

На правах рукописи

ЧЕРНОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И РЕПАРАТИВНОГО ГИСТОГЕНЕЗА
ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У
МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫМ ДЕФИЦИТОМ
ДИСФЕРЛИНА**

1.5.22. Клеточная биология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Казань
2021

Работа выполнена в ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Научный руководитель кандидат медицинских наук, доцент
Деев Роман Вадимович

Научный консультант доктор медицинских наук, профессор
Киясов Андрей Павлович

Официальные оппоненты:

Одинцова Ирина Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии с курсом эмбриологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Загребин Валерий Леонидович – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в «__» часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12 и на сайте <https://iemsph.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент

Алешина Галина Матвеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Поперечнополосатая скелетная мышечная ткань (ППСМТ) подвержена повреждающему воздействию факторов как эндогенной, так и экзогенной природы. Постоянная физическая активность приводит к растяжению, микроразрывам сарколеммы мышечных волокон (МВ), следовательно, в скелетных мышцах постоянно происходит физиологическая регенерация как на субклеточном, так и на клеточном и тканевом уровнях. Последний процесс возможен благодаря наличию миосателлитоцитов, расположенных между плазмолеммой и базальной мембраной каждого МВ и способных поддерживать свой пул путем самообновления (Одинцова и соавт., 2014; Seale et al., 2000, Sharner et al., 2011). Особенностью регенерации скелетной мышечной ткани является так же то, что процесс формирования «молодого» МВ при репаративном гистогенезе проходит те же этапы, что и в эмбриональном миогистогенезе (Клишов, 1984; Данилов, 2008; Одинцова, 2004).

Начало изучения регенерации ППСМТ датируется 1860-ми годами, когда Ф. Ценкер и Г. Вальдейер описали изменения в скелетных мышцах при брюшном тифе, а К. Вебер охарактеризовал строение рабдомиосаркомы (Waldeyer, 1865; Weber, 1867; Zenker, 1864). Однако клеточные механизмы регенерации скелетных мышц оставались не ясными до 1961 года, когда А. Мауро описал ультраструктуру и функции миосателлитоцитов (Mauro, 1961). В 50-70-е годы прошлого столетия механизмы регенерации поперечнополосатых мышц, в т. ч. посттравматической изучали Д.С. Саркисов, А.Н. Студитский, П.П. Румянцев (Румянцев и соавт., 1977; Саркисов, 1979; Студитский, 1952; Студитский, 1977).

Профессор А.А. Клишов занимался вопросами эмбрионального развития ППСМТ, а также процессами посттравматической регенерации скелетных мышц, сформулировал гипотезу ядерно-саркоплазменных территорий (Клишов, 1980; Клишов, 1984). С начала 1980-х годов коллектив кафедры гистологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова под руководством А.А. Клишова занимался вопросами гистогенеза скелетной мышечной ткани, в том числе в условиях раневого процесса. Результаты работы отражены в многочисленных научных трудах профессоров Р.К. Данилова, И.А. Одинцовой (Данилов, 1993; Данилов, 2011; Одинцова, 2004).

Значимый вклад в изучение гистогенеза скелетной мышечной ткани внесла казанская школа гистологов (Э. Г. Улумбеков, Н.П. Резвяков, В.В. Валиуллин, Р.Р. Исламов, А.П. Киясов). В экспериментах Н.П. Резвякова было показано, что мышечные волокна (МВ) не окончательно

детерминированы и при различных воздействиях способны менять свои качественные характеристики (Резвяков, 1973; Резвяков, 1982). На модели денервации скелетных мышц было выявлено увеличение содержания медленных МВ (Валиуллин и соавт., 1991), при тиреоидэктомии, наоборот, снижение их содержания (Валиуллин и соавт., 1983). Таким образом, было показано, что скелетная мышечная ткань обладает пластичностью, т.е. способностью менять свои свойства в зависимости от условий среды. Позже, в работах по изучению ишемии скелетных мышц Р.Р. Исламовым и А.П. Киясовым была продемонстрирована сохранность структуры червеобразных мышц крыс до 6 часов после их ишемии (Исламов и соавт., 1991), а также показано влияние температуры окружающей среды на степень сохранности ишемизированных скелетных мышц (Исламов и соавт., 1994). А.П. Киясовым и А.А. Гумеровой были изучены процессы репаративной регенерации *m.soleus* крыс после локальной инъекции 0,5% р-ра новокаина, выявлена реституция скелетной мышечной ткани к 30 сут. после инъекции (Киясов и соавт., 1992).

Современные исследования сосредоточены на поиске клеточных и биоинженерных источников восстановления объемных повреждений мышц (Gilbert-Honick et al., 2020; Kwee et al., 2017; Liu et al., 2018; Pantelic et al., 2018), а также способов стимуляции гистотипической регенерации скелетных мышц при наследственных (Chal et al., 2017; Sun et al., 2020) и возрастных (Landi et al., 2018; Morley, 2016) состояниях, сопровождающихся снижением объема мышечной массы.

Изучение репаративных процессов в скелетных мышцах приобретает все большую актуальность с появлением методов генной и клеточной терапии. Особый научный и практический интерес представляет изучение наследственных мышечных заболеваний и механизмов их патогенеза на различных уровнях организации живых организмов. Поясно-конечностные мышечные дистрофии (ПКМД) 2 типа – группа наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. Дисферлинопатии – наследственные миодистрофии с распространенностью 7,4:1000000, в основе развития которых лежат мутации в гене *DYSF*. Среди всех ПКМД 2 типа на дисферлинопатии приходится 15-20% (Liu et al., 2019).

С появлением линейных животных, имеющих те же мутации, что и при наследственных заболеваниях человека (Kobayashi et al., 2012), становится актуальным изучение патогенетических и патофизиологических (гистофизиологических) основ болезней, что крайне важно для разработки научно обоснованной патогенетической и этиотропной терапии.

Таким образом, существует обширная база фундаментальных исследований по изучению регенерации скелетных мышц в условиях физической, химической, механической травмы, однако с появлением методов генной и клеточной терапии генетических заболеваний актуальность приобретает изучение пластичности ППСМТ на биологических (генетических) моделях (Деев, 2019).

Степень разработанности темы исследования. На сегодняшний день выявлены основные закономерности онтогенетического и регенерационного гистогенеза поперечнополосатой скелетной мышечной ткани; установлены особенности повреждения и реактивности после наиболее значимых видов повреждений. Вместе с тем, особенности миогистогенеза в условиях генетически обусловленного повреждения, связанного с отсутствием одного из конституциональных белков, остаются невыявленными.

Цель исследования – определить особенности онтогенетического и репаративного рабдомиогенеза у мышей с дефицитом дисферлина.

Задачи исследования

1. Изучить структуру и ультраструктуру поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в постнатальном онтогенезе мышей линий *Vla/J* и *C57Bl/6*.

2. Охарактеризовать стромально-сосудистую архитектуру скелетных мышц у мышей с генетически обусловленным дефицитом дисферлина на этапах постнатального онтогенеза.

3. Охарактеризовать особенности повреждения поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в модели химической травмы у мышей линий *Vla/J* и *C57Bl/6*.

4. Определить особенности репаративного гистогенеза поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мышей, дефицитных по дисферлину.

5. На основании полученных данных сформулировать научно обоснованные рекомендации к использованию линии *Vla/J* в доклинических исследованиях коррекции дисферлинопатии.

Научная новизна

Впервые изучены структура и ультраструктура поперечнополосатой мышечной ткани у мышей, мутантных по гену *DYSF* в возрастном аспекте, а полученные данные сопоставлены с показателями мышей дикого типа. В диссертации впервые описаны микроскопические и ультрамикроскопические процессы, происходящие в ППСМТ на протяжении постнатального онтогенеза мышей с генетически обусловленным отсутствием дисферлина. Было показано, что в течение постнатального онтогенеза скелетные мышцы

нокаутных мышей претерпевают ряд патоморфологических изменений, свойственных пациентам с дисферлинопатиями: появление центральноядерных и единичных некротизированных МВ с пубертатного периода (соответствует возрасту 2-3 мес. у мышей), гипертрофия МВ с последующей их атрофией, липоидозом, снижение регенераторного потенциала мышц. Было произведено сравнение полученных результатов с аналогичными показателями у мышей дикого типа – C57Bl/6.

Впервые разработан и применен комплекс морфометрической оценки тканей скелетной мышцы, позволяющий достоверно оценить некроз, объем стромы, сосудистую сеть, пролиферацию и дифференцировку элементов миогенного дифферона.

В ходе работы впервые было проведено сравнение репаративной регенерации ППСМТ у мышей линий B1a/J и C57Bl/6. Согласно полученным данным, при репаративном рабдомиогенезе у мышей с мутацией в гене *DYSF* происходят те же процессы, что и у мышей дикого типа, однако медленнее, доля некротизированных МВ у первых выражена значительно больше во все исследуемые периоды, а пролиферация и миогенная дифференцировка происходят с меньшей интенсивностью.

На основании полученных данных были сформулированы рекомендации, использование которых применимо для дальнейших доклинических исследований безопасности и эффективности генных препаратов, направленных на лечение мышечных дистрофий.

Теоретическая и практическая ценность работы

Проведенная работа содержит описание основных процессов, происходящих в скелетной мышечной ткани мышей в отсутствие дисферлина как при естественном течении дисферлинопатии, так и при остром повреждении скелетных мышц. Понимание механизмов регенерации скелетной мышечной ткани при наследственной патологии скелетных мышц крайне важно как с точки зрения изучения патоморфогенеза, так и для разработки таргетной терапии. В работе впервые описано влияние миотоксичного агента на мышечную ткань мышей линии B1a/J, дано патогистологическое заключение ключевым стадиям восстановления скелетных мышц.

Предложенная схема морфометрической оценки основных гистофизиологических процессов, входящих в гистогенез (пролиферация, миграция, специализация, дифференцировка, гибель), в состоянии генетически обусловленного дефицита того или иного значимого для гистофизиологии данной ткани белка является одним из подходов,

позволяющих выявить новые значимые особенности гистогенеза и регенерации тканей и представляют собой т.н. «мутантный гистогенез».

Созданная в ходе работы схема исследования (алгоритм) является необходимой и достаточной моделью для исследований специфической эффективности в доклинических исследованиях разрабатываемых этиотропных и патогенетических препаратов для лечения мышечных дистрофий. Практическая значимость исследования заключается в возможности применения полученных результатов в разработке и тестировании препаратов *in vivo* для этиотропной и патогенетической терапии наследственных заболеваний скелетных мышц.

Методология и методы исследования. Исследование было выполнено на мышцах-самцах линий V1a/J и C57Bl/6. Мыши линии V1a/J были получены из Лаборатории Джексон (JAX®, штат Мэн, США), мыши линии C57Bl/6 – из Научно-исследовательского центра биомедицинских моделей и технологий (г. Москва). При выполнении работы были использованы гистологические методы, иммуногистохимические методы, молекулярно-биологические методы (полимеразная цепная реакция в режиме реального времени), электрофорез ДНК в агарозном геле, а также метод трансмиссивной электронной микроскопии. Статистическая обработка полученных данных проводилась в программе Statistica 13.3 критерием Краскела-Уоллиса для нескольких независимых выборок со значением $p < 0,05$ в качестве уровня значимости.

Положения, выносимые на защиту

1. Гистогенез поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в условиях отсутствия белка дисферлина протекает с особенностями, включающими ранний массивный некроз мышечных волокон, гиперплазию и гипертрофию стромы, раннее истощение камбиальных резервов ткани.

2. Модель химического некроза мышечной ткани дисферлин-дефицитных мышей с большой достоверностью демонстрирует патофизиологические процессы, приводящие к нарушению репаративного миогистогенеза и его исхода.

Степень достоверности и апробации результатов

Результаты исследований были представлены и обсуждены на Международной научной конференции «Трансляционная медицина: настоящее и будущее», г. Казань (2016), XXIV Ежегодном конгрессе Европейского Общества Генной и Клеточной Терапии, г. Флоренция, Италия (2016), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Москва (2016), 2 Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и

клинической морфологии», г. Рязань (2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине, г. Москва (2017), XXV Ежегодном конгрессе Европейского Общества Генной и Клеточной Терапии, г. Берлин, Германия (2017), Международной научно-практической конференции «Перспективы развития технологий регенеративной медицины», г. Оренбург (2018), 52 Ежегодном научном собрании Европейского Общества Клинических исследований, г. Барселона, Испания (2018), VI Международном конгрессе по Миологии, г. Бордо, Франция (2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине, г. Москва (2019), VII Молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург (2020), Всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина», г. Москва (2021), 25 Всероссийская научная конференция «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей», г. Санкт-Петербург (2021).

По результатам работы опубликовано 28 научных трудов (1 монография, 5 статей, 4 из которых опубликованы в журналах, включенных в список ВАК, 22 тезиса докладов).

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в подготовке и проведении экспериментальной части работы, в получении материала и изготовлении гистологических срезов с их последующей окраской простыми гистологическими методами, проведении иммуногистохимических и иммунофлуоресцентных реакций. Автором проведено получение микрофотографий с полученных срезов, их последующая количественная оценка, статистическая обработка данных и формирование выводов на основании полученных результатов. Автором был подготовлен и опубликован ряд статей и материалов научных докладов.

Объём и структура диссертации. Материалы диссертационной работы изложены на 149 страницах машинописного текста. Иллюстрации и цифровой материал представлены 74 рисунками и 7 таблицами. Диссертация состоит из оглавления, введения, обзора литературы, экспериментальной части с описанием материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы из 252 источников.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследование было проведено на самцах мышей линии Vla/J с мутацией в гене *DYSF* (n=30) и линии C57Bl/6 (контрольная группа, n=30). Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (протокол №14 от 08.02.2019).

С целью подтверждения гомозиготной мутации в гене *DYSF* перед началом эксперимента было проведено генотипирование 20 мышей линии Vla/J и мышей линии C57Bl/6 в качестве контроля.

Экспериментальная часть работы включала в себя оценку состояния скелетных мышц в постнатальном онтогенезе мышей с дисферлинопатией, а также оценку репаративной регенерации в ответ на острое химическое повреждение. Для изучения особенностей естественного течения заболевания на светооптическом уровне были изучены гистологические срезы икроножных мышц мышей двух линий в возрастах от 1 сут. до 18 мес. (всего 14 мышей каждой линии) постнатального онтогенеза, на электронномикроскопическом уровне – икроножная мышца, медиальная широкая мышца бедра и диафрагма мышей линии Vla/J в возрастах 1 сут., 20 сут., 3 мес. и 12 мес. Для оценки реактивности скелетных мышц в ответ на острое повреждение была выбрана химическая модель. В медиальную головку правой икроножной мышцы всем животным вводили 100 мкл 0,5% раствора новокаина (Renewal®, серия №421115, Россия) через кожный разрез. Кожа рассекалась, миотоксический агент вводился прецизионно инсулиновым шприцом под контролем зрения. Затем кожа ушивалась. Животные находились под комбинированным золетил-медитиновым наркозом. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 2, 4, 10 и 14 сут. (n=4 из каждой группы для каждого срока, всего 32 животных). После извлечения икроножных мышц проводилась стандартная гистологическая пробоподготовка.

Парафиновые срезы были окрашены гематоксилином и эозином, по Маллори, на срезах были проведены иммуногистохимические реакции с антителами (Ат) к альфа-гладкомышечному актину (α -SMA, разведение 1:50, клон 1A4, ДАКО, США), Ki-67 (разведение 1:200, ab16667, Abcam, Великобритания), миогенину (разведение 1:100, клон F5D, ДАКО, США), быстрым (разведение 1:500, клон My-32, Sigma, США) и медленным изоформам тяжелых цепей миозина (разведение 1:2000, клон NOQ7.5.4D, Sigma, США). Контрастирование ядер проводилось гематоксилином. Для предотвращения неспецифического фонового окрашивания при

использовании мышинных первичных антител на срезах мышинной ткани использовался коммерческий набор Animal Research Kit (ДАКО, США) с обязательным отрицательным контролем реакций. С целью обнаружения синтеза дисферлина на криосрезах мышц голени была произведена иммунофлуоресцентная реакция Ат к дисферлину (ab124684, 1:200, Abcam, Великобритания), вторичные Ат Alexa Fluor 647 (1:2000, Invitrogen, США). Контрастирование ядер проводилось DAPI.

Для изучения ультраструктуры скелетных мышц образцы икроножной, медиальной широкой мышцы бедра и диафрагмы размерами 1×1×5 мм фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, разведенном в фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) и постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия. После дегидратации в спиртах возрастающей концентрации и ацетонах материал заливали смесью эпоксидных смол Epon (Epon 812, Epon DDSA, Epon MNA, DMP, Fluka Chemie AG, Швейцария). Ультратонкие срезы контрастировали на сетках уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе JEM-100 CX. Пробоподготовку и электронную микроскопию проводили в лаборатории электронной микроскопии патологоанатомического отделения Национального медицинского исследовательского центра хирургии им. А.В. Вишневского под руководством доктора биологических наук И.А. Чекмаревой.

Окрашенные гистологические срезы фотографировали с помощью светового микроскопа Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия), а также сканировали с помощью сканера предметных стекол Aperio CS2 (Leica Microsystems, Германия). Полученные изображения анализировали с использованием программ Aperio ImageScore (Leica, Германия) и ImageJ (NIH, США). Морфометрия производилась по 10 микрофотографиям со срезов икроножных мышц. При морфометрии оценивали следующие показатели:

1. Средняя площадь поперечного сечения МВ;
2. Доля центральоядерных МВ;
3. Доля некротизированных МВ;
4. Соотношение МВ, синтезирующих тяжелые цепи быстрых и медленных миозинов;
5. Поздняя миогенная дифференцировка;
6. Индекс пролиферации (ИП): 1) отношение Ki-67 позитивных ядер в мышечных клетках к общему числу ядер в мышечных клетках; 2) отношение Ki-67 позитивных ядер в эндотелиоцитах к общему числу ядер в эндотелиоцитах; 3) отношение Ki-67 позитивных ядер в СТ к общему числу ядер в СТ;

7. Сосудистая плотность;

8. Доля фиброза.

Результаты морфометрического анализа выражали в виде медианы (1-й квартиль; 3-й квартиль). Статистическую достоверность различий средних величин двух линий экспериментальных животных оценивали в программе Statistica 13.3 критерием Краскела-Уоллиса для нескольких независимых выборок со значением $p < 0,05$ в качестве уровня значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

Структура и ультраструктура поперечнополосатой скелетной мышечной ткани мышц линии Vla/J в разные периоды онтогенеза. В икроножной мышце мыши линии Vla/J на ультраструктурном уровне были выявлены признаки повреждения клеток миогенного дифферона: нарушение целостности сарколеммы, мозаичные просветления матрикса митохондрий, выраженная вакуолизация саркоплазмы, высокая складчатость ядер, расширение цистерн гранулярной ЭПС. В скелетной мышечной ткани были обнаружены капилляры с патоморфологическими изменениями: истончением базальной мембраны, вакуолизацией эндотелиоцитов и глыбчатостью цитоплазмы в них. Не исключено, что эти проявления связаны с нарушением синтеза дисферлина и в эндотелиоцитах.

При исследовании ультраструктуры скелетных мышц в условиях отсутствия дисферлина через 20 сут. после рождения были обнаружены патологические изменения различных компартментов мышечных волокон: набухание плазматической мембраны, инвагинации и фрагментарное нарушение целостности сарколеммы, изменения в организации сократительного аппарата МВ (расширение промежутков между истонченными миофибриллами, дезорганизация Z-линий, множественная вакуолизация СПР). Кроме того, было обнаружено субсарколеммное скопление полиморфных митохондрий, увеличение одних митохондрий наряду с деструктивными изменениями других, выявлено уплотнение крист.

Степень дегенерации МВ в скелетных мышцах мыши линии Vla/J 3 мес. жизни усиливалась: в некоторых волокнах наблюдался выраженный отек саркоплазмы с дезорганизацией миофибрилл в виде их истончения, аномалий Z-линий, разрывами миофибрилл на пучки и отеком межпучковых пространств, деформированные и полиморфные митохондрии сливались в единую биоэнергетическую цепь.

При изучении ультраструктуры мыши линии Vla/J в возрасте 12 мес. были обнаружены многочисленные некротизированные МВ со следующими признаками дегенерации: миолиз с множественной вакуолизацией

саркоплазмы, отсутствие границ сарколеммы, потеря поперечной исчерченности, отек саркоплазмы, разрывы и фрагментация пучков миофибрилл, полиморфизм митохондрий. В местах разрывов сарколеммы наблюдается скопление малых везикул, предположительно, сформированных «патчей». В мышцах изучаемой возрастной группы выявлены скопления коллагеновых волокон, что на светооптическом уровне соответствует фиброзу мышечной ткани. В этот период изменения как на светооптическом, так и на электронномикроскопическом уровнях были наиболее выраженными по сравнению с другими (более ранними) изучаемыми возрастными группами.

Результаты морфометрического исследования поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период молочного кормления мышей линий Vla/J и C57Bl/6. В обеих линиях данной возрастной группы на светооптическом уровне отсутствовали некротизированные МВ (в отличие от ультраструктурного уровня) и ЦЯМВ. Площадь поперечного сечения МВ возрастала с 1 сут. жизни, однако она была выше у мыши линии Vla/J (57,56 (43,84;73,56) мкм²) в два раза по сравнению с животным дикого типа (28,59 (20,19;37,38) мкм², $p < 0,01$). К 20 сут. показатель был примерно одинаковым у мышей обеих линий (185,15 (139,81;245,23) мкм² у Vla/J и 205,52 (155,80;256,80) мкм² у C57Bl/6, $p = 0,061$). Показатель сосудистой плотности на 1 сут. жизни оказался выше у C57Bl/6. К 20 сут. у мышей дикого типа показатель снижался, а у линии с дефицитом дисферлина, наоборот, возрастал и достоверно отличался (40,00 (27,13;44,99)% у линии мышей Vla/J и 16,44 (14,81;18,14)% у линии мышей C57Bl/6, $p = 0,0029$).

Результаты морфометрического исследования поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период полового созревания мышей линий Vla/J и C57Bl/6. В этом периоде были изучены мышцы мышей 1 и 2 мес. жизни. На первом мес. в икроножных мышцах обеих линий животных были выявлены единичные некротизированные МВ – 1,06 (0;2,31)% у C57Bl/6 и 0 (0;1,03)% у Vla/J, $p = 0,55$, но уже в 2 мес. показатель значительно повысился у мышей с мутацией в гене *DYSF* и составил 7,31 (6,82;11,90)%, у дикого типа он был равен 0 (0;1,32)%, $p = 0,067$. При ультраструктурном исследовании гибнущие МВ в мышцах линейных мышей были выявлены на более ранних сроках.

ИП мышечных клеток в икроножной мышце мыши дикого типа был ниже в 1 мес. по сравнению с дисферлиндефицитной линией и составил 0 (0;0,49)%, у Vla/J – 0 (0;0,77)%, $p = 0,86$. У мышей линии Vla/J доля ЦЯМВ повышалась с 0 (0;0,8)% в 1 мес. до 2,22 (0;2,4)% в 2 мес., $p = 0,1$. Вероятно, есть обратная зависимость между долей некротизированных и центральоядерных МВ. Другой показатель, который значительно возрос у

линейных животных к 2 мес. – это средняя площадь поперечного сечения МВ, которая увеличивалась с 282,29 (208,15;379,95) мкм² в 1 мес. до 768,63 (425,9;1158,72) мкм² в 2 мес., $p < 0,01$.

Аналогичная динамика прослеживалась у мышей с мутацией в гене *DYSF* и в соотношении быстрых и медленных МВ; доля медленных МВ возрастала с 0 (0;0,48)% в 1 мес. до 5,09 (0;11,34)% в 2 мес., $p = 0,043$, в то время как у мышей дикого типа показатель был равен 0 (0;0)%. Появление медленных МВ у мышей линии Vla/J может быть результатом реактивности скелетных мышц в ответ на повреждение.

Показатели поздней миогенной дифференцировки и сосудистой плотности в описываемой возрастной группе были выше у мышей линии C57Bl/6. Более низкая по сравнению с контролем сосудистая плотность может свидетельствовать о сниженной васкуляризации скелетных мышц у мышей, мутантных по гену *DYSF*, и подтверждает участие дисферлина в ангиогенезе. Снижение васкуляризации, возможно, усугубляет течение дисферлинопатии, так как развивающаяся ишемия скелетных мышц способствует усилению альтерации МВ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 2-й мес. жизни для мышей линии Vla/J является манифестирующим по основному заболеванию. На светооптическом уровне появляются патоморфологические признаки, характерные для миодистрофического процесса: гибель (некроз МВ) и регенерация (центральнаяядерные МВ) скелетных мышц, гипертрофия МВ.

Результаты морфометрического исследования поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в репродуктивный период мышей линий Vla/J и C57Bl/6. На всех изучаемых сроках доля некротизированных МВ была достоверно выше у мышей линии Vla/J и составляла 9,38 (4,39;14,2)%, 7,31 (6,67;8,51)% и 6,25 (3,69;4,96)% в 3, 5 и 9 мес. соответственно. Показатель у мышей дикого типа был минимальным вплоть до 9 мес. (0 (0;0,5)%) (Рисунок 1).

ИП мышечных ядер в обеих линиях до 5 мес. не превышал 1,58 (1,45;3,96)% (у мыши C57Bl/6 в 3 мес.). С 3 по 5 мес. показатель снижался, а к 7 мес. повысился у обеих линий животных и оставался выше у мышей дикого типа: 3,93 (1,84;5,31)% в 7 мес. и 1,72 (0;4,17)% в 9 мес. У дисферлиндефицитных мышей значения составили 0,98 (0;1,26)% ($p = 0,049$) и 3,89 (1,71;5,50)% ($p = 0,23$) в 7 и 9 мес., соответственно. Доля ЦЯМВ была выше у животных с дефицитом дисферлина на всех изучаемых сроках, где постепенный рост показателя наблюдался с 1 мес. (0 (0;0,88)%) до 5 мес. (17,78 (17,3;19,15)%, $p = 0,007$). В 7 мес. показатель снизился до 6,56 (2,85;7,67)%, а в 9 мес. снова вырос и составил 18,94 (18,22;19,84)%, $p = 0,007$.

Полученный результат свидетельствует об активном репаративном процессе в МВ.

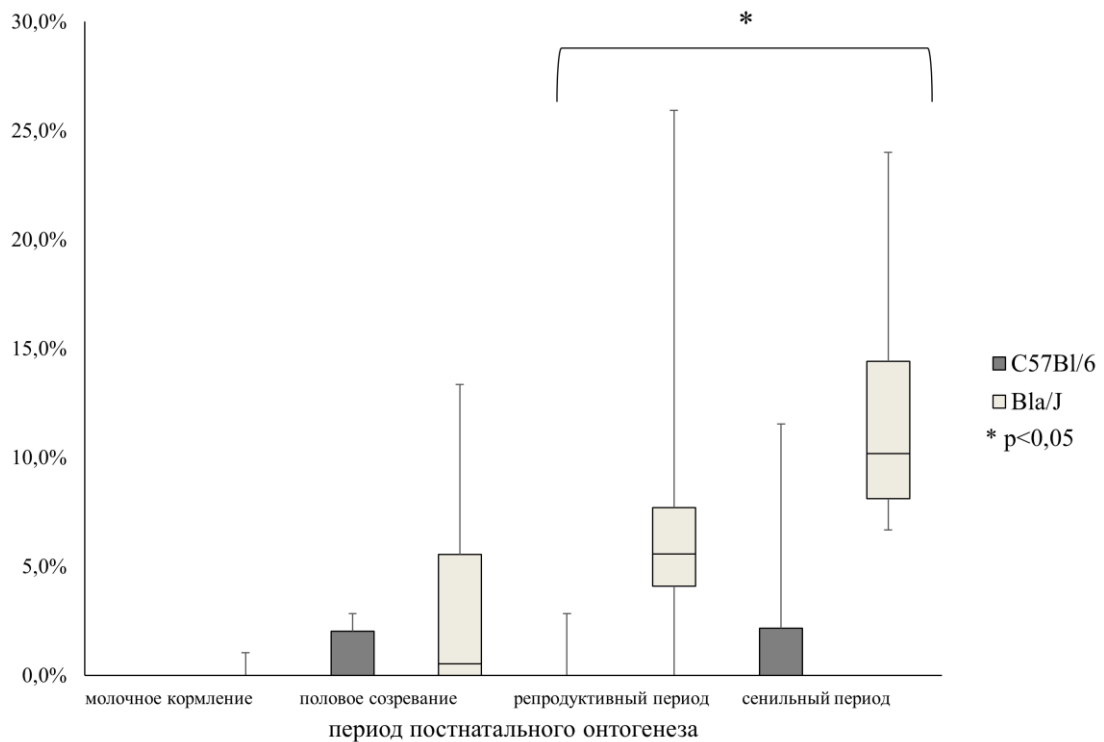


Рисунок 1 – Количество некротизированных мышечных волокон в икроножной мышце в динамике постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$.

Похожей динамикой характеризуется показатель средней площади поперечного сечения МВ, который возрастал у мышей линии Bla/J до 7 мес. и на всех сроках оставался выше по сравнению с мышами дикого типа. К 9 мес. показатель снизился и составил 621,89 (392,03;935,36) $\mu\text{м}^2$ у мыши Bla/J, а у C57Bl/6, наоборот, повысился к 9 мес. – 1163,55 (895,22;1442,25) $\mu\text{м}^2$, $p < 0,001$. Полученные данные подтверждают компенсаторную гипертрофию МВ на фоне постоянной гибели мышечных волокон в условиях отсутствия дисферлина.

В изменении доли миогенин-позитивных ядер выявлена общая тенденция у мышей обеих линий: после спада в 2 мес. показатель возрастал от 3 к 5 мес., а затем снижался и в 7 мес. был равен 0,68 (0%;0,86)% у мыши с отсутствием дисферлина и 0,32 (0;0,9)% у мыши дикого типа, $p = 0,96$. К 9 мес. доля миогенин-позитивных ядер снова возросла до 1,53 (0,9;1,6)% у дисферлиндефицитной мыши и 1,02 (0;1,7)% у мыши линии C57Bl/6, $p = 0,47$. Можно предположить, что до этого времени пул миосателлитоцитов, способных к миогенной дифференцировке, не теряет свою функциональную способность в условиях отсутствия дисферлина, однако и не компенсирует

собой гибель МВ, которая на протяжении всего онтогенеза остается выше у мышечной линии Vla/J.

В образцах скелетных мышц голени мышей 7 месячного возраста у представителей линии Vla/J наблюдался более низкий уровень ИП эндотелиальных клеток и клеток стромы, а также снижение сосудистой плотности. Вероятно, это свидетельствует об уменьшении активности ангиогенеза в отсутствие дисферлина.

Результаты морфометрического исследования поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период выраженных старческих изменений мышечной ткани линий Vla/J и C57Bl/6. Было установлено, что доля некротизированных МВ возрастала с 9 до 18 мес. у мышечной обеих линий, что позволяет говорить о снижении регенераторного потенциала скелетных мышц в течение постнатального онтогенеза. В 18 мес. показатель составил 3,33 (0;6,01)% у линии C57Bl/6 и 14,44 (11,96;18,07)% у мышечной линии Vla/J, $p < 0,001$, что делает очевидным вклад дисферлина в восстановление целостности сарколеммы. На фоне роста показателя некроза МВ наблюдалось и повышение доли ЦЯМВ, показатель которой также оказался выше в группе с отсутствием дисферлина (22,72 (20,37;27,21%) в 18 мес., тогда как у C57Bl/6 на этом сроке показатель составил 6,04 (3,84;13,02)%, $p = 0,001$ и был максимальным для мышечной этой линии на всех изучаемых сроках. Следовательно, существует обратная корреляция между уровнем некротизированных МВ и ЦЯМВ, что логично, т.к. повышение доли ЦЯМВ свидетельствует о репаративных процессах в скелетных мышцах на фоне их гибели. Показатель средней площади поперечного сечения МВ возрастал и был достоверно выше у мышечной линии Vla/J до 5 мес., после чего у обеих линий продолжал снижаться до 18 мес. При этом начиная с 9 мес. показатель в контрольной группе все время оставался выше. Так, если показатель достиг своего максимума у линии Vla/J к 5 мес. и был равен 1075,73 (675,58;1725,62) $\mu\text{м}^2$, то к 15 мес. он составил 465,96 (274,51;695,44) $\mu\text{м}^2$, $p < 0,05$. Из этого следует, что у мышечной с дисферлинопатией вплоть до 9 мес. наблюдается компенсаторная гипертрофия МВ, которая в последующем сменяется атрофией ввиду истощения камбиального резерва скелетных мышц.

Доля миогенин-позитивных ядер в изучаемой возрастной группе отличалась у мышечной двух линий и на всех изучаемых сроках оставалась выше у мышечной линии C57Bl/6. У мышечной линии Vla/J показатель снижался с 1,75 (1,17;2,10)% в 12 мес. до 0,97 (0,65;1,32)% в 18 мес., что может свидетельствовать о снижении миогенного потенциала в условиях дефицита дисферлина. Похожие изменения выявлены и в динамике сосудистой

плотности, где показатель у дисферлиндефицитных мышей оказался ниже в описываемой возрастной группе.

По результатам сравнительного патоморфологического анализа скелетных мышц в постнатальном онтогенезе у мышей двух линий было выявлено снижение репаративных свойств скелетной мышечной ткани (более высокая доля некротизированных МВ, компенсаторная гипертрофия МВ с последующей их атрофией, снижение пролиферативной активности и уровня миогенной дифференцировки), однако процессы дегенерации у мышей с дисферлинопатией были отмечены с первых суток жизни и прогрессировали в течение жизни, в то время как у мышей контрольной линии гибель отдельных МВ и появление ЦЯМВ наблюдалось лишь на поздних сроках онтогенеза. Это подтверждает, что дисферлин выполняет ключевую функцию в репарации поврежденных МВ.

Обнаружено, что скелетные мышцы в условиях отсутствия дисферлина претерпевают постоянные процессы дегенерации и регенерации МВ, постепенно снижая свои компенсаторные возможности к 9 мес. Было выявлено статистически достоверное различие в доле некротизированных МВ у мышей линии Vla/J с 3 мес. жизни с постепенным ростом показателя до 18 мес.

Особенности репаративного рабдомиогенеза у мышей линий Vla/J и C57Bl/6

Химическое повреждение и воспаление мышечного регенерата. Доля некротизированных МВ – один из важнейших показателей динамики восстановления скелетной мышечной ткани после травмы. Показатель у обеих групп животных был максимальным на 2 сут. (35,13 (29,41;42,86)% у мышей линии Vla/J и 25,81 (17,85;37,42)% у линии C57Bl/6, $p < 0,05$). У контрольной группы значения постепенно снижались к 14 сут. (2,51 (1,46;3,13)%). Показатель в экспериментальной группе снижался от 2 к 10 сут., а к 14 сут. возрос до 7,36 (5,35;9,85)%). Такая динамика показателя может быть связана со второй волной гибели МВ в результате воспалительного процесса. При мутациях в гене *DYSF* наблюдается сниженная секреция МВ цитокинов и хемокинов, что, в свою очередь, замедляет рекрутинг лейкоцитов и приводит к более позднему воспалительному ответу (Chiu et al., 2009; de Morree et al., 2013). Предполагается, что у макрофагов в отсутствие синтеза дисферлина нарушен процесс переключения с провоспалительных на противовоспалительные, что приводит к длительному воспалительному ответу и отсутствию реституции скелетных мышц (Baek et al., 2017). Снижение эффективности фагоцитоза при дефиците дисферлина также приводит к персистенции

некротизированных МВ и увеличение их числа у мышей линии B1a/J (Chiu et al., 2009). В мышечном регенерате мышей линии B1a/J после введения новокаина была выявлена более выраженная лейкоцитарная инфильтрация по сравнению с мышами дикого типа (Рисунок 2).

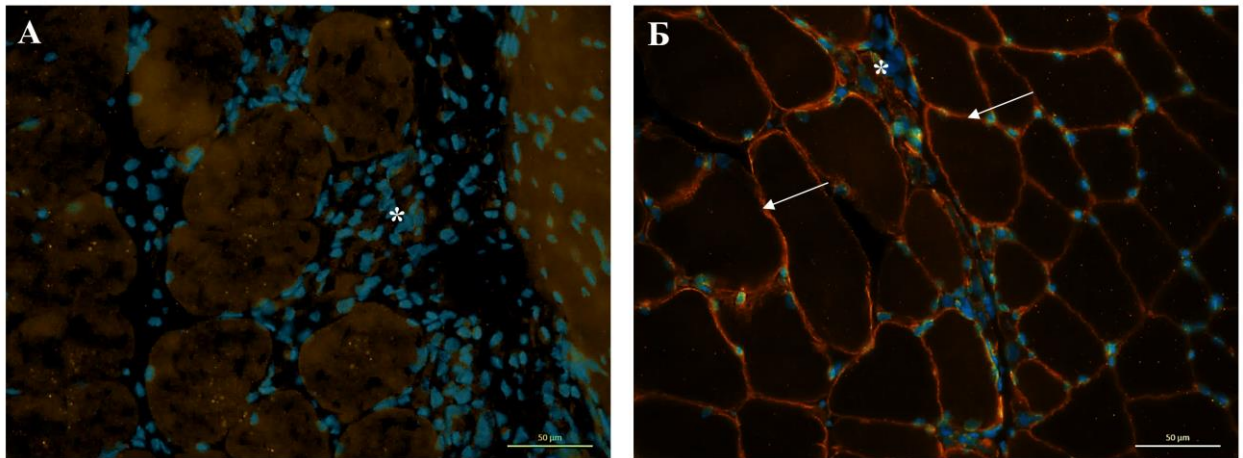


Рисунок 2 – Срезы икроножной мышцы мышей линии B1a/J (А) и C57Bl/6 (Б), 4 сут. после повреждения новокаином. Лейкоцитарная инфильтрация в месте инъекции (*). Синтез дисферлина в сарколемме мышечных волокон контрольной группы (стрелки). Иммунофлуоресцентная реакция с Ат к дисферлину. Докраска ядер: DAPI. Ув.: $\times 400$.

Пролиферация и дифференцировка структур мышечного регенерата. Пролиферативные процессы после повреждения характерны не только для МВ, но и для других элементов в составе скелетной мышцы, в частности, сосудов и стромы, поэтому в ходе исследования целесообразно было оценить и их репаративную способность. Ki-67 экспрессируется во всех стадиях клеточного цикла. При анализе ИП мышечных клеток было выявлено, что доля Ki-67-позитивных ядер в МВ снижалась в обеих изучаемых группах в интервале от 2 до 14 сут., однако на всех сроках, кроме 10 сут., этот показатель оказался выше у мышей линии C57Bl/6, что указывает на сниженную пролиферативную активность при отсутствии дисферлина. К 14 сут. показатель в обеих группах не превышал 1%, таким образом, пролиферация мышечных клеток у мышей обеих линий была завершена к концу 2 недели после повреждения.

Важно отметить, что динамика снижения ИП отличалась у мышей разных линий: у мышей линии B1a/J показатель быстрее снижался в интервале между 2 и 4 сут. (примерно на 8-9%, в контрольной группе – на 3-4%), а у мышей линии C57Bl/6 наиболее активное снижение показателя пришлось на 4 и 10 сут. (приблизительно на 14%, у B1a/J – на 0-2%). Полученный результат свидетельствует о менее интенсивном и более

позднем завершении пролиферации у мышей линии Vla/J. Вероятно, это может быть связано с истощенным пулом миосателлитоцитов, которые постоянно активируются при естественном течении миодистрофии (Politi et al., 2006).

Пролиферация ядер в эндотелиоцитах, в отличие от показателей пролиферации в строме и мышечных клетках, не сопровождалась постепенным снижением синтеза Ki-67 ни в контрольной, ни в экспериментальной группах. Однако значения были ниже у мышей линии Vla/J с 4 по 14 сут., что вновь подтверждает предположение о снижении пролиферативной активности в отсутствие дисферлина, в том числе и в сосудистом компоненте скелетных мышц. Если у животных контрольной группы рост показателя со 2 к 4 сут. возрастал с 10,72 (0;21,58)% до 28,23 (20,91;35,84)%, то в экспериментальной группе – лишь с 13,33 (11,76;26,79)% до 15,38 (11,11;22,22)%, $p < 0,05$. Следовательно, камбиального резерва для пролиферации эндотелиоцитов у дефицитных по дисферлину мышей недостаточно. Это может быть связано с отсутствием дисферлина в эндотелиоцитах, где доказано его участие в ангиогенезе (Sharma et al., 2010).

Доля миогенин-позитивных клеток у мышей линии C57Bl/6 была выше на всех сроках наблюдения. Тенденция к снижению показателя у мышей линии Vla/J свидетельствует о нарушенной миогенной дифференцировке в отсутствие дисферлина. Наблюдалась обратная корреляция между числом миогенин-позитивных ядер и долей некротизированных МВ в поврежденных мышцах у мутантных животных. Из этого можно заключить, что миогенная дифференцировка в отсутствие дисферлина активируется, но остается незавершенной. Также нельзя исключить, что у мышей линии Vla/J регенеративный потенциал может быть снижен вследствие того, что в их онтогенезе и так непрерывно происходит репарация поврежденных МВ.

Интернализация ядер в клетках миогенного дифферона отражает процессы внутриклеточной регенерации МВ, при этом ядра МВ с периферии волокна смещаются к центру. Кроме того, центральное расположение ядер наблюдается во вновь формирующихся МВ (Roman et al., 2018). Так как данная локализация ядер снижает сократительную способность МВ, после слияния миобластов ядра мигрируют на периферию (Cadot et al., 2012). Поэтому при подсчете доли ЦЯМВ учитывались не только регенерирующие МВ, но также мышечные трубочки. Показатель доли ЦЯМВ был минимальным для обеих линий мышей на 2 сут., у мышей линии Vla/J оставался ниже по сравнению с контрольной группой до 10 сут. включительно, что свидетельствует о более позднем начале и меньшей интенсивности репаративных процессов в условиях отсутствия дисферлина.

К 14 сут. у мышей дикого типа репаративная регенерация завершилась, в то время как для мутантных животных в данной точке наблюдалось максимальное значение показателя: (48,98 (33,33;54,32)% у мышей линии Vla/J и 46,15 (34,30;58,46)% у мышей линии C57Bl/6, $p=0,45$). Меньшая доля ЦЯМВ у мышей линии Vla/J в ответ на повреждение может быть связана со снижением числа миобластов как результат истощения пула миосателлитоцитов и нарушением слияния миобластов.

Другим показателем, отражающим состояние МВ, является средняя площадь поперечного сечения МВ. Этот параметр на всех сроках был выше у мышей Vla/J, что можно трактовать как компенсаторную гипертрофию сохранивших жизнеспособность МВ на фоне их постоянной гибели. У мышей контрольной линии изучаемый показатель снижался к 4 сут. и составил 255,56 (165,39;650,67) $\mu\text{м}^2$, что связано с появлением большего по сравнению с экспериментальной группой количества миотуб.

У мышей линии Vla/J содержание медленных мышечных волокон было выше на всех изучаемых сроках. По-видимому, это связано с преимущественной гибелью волокон, экспрессирующих быстрые изоформы тяжелых цепей миозина, за которой следует образование медленных МВ, более устойчивых к повреждению в условиях дефицита дисферлина. Ранее было описано уменьшение количества быстрых МВ у мышей SJL с мутацией в гене *DYSF* (Kobayashi et al., 2012), а также преимущественная потеря быстрых мышечных волокон у пациентов с дисферлинопатиями (Grounds et al., 2014). Вероятно, большая сохранность медленных МВ связана с наличием в них большего числа митохондрий, которые выступают буфером для ионов кальция (Santo-Domingo et al., 2010). Наличие липидных капель в этих волокнах у пациентов с дисферлинопатиями (Grounds et al., 2014) может быть результатом нарушения метаболизма жирных кислот в митохондриях.

Ремоделирование и функциональная адаптация мышечного регенерата. Завершающий этап в восстановлении морфофункциональной способности поврежденной ткани, который находит отражение в фиброзировании и васкуляризации. Сосудистая плотность повышалась со 2 сут. после введения новокаина в обеих группах и достигла своего максимума к 14 сут. (22,22 (18,42;26,09)%) в контрольной группе и 19,61 (15,64;24,00)% в экспериментальной группе, $p<0,05$). Отставание показателей у последних, вероятно, связано со сниженной экспрессией дисферлина в эндотелиоцитах.

Различия в доле соединительной ткани (СТ) хоть и были статистически достоверны во всех изучаемых сроках, однако едва превышали 0,05% у мышей Vla/J (максимум 0,06 (0,01;0,12)% на 10 сут.). Таким образом, внутримышечное введение новокаина не оказывает фиброзирующего

влияния на скелетные мышцы изучаемых линий мышей в первые 14 сут. после инъекции.

Результаты описанной работы показывают, что репаративный гистогенез в условиях отсутствия дисферлина проходит те же стадии, что и в нормальной скелетной мышечной ткани, однако с некоторыми отличиями: альтерация протекает интенсивнее с большей долей некроза, процессы восстановления замедлены, пролиферативная активность снижена, дифференцировка отсроченная. Эти процессы обусловлены еще и тем, что естественное течение мышечной дистрофии создает неблагоприятные условия для восстановления скелетных мышц после острого повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе впервые проведена комплексная и количественная оценка основных показателей состояния скелетных мышц у мышей с мутацией в гене *DYSF* на протяжении постнатального гистогенеза. Было выявлено, что первые деструктивные изменения в ППСМТ на электронномикроскопическом уровне появляются с первых суток жизни, а на светооптическом – со второго месяца.

Установлено, что в условиях напряженно протекающей физиологической и репаративной регенерации ППСМТ у мышей линии *Bla/J* химическое повреждение скелетной мышцы приводит к снижению пролиферации эндотелиоцитов, снижению пролиферации клеток стромы и увеличению степени фиброза в месте повреждения по сравнению с мышцами дикого типа. Из вышесказанного следует, что отсутствие дисферлина в реактивно измененных скелетных мышцах замедляет не только скорость репаративной регенерации МВ, но и компонентов стромального и сосудистого дифферонов.

Таким образом, белок дисферлин вносит существенный вклад в постоянно протекающие процессы постнатального гистогенеза и регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани. В отсутствии продукта экспрессии гена снижается не только репаративная способность сарколеммы, но и сосудистая плотность. Последнее, в свою очередь, способствует ишемии скелетных мышц и усугублению ведущего патофизиологического процесса, развивающегося на тканевом и органном уровнях. Полученные данные можно использовать в дальнейшем для создания и развития этиотропной или патогенетической терапии.

Выводы

1. Постнатальный гистогенез поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в условиях генетически обусловленного дефицита дисферлина характеризуется более высокой долей некротизированных мышечных волокон – 14,49 (11,96;18,1)%, $p < 0,05$, в 18 мес., компенсаторной гипертрофией мышечных волокон с последующей их атрофией, снижением пролиферативной активности и уровня миогенной дифференцировки миогенных клеток-предшественниц – 0,97 (0,66;1,32)% в 18 мес. по сравнению с мышами дикого типа.

2. Строение мышцы (как органа) у животных с мутацией в гене дисферлина характеризуется понижением васкуляризации, начиная с 5 мес. по сравнению с мышами дикого типа (40,91 (29,41;51,0)% у мышей линии Vla/J и 56,05 (42,34;67,89)% у мышей линии C57Bl/6, $p < 0,05$). Доля стромального компонента с возрастом повышается у мышей линии Vla/J.

3. Выявлено, что в мышцах животных с мутацией в гене *DYSF* происходят те же процессы, что и у мышей контрольной группы, однако альтерация у первых выражена значительно больше, что проявляется большей долей некротизированных мышечных волокон (35,13 (29,41;42,86)% у мышей линии Vla/J и 25,81 (17,85;37,42)% у C57Bl/6) на 2 сут. после повреждения, $p < 0,05$, а пролиферация и миогенная дифференцировка происходят с меньшей интенсивностью по сравнению с контрольной группой: процент миогенин-позитивных ядер составил 3,2 (0,06; 6,9)% на 4 сут. после повреждения у мышей линии Vla/J и 6,3 (1,3;15,3)% у мышей линии C57Bl/6, $p = 0,046$.

4. В условиях напряженно протекающей физиологической и репаративной регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани обширный химический некроз мышцы приводит к снижению пролиферации эндотелиоцитов (8,33 (0;16,44)% у мышей линии Vla/J и 21,18 (14,29;26,79)% в контрольной группе, $p < 0,05$, на 14 сут. после повреждения), снижению пролиферации клеток стромы (0 (0;2,43)% у мышей линии Vla/J и 10,56 (1,93;26,32)% у мышей C57Bl/6, $p < 0,05$, 4 сут. после повреждения) и увеличению фиброза в месте повреждения.

5. Модель химического повреждения мышц мышей линии Vla/J в возрасте 5 мес. с последующим морфометрическим анализом показателей альтерации, пролиферации, миогенной дифференцировки, васкуляризации и степени фиброза является достоверной для оценки действия кандидатов для терапии дисферлинопатий, поскольку учитывает изменения не только миогенного, но и других дифферонов в составе поперечнополосатой

скелетной мышечной ткани, а также позволяет провести количественную оценку изменений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендовать внедрение в лабораторную практику предложенную модель химического повреждения скелетных мышц линейных мышцей с последующим морфометрическим и статистическим анализом показателей альтерации, пролиферации, миогенной дифференцировки, васкуляризации и степени фиброза для оценки действия препаратов, направленных на этиотропную и патогенетическую терапию дисферлинопатий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Опубликовано 28 работ (1 монография, 5 статей и 22 тезиса докладов).

1.Чернова О.Н. Признаки повреждения и регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мышцей линии B1a/J: ультраструктурный аспект / О.Н. Чернова, И.А Чекмарева, М.О. Мавликеев, А.П. Киясов, Р.В. Деев // Сборник научных трудов российской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина». — М.: ФГБНУ НИИМЧ, 2021. С. 223-224. DOI: 10.31088/Regbiomed2021.15-16

2.Чернова О.Н. Патоморфологические изменения диафрагмы в онтогенезе мышцей линии B6.A-Dysfprmd/GeneJ / Чернова О.Н., Мавликеев М.О., Павлович В.В., Киясов А.П., Деев Р.В. // Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», М.: Группа МДВ, 2020. — 232 с.

3. Чернова О.Н. Реактивные изменения элементов стромально-сосудистых дифферонов поперечнополосатой скелетной мышцей после повреждения новокаином в условиях дефицита дисферлина / Чернова О.Н., Мавликеев М.О., Киясов А.П., Бозо И.Я., Деев Р.В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2020. - 11(170). – С. 646-650

4. Чернова О.Н. Морфологические особенности физиологического и репаративного миогистогенеза при мутации в гене DYSF. / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, И.С. Лимаев, М.В. Елистратова, А.П. Киясов, Р.В. Деев // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15, №3. – С. 123.

5. Chernova O. Histopathological characterization of skeletal muscle during postnatal ontogenesis of dysferlin-deficient mice / O. Chernova, M. Mavlikeev, A. Shafigullina, A. Zeinalova, F. Faizrahmanova, D. Proskunov, A. Kiyasov, R. Deev // 6th International Congress on Myology. Abstracts. - 2019. - p. 57

6. Чернова О.Н. Репаративная регенерация скелетных мышц у животных с мутацией в гене *DYSF* / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, А.П. Киясов, Р.В. Деев // *Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки.* - 2019. - №4. - С. 253-254.

7. Чернова О.Н. Репаративный рабдомиогистогенез у мышечной ткани мутантных по гену *DYSF* / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, А.К. Зейналова, Р.В. Деев, А.П. Киясов // *Гены и Клетки.* – 2019. - №2. - С. 32-39.

8. Чернова О.Н. Репаративная регенерация поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани у мышечной недостаточности по белку дисферлин (Bla/J) / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, А.П. Киясов, Р.В. Деев // *Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий».* Гены и Клетки. - 2019. - №3. - С. 90-91.

9. Chernova O N. Histopathological analysis of gingiva-derived MMSCs transplantation effect on skeletal muscles regeneration / O N Chernova, M O Mavlikeev, M V Elistratova, I S Limaev, R V Deev, A P Kiyasov, I I Eremin, I N Korsakov, S S Girina, M A Berestovoi, I Ya Bozo, A A Pulin // *Hum. Gene Ther. ESGCT 27th Annual Congress In collaboration with SETGyc Abstract.* - 2019. - A167-168. s

10. Chernova O. Procaine local effects on skeletal muscles in dysferlin-deficient Bla/J mice / O. Chernova, A. Titova; M. Mavlikeev; A. Shafigullina; A. Zeynalova; F. Faizrahmanova; A. Kiyasov; R. Deev // *52nd Annual Scientific Meeting of ESCI, 29 May -1 June 2018, Barcelona, Spain.* - *European Journal of Clinical Investigation* - May, 2018 - Vol.48 (Suppl.1) - P.105

11. IG Starostina, AA Shaimardanova, VV Solovyeva, AA Titova, ON Chernova, MO Mavlikeev, IA Yakovlev, FA Faizrahmanova, AK Zeinalova, AT Chebochakova, MS Kaligin, RV Deev, AA Isaev, AA Rizvanov. Biosynthesis of *DYSF* protein in Bla/J dysferlin-deficient mice after administration of recombinant adenovirus encoding dysferlin cDNA. *HUMAN GENE THERAPY.* 2018; 29(12): A.138.

12. Чернова О.Н. Сравнительная характеристика скелетной мышечной ткани мышечной недостаточности линий Bla/J и C57BL/6 в онтогенезе / О.Н. Чернова, А.К. Зейналова, А.А. Титова, М.О. Мавликеев, Ф.А. Файзрахманова, А.П. Киясов // *Морфология.* - 2018. - №153(3). - С. 305.

13. Umakhanova Z, Bardakov S, Mavlikeev M, Chernova O, Magomedova R, Akhmedova P, Yakovlev I, Dalgatov G, Fedotov V, Isaev A and Deev R (2017). Twenty-year clinical progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. *Front. Neurol.* 8:77. doi: 10.3389/fneur.2017.00077

14. Влияние аутологичных клеток десны, обладающих миогенным потенциалом, на регенерацию скелетной мышечной ткани. Корсаков И.Н., Самчук Д.П., Пулин А.А., Мавликеев М.О., Чернова О.Н., Титова А.А., Деев Р.В., Бозо И.Я., Зорин В.Л., Еремин И.И., Денисова О.В., Карпухина А.С., Городков А.Ю., Котенко К.В., Копнин П.Б. Гены и Клетки. 2017. Т. 12. № 2. С. 71-81.

15. Titova A., Mavlikeev M., Garanina E., Chernova O.N. Histopathological analysis of skeletal muscles after injection of adipose-derived mesenchymal stem cells transduced with LV-VEGF165 and LV-SDF1A//EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. - 2017. - Vol.47, Is.. - P.131-131.

16. Mavlikeev M., Titova A., Martynova E., Chernova O.N. Multiplex analysis of skeletal muscles after intramuscular injection of adipose-derived mesenchymal stem cells transduced with LV-VEGF165 and LV-SDF1A in rat hindlimb ischemia model// EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. - 2017. - Vol.47, Is.. - P.131-132.

17. Chernova O. N. Effects of Ad5-DYSF transduction on skeletal muscles of dysferlin-deficient mice / O.N. Chernova, A.A. Titova, M.O. Mavlikeev et al. // HUMAN GENE THERAPY. - 2017. - Vol.28, Is.12. - P. 43.

18. Titova A. A., Mavlikeev M. O., Martynova E. V., Chernova O.N. The influence of intramuscular injection of genetically modified adipose-derived mesenchymal stem cells on skeletal muscle regeneration in rat hindlimb ischemia model // HUMAN GENE THERAPY. - 2017. - Vol.28, Is.12. - P.A41-A41.

19. Чернова О.Н. Влияние рекомбинантного аденовируса Ad5-Dysf на скелетную мышечную ткань у дисферлин-дефицитных мышей VlaJ / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, И.А. Яковлев, А.А. Титова, В.В. Соловьева, И.Г. Старостина, А.К. Зейналова, М.С. Калигин, А.А. Ризванов, А.П. Киясов, Р.В. Деев // Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии: материалы Всероссийской конференции молодых специалистов; под ред. Р.В. Деева; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань: ООП УИТ-ТиОП, 2017. – С.98.

20. Чернова О.Н. Оценка регенерации скелетной мышечной ткани у мышей линии Vla/J после трансдукции рекомбинантным аденовирусом Ad5-DYSF / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, И.А. Яковлев, В.В. Соловьева, И.Г. Старостина, А.А. Титова, А.К. Зейналова, М.С. Калигин, А.А. Ризванов, А.П. Киясов, Р.В. Деев // Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки.- 2017.- 12(3). - С. 261.

21. Chernova O.N. Effects of Ad5-DYSF transduction on skeletal muscles of dysferlin-deficient mice / O.N. Chernova, A.A. Titova, M.O. Mavlikeev, I.A.

Yakovlev, A.K. Zeynalova, M.S. Kaligin, A.A. Rizvanov, A.P. Kiyasov, R.V. Deev // HUMAN GENE THERAPY. - 2017. - V.28. - A43.

22. Чернова О. Н. Гистологическая характеристика процесса репаративной регенерации скелетной мышечной ткани кроликов после механического повреждения / О. Н. Чернова, Д. П. Самчук, М. О. Мавликеев // Ломоносов – 2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология»; 11-15 апреля 2016 г.: Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Тезисы докладов. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – С. 212.

23. Chernova O. Characterization of model for study of skeletal muscles regeneration in dysferlin-deficient mice / O. Chernova, A. Titova, M. Mavlikeev, A. Kiyasov, R. Deev // Human Gene Therapy. - 2016. - Т. 27. - Р. A144-145.

24. Чернова, О. Н. Изучение репаративной регенерации поперечно-полосатых скелетных мышц у дисферлин-дефицитных мышцей / О.Н. Чернова, А.А. Титова, М.О. Мавликеев, Г.О. Певнев, И.А. Яковлев, Р.В. Деев, А.П. Киясов // Трансляционная медицина 2016: сборник тезисов междунар. конф. - Казань, 2016. - С.109.

25. Титова А.А. Новая двухэтапная модель хронической ишемии нижних конечностей для оценки эффективности терапевтического ангиогенеза / Титова А.А., Мавликеев М.О., Певнев Г.О., Латышев А.А., Сахапов Д.И., Гаранина Е.Е., Шафигуллина А.К., Чернова О.Н., Деев Р.В., Ризванов А.А., Киясов А.П. // Сборник тезисов международной конференции «Трансляционная медицина 2016», Казань, 13-14 октября 2016 г.. - Казань, КФУ, 2016. - С. 98

26. Скелетная мышечная ткань: биология развития, реактивность и индуцированный гистогенез / под ред. А.П. Киясова и А.А. Пулина. - Санкт-Петербург: ООО «ИМЖ-СПБ», 2016. - 304 с.

27. Mavlikeev M.O. Adenoviral transduction of adipose-derived mesenchymal stem cells with vegf165 and fgf2 promotes their survival after intramuscular injection in rat hindlimb ischemia model / M.O. Mavlikeev, A.K. Shafigullina, A.A. Titova, D.I.Sakharov, V.V. Averyanov, A.T.Garaev, O.N.Chernova, E.E.Garanina, A.A.Rizvanov, A.P.Kiyasov // Human Gene Therapy. 2016. Т. 27. № S. P. A103.

28. Чернова О.Н. Экспериментальные модели для изучения регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани / О.Н. Чернова, И.Н. Корсаков, Д.П. Самчук, А.А. Пулин, М.О. Мавликеев, Р.В. Деев, И.И. Еремин // Гены и клетки. - 2015. - №4. - С.127-140.