимодействии биологических систем со слабыми магнитными полями, величина магнитной индукции которых составляет 1—100 мкТл, т. е. имеет порядок индукции магнитного поля Земли. Для объяснения наблюдаемых эффектов слабых магнитных полей Либовым (Liboff, 1985) была предложена теория циклотронного магнитного резонанса, согласно которой непосредственной мишенью воздействия слабых комбинированных магнитных полей (КМП) с биологическими системами могут быть ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ , в частности свободные ионы, находящиеся в каналах (Liboff, 1985; Liboff, Parkinson, 1991). При этом была показана зависимость биоэффекта как от частоты переменного поля, так и от величины магнитной индукции постоянной компоненты магнитного поля, при этом данная зависимость имеет резонансный характер.

Леднев (1996) предположил, что основные результаты, полученные в экспериментах Либова (Liboff, 1985) с КМП, могут быть объяснены на основе представлений о воздействии таких полей на связанные ионы, прежде всего  $\text{Ca}^{2+}$ , регулирующие скорость некоторых биохимических реакций, зависящих от  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулина и протеинкиназы С. Эта модель получила известность как теория магнитного параметрического резонанса (в биосистемах) (Леднев, 1996). Биологические эффекты слабых КМП, частота переменной компоненты которых совпадала с циклотронной частотой, были подтверждены в многочисленных экспериментах, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo* (обзор см.: Liboff, 2003). Биоэффекты КМП должны проявляться при достаточно высоких активностях Са-зависимых киназ, в первую очередь в пролиферирующих клетках, как в условиях *in vivo*, так и в культуре клеток в логарифмической фазе роста (Белова, 2011).

В настоящее время накоплены данные о положительном влиянии  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП на регенераторные процессы в обновляющихся клеточных популяциях как *in vivo*, так и *in vitro*. Показано, что  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП увеличивает длину и толщину бедренных костей зародышей цыплят, стимулирует рост и регенерацию костей у кроликов (Liboff et al., 1990).  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП ускоряет регенерацию планарий, которая протекает с участием стволовых клеток (Тирас и др., 1996).  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП положительно влияет на дифференцировку миобластов (De Carlo et al., 2012). По нашим данным,  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП также увеличивает массу тела и активизирует процессы синтеза ДНК в ростковых зонах длинных костей растущих мышей C57BL/6 в возрасте 1—2 мес.  $\text{K}^{+}$ -КМП таким действием не обладает (Арсеньев и др., 2007). Свойства  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП обуславливают его применение для лечения больных с травмами опорно-двигательного аппарата (Пономаренко и др., 1998) и для лечения разновеликих конечностей у детей и подро-

стков (Дудин и др., 2003). В связи со сказанным выше задачей данного исследования было исследовать возможность использования  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП для активации транскрипционной активности ядер ККМ доноров, проникших в саркоплазму ППМВ облученных реципиентов после трансплантации ККМ.

## Материал и методика

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

**Создание радиационных химер.** 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. Клетки костного мозга (ККМ) выделяли из бедренных и больших берцовых костей мышей C57BL/6. Мышей умерщвляли 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 доводили костный мозг до состояния однородной клеточной суспензии, пропуская его через иглу шприца. Облученных мышей mdx наркотизировали нембуталом (40 мг на 1 кг массы животного). Полученные ККМ в объеме 0.2 мл ( $15\text{—}20 \cdot 10^6$  клеток) вводили облученным мышам в яремную вену. Введение ККМ производили через 1 сут после облучения. В течение 1 мес после трансплантации в воду для питья, которую получали мыши, добавляли стрептомицин и бензпенициллин (по 125 мг на 250 мл воды).

Облучение радиационных химер mdx слабым комбинированным магнитным полем. Комбинированное магнитное поле, настроенное на ион-параметрический резонанс для  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -КМП), создавали с помощью установки, сконструированной Г. В. Соколовым (ЦНИИ им. акад. А. Н. Крылова) (Дудин и др., 2003). 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, суммируясь, создавали суммарный модуль индукции магнитного поля ( $B_{dc}$ ), равный 65.7 мкТл. Переменная компонента поля частотой  $f_{ac} = 50$  Гц создавалась индуктором и была направлена вертикально, амплитуда магнитной индукции переменной компоненты ( $B_{ac}$ ) была равна 90 мкТл.

Радиационных химер mdx подвергали воздействию  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП в течение 4 нед по 30 мин каждый день (кроме выходных). Воздействие начинали через 4 нед после трансплантации ККМ. Контрольные животные находились в постоянном МПЗ ( $B_{dc} = 48$  мкТл).

Таким образом, были сформированы 3 группы животных: 1) мыши mdx, находившиеся в постоянном МПЗ; 2) химеры mdx, находившиеся только в постоянном МПЗ; 3) химеры mdx, подвергавшиеся в течение 1 мес воздействию  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП.

**Иммуногистохимия.** Поперечные срезы четырехглавых мышц бедра толщиной 10 мкм получали на криостате Bright Co Ltd (Великобритания) после пред-

варительного охлаждения мышцы в жидком азоте. Подсушенные срезы фиксировали 1 мин в смеси этанола и карбинола (1 : 1) при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Готовые срезы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для выявления дистрофина на срезы 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 (Abcam, США). Срезы инкубировали с антителами при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. На часть срезов вместо антител наносили PBS для контроля неспецифического связывания вторичных антител. После отмывки в PBS 3 раза по 5 мин на срезы наносили раствор 0.03%-ной  $\text{H}_2\text{O}_2$  на 30 мин. Далее срезы промывали в PBS 3 раза по 5 мин и наносили на срезы реагенты Avidin/Biotin Bloking Kit (Zymed Laboratories Inc., Invitrogen, США) для уменьшения неспецифического связывания стрептоаваидина с эндогенным биотином согласно инструкции фирмы-производителя. Затем срезы отмывали 3 раза по 5 мин в PBS и наносили вторичные антитела к иммуноглобулинам кролика, меченные биотином в разведении 1 : 100 (Sigma, США) на 1 ч. Далее промывали срезы в PBS 3 раза по 5 мин и наносили стрептоаваидин, конъюгированный с пероксидазой, в разведении 1 : 200 (Sigma, США) на 30 мин. Срезы промывали в PBS 3 раза по 5 мин и на срезы наносили диаминобензидин (10 мг диаминобензидина растворяли в 10 мл PBS и смешивали с 0.5 мл 0.1%-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  в PBS) на 5 мин. Далее срезы 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 (Полак, Ван Норден, 1987). Ядра докрашивали красителем Гимза, затем срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, проводили через 3 порции ксилола (в последней оставляли не менее чем на 3 ч) и заключали в канадский бальзам.

На срезах, окрашенных на дистрофин, в прямой мышце бедра подсчитывали количество ППМВ, содержащих дистрофин, и затем определяли долю дистрофин-положительных волокон в прямой мышце. Долю ППМВ, не содержащих центрально расположенных ядер, определяли для оценки перехода мышечной трубочки в мышечный симпласт, т. е. данный показатель использовали как критерий дифференцировки ППМВ. Определение доли ППМВ без центральных ядер, а также доли погибших ППМВ проводили по общепринятой методике на гистологических срезах.

Использованные реактивы: DPBS без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , PBS (Биолот, Россия); антитела к дистрофину (Abcam, США); Avidin/Biotin Bloking Kit (Zymed Laboratories Inc., Invitrogen, США); BSA, антитела к иммуноглобулинам кролика, меченные биотином, стрептоаваидин, конъюгированный с пероксидазой (Sigma, США).

## Результаты и обсуждение

В первом эксперименте было получено, что в группе радиационных химер mdx 5 Гр, подвергавшейся действию только постоянного магнитного поля Земли (МПЗ), не наблюдали накопления дистрофина в ППМВ, увеличения доли гибнущих ППМВ, а также доли ППМВ, имеющих центрально расположенных ядер (табл. 1), что подтверждает наши предыдущие результаты (Михайлов и др., 2006). У радиационных химер mdx, дополнительно подвергавшихся в течение 1 мес воздействию  $\text{Ca}^{2+}$ -КМП, наблюдали достоверное увеличение доли дистрофин-положительных ППМВ до 15.8 % по сравнению с обеими контрольными группами. Также возрастала доля ППМВ без центрально расположенных ядер (табл. 1).

Как уже было указано выше, несмотря на участие трансплантированных ККМ в регенерации ППМВ мышцей mdx и включение ядер введенных клеток в состав ППМВ, значительного увеличения доли дистрофин-положительных волокон не наблюдалось (Михайлов и др., 2006). Эти данные согласуются с результатами, полученными другими группами исследователей (Gussoni et al., 1999; Chretien et al., 2005; Wernig et al., 2005). По-видимому, для экспрессии гена дистрофина недостаточно проникновения трансплантированных ядер ККМ дикого типа в состав ППМВ мышцей mdx. В литературе высказано предположение о том, что популяция стволовых ККМ имеет очень ограниченный потенциал для регенерации скелетных мышц (Cossu, 2004; Lapidus et al., 2004). По нашему мнению, торможение транскрипционной активности ядер ККМ, трансплантированных в мышечных волокнах мышцей mdx, является результатом окислительного стресса, характерного для мышечных волокон мышцей mdx (Tidball, Wehling-Henricks, 2007). Возможно, что в условиях окислительного стресса активность ростовых факторов мышц мышцей mdx, регулирующих транскрипционную активность ядер, уменьшается.

Ранее для преодоления торможения транскрипционной активности трансплантированных ядер у мышцей-химер mdx нами было предложено проводить трансплантацию костного мозга после облучения в нелетальной дозе

Таблица 1

### Влияние рентгеновского облучения в дозе 5 Гр, трансплантации клеток костного мозга и воздействия $\text{Ca}^{2+}$ -КМП на поперечнополосатые мышечные волокна мышцей mdx

Вариант опыта	Доля дистрофин-положительных ППМВ, %	Доля погибших ППМВ, %	Доля ППМВ без центрально расположенных ядер, %
Контроль (3)	$1.1 \pm 0.4$	$2.2 \pm 0.6$	$10.5 \pm 1.0$
2 мес после облучения в дозе 5 Гр и трансплантации клеток костного мозга (3)	$1.2 \pm 0.6$	$1.6 \pm 0.2$	$11.2 \pm 1.5$
2 мес после облучения в дозе 5 Гр, трансплантации клеток костного мозга и воздействия $\text{Ca}^{2+}$ -КМП (5)	$15.8 \pm 3.8$	$2.1 \pm 0.6$	$22.8 \pm 3.0$

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках указано число животных в группе.

Таблица 2

Влияние рентгеновского облучения в дозе 3 Гр, трансплантации клеток костного мозга и воздействия Ca<sup>2+</sup>-КМП на поперечнополосатые мышечные волокна мышей mdx

Вариант опыта	Доля дистрофин-положительных ППМВ, %	Доля погибших ППМВ, %	Доля ППМВ без центрально расположенных ядер, %
Контроль (3)	4.18 ± 1.09	3.3 ± 1.1	8.4 ± 0.8
2 мес после облучения в дозе 3 Гр и трансплантации клеток костного мозга (3)	5.7 ± 1.6	3.8 ± 1.4	15.2 ± 3.2
2 мес после облучения в дозе 3 Гр, трансплантации клеток костного мозга и воздействия Ca <sup>2+</sup> -КМП (5)	18.3 ± 3.7	5.2 ± 1.8	18.6 ± 3.2

3 Гр. Показано, что донорский химеризм в костном мозге мышей после трансплантации клеток костного мозга наблюдается и в случае, если клетки трансплантировали животным, предварительно облученным в дозах 3 и 1.6 Гр (Goebel et al., 2002), и даже необлученным мышам (Stewart et al., 1993). Оказалось, что у радиационных химер mdx, облученных лучами Рентгена в дозе 3 Гр, последующая замена костного мозга на костный мозг мышей дикого типа приводит к частичному восстановлению синтеза дистрофина и более выраженному восстановлению структуры и функции нейромышечных соединений ППМВ (Соколова и др., 2010; Кравцова и др., 2011; Mikhailov et al., 2012). Однако наблюдаемое увеличение доли дистрофин-положительных ППМВ до 27 % занимало весьма продолжительное время (до 6 мес). Поэтому было предложено также исследовать воздействие Ca<sup>2+</sup>-КМП на радиационных химер mdx 3 Гр.

Через 2 мес после трансплантации у мышей mdx, находящихся только в МПЗ, увеличения доли дистрофин-положительных волокон и доли ППМВ без центрально расположенных ядер по сравнению с контрольной группой, не подвергавшейся каким-либо воздействиям, не наблюдали. У мышей mdx, дополнительно подвергавшихся воздействию Ca<sup>2+</sup>-КМП, наблюдали значительное увеличение доли дистрофин-положительных волокон до 18.3 % по сравнению с обеими контрольными группами (табл. 2). Таким образом, процентное содержание дистрофин-положительных ППМВ после воздействия на радиационных химер Ca<sup>2+</sup>-КМП (15.8 и 18.3 %) значительно выше данного показателя у химер mdx, находящихся только в МПЗ (1.2 и 5.7 % соответственно). Исходя из данных Беловой с соавторами (2010) о подавлении накопления свободных радикалов кислорода в цитоплазме нейтрофилов мышей под действием Ca<sup>2+</sup>-КМП, мы предполагаем, что в случае химер-мышей mdx Ca<sup>2+</sup>-КМП подавляет окислительный стресс (Tidball, Wehling-Henricks, 2006). Следствием подавления окислительного стресса является усиление синтеза дистрофина и дифференцировки ППМВ мышей mdx. Аналогичный эффект был получен в результате совместной генной терапии мышей mdx при баллистической трансфекции мини-геном дистрофина вместе с антиапоптотическим геном *BCL-xL* или *PRDX5 (ACR-1)*. В данных экспериментах усиление синтеза дистрофина и уменьшение окислительного стресса вызвали усиление дифференцировки ППМВ, что проявлялось в виде увеличения доли ППМВ без центральных ядер (Михайлов и др., 2002).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследо-

ваний (проекты 14-04-32205 мол\_а и 14-04-00259 а) (обеспечение работы антителами), а также при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и ФАНО России.

## Список литературы

- Арсеньев А. В., Дудин М. Г., Михайлов В. М., Соколов Г. В. 2007. Влияние слабого комбинированного магнитного поля, вызывающего эффект ион-параметрического резонанса, на функциональную активность ростковых зон экспериментальных животных. Матер. Рос. нац. конгр. «Человек и его здоровье». Травматология и ортопедия России, приложение. 3 (45) : 12. (Arsen'ev A. V., Dudin M. G., Mikhailov V. M., Sokolov G. V. 2007. Influencing of weak magnetic field which induced ion-parametric resonance on function activity of growth zone of experimental animals. Proc. of the Russian national congress «Human and his health». Traumatology and orthopedics of Russia, supplement 3 (45) : 12.)
- Белова Н. А. 2011. Первичные мишени во взаимодействии слабых магнитных полей с биологическими системами: Автореферат докт. дис. Пушино. 42 с. (Belova N. A. 2011. Primary targets in interaction of weak magnetic fields with biological systems. Abstract of doctoral dissertation. Pushchino. 42 p.)
- Белова Н. А., Поцелуева М. М., Скребницкая Л. К., Знобишина А. В., Леднев В. В. 2010. Регуляция скорости образования активных форм кислорода в перитонеальных нейтрофилах мышей с помощью слабых магнитных полей. Биофизика. 55 (4) : 657—663. (Belova N. A., Potseleva M. M., Skrebniatskaia L. K., Znobishcheva A. V., Lednev V. V. 2010. Effects of weak magnetic fields on the production of reactive oxygen species in peritoneal neutrophils in mice. Biophysics. 55 (4) : 657—663.)
- Дудин М. Г., Арсеньев А. В., Соколов Г. В. 2003. Патент 2212258. Российская Федерация, МПК А61N2/00. Способ лечения разновеликих конечностей у детей и подростков. Бюл. изобр. № 26. 20 с. (Dudin M. G., Arsen'ev A. V., Sokolov G. V. 2003. RF Patent No 2212258. Byull. Izobret, № 26. 20 p.)
- Кравцова В. В., Михайлов В. М., Соколова А. В., Михайлова Е. В., Тимонина Н. А., Никольский Е. Е., Кривой И. И. 2011. Восстановление электрогенеза скелетной мышцы после клеточной терапии миодистрофии у мышей mdx. Докл. РАН. 441 (2) : 272—274. (Kravtsova V. V., Mikhailov V. M., Sokolova A. V., Mikhailova E. V., Timonina N. A., Nikol'skii E. E., Krivoi I. I. 2011. Recovery of electrogenesis in skeletal muscles after cell therapy of myodystrophy in MDX mice. Dokl. Biol. Sci. 441 (2) : 357—359.)
- Леднев В. В. 1996. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей. Биофизика. 41 (1) : 224—232. (Lednev V. V. 1996. Bioeffects of weak combined, static and alternating magnetic fields. Biophysics. 41 (1) : 224—232.)
- 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 поперечнополоса-

- тых мышц mdx. Цитология. 48 (5) : 410—417. (Mikhailov V. M., Evtifeeva E. V., Serikov V. B., Pereverzev A. E., Karmanova A. V., Zenin V. V. 2006. Participation of bone-marrow stem cells in the differentiation of mdx mice striated muscle. Tsitologiya. 48 (5) : 410—417.)
- Михайлов В. М., Кротонов А. В., Зеленин А. В., Крутили-на 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. (Mikhailov V. M., Kropotov A. V., Zelenin A. V., Krutilina R. I., Kolesnikov V. A., Zelenina I. A., Baranov A. N., Stein G. I., Ostapenko O. V., Tomilin N. V., Baranov V. S. 2002. The *Bcl-xL* and *ACR-1* genes promote differentiation and reduce apoptosis in muscle fibers of mdx mice. Russ. J. Genetics. 38 (11) : 1221—1225.)
- Полак Дж., Ван Норден С. 1987. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир. 74 с. (Polak J., Van Noorden S. 1984. An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems. M.: Mir. 74 p.)
- Пономаренко Г. Н., Соколов Г. В., Шустов С. Б., Киселева Т. П., Мажара Ю. П., Анисимов А. И., Калинин А. В., Носова В. Ф. 1998. Анализ клинических эффектов ион-параметрической магнитотерапии. Вопросы курортологии, физиотерапии и ЛФК. 1 : 6—9. (Ponomarenko G. N., Sokolov G. V., Shustov S. B., Kiselyova T. P., Mazhara Yu. P., Anisimov A. I., Kalinin A. V., Nosova V. F. 1998. The analysis of clinical effects an ion-parametrical magnetotherapy. Questions of balneology, physical therapy and LFK. 1 : 6—9.)
- 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. (Sokolova A. V., Zenin V. V., Mikhailov V. M. 2010. Structure of neuromuscular junctions and differentiation of striated muscle fibers in mdx mice after bone-marrow stem cell therapy. Cell Tissue Biol. 4 : 258—266.)
- Тирас Х. П., Сребницкая Л. К., Ильясова Е. Н., Климов А. А., Леднев В. В. 1996. Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina*. Биофизика. 41 (4) : 826—831. (Tiras Kh. P., Sreb-nitskaya L. K., Ilyasova E. N., Klimov A. A., Lednev V. V. 1996. The influence of weak combined magnetic field on the rate of regeneration in planarians *Dugesia tigrina*. Biophysics. 41 (4) : 826—831.)
- Bittner R. E., Schöfer C., Weipoltshammer K., Ivanova S., Streubel B., Hauser E., Frellinger M., Höger H., Elbe-Bürger A., Wachtler F. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. Anat. Embryol. (Berlin). 199 : 391—396.
- Bulfield G., Siller W. G., Wight P. A., Moore K. J. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 81 : 1189—1192.
- 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.
- Dalkilic I., Kunkel L. M. 2003. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. Curr. Opin. Genet. Develop. 13 : 231—238.
- De Carlo F., Ledda M., Pozzi D., Pierimarchi P., Zonfrillo M., Giuliani L., D'Emilia E., Foletti A., Scorretti R., Grimaldi S., Lisi A. 2012. Nonionizing radiation as a noninvasive strategy in regenerative medicine: the effect of Ca<sup>2+</sup>-ICR on mouse skeletal muscle cell growth and differentiation. Tissue Eng. Part A. (21—22) : 2248—58. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0113.
- 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.
- Goebel W. S., Yoder M. C., Pech N. K., Dinauer M. C. 2002. Donor chimerism and stem cell function in a murine congenic transplantation model after low-dose radiation conditioning: effects of a retroviral-mediated gene transfer protocol and implications for gene therapy. Exp. Hematol. 30 : 1324—1332.
- 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.
- Lapidos K. A., Chen Y. E., Earley J. U., Heydemann A., Huber J. M., Chien M., Ma A., McNally E. M. 2004. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. J. Clin. Invest. 114 : 1577—1585.
- Liboff A. R. 1985. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells. J. Biol. Phys. 13 : 99—102.
- Liboff A. R. 2003. Ion cyclotron resonance in biological systems: Experimental evidence. In: Stavroulakis P. (Ed.). Biological effects of electromagnetic field. Berlin: Springer. 76—113.
- Liboff A. R., McLeod B. R., Smith S. D. 1990. United States Patent № 4932951.
- Liboff A. R., Parkinson W. C. 1991. Search for ion-cyclotron resonance in an Na<sup>+</sup>-transport system. Bioelectromagnetics. 12 : 77—83.
- Mikhailov V. M., Sokolova A. V., Kravtsova V. V., Zenin V. V., Kaminskaya E. V., Timonina N. A., Krivoi I. I. 2012. Non-myeloablative bone marrow stem cell transplantation for mdx mice myodystrophy therapy. J. Cell Sci. Ther. 3 : 122. doi: 10.4172/2157-7013.1000122
- Otto A., Collins-Hooper H., Patel K. 2009. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. J. Anat. 215 : 477—497.
- 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.
- Sciusi P., Geng Y., Ryder-Cook A. S., Barnard E. A., Darlison M. G., Barnard P. J. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science. 244 : 1578—1580.
- Stewart F. M., Crittenden R. B., Lowry P. A., Pearson-White S., Quisenberry P. J. 1993. Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice. Blood. 81 : 2566—2571.
- Tidball J. G., Wehling-Henricks M. 2007. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. J. Appl. Physiol. 102 : 1677—1687.
- 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 (Pt 2) : 269—299.
- Wernig G., Janzen V., Schafer R., Zweyer M., Knauf U., Högemeier O., Mundegar R. R., Garbe S., Stier S., Franz T., Wernig M., Wernig A. 2005. The vast majority of bone-marrow-derived cells integrated into mdx muscle fibers are silent despite long-term engraftment. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 11 852—11 857.
- Zhadin M. N. 2001. Review of russian literature on biological action of DC and low-frequency AC magnetic fields. Bioelectromagnetics. 22 : 27—45.

WEAK COMBINED MAGNETIC FIELDS ADJUSTED TO THE PARAMETRIC RESONANCE  
FOR  $\text{Ca}^{2+}$  INTENSIFY DYSTROPHIN SYNTHESIS IN MDX MICE SKELETAL MUSCLES  
AFTER CELL THERAPY

*A. V. Sokolova,<sup>1,\*</sup> G. V. Sokolov,<sup>2</sup> V. M. Mikhailov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

<sup>2</sup> Krylov State Research Centre, St. Petersburg, 196159;

\* e-mail: avokolova@inbox.ru

The mdx mice are an X-linked myopathic mutants, an animal model for human Duchenne muscular dystrophy (DMD). Mdx mice muscles are characterized by high level of striated muscle fibers (SMF) death followed by regeneration. As a result most SMFs of mdx mice have centrally located nuclei. The possibility of using stem cells therapy for the correction of DMD is actively being studied. One of the approaches to the usage of bone marrow stem cells for cellular therapy of DMD is the replacement of bone marrow after irradiation by X-rays. This method however does not give significant increase of dystrophin synthesis in mdx mice muscles fibers. We have tried to affect the mice after bone marrow transplantation by weak combined magnetic fields adjusted to the parametric resonance for  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -MF) based on the data that the weak combined magnetic fields influence on tissues regeneration. We observed a significant increase in the proportion of dystrophin-positive SMFs in group of mdx mice radiation chimera 5 Gy and 3 Gy which was additionally exposed in  $\text{Ca}^{2+}$ -MF in comparison with the control mdx mice and the group of mdx mice radiation chimera 5 Gy and 3 Gy which was kept in terrestrial magnetic field 2 months after chimera preparation — up to 15.8 and 18.3 %, respectively. Also, there was an accumulation of SMFs without central nuclei. These data indicate a significantly increased efficacy of cell therapy in the case of additional exposition in  $\text{Ca}^{2+}$ -MF. Thus, the efficiency of bone marrow transplantation mdx mice after both in doses 3 and 5 Gy was considerably enhanced by additional exposition to  $\text{Ca}^{2+}$ -MF. Apparently, such magnetic field can intensify functioning of donor's nuclei which had been incorporated into muscle fibers.

**Key words:** mdx mice, dystrophin, bone marrow stem cells, weak combined magnetic fields adjusted to the parametric resonance for  $\text{Ca}^{2+}$ .