

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
Казанский (Приволжский) федеральный университет

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель

кандидат медицинских наук, доцент Р.В. Деев

Научный консультант

доктор медицинских наук, профессор А.П. Киясов

Казань – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Общие сведения о гистогенезе, структуре и ультраструктуре поперечнополосатой скелетной мышечной ткани	12
1.2 Современные представления о регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани	19
1.3 Значение дисферлина в норме и патологии	33
1.4 Экспериментальные модели для изучения регенерации мышц	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1 Генотипирование мышей с мутацией в гене <i>DYSF</i>	42
2.2 Методика отбора образцов.....	43
2.3 Световая микроскопия.....	45
2.4 Электронная микроскопия	48
2.5 Микроскопия и морфометрия.....	48
2.6 Статистическая обработка полученных данных.....	49
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МЫШЕЙ ЛИНИЙ VLA/J И C57BL/6	51
3.1 Генотипирование мышей и синтез дисферлина	51
3.2 Структура и ультраструктура поперечнополосатой скелетной мышечной ткани мышей линии Vla/J в разные периоды онтогенеза	53
3.3 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период молочного кормления мышей линий Vla/J и C57Bl/6	76
3.4 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период полового созревания мышей линий Vla/J и C57Bl/6	79

3.5 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в репродуктивный период мышей линий Vla/J и C57Bl/6	83
3.6 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период выраженных старческих изменений мышей линий Vla/J и C57Bl/6	90
ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО РАБДОМИОГЕНЕЗА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ VLA/J И C57BL/6.....	98
4.1 Химическое повреждение и воспаление мышечного регенерата	100
4.2 Пролиферация и дифференцировка структур мышечного регенерата.....	102
4.3 Ремоделирование и функциональная адаптация мышечного регенерата	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

ВВЕДЕНИЕ

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 миосателлитов, расположенных между плазмолеммой и базальной мембраной каждого МВ и способных поддерживать свой пул путем самообновления [21, 210, 211]. 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 [6, 16, 22].

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 [211, 230, 234, 251]. Однако клеточные механизмы регенерации скелетных мышц оставались не ясными до 1961 года, когда А. Мауро описал ультраструктуру и функции миосателлитов [168]. 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 [27, 28, 30, 31].

Профессор А.А. Клишов занимался вопросами эмбрионального развития ППСМТ, а также процессами посттравматической регенерации скелетных мышц, сформулировал гипотезу ядерно-саркоплазменных территорий [16, 17]. 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 [5, 6, 21, 22].

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 (1973; 1982) было показано, что мышечные волокна (МВ) не окончательно детерминированы и при различных воздействиях способны менять свои качественные характеристики [14, 24, 25]. На модели денервации скелетных мышц было выявлено увеличение содержания медленных МВ [2], при тиреоидэктомии, наоборот, снижение их содержания [1]. 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 (1991) была продемонстрирована сохранность структуры червеобразных мышц крыс до 6 часов после их ишемии [12], а также показано влияние температуры окружающей среды на степень сохранности ишемизированных скелетных мышц [13]. А.П. Киясовым и А.А. Гумеровой (1992) 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 [15].

Современные исследования сосредоточены на поиске клеточных и биоинженерных источников восстановления объемных повреждений мышц [118, 151, 159, 189], а также способов стимуляции гистотипической регенерации скелетных мышц при наследственных [73, 218] и возрастных [153, 178] состояниях, сопровождающихся снижением объема мышечной массы.

Таким образом, к сегодняшнему дню 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 не выявленными.

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 механизмы 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% [160].

Ген *DYSF* кодирует одноименный трансмембранный белок, который помимо скелетных мышц экспрессируется также в сердце, легких, почках, печени, костном мозге, селезенке, яичках, головном мозге и плаценте [44, 65]. Дисферлин участвует в репарации поврежденной сарколеммы при значительных ее дефектах (разрывах диаметром более 1 мкм) путем формирования заплатки («патча»). Такая заплатка образуется из везикул, содержащих дисферлин и некоторые другие белки (аннексины A1 и A2, кавеолин-3, митсугмин 53). Именно дисферлин, связываясь с ионами кальция своими C2 доменами, не только предотвращает индуцируемую избыточным поступлением ионов кальция клеточную гибель, но и обеспечивает активацию слияния везикул и их доставку в место дефекта [70, 85, 87, 243]. Так как ППСМТ подвержена воздействию повреждающих факторов, а дисферлин обеспечивает целостность сарколеммы, то целесообразно определить его участие в условиях острого повреждения скелетных мышц.

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

Для изучения дисферлинопатий *in vivo* применяют нокаутных животных с мутацией в гене *DYSF*, одними из которых являются мыши линии Bla/J, полученные в 2010 году путем вставки ретротранспозона в 4 интрон гена *DYSF* мышей дикого типа – C57Bl/6 [161]. Научных работ, в которых бы не только описывались события, протекающие в скелетных мышцах мышей с дисферлинопатиями, но и количественно определялись показатели дегенеративно-регенеративных изменений на этапах онтогенетического гистогенеза на сегодняшний день нет.

Для оценки эффективности влияния генных конструкций на состояние ППСМТ необходимо полное представление о патогистологических процессах, происходящих при дисферлинопатиях, что позволило бы детальнее и более комплексно изучить влияние генных препаратов на скелетные мышцы. Понимание процессов, происходящих на протяжении всего постнатального онтогенеза линейных животных позволит сопоставить патоморфогенез заболевания у мышей и человека, мутантных по гену *DYSF*, даст возможность оценить вклад дисферлина не только в поддержание целостности МВ, но и его потенциальное влияние на воспалительный ответ, степень фиброза и васкуляризацию скелетной мышечной ткани. Ранее не были описаны патогистологические процессы, происходящие в скелетных мышцах на протяжении постнатального онтогенеза у мышей с мутацией в гене *DYSF*.

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 [8, 10].

Исходя из вышеописанного, **целью** исследования стало 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 *Bla/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 *Bla/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 *Bla/J* в доклинических исследованиях коррекции дисферлинопатии.

Научная новизна. Впервые изучены структура и ультраструктура поперечнополосатой скелетной 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 центральоядерных и единичных некротизированных МВ с пубертатного периода (соответствует возрасту 2-3 мес. у мышей), гипертрофия МВ с последующей их атрофией, липоидозом, снижение регенераторного потенциала скелетных мышц. Было произведено сравнение полученных результатов с аналогичными показателями у мышей дикого типа – линии *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 *Vla/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 значимость.

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 *Vla/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 так называемый «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.

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 мышечных 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 материалам диссертации опубликовано 28 научных трудов (1 монография, 6 статей, 4 из которых опубликованы в журналах, включенных в список ВАК, 21 тезис).

Структура и объем диссертации. 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.

Диссертационная работа изложена на 149 страницах компьютерного текста. Иллюстрации и цифровой материал представлены 74 рисунками и 7 таблицами.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о гистогенезе, структуре и ультраструктуре поперечнополосатой скелетной мышечной ткани

Двигательная активность, осуществление опоры, внешнего дыхания – одни из фундаментальных свойств живых организмов. Эволюционно реализация этих функций стала возможной в связи с формированием механохимического преобразователя энергии – актомиозинового комплекса [11]. Комплекс белков, регулирующих работу актомиозинового комплекса, называется контрактомом и насчитывает около 100 белков [245].

Существуют разные принципы классификации мышечных тканей: филогенетический (по Н. Г. Хлопину), моर्फофункциональный (по Ю. И. Афанасьеву), по структурной организации акто-миозинового комплекса (по А.А. Заварзину), однако наиболее часто используется классификация мышечных тканей на скелетную, гладкую и сердечную [36].

В организме человека находится примерно 640 скелетных мышц [115], на долю которых приходится около 40% массы тела. Химически скелетные мышцы состоят из воды (75%), белков (20%) и других субстратов (неорганические соли, минералы, жиры и углеводы – 5%) [115, 176].

Гистогенез ППСМТ. Скелетные мышцы туловища и конечностей развиваются из параксиальной мезодермы, в частности, из миотомов [79], рисунок 1. Дорсомедиальная часть сомита включает в себя дермомиотом, который дает начало скелетным мышцам миотома и мышцам спины. Дермомиотом дифференцируется от дорсальной части сомита и экспрессирует *Pax3* и *Pax7* [51]. Из эпаксиального (вблизи с нервной трубкой и нотохордой) дермомиотома развиваются глубокие мышцы спины, из гипаксиального – все мышцы туловища и конечностей [63].

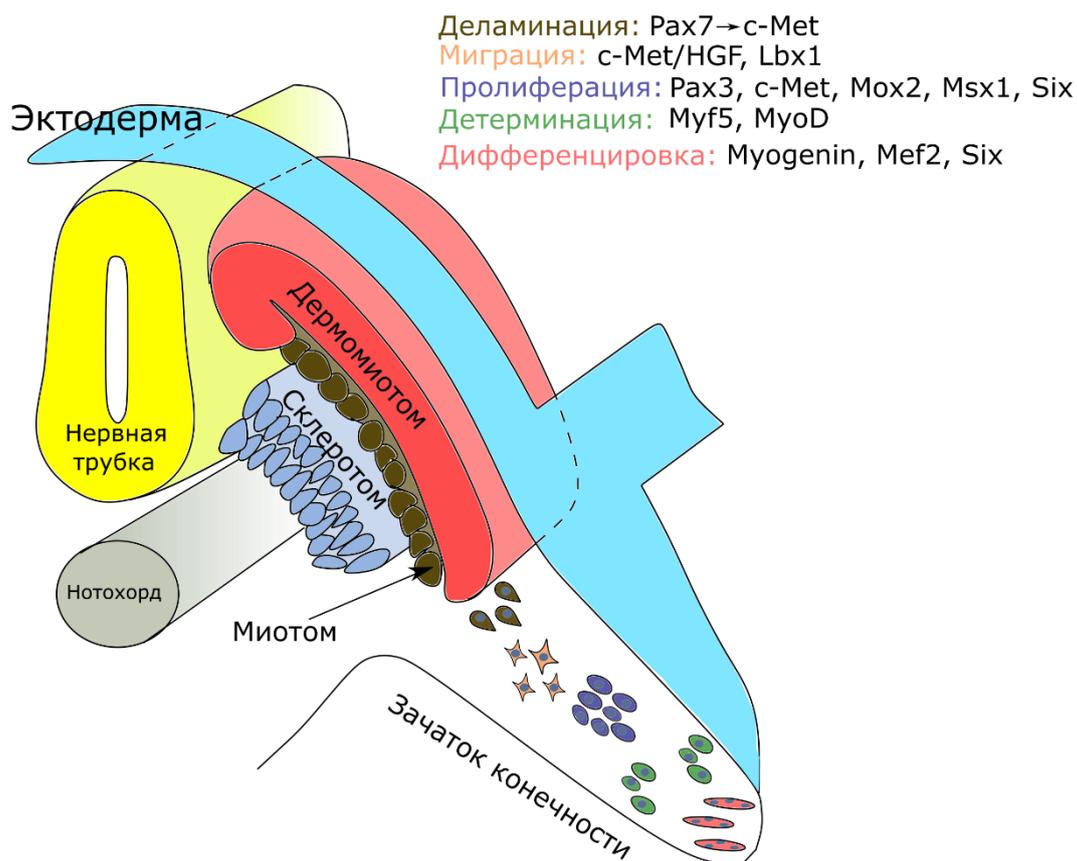


Рисунок 1 – Схема эмбрионального миогистогенеза. Фронтальный срез на уровне 10 сомита

Первые клетки, экспрессирующие ген миогенного регуляторного фактора *Myf5*, обнаруживаются в дорсомедиальной части сомита на 8 сут. эмбрионального развития (у мышей) [187], при этом снижается экспрессия *Pax3* [58, 187]. Таким образом, первичный миотом формируется между дермомиотомом с дорсальной стороны и склеротомом – с вентральной [186]. В этой части эмбриона появляются первые клетки рабдомиогенного дифферона – клетки миотома, для которых характерна экспрессия генов специализированных белков цитоскелета – медленных (*Myh7*) и эмбриональных (*Myh3*) изоформ тяжелых цепей миозина, α -актинов (скелетномышечного *ACTA1*) и десмина [49, 116, 163, 164]. Этот процесс протекает от головной к каудальной части эмбриона [88, 141]. Поэтому мышцы передних конечностей эмбриона мышцы закладываются на 12 часов раньше задних. От латеральной части дермомиотома отделяются клетки-предшественницы миогенеза и мигрируют в сторону зачатков конечностей [76, 135], рисунок 1. Этот

этап регулируют *Pax7* и миогенные регуляторные факторы: *Myf5*, *MyoD*, *Myf6*, *myogenin* [54, 133, 194]. Последний отвечает за терминальную миогенную дифференцировку миобластов в мышечные трубочки [127]. Деламинация («расслоение») и последующая миграция клеток-предшественниц миогенеза требуют наличия рецептора *c-Met* (рецептор тирозинкиназы), который связывается с HGF (фактор роста гепатоцитов). Транскрипция *c-Met* контролируется *Pax3*. Без *c-Met* и HGF не происходит закладки конечностей [42, 63].

Клетки-предшественницы миогенеза, мигрирующие от сомитов, приобретают свою миогенную дифференцировку только в месте будущих конечностей, где они начинают экспрессировать *MyoD* и *Myf5* [63]. Пролиферирующие *MyoD* и (или) *Myf5*-позитивные миогенные клетки называются миобластами. После прохождения ряда клеточных циклов часть митотических миобластов (G1-миобласты) образует пул миосателлитоцитов (МСЦ), а часть выходит из цикла деления (G0-миобласты) с формированием миосимпласта [3].

Так как репаративный рабдомиогенез во многом повторяет эмбриональный гистогенез скелетной мышечной ткани, то необходимо подчеркнуть ключевые процессы пренатального формирования ППСМТ (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика эмбрионального рабдомиогистогенеза у человека и мыши

Стадия Карнеги	Соответствующий день эмбриогенеза		Ключевые процессы эмбрионального миогенеза	Основные экспрессируемые гены	Ссылки
	человек	мышь			
7	15-17	E7.0	Появление прогениторных клеток мезодермы	<i>Wnt</i> , <i>BMP4</i>	219
			Индукция морфогенеза:	<i>Shh</i>	123, 180

			деламинация первичных миогенных клеток с краев дермомиотома. Экспрессия миогенных регуляторных генов. Миграция первичных миогенных клеток от дермомиотома в сторону зачатков конечностей	<i>Wnt</i> <i>Noggin</i> <i>c-Met, HGF</i>	56
8	17-19	E8	Появление пресомитных прогениторных клеток	<i>Wnt, FGF,</i> <i>BMP</i>	74
			Миграция первичных миогенных клеток в миотом и их пролиферация	<i>Pax3</i>	23, 131, 133, 197
10	22	E9.5	Миграция предшественников миогенеза в будущие конечности Синтез МуНС-emb (у мышей)	<i>Fgf10, Tbx5,</i> <i>Lef1</i>	164, 219
12	28	E10.5 (задняя часть)	Первичная фаза миогенеза: миграция предшественников миогенеза в будущие конечности Начало синтеза МуНС-neo (у мышей)	<i>Sox9, Vmp,</i> <i>Vmpr</i>	57, 164, 216, 219

14	33	E11.5	Пролиферация миогенных клеток, появление нервных пучков в конечностях	<i>Sox5/6/9, Vmp, Vmpr, MyoD, myogenin</i>	219
16	40	E12.5	Образование фаланг пальцев	<i>Sox5/6/9, Vmp, Vmpr</i>	219
18	44	E13.5	Гипертрофия сформированных миобластов, появление единичных коротких мышечных трубок	<i>Runx1/2/3, Vmp, Vmpr.</i>	219
20	52	E14.5	Вторичная фаза (волна) миелинизации: появляются пястные мышцы. Появление первых ЦЯМВ у человека	<i>MyoD, Myog, β-энолаза, Nfix, Myh7, Myh3, Myh8</i>	57, 74, 111, 113, 143, 216, 219
22-23	53-60	E17.5- E18	Формируется базальная мембрана МВ, впервые обнаруживаются МСЦ в виде одноядерных клеток под базальной мембраной	<i>Myh7, Myh3, Myh8, PDGF</i>	57, 74, 185

После рождения МВ продолжают свой рост до 12-15 лет [175]. В некоторых мышцах число МВ увеличивается до 80-100% от исходного [176], а диаметр во взрослых МВ больше в 5 раз по сравнению с их диаметром при рождении [139]. Уменьшается объемная доля перимизия и других соединительнотканых компонентов скелетных мышц с 20% при рождении до 5% к первым годам жизни, что объясняется увеличением числа и размера МВ [176].

Основные представления о структуре поперечнополосатой скелетной мышечной ткани.

Разные скелетные мышцы человека содержат разное количество МВ. Так, в червеобразных мышцах их число достигает 10 000, в икроножной – до 1 000 000 [108]. Каждую скелетную мышцу окружает эпимизий, группы МВ – перимизий, а каждое МВ – эндомизий.

Структура МВ. Морфологической единицей мышцы является МВ размерами около 100 мкм в диаметре и до 12 см в длину [7]. МВ состоит из миосимпласта и миосателлитоцитов. Миосимпласт содержит до нескольких десятков тысяч ядер, расположенных непосредственно под плазмолеммой. При физиологических условиях в неделю заменяется 1-2% мышечных ядер [208]. Плазмолемма миосимпласта и покрывающая ее и миосателлитоциты базальная мембрана называются сарколеммой [3]. До 5% всех мышечных ядер приходится на миосателлитоциты [21, 120].

Миосимпласт представлен преимущественно сократительными миофибриллами, собранными из сотен и тысяч объединенных постмитотических терминально дифференцированных мышечных клеток [4, 223]. Каждое МВ окружено тремя концентрическими слоями: плазмолеммой, базальной мембраной и снаружи – ретикулярными волокнами. Плазмолемма имеет толщину 8-10 нм, базальная мембрана – 30-40 нм. Между ними имеется пространство шириной 15-25 нм, в котором располагаются МСЦ [7]. МСЦ являются камбиальным резервом скелетных мышц. Поддержание постоянства их числа обеспечивается двумя путями самообновления (рисунок 2):

- асимметричное самообновление (деление), при котором один МСЦ делится на одну дифференцированную клетку и один новый МСЦ;
- симметричное самообновление (деление), когда один МСЦ дает начало двум МСЦ [84].

Путь самообновления диктует сигнал для активации покоящегося МСЦ: в условиях гомеостаза достаточно асимметричного пути для восполнения числа МВ;

при повреждении необходимо большее количество МСЦ и здесь целесообразен симметричный путь самообновления [179].

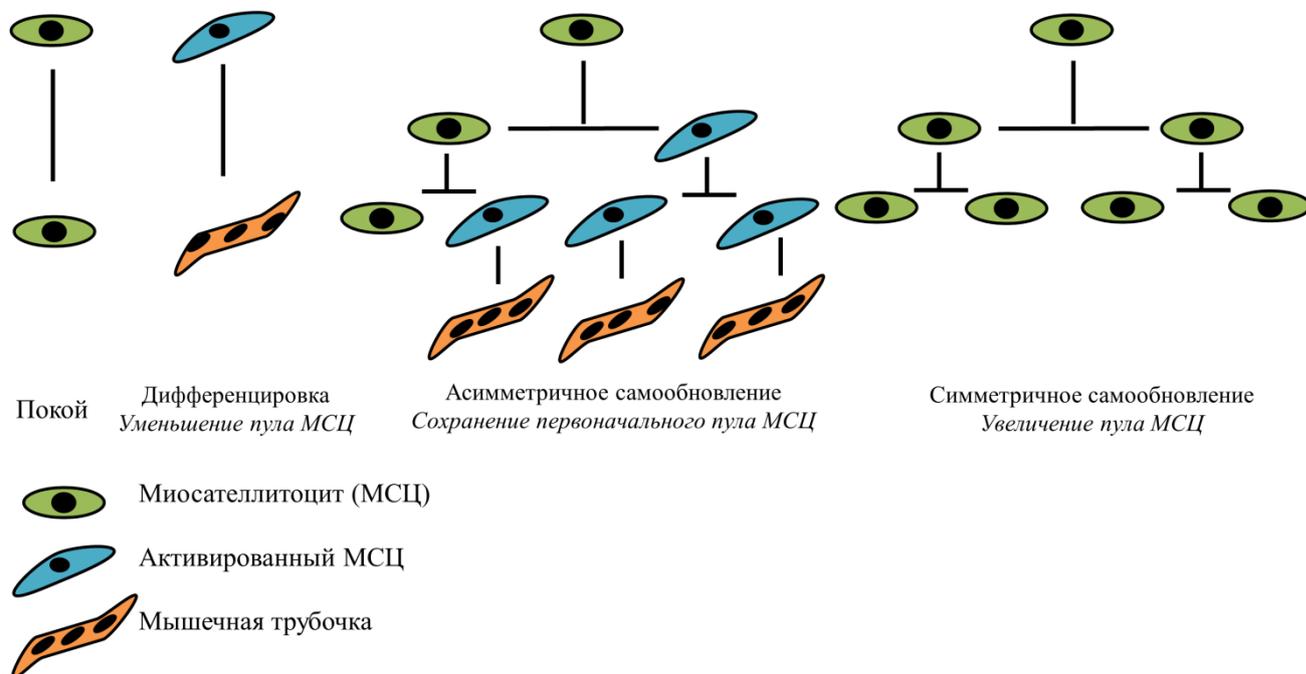


Рисунок 2 – Схема самообновления миосателлитоцитов

Ультраструктура МВ. Миофибрилла – структурно-функциональная единица МВ, состоящая из миофиламентов. Каждое МВ содержит до нескольких тысяч миофибрилл и миллионы миофиламентов. Миофиламент – сократительный белок мышцы. Есть два типа миофиламентов – тонкие (содержат актин, тропомиозин и тропонины) и толстые (миозиновые). Актин и миозин – основные сократительные белки, на чью долю приходится до 80% всех белков МВ [115].

Ультраструктура миосателлитоцитов. МСЦ впервые были описаны Александром Мауро в 1961 году при изучении электронной микрофотографии передней большеберцовой мышцы (*m. tibialis anticus*) лягушки [168]. Морфологически выделяют два типа миосателлитоцитов: первые содержат узкое вытянутое ядро с преобладанием гетерохроматина, малый объем цитоплазмы с небольшим числом митохондрий и рибосом, слабо развитую ЭПР; у вторых

светлое округлое ядро и развитая цитоплазма с обилием органелл. В ходе постнатального онтогенеза преобладает первый тип миосателлитоцитов [22].

Скелетная мышечная ткань и миопатии. Наиболее частой группой заболеваний СМТ являются мышечные дистрофии. В этиопатогенезе этой группы заболеваний лежат мутации в генах, кодирующих белки или ферменты МВ, приводящие к посттрансляционным модификациям этих белков [83]. Заболевания, как правило, манифестируют с прогрессирующей мышечной слабости в конечностях. Патогистологически у пациентов выявляют дегенерацию скелетных мышц. Примечательно, что данные мутации также сопровождаются снижением скорости скольжения актина [71] и нарушениями силы и качества сокращений волокон I и II типов [90, 150]. Известны также мутации в генах регуляторных белков, например, тропомиозина [184].

1.2 Современные представления о регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани

Изучение регенерации ППСМТ началось более 150 лет назад, когда в 1865 году Вильгельм Вальдейер описал восстановление скелетных мышц у пациентов, перенесших брюшной тиф [230]. В образцах большой грудной, передней зубчатой и широчайшей мышц спины пациента с саркомой он описал большое скопление одноядерных веретенновидных клеток на месте погибших и предположил, что эти ядра являются источником образования миотуб [230]. На протяжении последующих 100 лет господствовала теория регенерации МВ путем формирования цитоплазматических почек из краев поврежденной сарколеммы, но оставалось не ясным появление полосок ядер вблизи места травмы. Существовало несколько теорий, объясняющих это явление: вытеснение ядер из поврежденных МВ через цитоплазматические почки, пролиферация клеток, окружающих МВ и миграция клеток из других мест [206]. Только в 1961 году Мауро дал подробное описание морфологии, локализации и функций МСЦ [168].

Так как постоянная физическая активность приводит к растяжению МВ, микроразрывам сарколеммы, в скелетных мышцах постоянно происходит

физиологическая регенерация. Этот процесс возможен благодаря наличию миосателлитов, способных поддерживать свой пул путем самообновления [210]. Особенностью регенерации скелетных мышц является так же то, что процесс формирования молодого МВ при репаративном гистогенезе проходит те же этапы, что и в эмбриональном миогистогенезе.

Репаративная регенерация поперечнополосатой скелетной мышечной ткани и мышцы как органа

ППСМТ подвержена действию широкого спектра экзогенных (химические, физические, биологические) и эндогенных (мутации, аутоиммунная агрессия) повреждающих факторов [35, 223]. Существуют разные подходы к классификации процессов, происходящих при репаративном рабдомиогистогенезе. Морфогенетически выделяют следующие фазы репаративного процесса: гибель МВ, активация миосателлитов, пролиферация миобластов, их дифференцировка и слияние с образованием миосимпласта [7]. Кроме того, описаны три патофизиологические фазы репарации: дегенеративная, регенеративная и фаза ремоделирования [109], таблица 2. *Дегенеративная фаза* характеризуется некрозом МВ, обусловленным разрушением сарколеммы, которое ведет к увеличению ее проницаемости для ионов и повышению уровня концентрации внутримышечных ферментов в сыворотке крови (например, креатинкиназы (КК), альдолазы, лактатдегидрогеназы и трансаминаз). Увеличивается ядерно-цитоплазматическое отношение. Возобновление популяции миосателлитов обеспечивает *Myf5* [57]. Во время *регенеративной фазы* происходят стадии пролиферации и дифференцировки структур скелетных мышц. Эта фаза регулируется миогенными транскрипционными факторами: *MyoD*, *myogenin*, *Myf4* и *Myf5*, каждый из которых может образовывать гетеродимеры с энхансерными белками, которые далее связываются с генами, активируя их транскрипцию [156].

Первая стадия – пролиферативная. Она включает активацию покоящихся миосателлитов, что ведет к их пролиферации и активации экспрессии *MyoD* и

Muf5 [86]. В то же время запускается экспрессия миогенина и *Muf4* благодаря транскрипционным факторам семейства MEF2 [177]. Эти факторы и активированные *MyoD* и *Muf5* обеспечивают экспрессию генов, необходимых для перехода части миобластов к следующей стадии – конечной дифференцировке, в течение которой они сливаются с образованием многоядерных МВ [221].

Таблица 2 – Характеристика фаз репаративной регенерации ППСМТ

Фаза регенерации	Действующие факторы в очаге повреждения	Характеристика фазы	Ссылки
I. Фаза дегенерации	Повреждающий агент	Альтерация: - разрыв сарколеммы; - повышение проницаемости МВ для ионов; - повышение уровней КК, МНС, тропонина в сыворотке крови.	162
	Нейтрофилы (max 1-6 ч.)	Воспалительный ответ: очистка клеточного дебриса (протеолиз, оксидативный стресс, фагоцитоз)	47, 85, 248
	Макрофаги (48 ч.) - TNF α - INF α - IL6	Активация миогенных клеток Провоспалительные цитокины	

		-IL4, IL10, которые стимулируют миобласты, FAPs и мезангиобласты	Противовоспалительные цитокины	
II. Фаза регенерации		MyoD Myf5 Myogenin MRF4	Пролиферация МСЦ Дифференцировка и слияние миобластов с образованием миосимпласта Увеличение молодых МВ в размерах, смещение ядер на периферию	173
		Макрофаги: провоспалительные и противовоспалительные медиаторы	Баланс провоспалительных и противовоспалительных факторов, который определит исход повреждения: реконституция с формированием новых МВ либо фиброзирование	184
III. Фаза ремоделирования (внеклеточного матрикса)		IGF-1/Akt TGFβ/Smad Факторы роста в эндотелиоцитах	Меняет баланс между синтезом и распадом белков в сторону первых Отрицательный контроль гипертрофии мышц, участвует в делении и дифференцировке МСЦ	85

- средние – несколько нанометров; требуют активных механизмов закрытия дефекта (пороформирующие токсины бактерий) с участием микровезикул. Токсины при этом перерабатываются эндосомами либо выводятся экзосомально;

- крупные – диаметром от сотен нанометров до нескольких микронов; протекают посредством кальций-зависимого экзоцитоза и активации везикулярного транспорта. Такие дефекты не могут закрыться самостоятельно и требуют образования заплатки («патча») [85, 122, 238], таблица 3, рисунок 3.

При гомеостазе МВ поддерживается определенная концентрация ионов вне и внутри миосимпласта (рисунок 3, а). Повреждение сарколеммы способствует свободному прохождению ионов кальция и натрия в МВ и выходу калия и белков из него [152]. Важным сигнальным событием, свидетельствующем о нарушении целостности сарколеммы, является входящий кальциевый ток, вызывающий деполимеризацию F-актина цитоскелета [250], рисунок 3, б. Отклонения от нормального уровня содержания ионов кальция приводят к активации каскада реакций, направленных на восстановление гомеостаза МВ. Существуют несколько семейств белков, активирующихся по кальций-зависимому механизму, которые используются как маркер повреждения МВ: ферлины, SNARE, S100, аннексины, протеинкиназы С и др. [61, 102, 203]. Основным белковым комплексом, обеспечивающим восстановление поврежденной сарколеммы, является дисферлиновый комплекс, который включает в себя около 115 белков [66, 96, 198]. В состоянии покоя дисферлин локализуется под сарколеммой, заякориваясь в нее своим С2G доменом, и в составе мембраны внутриклеточных везикул, связанный с аннексинами А1 и А2 (рисунок 3, а).

При нарушении целостности сарколеммы дисферлин связывается с мигсугмином-53 (МГ53) [167], кальпаинами, кавеолином-3 [68, 69, 132, 170], аннексином I [209], аннексином V и регулирует их активность. Помимо этого, дисферлин связывается с комплексом аннексин II:S100A10:АННАК, который вовлечен в направленный экзоцитоз энларгеосом – наиважнейшего комплекса в контроле потока ионов кальция при повреждении мембраны [80, 105]. Энларгеосомы представляют собой АННАК-позитивные везикулы с молекулярной

массой ~700 кДа [60], мембраны которых богаты холестерином и сфинголипидами [81]. Высокая концентрация ионов кальция приводит к активации кальпаинов – нелизосомальных протеаз, которые ремоделируют кортикальный цитоскелет [171], рисунок 3, б. Повышенное содержание ионов кальция приводит к слиянию везикул, содержащих дисферлин и аннексины, которые затем сливаются с сарколеммой в месте повреждения (рисунок 3, в).

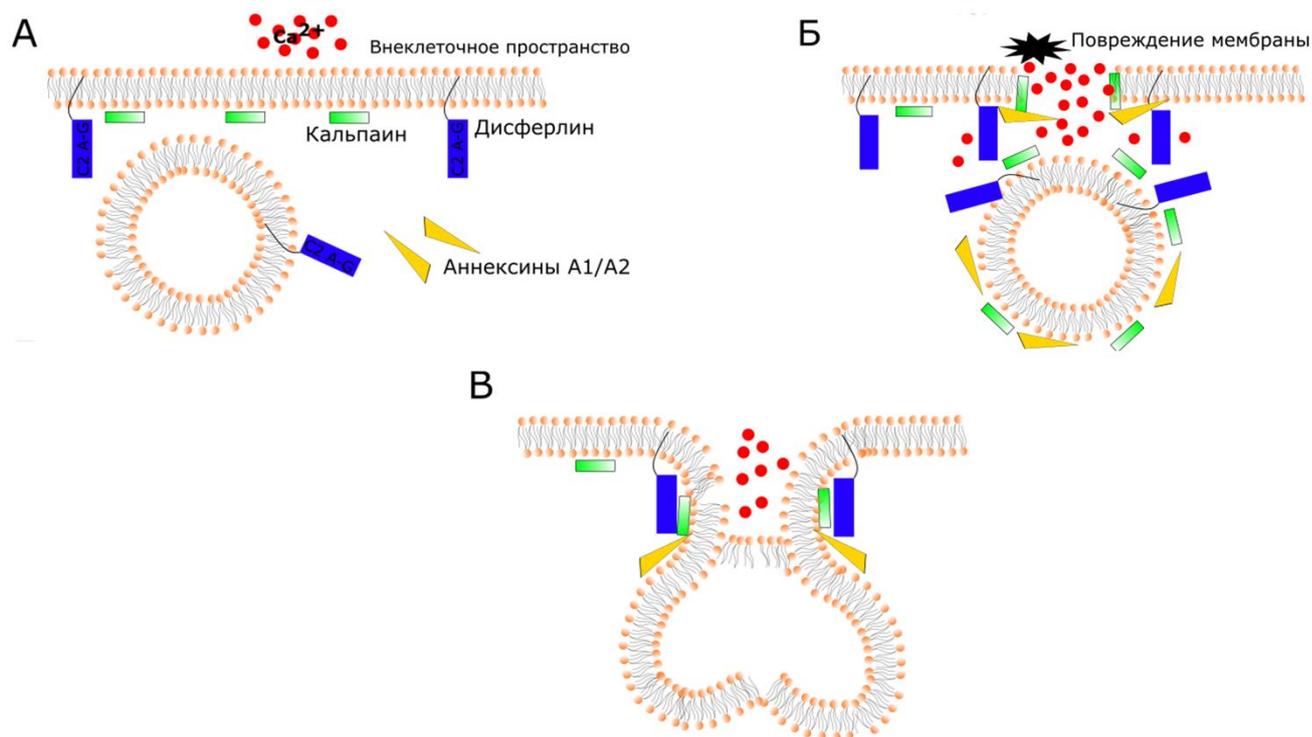


Рисунок 3 – Образование мембранной заплатки («патча») в ответ на повреждение сарколеммы [по Campbell, 2007; с изм.]

Восстановление поврежденного волокна включает экзоцитоз и другие процессы, связанные с действием SNARE и белков семейств синаптотагминов и ферлинов. Так, в культуре фибробластов синаптотагмин VII – дефицитной мышцы наблюдалось нарушение механизмов лизосомального экзоцитоза и репарации клеточной мембраны, что может быть связано с нарушенным кальций-опосредованным лизосомальным экзоцитозом [220].

Другим белком дисферлинового комплекса является МГ53 [68, 69, 228]. Считается, что из всех веществ, способных связываться с дисферлином, именно МГ53 вносит большой функциональный вклад в дисферлин-опосредованный

экзоцитоз. МГ53 связывается с мембраной через фосфотидилсерин [235], в неповрежденном МВ МГ53 локализуется на внутренней стороне плазмалеммы и в специализированных везикулах. После повреждения сарколеммы активные формы кислорода проникают внутрь волокна, вызывая олигомеризацию МГ53 [68, 69].

Таблица 3 – Динамика репаративных процессов, происходящих при крупных дефектах сарколеммы

Время после повреждения сарколеммы, секунды	Основные события, происходящие в мышечном волокне
0-10	<ul style="list-style-type: none"> - вход ионов кальция внутрь МВ; - активация сигнальных молекул и кальпаинов, которые переносят с собой дисферлин; - активация и рекрутирование МГ53 в месте повреждения; - слияние везикул, содержащих дисферлин; - протеолиз мембранных нитей (тетеров) кальпаином; - деполимеризация актина цитоскелета; - расширение зоны повреждения.
10-30	<ul style="list-style-type: none"> - медленная фаза слияния везикул; - ALG-2 (кальций-связывающий белок) и аннексины А6 и А11 транспортируются в место повреждения; - лизосомальный экзоцитоз под действием кальция; - кальпаины разобщают связи цитоскелета и адгезию белков; - зона повреждения все еще расширяется.
30-60	<ul style="list-style-type: none"> - актин накапливается на периферии дефекта, быстро полимеризуясь и деполимеризуясь;

	<ul style="list-style-type: none"> - микротрубочки стабилизируют зону актиновой полимеризации для облегчения формирования актомиозинового сократительного кольца; - в месте дефекта накапливаются ALIX, SNMP, Vsp4 ATPase ESCRT-III; - кислая сфингомиелиназа гидролизует сфингомиелин с формированием керамидных платформ для трансмембранного сигналинга и активации эндоцитоза; - участок поврежденной мембраны удаляется эндоцитозом и выделением экзосом; - уменьшение площади повреждения.
60-240	<ul style="list-style-type: none"> - актомиозиновое кольцо сокращается и закрывается, восстанавливая сеть взаимодействий белков цитоскелета вблизи поврежденной сарколеммы; - возле дефекта накапливаются аннексины A1 и A2; - стадии экзоцитоза, эндоцитоза и экзосомального выделения (отщепления) замещают поврежденные белки и рецепторы, происходит восстановление физиологической структуры плазмалеммы.

Важным процессом для восстановления целостности мембраны является реорганизация актинового цитоскелета. Механические сигналы [129] и стресс [100] способны вызывать деполимеризацию F-актина различными путями: через активацию механочувствительных ионных каналов [165], RhoA-опосредованную сигнализацию [205], напрямую через механочувствительность полимеризованного актина [98]. Помимо этого, актин связывается с фосфотидилсеринем, который преимущественно располагается на внутренней поверхности плазмалеммы [142]. Изменение архитектуры плазматической мембраны, связанное с экзоцитозом на ранних стадиях репаративного процесса, может приводить к деполимеризации актинового цитоскелета [61].

Аннексин V кальций-опосредованно связывает фосфолипиды и образует двухмерные структуры [227], которые вызывают скопление фосфолипидов, тем самым стабилизируя плазмалемму [72]. К образованным структурам могут присоединяться аннексин I и аннексин II [215].

Помимо белков в репарации сарколеммы участвуют также и фосфолипиды. Так, кислая сфингомиелиназа гидролизует сфингомиелин и с внешней стороны плазмалеммы образуются домены, богатые церамидами, благодаря чему мембрана изгибается внутрь и происходит эндоцитоз [103]. Эти домены могут изменять степень связывания кавеолинов с плазмалеммой [183], менять конфигурацию цитоскелета, взаимодействуя с актином [188]. Также к краям дефекта направляются PIP 2, PIP 3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат) и фосфатидилсерин [226].

После образования заплатки в месте разрыва сарколеммы необходимо ее дальнейшее удаление для замены обычным участком мембраны. Этот процесс осуществляется макрофагами. Практически сразу же после повреждения начинается транслокация фосфатидилсерина и холестерина к зоне повреждения мембраны. Со временем начинают накапливаться и другие липиды. К примеру, фосфатидилинозитол-3,4-дифосфат обнаруживается в зоне повреждения через 4–5 мин. Липиды транспортируются к краям повреждения, постепенно затягивая брешь [217]. Фосфатидилсерин, в свою очередь, является сигналом «съешь меня» для макрофагов. Ключевым в связывании фосфатидилсерина дисферлином является богатый аргинином мотив, расположенный рядом с трансмембранным доменом [174].

После повреждения скелетных мышц формируется местный иммунный ответ. Иммунокомпетентные клетки могут присутствовать в мышцах в концентрациях, превышающих 100,000 воспалительных клеток/мм³ мышцы [235]. К ним относятся преимущественно клетки миелоидного ряда, секретирующие цитокины, необходимые для регуляции транскрипции в мышечных клетках [221].

Нейтрофилы появляются в течение 90 мин. после повреждения с максимальным содержанием через 6-24 ч после травмы, затем их количество уменьшается, и в очаге воспаления начинают преобладать фагоцитирующие

макрофаги, количество которых максимально через 24-48 ч после травмы [114]. Затем их заменяет популяция не фагоцитирующих макрофагов, пик концентрации которых наблюдается через 4 суток после травмы. Добавление макрофагов к культуре миогенных клеток приводит к увеличению интенсивности пролиферации и снижению экспрессии миогенина [172].

К веществам, синтезируемым иммунокомпетентными клетками и способными воздействовать на пролиферацию миобластов, относятся простагландины [246], которые также могут регулировать дифференцировку и слияние миобластов и влиять на рост МВ, синтез и деградацию белков в мышцах [246]. Циклооксигеназы (СОХ) – семейство ферментов, необходимых для синтеза простагландинов. Наиболее активно в поврежденных МВ экспрессируются СОХ-1 и СОХ-2 [59]. Цитокины и митогены, которые высвобождаются поврежденными волокнами, обеспечивают экспрессию СОХ-2 в воспалительных клетках, благодаря чему увеличивается концентрация простагландинов в компонентах мышечной ткани [119]. Ингибирование СОХ-2 уменьшает экспрессию *MyoD* в мышцах, влияя на дифференцировку и рост [59].

Активированный транскрипционный фактор NF-κB может ингибировать миогенез, однако активация хотя бы по одному альтернативному пути может способствовать поддержанию популяции мышечных трубочек. Важно, что NF-κB может увеличивать уровень экспрессии циклина D1 и поддерживать его стабильность в мышцах [51], приводя к увеличению интенсивности пролиферации и ингибированию дифференцировки миогенного пула клеток. Более того, активация NF-κB может приводить к дестабилизации мРНК *MyoD* и его деградации [155]. Также NF-κB может ингибировать дифференцировку миобластов путем связывания с транскрипционным репрессором YY1, который угнетает экспрессию миофибриллярных генов [232].

Секреция ФНО-α нейтрофилами и макрофагами M1 в месте повреждения может привлекать МСЦ и мезоангиобласты к зоне повреждения [222]. ИЛ-6 и ФНО-α способствуют пролиферации миобластов, выступая в роли

хемоаттрактантов для миобластов и миелоидных клеток и ингибируют слияние миобластов [222].

Таким образом, при повреждениях сарколеммы диаметром до 30-50 нм репарация происходит путем образования мембранной заплатки («патча»), которая образуется в результате связывания дисферлина с внутриклеточными везикулами посредством кальций-инициируемого везикулярного экзоцитоза [233]. В месте повреждения независимо от дисферлина накапливаются молекулы аннексина VI [217]. Мигрировавшие в место повреждения везикулы с дисферлином связываются с аннексинами A1 и A2, а затем заплатку «доформируют» кавеолин-3 и МГ53 [156, 167, 201, 228]. Весь процесс образования заплатки занимает примерно 90 сек.

Следует помнить, что повреждение скелетных мышц включает в себя не только изменения в МВ, но также и немышечных элементах, в частности, сосудистом компоненте, где также в норме содержится дисферлин. В экспериментах *in vitro* на коронарных артериях было показано, что блокирование экспрессии гена *DYSF* обращает запущенное Fas-лигандами замедление эндотелий-зависимой вазодилатации и полностью останавливает слияние лизосом с плазматической мембраной [126].

При более обширных дефектах сарколеммы образования заплатки недостаточно, более того, репаративных возможностей МВ для закрытия крупного дефекта путем формирования заплатки не хватит. В таких случаях репарация поврежденного МВ будет происходить принципиально другим способом – при помощи активации МСЦ.

Активация миосателлитоцитов

Во взрослой скелетной мышце МСЦ находятся в покоящемся состоянии либо в фазе G^0 митотического цикла, все они являются Pax7+. Около 90% Pax7+ покоящихся МСЦ экспрессируют *Myf5* и предполагается, что именно они относятся к миогенной линии клеток [106]. Активированные МСЦ экспрессируют *Myf5* и *MyoD*. И покоящиеся, и активированные МСЦ экспрессируют *Pax7*, *MNF* (ядерный фактор миоцитов), *c-met*, *NCAM* (молекула адгезии нейральных клеток), *SDC4* (синдекан-4) [7].

МСЦ быстро активируются и пролиферируют до одноядерных прогениторных клеток – миобластов. Далее они дифференцируются и происходит их слияние либо с существующими миофибриллами, либо друг с другом с формированием новых миофибрилл.

Различия активации МСЦ в эмбриогенезе и при репаративной регенерации.

В эмбриогенезе МСЦ активируются продуктами экспрессии генов семейств *Shh* и *Wnt*, при травме – ростовыми факторами *HGF*, *FGF-2*, *FGF-6*, *IGF-1*, *TGF- β* , *TNF- α* , а также IL-6, LIF, NO и АТФ [210], что, в свою очередь, приводит к активации миогенных регуляторных факторов. Экспрессия последних также происходит с некоторыми отличиями:

- в эмбриогенезе сначала происходит экспрессия *Myf5*, затем *MyoD*, последним активируется *миогенин*;
- при репаративной регенерации первыми экспрессируются *MyoD*, потом *Myf5* и *MRF4*, последним *миогенин*.

При повреждении МВ под базальной мембраной высвобождается NO-синтаза, активирующая NO, который в свою очередь активирует HGF. Синдеканы 3 и 4 синтезируются в первые 96 ч после активации МСЦ. Предполагается их участие в активации, пролиферации и дифференцировке МСЦ. IGF-1 (фактор роста инсулина) запускает пролиферацию МСЦ, синтез белков и ДНК во взрослых МВ, вызывая их гипертрофию [23].

Кроме МСЦ в репаративной регенерации МВ участвуют мышечные интерстициальные клетки, фиброгенно-адипогенные прогениторные клетки (FAPs), ассоциированные с сосудами мезангиобласты, перициты и мезенхимальные стволовые клетки [242].

Помимо описанных механизмов репаративной регенерации скелетной мышечной ткани в литературе есть сведения о других способах реализации репаративного рабдомиогенеза: активация ядерно-саркоплазмных территорий и образование мышечной почки роста [22]. Первый механизм объясняется появлением вокруг ядер МВ инвагинаций сарколеммы, что напоминает отделение ядра от миосимпласта [181]. Однако точных данных, доказывающих эту теорию,

нет. Мышечная почка роста образуется путем слияния миобластов с концами поврежденных МВ [3, 27].

Кроме способов регенерации с участием мышечных клеток выделен ряд немышечных стволовых клеток, которые предположительно обладают миогенным потенциалом. Далее приведена их классификация.

1. *Немышечные стволовые клетки – производные эктодермы.* Galli с соавт. была описана способность дифференцировки нервных стволовых клеток в скелетные мышечные при совместном культивировании с миобластами [117].

2. *Немышечные стволовые клетки гемопоэза.* Впервые возможность участия клеток красного костного мозга в рабдомиогенезе была описана в 1998 году. Ferrari с соавт. получили трансгенную линию мышей, экспрессирующих *lacZ* (лактозный оперон, кодирующий β -галактозидазу). Затем костный мозг этих мышей ввели мышам с летальной дозой облучения и через некоторое время произвели повреждение передней большеберцовой мышцы инъекцией кардиотоксина. При гистологическом анализе мышцы в центре регенерирующих МВ были обнаружены β -галактозидаза-положительные ядра, из чего был сделан вывод о содержании в костном мозге трансплантируемых прогениторных клеток миогенеза, которые можно вводить системно [110]. В другой работе Torrente с соавт. кокультивировали выделенные из человеческой крови AC133⁺ клетки – предшественницы гемопоэза с мышинными миобластами и вводили полученную культуру мышам линии *scid/mdx* (нокаутные по дистрофину). Инъецированные клетки были обнаружены под базальной мембраной и экспрессировали маркеры МСЦ – М-кадгерин и Myf5 [222].

3. *Немышечные стволовые клетки производных мезодермы.* Перициты, расположенные на периферии капилляров, участвуют в росте, ремоделировании, гомеостазе и проницаемости сосудов [46]. Перициты в скелетных мышцах – компоненты сателлитной ниши, они экспрессируют IGF-1 или ANGPT1 (ангиопоэтин). Активируясь после повреждения мышцы, перициты дают начало сосудо-ассоциированным прогениторным клеткам – мезоангиобластам. Последние обладают более низким миогенным потенциалом по сравнению с МСЦ, однако

описано повышение устойчивости МВ к повреждению после внутримышечного либо системного введения мезоангиобластов линейным животным с дисферлинопатией и миодистрофией Дюшенна [57, 100, 202].

Таким образом, репаративная регенерация скелетных мышц представляет собой комплексный и многоэтапный процесс, зависящий не только от вида и продолжительности воздействия повреждающего агента, но и от степени повреждения сарколеммы, степени активации МСЦ, состояния немиеоидных компонентов скелетных мышц.

1.3 Дисферлин: строение и функции в норме и при патологии

Ген *DYSF*

Белок дисферлин кодируется геном *DYSF* (Dys – от «dystrophy», fer-1 – фактор сперматогенеза *C. elegans*). Локус гена расположен на коротком плече 2 хромосомы. *DYSF* состоит из 55 экзонов размером 150 тысяч пар нуклеотидов [45, 65]. Такой крупный размер гена затрудняет создание генной конструкции для переноса его в клетку [29, 182]. Мутации в любом из пяти С2 доменов дисферлина (С2А, В, D, Е и G) могут привести к формированию аномальной структуры белка или к его деградации, тем самым приводя к развитию дисферлинопатий [44].

Экспрессия дисферлина в конечностях человеческого эмбриона наблюдается с 15-16 стадий Карнеги (37-39 дней пренатального онтогенеза). Эта находка позволила предположить, что отсутствие дисферлина в это время может способствовать развитию мышечной дистрофии с поздним дебютом, с преимущественным вовлечением проксимальных или дистальных мышц конечностей [43].

Семейство ферлиновых белков

Дисферлин наряду с отоферлином, миоферлином, Fer1L4, Fer1L5, Fer1L6 относится к семейству ферлиновых белков, обнаруженных у беспозвоночных и позвоночных. Для всех шести гомологов характерны несколько С2- доменов и один С-терминальный трансмембранный домен [70]. Эти домены объединяет участие в кальций-зависимых процессах, связанных с преобразованием липидов. Четыре-

пять остатков аспарагиновой кислоты связывают ионы кальция с доменом, что обеспечивает транслокацию и слияние мембранных органелл [233].

Миоферлин является наиболее схожим по структуре с дисферлином. Этот белок локализуется в ЦПМ и в ядре и участвует в слиянии миобластов [101]. Отоферлин – белок с молекулярной массой 226 кДа, обеспечивает кальций-зависимый экзоцитоз в синапсах [239]. Мутации в гене *Otof* приводят к аутосомно-рецессивному наследованию человеческой глухоты, DFNB9 [90]. Белок Fer1L5 экспрессируется в малых миотубах, содержащих от двух до четырех ядер. Во время образования миобласта требуется прямое связывание между белками эндоцитов, EHD1 и EHD2 для перемещения Fer1L5 в плазматическую мембрану [193]. Немного известно о белках Fer1L4 и Fer1L6. Их молекулярная масса составляет 201 и 209 кДа соответственно и оба они содержат по пять C2 доменов.

Структура дисферлина

Дисферлин – белок массой 237 кДа, располагается в сарколемме и сети Т-трубочек [41, 43, 144]. Кроме скелетных мышц, он обнаружен в сердечной мышце, почках и в меньшей степени в легких, печени, селезенке, плаценте, головном мозге [41, 64, 81, 85], моноцитах [96], эндотелии сосудов [212].

В структуре дисферлина, состоящего из 2080 аминокислотных остатков, выделяют семь кальций-чувствительных C2 доменов (C2A, C2B, C2C, C2D, C2E, C2F, C2G, рисунок 4), обеспечивающих мембранный и везикулярный транспорт веществ, а также три fer и два DysF домена [64]. Все семь C2 доменов дисферлина способны связывать ионы кальция и в меньшей степени ионы магния и стронция [38]. Особенно функционально важен C2A домен, который способен связывать фосфатидилинозитол-4-фосфат, фосфатидилсерин, и PIP 2 [92]. Дисферлин выполняет множество функций: восстановление поврежденной мембраны, слияние везикул, клеточная адгезия, передача межклеточного сигнала [54, 96, 144, 145, 212], участие в реорганизации микротрубочек в ходе миогенеза [48, 99, 144]. Период полужизни дисферлина в несвязанном состоянии составляет ~4–6 часов, в составе плазматической мембраны – примерно 3 часа [117]. Недостаток дисферлина сказывается на замедлении лизосомального экзоцитоза [97].

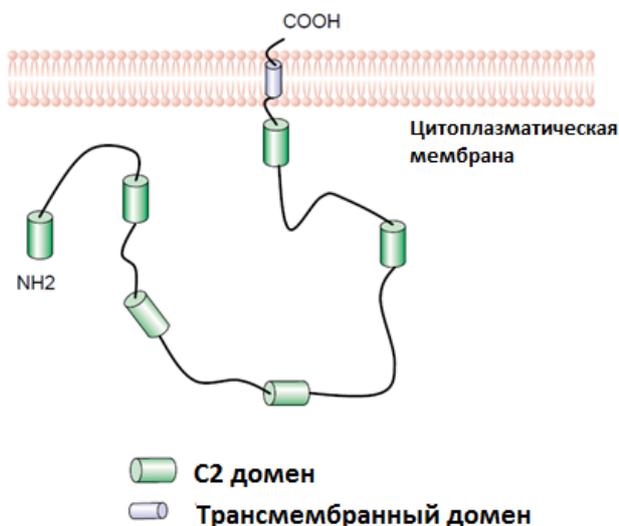


Рисунок 4 – Локализация доменов дисферлина в клетке [по Bansal, 2004; с изм.]

Дисферлин в скелетной мышечной ткани

Дисферлин участвует в развитии и функционировании скелетной мускулатуры. Белок участвует в образовании миобластов, их слиянии и формировании МВ [43].

Рядом с дисферлином под плазмолеммой локализованы кавеолин-3 (Cav-3) и Vin-1, которые необходимы для развития и функционирования Т-трубочек, непосредственно в самой Т-трубочке имеется кальций канал L-типа, а в саркоплазматическом ретикулуме – рианодиновый рецептор. Эти компоненты в тандеме с дисферлином образуют единый механизм, направленный на восстановление поврежденной сарколеммы.

Известно, что дефекты сарколеммы приводят к накоплению ионов кальция внутри поврежденного волокна. В норме дисферлин связывается с кальцием С2 доменами (преимущественно С2А доменом) [53]. В отсутствие белка концентрация этих ионов возрастает и приводит к активации протеолитических ферментов (нуклеаз, протеаз и липаз) путем активации свободноперекисного окисления липидов. Такой механизм усугубляет процесс воспаления и в итоге приводит к гибели МВ [43].

Дисферлин в других тканях

Помимо клеток миогенного дифферона, экспрессия дисферлина описана и в других клетках.

Клубочковый аппарат почек. Дисферлин локализуется в эпителиальных клетках и цитоплазме подоцитов почечной ткани. Известно несколько случаев развития болезни минимальных накоплений у пациентов с ПКМД2В. В отсутствие связывания дисферлина с кавеолином-3 не происходит организация мембраны клубочка, что приводит к развитию протеинурии [134].

Гепатоциты. Описано повышение уровня трансаминаз у пациентов с дисферлинопатиями, которое обнаруживалось за несколько лет до появления клинической картины мышечной дистрофии. В биоптатах печени пациентов описаны воспалительные инфильтраты в портальных трактах, умеренный фиброз, признаки стеатоза [38, 62].

Нейроны. Дисферлин экспрессируют пирамидальные нейроны. Было установлено избыточное накопление дисферлина у пациентов с болезнью Альцгеймера [137].

Кардиомиоциты. У части пациентов с мутациями в гене *DYSF* описывают дилатационную кардиомиопатию [237].

Эндотелиоциты и моноцитарно-макрофагальная система

Было показано, что дисферлин способен регулировать функцию моноцитов и макрофагов через белки семейства Rho ГТФаз, которые контролируют фагоцитоз через реорганизацию актинового цитоскелета [182].

Дисферлин регулирует адгезию эндотелиоцитов. Было выявлено замедление ангиогенеза у дисферлин-дефицитных мышей. В культуре эндотелиальных клеток отсутствие экспрессии дисферлина приводило к деградации PECAM-1/CD31 – молекулы адгезии, необходимой для ангиогенеза [212].

Трофобласт. Локализуясь в цитоплазматической мембране синцитиотрофобласта, дисферлин предположительно участвует в слиянии клеток синцитиотрофобласта. У пациенток с мутациями в гене *DYSF* описано более частое развитие преэклампсии по сравнению со здоровыми роженицами [154, 199].

Дисферлинопатии

Дисферлинопатии – группа наследственных заболеваний скелетной мышечной ткани, в этиопатогенезе которых лежат мутации в гене *DYSF*.

В 1998 году Liu с соавт. описали результаты исследования, включавшего когорту из 134 пациентов с дисферлинопатией, у которых были обнаружены 212 разных мутаций. Две мутации, точно вызывающие развитие заболевания, были обнаружены у 89 пациентов (66%), включая трёх пациентов, у которых были обнаружены более 2 мутаций, которые могли привести к развитию заболевания. Из всех мутаций 28% составляют мутации со сдвигом рамки считывания, 26% – миссенс мутации, 26% – нонсенс мутации, 18% – интронные мутации и 1% – делеции внутри рамки считывания [149].

Мутации в гене *DYSF* могут привести к развитию одного из четырех клинических фенотипов:

- дистальная миопатия Миоши (доминирует поражение голени и стоп, в патологический процесс также могут вовлекаться мышцы задней поверхности бедра и в меньшей степени ягодиц, а также мышцы запястий и пальцев);
- ПКМД типа 2В (преобладают изменения мышц преимущественно тазового пояса, наблюдается неловкость при ходьбе или подъеме по лестнице);
- дистальная миопатия с первичным поражением передней группы мышц голени (DMAT/DACM) (характеризуется свисающей стопой и степпажом);
- проксимально-дистальные формы.

Наиболее распространёнными формами дисферлинопатий являются миопатия Миоши и ПКМД типа 2В, часто обусловленные мутациями в локусе, кодирующем С2А домен [249].

Для дисферлинопатий характерны аутосомный тип наследования, относительно поздний дебют, значительное повышение уровня креатинфосфокиназы (КФК), гистологически обнаруживают некроз в результате нарушения регенерации МВ, лейкоцитарную инфильтрацию, фиброз и липоидоз [146].

Снижение синтеза дисферлина обнаружено также при дистрофинопатиях, саркогликанопатиях, кальпаинопатиях и кавеолинопатиях [160].

1.4. Модели повреждения мышечной ткани

Первые эксперименты по выявлению закономерностей восстановления ППСМТ после повреждения были проведены более семидесяти лет назад А.Н. Студитским. Их суть заключалась в удалении большого объема мышц либо в измельчении удаленной мышцы и ее возвращению в первоначальное анатомическое местоположение [30, 31].

Модели повреждения скелетных мышц можно разделить на *in vitro* и *in vivo* [35]. К первым относят культуры мышечных клеток, ко вторым – физические, химические и биологические модели. В свою очередь, физические модели делятся на травмы мышц с нарушением целостности кожных покровов (рассечение-сшивание мышц, резекция, ишемия-реперфузия, денервация, огнестрельное ранение) и без нарушения (контузия, компрессия, компартмент-синдром, растяжение, термическое воздействие) [35].

Так как экспериментальная часть в данной работе проводилась на биологической и химической моделях *in vivo*, эти модели будут рассмотрены подробнее.

Модели химического повреждения

Такие модели подразумевают воздействие миотоксического агента на скелетные мышцы. По своей природе химические вещества с миотоксичным действием можно условно разделить на фармакологические препараты и прочие (яды, токсины). Среди первых наиболее известны статины и местные анестетики. Ввиду отсутствия окончательного понимания механизма действия статинов на мышечную ткань (одна из теорий – ингибирование синтеза мышечных белков) [112] их применение в качестве модели ограничено. Местные анестетики, наоборот, весьма распространены среди применяемых в исследованиях повреждающих агентов. Не действуя на миосателлиты, вызывая быстрое и прямое миотоксичное действие, данная группа препаратов приоритетна среди

остальных химических веществ. По структуре все местные анестетики можно разделить на две группы: 1) с аминоэфирной связью; 2) с аминоамидной связью. Прокаин (новокаин) является типичным представителем первой группы; лидокаин – второй. Примечательно, что у местных анестетиков имеется видовая специфичность. Так, например, бупикаваин вызывает большую миотоксичность у крыс и минимальную – у мышей [206]. Особенностью миотоксинов является то, что они могут избирательно повреждать один из типов мышечных волокон. Например, медленные мышечные волокна более подвержены токсическому действию нотексина, чем быстрые. Наиболее часто с целью моделирования повреждения мышц применяют новокаин, бупивакаин, лидокаин, тетракаин [112, 192, 240]. Новокаин – местный анестетик, снижающий проницаемость мембран для ионов натрия, тем самым препятствуя возникновению потенциала действия. При воздействии на МВ он приводит к разрыву пучков миофиламентов в области Z-линий, нарушению целостности митохондрий и саркоплазматического ретикулума, кариопикнозу. Было обнаружено, что через 2 сут. после повреждения клеточный дебрис фагоцитируется, остается лишь базальная мембрана с популяцией прилежащих к ней МСЦ [112].

Биологические модели

Данная группа моделей включает в себя инфекционные агенты и генетические модели.

Такие инфекционные агенты, как вирус гриппа, альфавирусы, метициллин-резистентный золотистый стафилококк, лейшмании способны вызвать дегенерацию, фиброз и некроз мышц [93, 177, 224, 244].

Разнообразны генетические модели повреждения. Так как большой пласт заболеваний СМТ обусловлен мутациями в тех или иных генах, изучение прогрессирования и апробация генных и клеточных препаратов *in vivo* диктует проведение исследований на животных с естественным мутагенезом, а также создание нокаутных линий лабораторных животных [191, 196, 213, 214, 252].

Ряд наследственных заболеваний мышечной ткани обусловлен мутациями в генах, кодирующих белки дистрофин-дистрогликанового комплекса. Одним из

наиболее часто моделируемых заболеваний этой группы является миодистрофия Дюшенна, для которой описано более 60 видов генетических моделей от нематод и дрозофил до собак и обезьян [169, 241]. Mdx – наиболее известная линия мышей со спонтанным мутагенезом, но, как и для многих других миодистрофий, животные с естественными мутациями во многом не пригодны для сопоставления с заболеванием у человека [225]. Ограничения, в основном, связаны с различиями в клиническом течении (дебют, степень тяжести, продолжительность жизни, сопутствующие заболевания), патогистологических данных (несоответствие гистологической картины у линейного животного и человека). В результате выводят новые линии животных, нокаутных по одному или нескольким генам, например, *mdx:utrophin^{-/-}* - двойные нокаутные мыши по генам дистрофина и утrophина [169].

Генетические модели для изучения дисферлинопатий

На сегодняшний день известно более 100 линий мышей с мутациями в гене дисферлина. Гены *DYSF* мышей и человека имеют схожую последовательность аминокислот, в связи с чем некоторые дисферлин-дефицитные мыши (например, линии мышей со спонтанным мутагенезом SJL и A/J) используются в качестве моделей для изучения дисферлинопатий [104, 169]. Следовательно, эти линии пригодны для экспериментов по контролю новых методов лечения и определения факторов, которые влияют на дистрофические изменения в скелетных мышцах [146, 147]. С трехнедельного возраста у мышей линии SJL с частичным дефицитом дисферлина наблюдается воспалительная миопатия, сопровождающаяся мышечной слабостью. Для этой линии мышей характерна невыраженная дистрофия проксимальных мышц. У мышей линии A/J заболевание дебютирует в возрасте 4-5 мес. с преимущественным поражением мышц задних конечностей, у этой линии сохранна сила хватки передних конечностей, но значительно снижена активность при проведении теста «открытое поле» [121, 130].

Экспериментальная часть данной работы была проведена на нокаутных мышцах линии B1a/J (B6.A-Dysf^{pmmd}/GeneJ) со вставкой ETn ретротранспозона в 4 интрон гена *DYSF* мышам дикого типа – C57Bl/6. Согласно литературным данным

дебют заболевания у них приходится на 2 мес., а первые гистологические изменения в виде появления ЦЯМВ и очагов воспаления – на 4 мес. Основными вовлеченными в патологический процесс мышцами являются большая поясничная мышца, четырехглавая мышца бедра, передняя большеберцовая, икроножная, мышцы передней брюшной стенки [130].

Анализ литературы показывает, что изучение миодистрофий и поиск пути к их терапии являются актуальной темой на сегодняшний день.

Описано многообразие функций и выявлена роль дисферлина в репаративной регенерации мышечных волокон. В настоящее время нет данных о прогрессировании заболевания у линий мышей с дисферлинопатиями, что послужило основанием для изучения патогистологических изменений в скелетной мышечной ткани во всех возрастных периодах мышей, мутантных по гену *DYSF*.

В литературе имеются данные о локальном действии миотоксических агентов на мышечную ткань, но нет сведений о влиянии острого повреждения на МВ в условиях отсутствия дисферлина. В связи с этим одной из задач работы стало изучение влияния новокаина на процессы репаративной регенерации у мышей, нокаутных по гену *DYSF*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Работа была проведена на самцах мышей линии *Vla/J* с мутацией в гене *DYSF* (n=30) и линии *C57Bl/6* (контрольная группа, n=30). Мыши линии *Vla/J* были получены из Лаборатории клеточной и молекулярной биологии Санкт-Петербургского государственного университета, мыши линии *C57Bl/6* – из Научно-исследовательского центра биомедицинских моделей и технологий (г. Москва). Содержание и экспериментальная работа с животными проводилась с соблюдением принципов биоэтики в соответствии с международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (1986 г.), директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/ЕС) о защите животных, использующихся для научных целей, «Биоэтическими правилами проведения исследований на человеке и животных». Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (протокол №14 от 08.02.2019).

2.1 Генотипирование мышей с мутацией в гене *DYSF*

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. Материалом для ПЦР был фрагмент уха исследуемой мыши. Забранный фрагмент ткани переваривали в Ear buffer (100 mM Tris pH 8,5; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,2% SDS) с добавлением протеиназы К (стоковый водный раствор 10 мг/мл) из соотношения 90 мкл буфера:10 мкл протеиназы К). Перевар готовили в термошейкере при температуре 55°C в режиме "встряски" в течение ночи. На утро протеиназу блокировали при температуре 95°C в течение 5 мин. Затем полученный перевар разводили 750

мкл буфера TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA) с добавлением РНКазыА (20 мкг/мл). На одну ПЦР-реакцию использовали 1 мкл полученного раствора. Отжиг проводили при температуре 55°C [136]. Полученные фрагменты разгоняли в 3% агарозном геле, т.к. они близки по размеру: дикий тип – 207 bp, мутантный – 234 bp, гетерозиготный – от 207 до 234 bp (последовательность праймеров представлена в таблице 4).

Таблица 4 – Праймеры, использованные для генотипирования мышей

Праймер	Последовательность 5' --> 3'	Тип праймера
8882	TTC CTC TCT TGT CGG TCT AG	Прямой к дикому типу
8883	CTT CAC TGG GAA GTA TGT CG	Общий
8884	GCC TTG ATC AGA GTA ACT GTC	Прямой к мутантному типу

2.2 Методика отбора материала

Отбор материала в онтогенезе мышей Bla/J и C57Bl/6

Для оценки состояния мышечной ткани в естественных условиях течения миодистрофии были исследованы икроножные мышцы мышей линии Bla/J в возрасте от 1 сут. до 18 мес. постнатального онтогенеза. В качестве контроля – мыши линии C57Bl/6 аналогичных возрастов. Эвтаназию животных проводили с применением двуокиси углерода с последующим забором мышц голени и фиксацией в 10% растворе забуференного формалина.

Таблица 5 – Количественное распределение животных при изучении постнатального онтогенеза

№	Период постнатального онтогенеза/линия мышей	1-20 сут.	30-60 сут.	3-9 мес.	12-18 мес.	Всего
1	Bla/J	3	3	5	3	14
2	C57Bl/6	3	3	5	3	14

Оценка патогистологических изменений проводилась в 4 возрастных группах в соответствии с классификацией В.Г. Макарова [32] (через двоеточие указан изучаемый возраст):

I. Период молочного кормления:

- а) новорожденные (1-5 сут.: 1 сут.);
- б) подсосный возраст (6-21 сут.: 10, 20 сут.).

II. Период полового созревания:

- а) неполовозрелый период (22-40 сут.: 30 сут.);
- б) предслучный период (41-60 сут.: 60 сут.).

III. Репродуктивный период:

- а) молодой (3-6 мес.: 3, 4, 5 мес.);
- б) зрелый (7-10 мес.: 7, 9 мес.).

IV. Период выраженных старческих изменений

- а) предстарческий (11-15 мес.: 12, 15 мес.);
- б) старческий (16-20 мес.: 18 мес.).

По данным исследований икроножная мышца является одной из наиболее вовлекаемых в патологический процесс при дисферлинопатиях как у мышей, так и у человека [44, 64, 130], чем был обусловлен выбор именно этой мышцы для изучения. Следует принимать во внимание, что в разных скелетных мышцах оцениваемые в работе показатели могут варьировать.

Методика введения миотоксического агента

С целью патоморфологической оценки репаративных процессов в скелетных мышцах в ответ на острое повреждение была выбрана химическая модель повреждения в виду удобства дозирования и возможности прецизионного введения миотоксического агента. В медиальную головку правой икроножной мышцы всем животным вводили 100 мкл 0,5% раствора новокаина (Renewal[®], серия №421115, Россия) через кожный разрез. Кожа в проекции места инъекции была предварительно выбрита, обработана 70% р-ром этилового спирта. Кожа отсекалась, миотоксический агент вводился прецизионно инсулиновым шприцом

под контролем зрения. Затем кожа ушивалась. Животные находились под комбинированным золетил-медитиновым наркозом. Животных выводили из эксперимента с применением двуокиси углерода через 2, 4, 10 и 14 сут. (n=4 из каждой группы для каждого срока, таблица 6). Фиксация среднего поперечного сегмента голени была произведена после извлечения берцовых костей. Для интактного контроля использовали конечность мышей того же возраста, которым не вводили новокаин (0 сут. на графических изображениях).

Таблица 6 – Количественное распределение животных в эксперименте с введением новокаина

№	Линия мышей	Сроки наблюдения				
		2 сут.	4 сут.	10 сут.	14 сут.	всего
1	B1a/J	4	4	4	4	16
2	C57Bl/6	4	4	4	4	16

2.3 Световая микроскопия

Фиксация и заливка

Образцы мышц голени фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. После фиксации в течение 24 часов материал был помещен в гистологический процессор Thermo Scientific (США), где проходили последовательные этапы парафинирования: промывка в воде 20 мин. при $t=20^{\circ}\text{C}$, проводка через 5 смен изопропанола по 1,5 часа при $t=37-40^{\circ}\text{C}$, 2 смены промежуточного раствора (изопропанол+минеральное масло – 1:1) по 90 мин. при $t=45^{\circ}\text{C}$, 1 смену минерального масла – 120 мин при $t=45^{\circ}\text{C}$, и 4 смены парафина по 1 часу при $t=58^{\circ}\text{C}$ [26]. После прохождения всех этапов проводки материал был залит в парафин и зафиксирован на пластиковые кассеты в виде парафиновых блоков.

Для проведения иммунофлуоресцентного анализа с Ат к дисферлину использовали образцы икроножных мышц мышей линии B1a/J в возрасте 5 мес., в качестве контроля – мышей линии C57Bl/6 в возрасте 5 мес. Мышцы помещали в

изопентан, охлажденный в жидком азоте. Из свежеприготовленного образца мышцы изготавливали криосрезы толщиной 10 мкм на криотоме Thermo Scientific Shandon Cryotome FSE (США).

Изготовление парафиновых срезов

Парафиновые срезы были изготовлены с использованием автоматического ротационного микротомы Thermo Scientific HM355S (США). Срезы толщиной 4 мкм были помещены на предметные стекла с предварительно нанесенным на них желатиновым адгезивом. Для дальнейшего просушивания стекла со срезами были помещены в термостат на 24 часа при $t=37^{\circ}\text{C}$ [18].

Окрашивание гематоксилином и эозином

Для этого был использован гематоксилин Майера и 1% водный раствор эозина. Окрашивание проводилось после депарафинирования и дегидратации, срезы были помещены на 2 мин. в раствор гематоксилина Майера, затем промыты в водопроводной воде (5 мин.). Далее срезы были помещены в раствор эозина на 15 сек., ополоснуты в дистиллированной воде и заключены в глицерогель под покровное стекло [20, 91].

Окрашивание по Маллори

Метод окрашивания был использован для выявления волокнистых структур соединительной ткани. Для окрашивания использовали коммерческий набор реактивов для окраски по Маллори (BioVitrum, Россия), который включает раствор карболового фуксина, кислотный буфер, раствор фосфорномолибденовой кислоты и полихромный раствор по Маллори. После депарафинирования и дегидратации срезы были окрашены по Маллори согласно приложенному производителем протоколу с последующим заключением в полистирол под покровное стекло.

Иммуногистохимические реакции

Иммуногистохимические реакции с антителами к альфа-гладкомышечному актину, Ki-67 и миогенину

Реакции были произведены после депарафинизации и дегидратации, демаскировки антигенных детерминант посредством HIER (раскрытие эпитопов, индуцируемое нагреванием) в цитратном буфере ($\text{pH} = 6.0$) в течение 30 мин.,

блокирования эндогенной пероксидазы 3% раствором пероксида водорода [18]. Реакции проводились с мышинными моноклональными антителами (Ат) к альфа-гладкомышечному актину (α -SMA, клон 1A4, DAKO, Калифорния, США) в разведении 1:50, кроличьими моноклональными Ат к Ki-67 (разведение 1:200, ab16667, Abcam, Кембридж, Великобритания), мышинными моноклональными Ат к миогенину (разведение 1:100, клон F5D, DAKO, Калифорния, США). Для детекции продуктов иммуногистологических реакций использовали систему Novolink (Novocastra, Ньюкасл, Великобритания), конъюгированную с пероксидазой, визуализация производилась хромогеном АЭК, ядра докрашивали гематоксилином Майера [94]. Для предотвращения неспецифического фонового окрашивания при использовании мышинных первичных антител на срезах мышинной ткани использовался коммерческий набор Animal Research Kit (DAKO, США) с обязательным отрицательным контролем реакций.

Иммуногистохимические реакции с Ат к быстрым и медленным миозинам

Реакции производились после депарафинизации и дегидратации, демаскировки антигенных детерминант посредством NIER в цитратном буфере (pH = 6.0) в течение 30 мин., блокирования эндогенной пероксидазы 3% раствором пероксида водорода. и нанесения раствора мышинных моноклональных Ат к МНС (тяжелым цепям миозина) fast (клон My-32, Sigma, Миссури, США) в разведении 1:500 и мышинных моноклональных Ат к МНС slow (клон NOQ7.5.4D, Sigma, Миссури, США) в разведении 1:2000. Для детекции продуктов иммуногистологических реакций использовали систему LSAB (Dako, США) согласно рекомендациям производителя, визуализация производилась хромогеном АЭК, ядра докрашивали гематоксилином Майера [125].

Иммунофлуоресцентные реакции с Ат к дисферлину

С целью обнаружения синтеза дисферлина на криосрезах мышц голени была произведена иммунофлуоресцентная реакция с кроличьими моноклональными Ат к дисферлину (ab124684, 1:200, Abcam, Кембридж, Великобритания), вторичные

At Alexa Fluor 647 (1:2000, Invitrogen, Калифорния, США). Контрастирование ядер проводилось DAPI.

2.4 Электронная микроскопия

Метод импрегнации полутонких срезов

Была изучена ультраструктура мышц мышечной линии Vla/J в возрастах: 1, 20 сут., 3, 12 мес. Образцы мышц (икроножной, медиальной широкой мышцы бедра и диафрагмы) размерами 1×5 мм фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, разведенном в фосфатном буфере (pH 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, Букс, Швейцария) в силиконовые формы. Выбор структур для изучения осуществляли на полутонких срезах толщиной 1 мкм, окрашенных толуидиновым синим, после чего производили прицельную заточку блоков [128].

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. На электронограммах оценивали состояние ядер, сарколеммы, сократительного аппарата, митохондрий, капилляров.

2.5 Микроскопия и морфометрия

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 (НИН, США). Морфометрия производилась

по 10 микрофотографиям со срезов икроножных мышц. При морфометрии оценивали следующие показатели:

- средняя площадь МВ (подсчет площади МВ производился по срезам, окрашенным ГЭ в программе ImageJ, при увеличении $\times 400$);

- доля центральоядерных МВ (ЦЯМВ, относительно числа всех МВ на микрофотографии, подсчет производился по срезам, окрашенным ГЭ в программе ImageJ, при увеличении $\times 400$);

- доля некротизированных МВ (среди всех МВ на микрофотографии, подсчет производился по срезам, окрашенным ГЭ в программе ImageJ, при увеличении $\times 400$);

- доля соединительной ткани (показатель оценивался на срезах, окрашенных по Маллори, в программе ImageJ, при увеличении в $\times 400$);

- индекс пролиферации (ИП, критерий оценивался по ИГХ реакции с Ат к Ki-67, на каждой микрофотографии при увеличении $\times 400$ в ImageJ подсчитывали три показателя: 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);

- поздняя миогенная дифференцировка (показатель оценивали по отношению миогенин-позитивных клеток к общему числу ядер при увеличении $\times 400$);

- сосудистая плотность (отношение сосудов, синтезирующих α -SMA к общему числу МВ, при увеличении $\times 400$);

- соотношение МВ, синтезирующих тяжелые цепи быстрых и медленных миозинов (при увеличении $\times 400$ подсчитывали долю МВ, экспрессирующих тяжелые цепи быстрых и медленных миозинов, по отношению к общему количеству волокон, в программе Aperio ImageScope (Leica, Германия)).

2.6 Статистическая обработка данных

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 и критерием Манна-Уитни для двух независимых выборок со значением $p < 0,05$ в качестве уровня значимости.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МЫШЕЙ ЛИНИЙ VLA/J И C57BL/6

3.1 Генотипирование мышей

С целью определения гомозиготной мутации в гене *DYSF* было произведено генотипирование 20 мышей линии Vla/J и мышей линии C57Bl/6 в качестве негативного контроля. Результаты генотипирования представлены на рисунке 5.

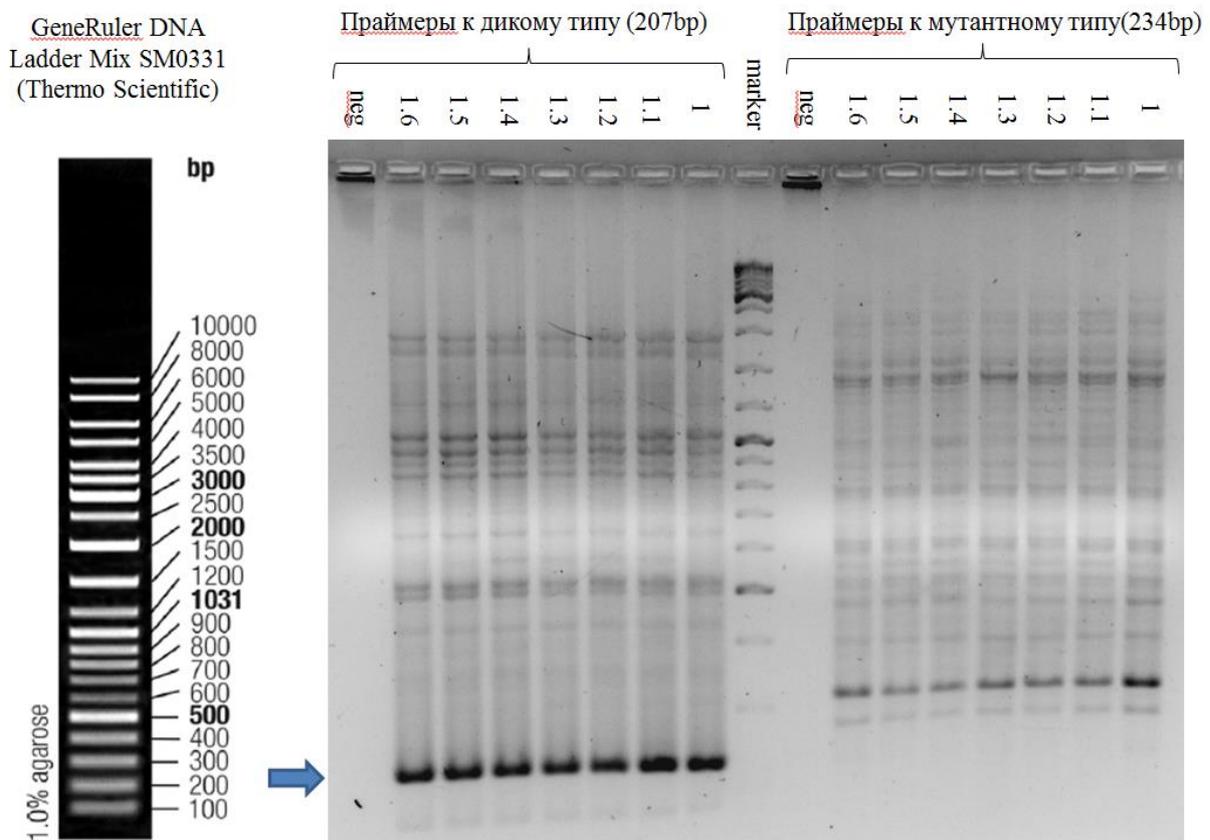


Рисунок 5 – Генотипирование мышей линий Vla/J и C57Bl/6. Neg. – образец ДНК контрольной мыши линии C57Bl/6, 1.1-1.5 – образцы ДНК мышей линии Vla/J

Как следует из результатов оценки гена *DYSF*, все генотипированные мыши линии Vla/J являются гомозиготными по мутации в гене *DYSF*.

При проведении иммунофлуоресцентной реакции с Ат к дисферлину было выявлено, что у мышей линии Vla/J, в отличие от мышей линии C57Bl/6, дисферлин

не синтезируется (рисунок 6), что свидетельствует о полном отсутствии продукта экспрессии гена *DYSF*.

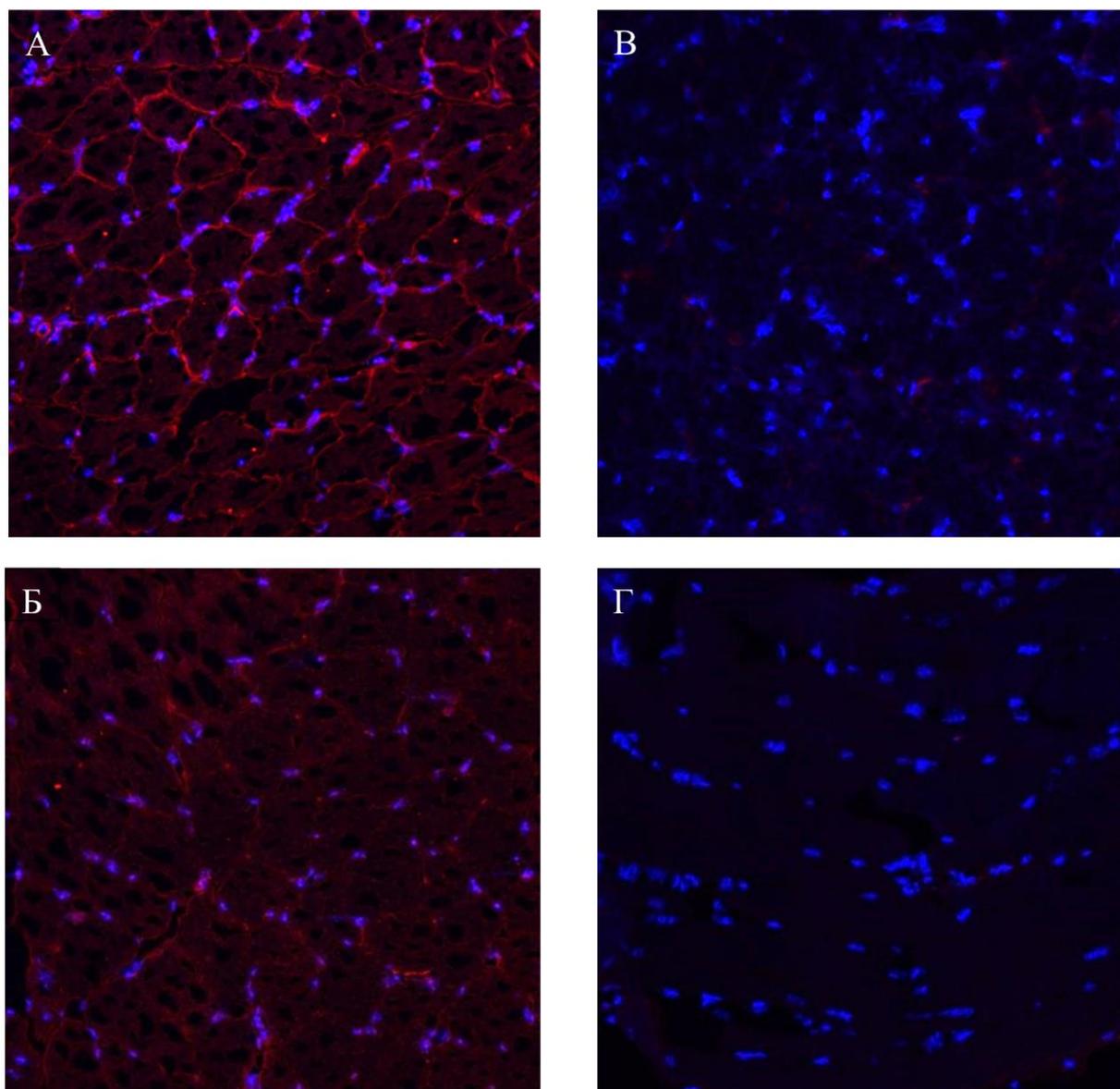


Рисунок 6 – Дисферлин (красный цвет) в срезах икроножной мышцы мышей линий C57Bl/6 (А, В) и Bla/J (Б, Г): А, Б – иммунофлуоресцентная реакция с Ат к дисферлину; В, Г – негативный контроль. Докраска ядер: DAPI. Ув.: ×200

3.2 Структура и ультраструктура поперечнополосатой скелетной мышечной ткани мышей линии Bla/J в разные периоды онтогенеза

На полутонких срезах препарата мышц голени мыши линии Bla/J в 1 сут. постнатального онтогенеза были выявлены следующие признаки: в мышцах

продолжаются процессы миогистогенеза (делящиеся ядра МВ и миобластов, рисунки 7 и 8), ядра большинства МВ уже смещены на периферию формирующихся МВ.

Кроме того, на одном из участков среза было выявлено несколько крупных МВ с дезорганизацией саркоплазмы (рисунок 8). Набухание саркоплазмы и изменение ее структуры – признаки повреждения мышечного синцития. На том же участке препарата были обнаружены МВ с вакуолизацией саркоплазмы.

На ультратонких срезах тех же образцов наряду с участками здоровой скелетной мышечной ткани (целой сарколеммой, сохранной исчерченностью МВ, ядрами с конденсированным хроматином) обнаружен ряд изменений в МВ.

Ультраструктурно выявлены признаки повреждения клеток миогенного дифферона: нарушение целостности сарколеммы, мозаичные просветления матрикса митохондрий, выраженная вакуолизация саркоплазмы, высокая складчатость ядер, расширение цистерн гранулярной ЭПС (рисунки 9, 10). Дегенеративные изменения в данных волокнах, скорее всего, вызваны отсутствием дисферлина в сарколемме, нарушение целостности которой привело к дальнейшей патогенетической цепочке повреждения миосимпласта: повышению проницаемости сарколеммы (вакуолизация цитоплазмы и набухание МВ), ионному дисбалансу со входом ионов кальция внутрь миосинцития и активацией внутриклеточных ферментов, в т.ч. нуклеаз (разрушение хроматина и изменение морфологии ядра). Следовательно, дегенеративные изменения в МВ в условиях дисферлинопатии у мышей линии Vla/J могут быть обнаружены с первых суток постнатального онтогенеза.

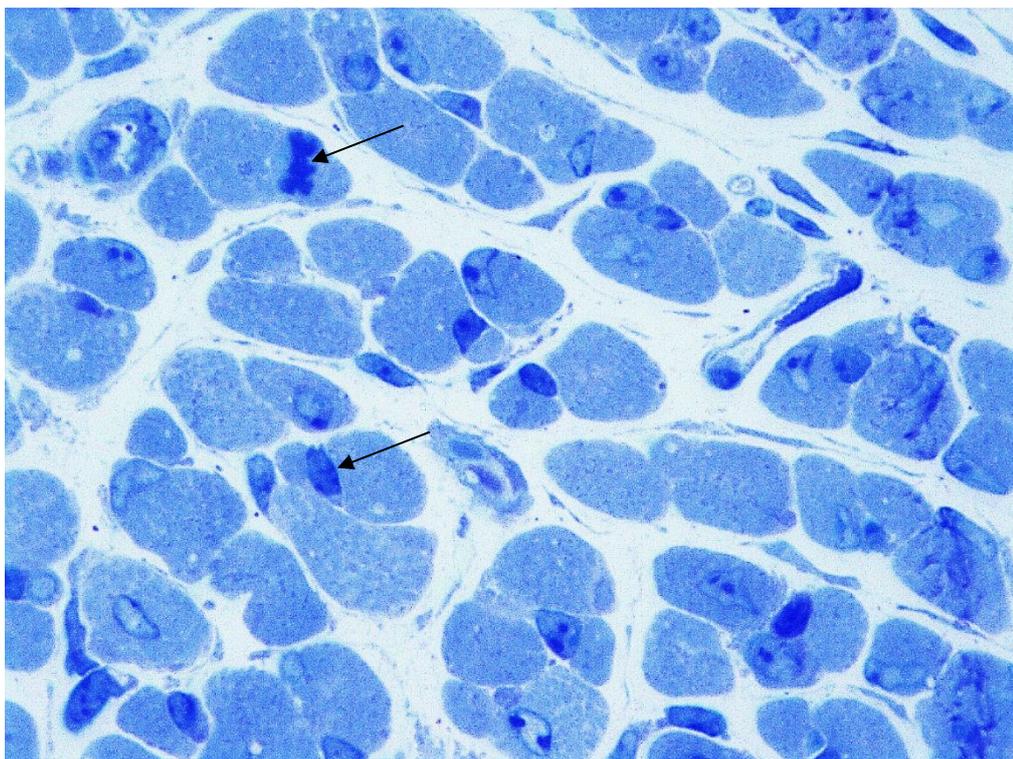


Рисунок 7 – Постнатальный миогистогенез в мышцах голени, 1 сут. жизни. Стрелками обозначены делящиеся ядра. Полутонкий срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

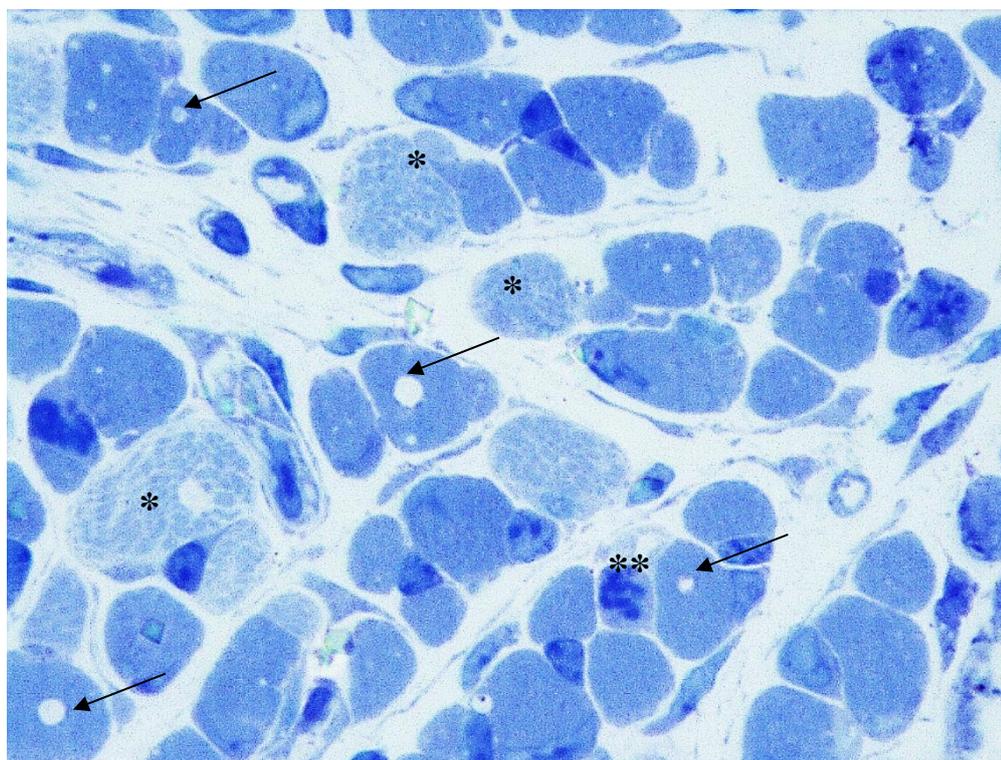


Рисунок 8 – Мышца голени мыши линии Bla/J, 1 сут. жизни. Стрелками обозначены MB с вакуолизацией саркоплазмы, * – дезорганизация MB, ** – делящиеся ядра. Полутонкий срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

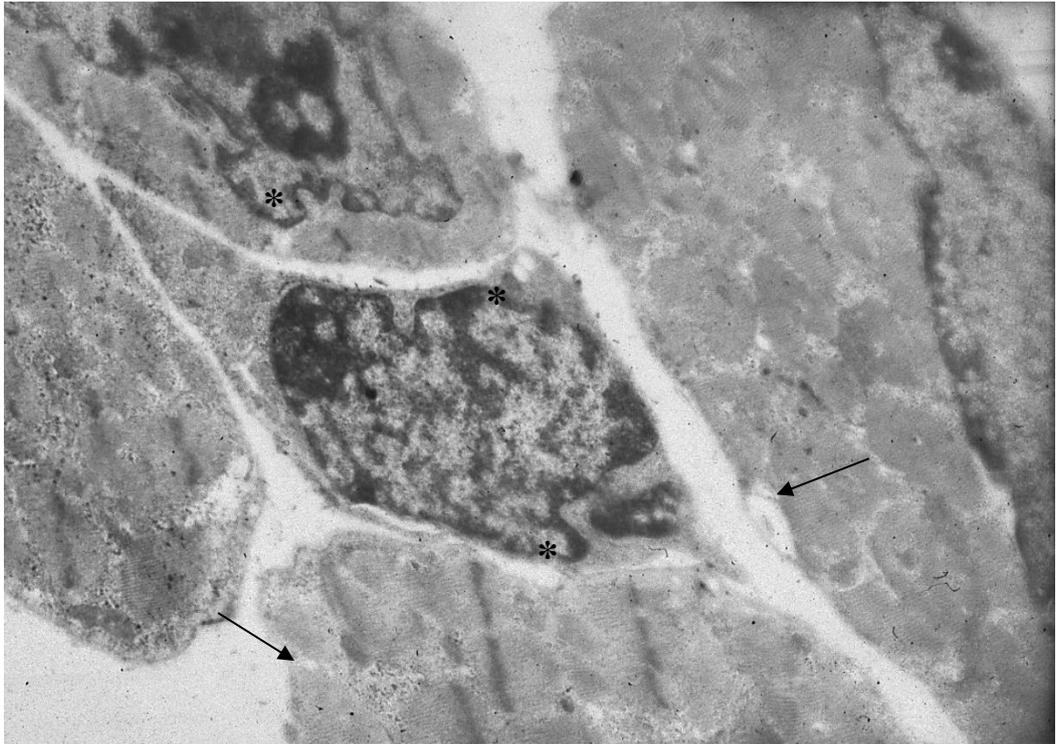


Рисунок 9 – Клетки миогенного дифферона с признаками дегенерации: истончение и прерывистость сарколеммы (стрелки), складчатость ядер (*). Мышца голени мыши В1а/Ј, 1 сут. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 9000$

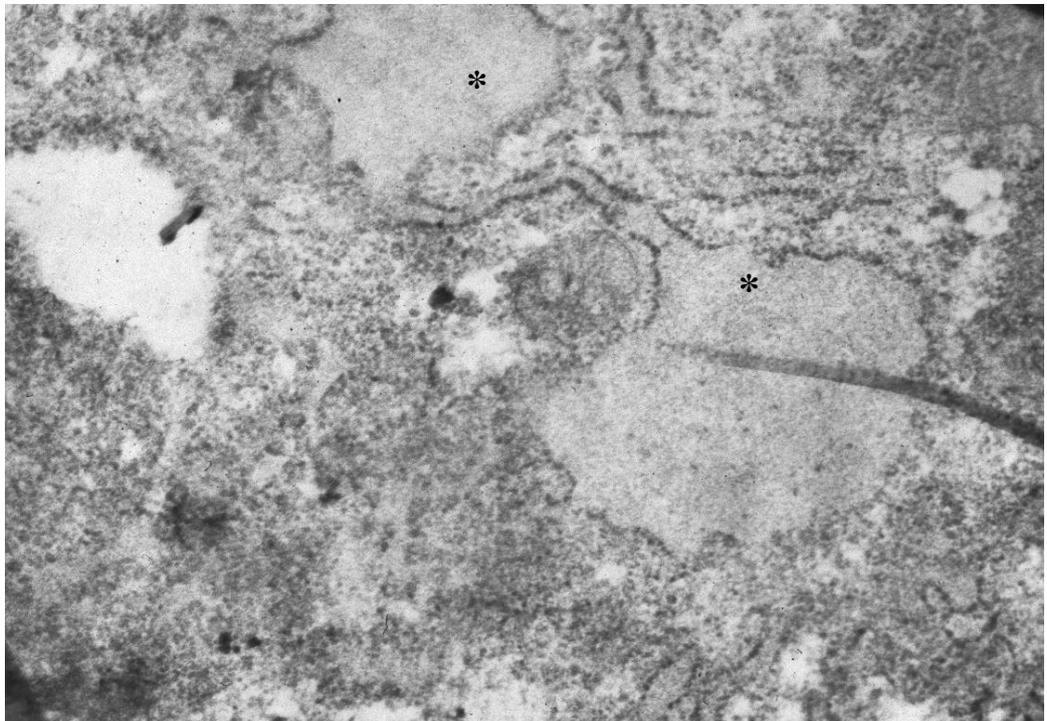


Рисунок 10 – Расширение гранулярной ЭПС в МВ (*). Мышца голени мыши В1а/Ј, 1 сут. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 23000$

Изменения в ультраструктуре компонентов скелетной мышечной ткани на 1 сут. постнатального онтогенеза мышц линии В1а/Ј выявлены не только в МВ, но и в сосудах микроциркуляторного русла. В скелетной мышечной ткани были обнаружены капилляры с сохранным строением (рисунок 11) и 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 [194]. Повреждение эндотелия в условиях дисферлинопатии способно приводить к гипоксии скелетных мышц, что, в свою очередь, будет усугублять повреждение МВ, вызывая в них разобщение процессов окислительного фосфорилирования. Последующий лактатацидоз, усиливая проницаемость сарколеммы, будет приводить к еще большему набуханию МВ и разрушению его целостности [19].



Рисунок 11 – Капилляр скелетной мышцы мышцы линии В1а/Ј 1 сут. жизни. Эндотелиоцит (*), эритроцит (**), перицит (стрелка). Электронограмма. Ув. $\times 14000$

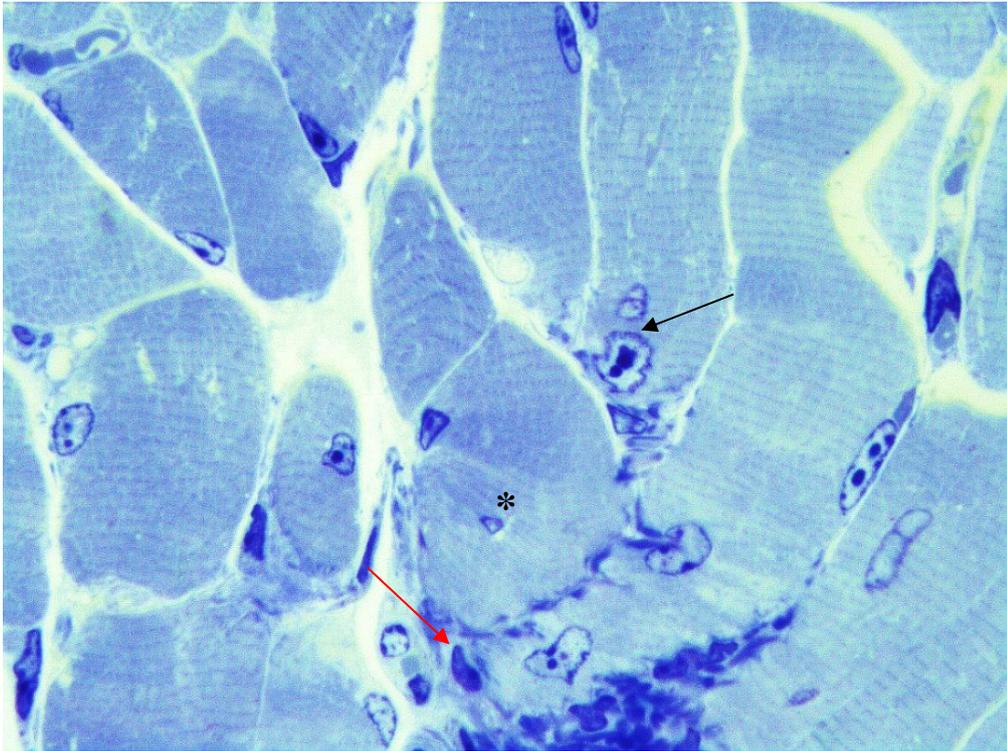


Рисунок 12 – Макрофаг в МВ (черная стрелка) и макрофаг в эндомизии (красная стрелка), ЦЯМВ (*) в икроножной мышце мыши линии В1а/J, 20 сут. жизни. Полутонкий срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

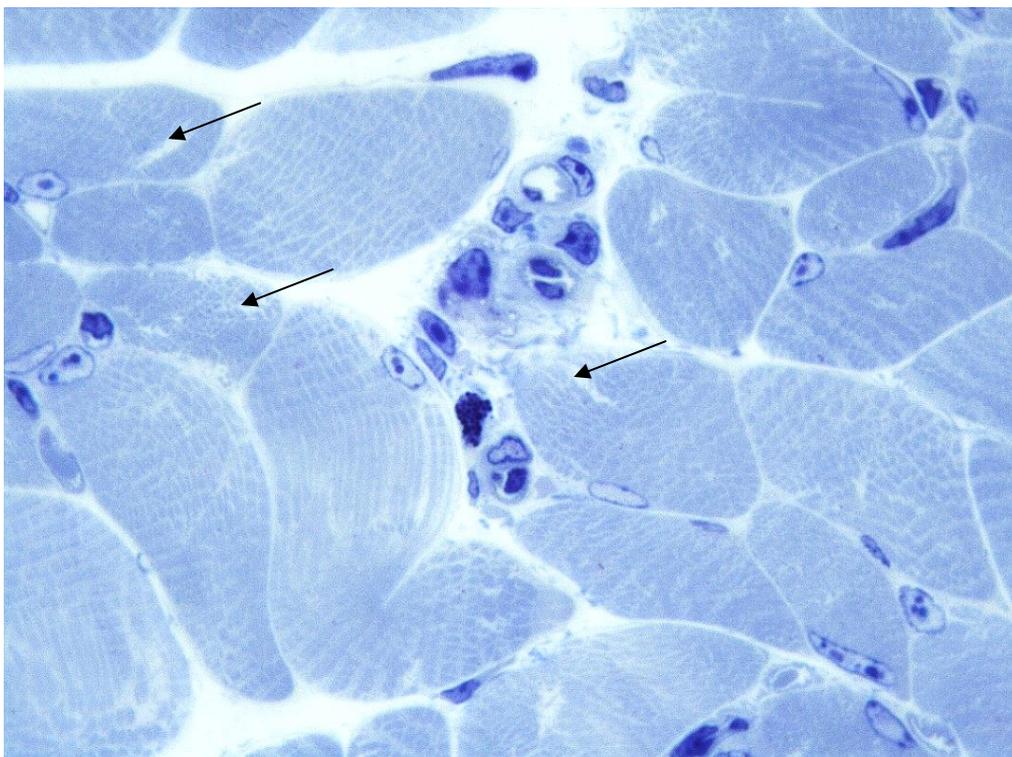


Рисунок 13 – Дезорганизация МВ (стрелки) в икроножной мышце мыши линии В1а/J, 20 сут. жизни. Полутонкий срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

На полутонких срезах скелетных мышц мыши через 20 сут. после рождения обнаружены дегенеративно-регенераторные изменения: появление единичных некротизированных МВ, инфильтрированных макрофагами, а также ЦЯМВ (рисунок 12). Были выявлены единичные МВ с дезорганизацией саркоплазмы (рисунок 13). Воспалительной инфильтрации в строме скелетных мышц при этом не визуализировано, что, вероятно, связано с дискретным повреждением единичных МВ.

При исследовании ультраструктуры скелетных мышц в условиях отсутствия дисферлина на 20 сут. жизни были обнаружены патологические изменения различных компартментов МВ. Отмечено набухание плазматической мембраны (рисунок 14), инвагинации и фрагментарное нарушение целостности сарколеммы (рисунки 14-16). Были выявлены изменения в организации сократительного аппарата МВ: расширение промежутков между истонченными миофибриллами (рисунки 15, 17, 18, 19), дезорганизация Z-линий (рисунок 17), множественная вакуолизация СПР (рисунки 17, 18). Кроме того, было обнаружено субсарколеммное скопление полиморфных митохондрий, увеличение одних митохондрий наряду с деструктивными изменениями других, выявлено уплотнение крист (рисунки 16, 19). Дезорганизацию сократительного аппарата можно объяснить, во-первых, вхождением избыточного количества ионов кальция при нарушении целостности сарколеммы, а во-вторых, отсутствием дисферлина в Т-трубочках. Последнее подтверждает участие дисферлина в развитии Т-трубочек, так как изменения в миофибриллах были обнаружены и при сохранности сарколеммы (рисунок 15). Вакуолизация СПР, вероятно, связана с повышением проницаемости сарколеммы для ионов натрия, что приводит к набуханию цитоплазмы [19]. Появление вакуолей наблюдалось и при сохранных миофибриллах (рисунок 18). Повышенным содержанием ионов кальция в цитоплазме можно объяснить и повреждение митохондрий, т.к. известно, что они выступают буфером для ионов кальция [204]. Таким образом, патологические процессы в скелетных мышцах продолжаются с течением времени, несмотря на ранние этапы постнатального онтогенеза.

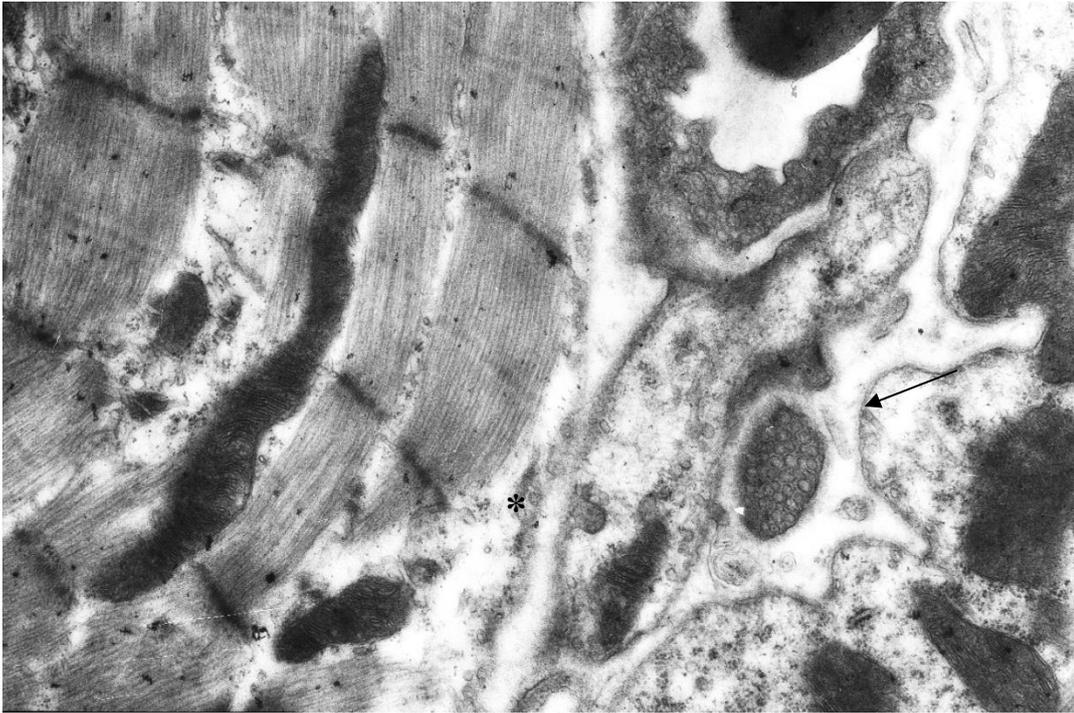


Рисунок 14 – Участки сохранной сарколеммы (стрелка) и набухшая, прерывистая сарколемма (*) на электроннограмме икроножной мышцы. Мышь линии В1а/Ј, 20 сут. жизни. Ув. $\times 23000$

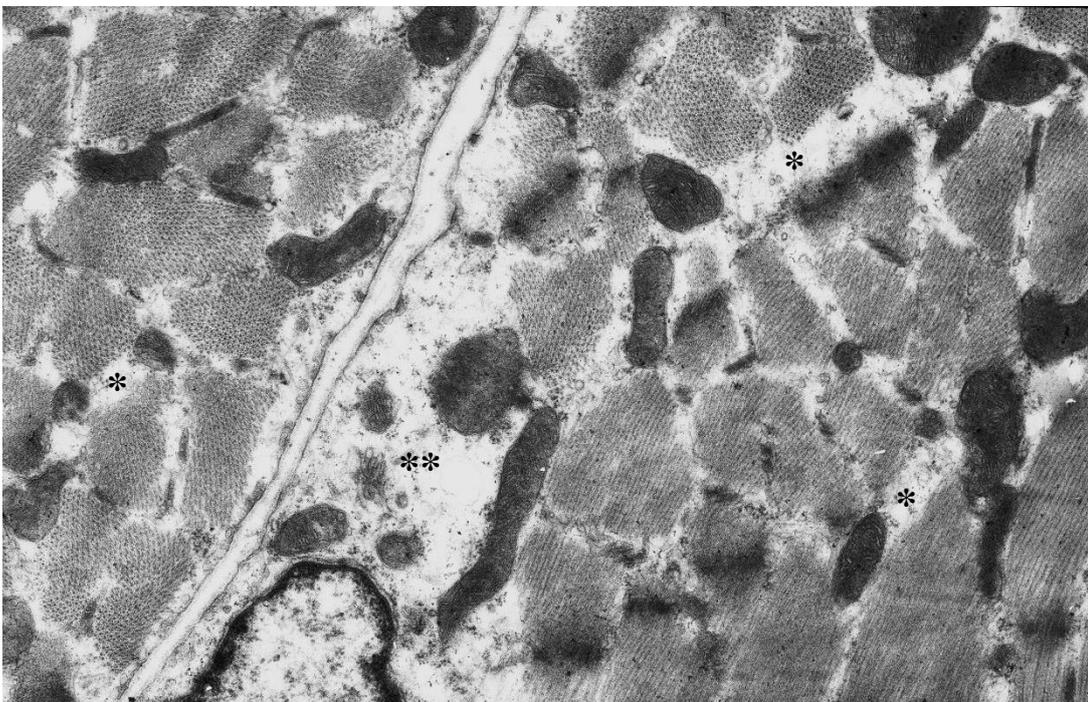


Рисунок 15 – Расширение пространств между миофибриллами (*), отек саркоплазмы (**) в МВ икроножной мышцы мыши линии В1а/Ј, 20 сут. жизни. Электроннограмма. Ув. $\times 23000$

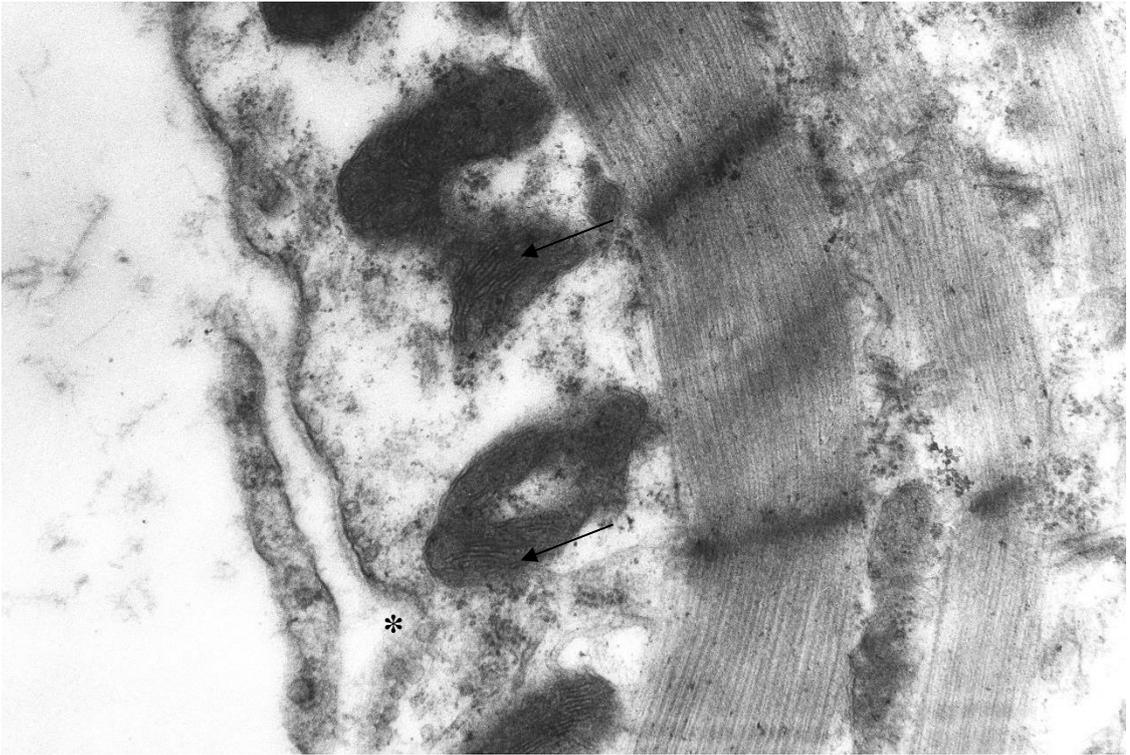


Рисунок 16 – Нарушение целостности сарколеммы (*) и уплотнение крист полиморфных митохондрий (стрелки) в икроножной мышце мыши линии Vla/J, 20 сут. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 23000$

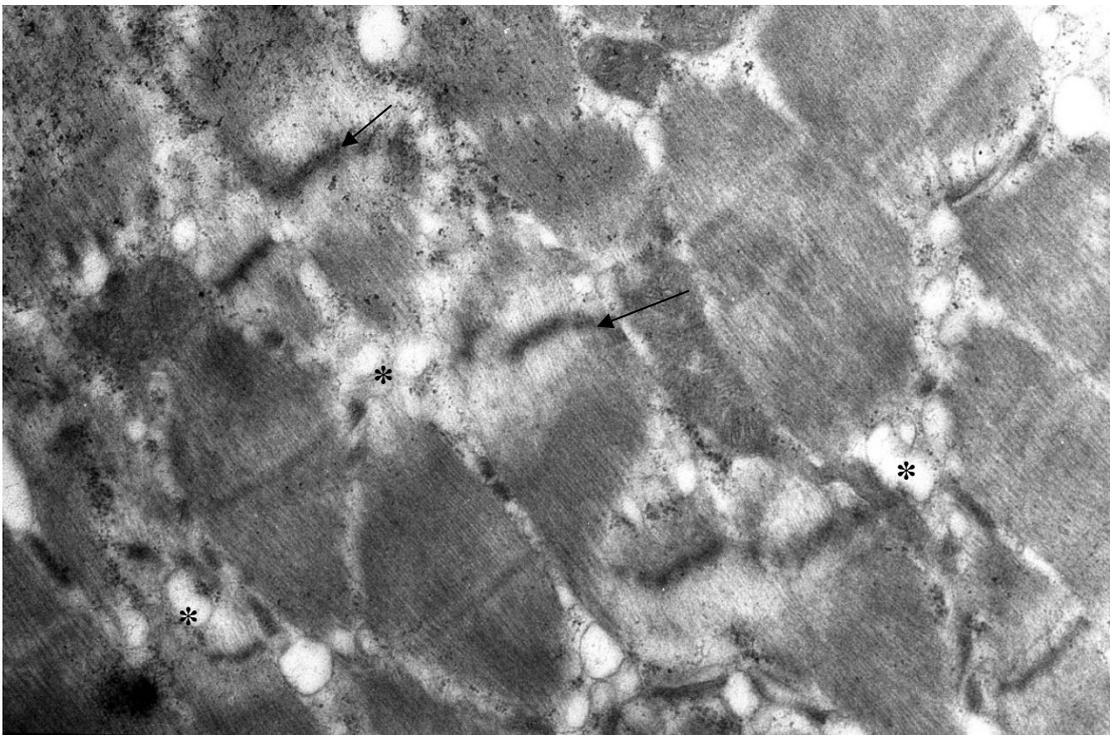


Рисунок 17 – Множественная вакуолизация расширенных промежутков между миофибриллами (*) и дезорганизация Z-линий (стрелки). Электронограмма икроножной мышцы мыши линии Vla/J, 20 сут. жизни. Ув. $\times 23000$

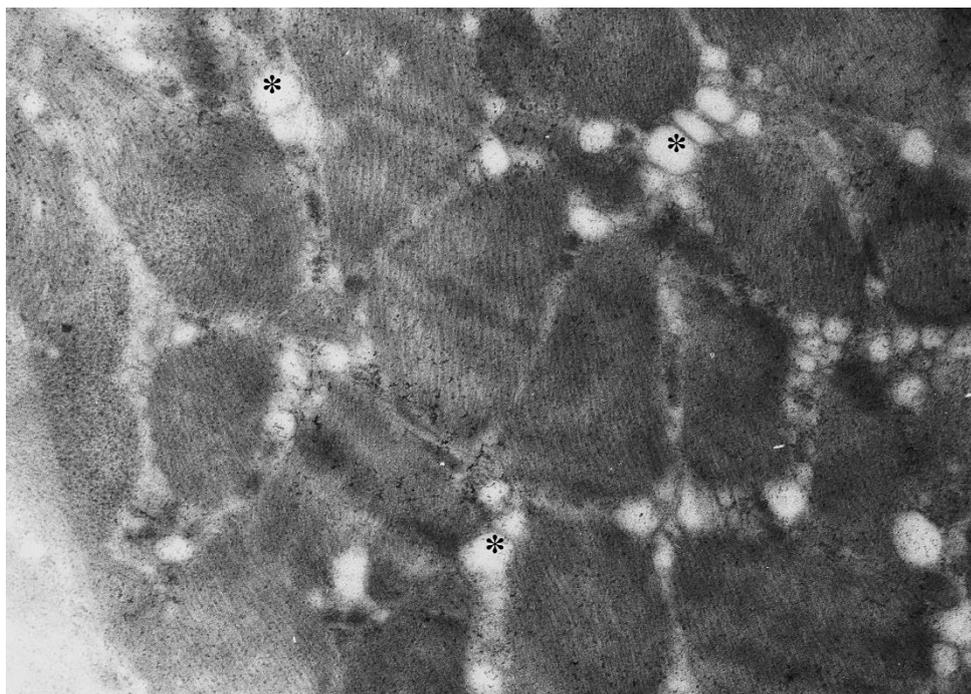


Рисунок 18 – Множественная вакуолизация расширенных пространств между миофибриллами (*). Электронограмма икроножной мышцы мыши линии В1а/Ј, 20 сут жизни. Ув. $\times 23000$

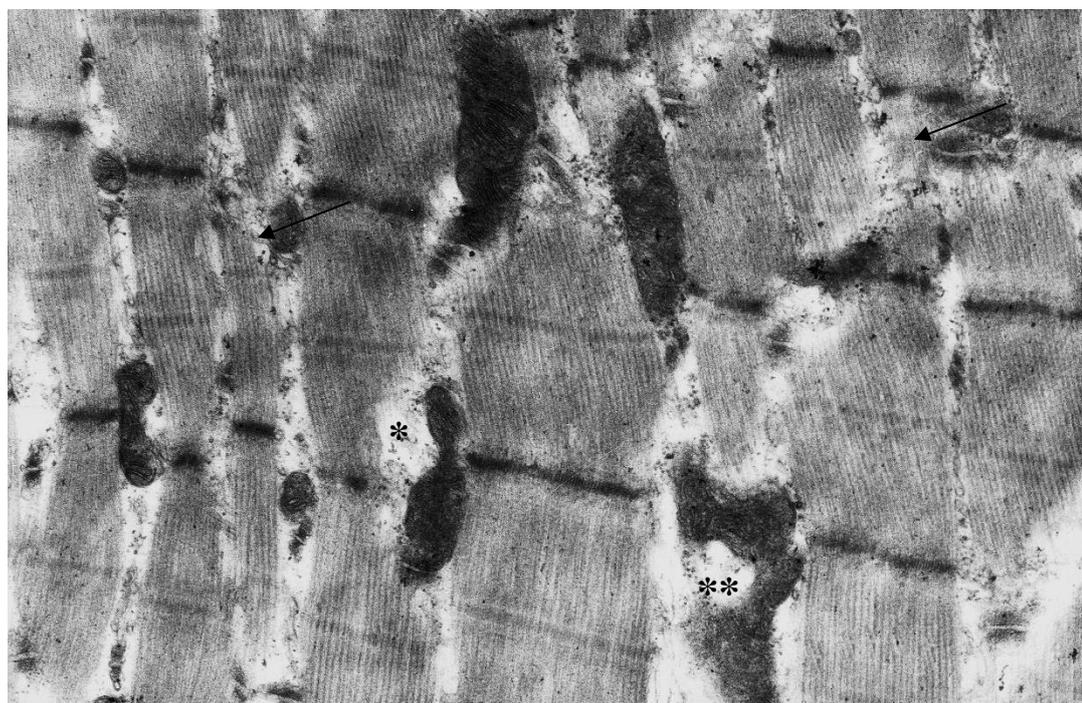


Рисунок 19 – Расширение пространств между миофибриллами (*), истончение миофибрилл (стрелки) и дезорганизация митохондрий (**), в икроножной мышце мыши линии В1а/Ј, 20 сут. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 17000$

Из вышесказанного можно сделать вывод, что дегенеративные изменения в скелетной мышечной ткани у мышей с диферлинопатией обнаруживаются уже на первом месяце жизни.

На полутонких срезах скелетных мышц мышей линии В1а/J в возрасте 3 мес. жизни наряду с участками здоровой мышечной ткани были выявлены структурные изменения в виде дезорганизации цитоскелета МВ (рисунок 20) – разрыва микротрубочек, гибели МВ (рисунок 21). В единичных МВ наблюдался фагоцитоз (рисунок 20).

На электроннограммах скелетных мышц мыши линии В1а/J в возрасте 3 мес. к прогрессирующим изменениям в сократительном аппарате МВ присоединились изменения в митохондриях. Так, в МВ на рисунке 22 наблюдается субсарколеммное скопление митохондрий, а также их дезорганизация в расширенных пространствах между истонченными миофибриллами. Митохондрии сливаются друг с другом, формируя крупные, гантелеобразные формы (рисунок 23). Такое слияние в единую биоэнергетическую сеть может происходить при метаболическом голоде с целью увеличения эффективности синтетических процессов в поврежденных органеллах [139].

В одном из полей зрения на месте погибшего МВ обнаружено скопление различных клеточных элементов (макрофаги, фибробласты, клеточный дебрис и фрагменты погибшего МВ) и коллагеновых волокон (рисунок 21), что свидетельствует о продолжающейся альтерации скелетных мышц.

Признаки дегенерации МВ в изучаемом возрасте были грубее по сравнению с 20 сут. В некоторых волокнах отмечается выраженный отек саркоплазмы с дезорганизацией миофибрилл в виде их истончения, аномалий Z-линий, разрывами миофибрилл на пучки и отеком межпучковых пространств (рисунок 24).

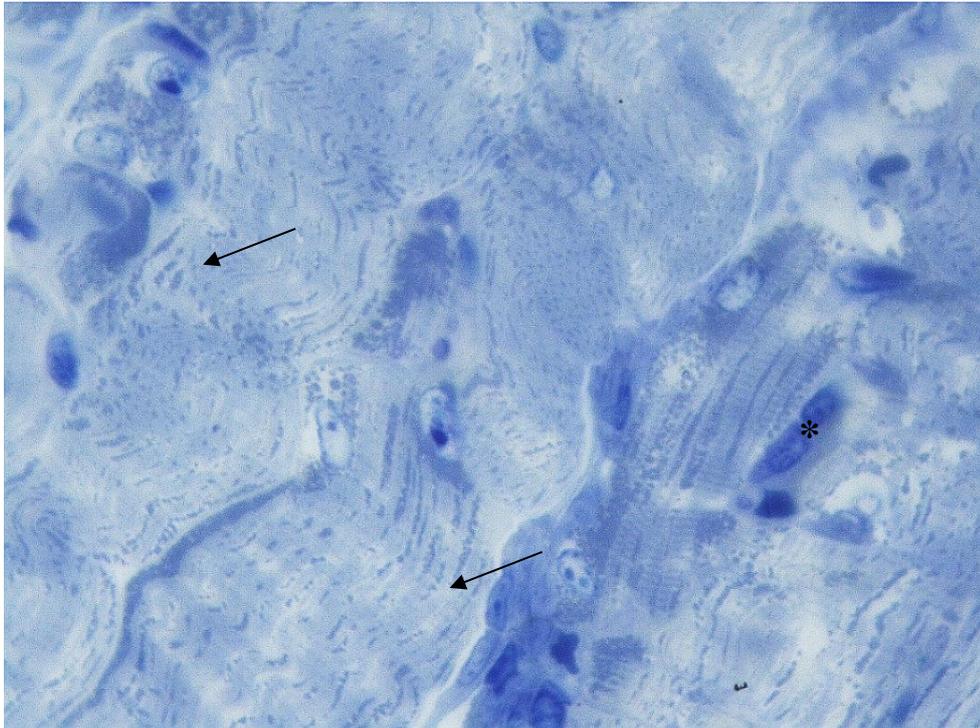


Рисунок 20 – Дезорганизация миофибрилл (стрелки) и фагоциты в МВ (*) – признаки повреждения МВ. 3 мес. Полутонкий срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

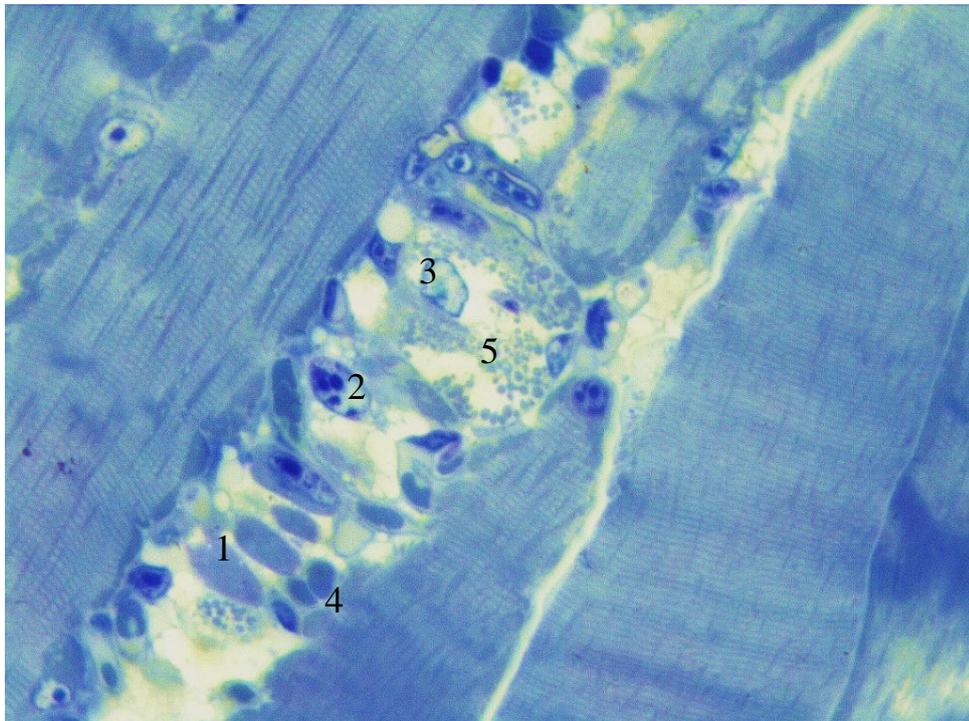


Рисунок 21 – Фрагменты мышечного волокна (1) и клеточный дебрис (2) среди макрофагов (3), фибробластов (4) и коллагеновых волокон (5) на месте погибшего МВ. Полутонкий срез икроножной мышцы мыши линии В1а/Ј, 3 мес. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

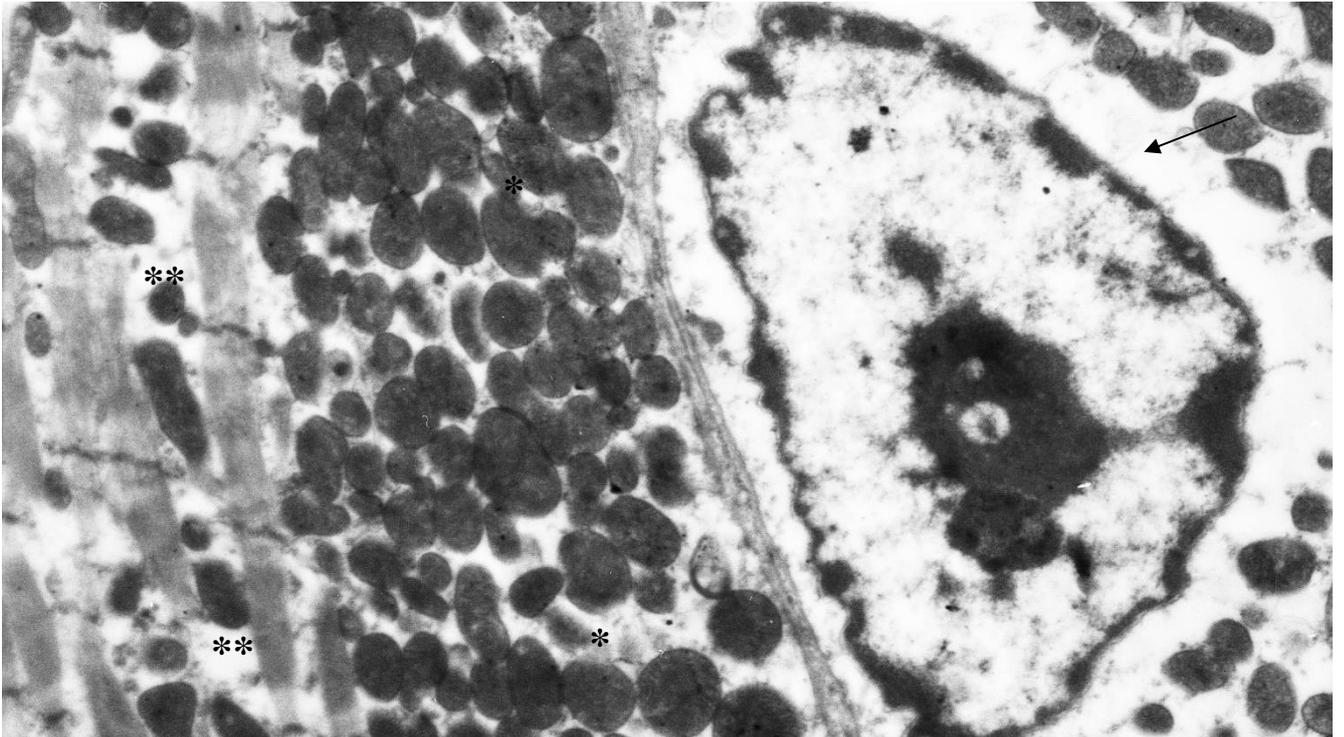


Рисунок 22 – Скопление митохондрий под сарколеммой (*) и расширение пространств между истонченными миофибриллами (**). Перинуклеарный отек в соседнем МВ (стрелка). Диафрагма мышцы линии Vla/J, 3 мес. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 12000$

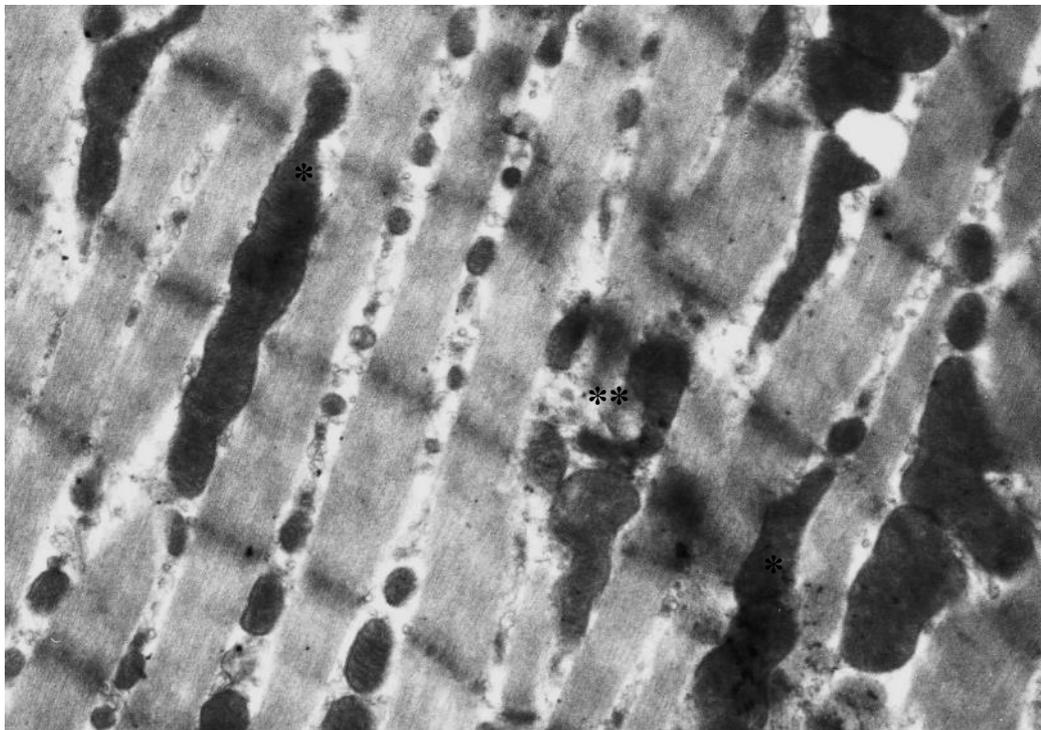


Рисунок 23 – Слияние (*) и разрывы (**) митохондрий в диафрагме мышцы линии Vla/J, 3 мес. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 26000$

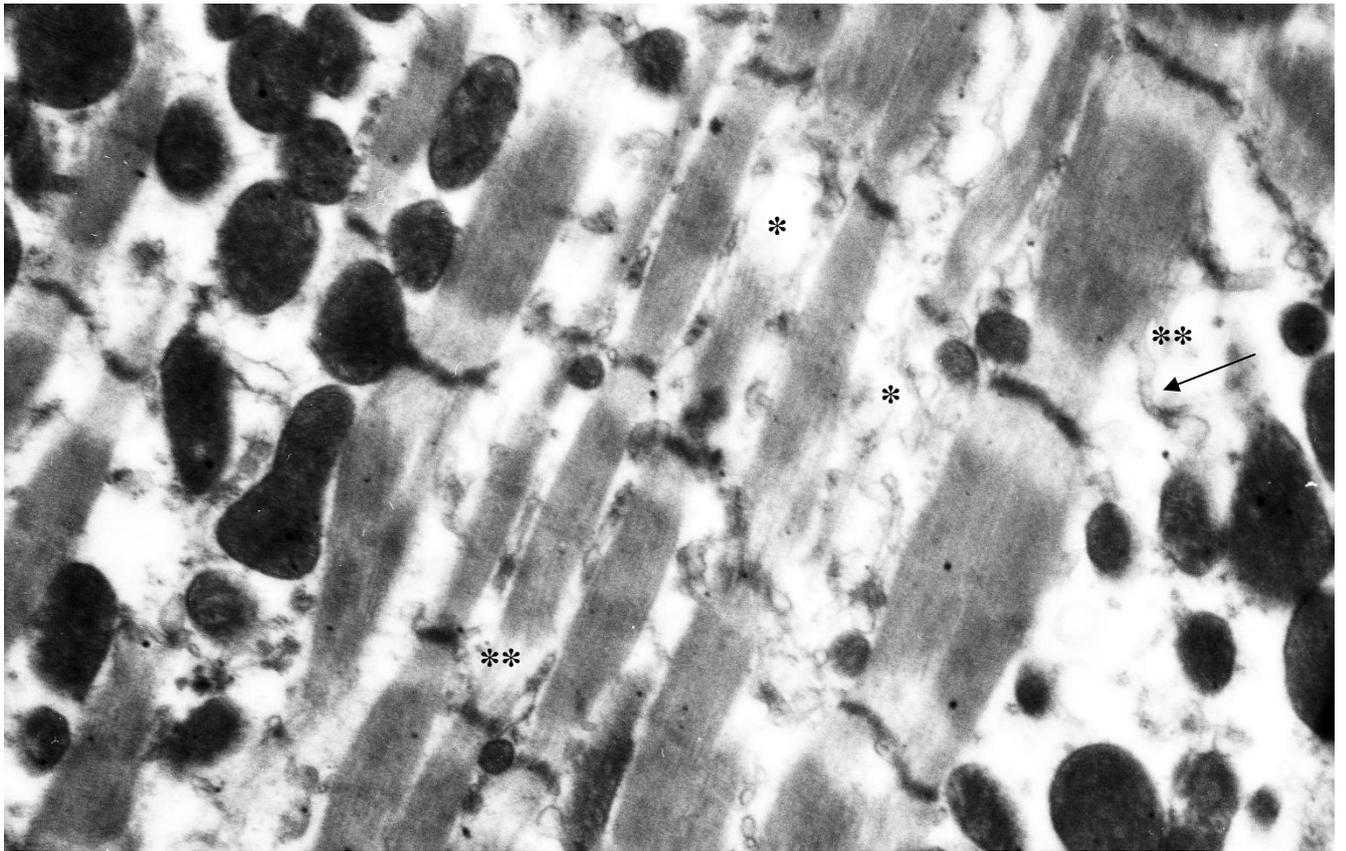


Рисунок 24 – Дегенерирующее МВ с фрагментацией и вакуолизацией цистерн саркоплазматического ретикулума (*), разрывы миофибрилл (**), и отек межпучковых пространств (стрелки) в диафрагме мышцы линии Bla/J, 3 мес. жизни. Электронограмма. Ув. $\times 17000$

При исследовании морфологии элементов скелетной мышечной ткани у мышцы линии Bla/J в возрасте 12 мес. жизни были обнаружены выраженные дегенеративные изменения (некроз большого количества МВ с участками воспалительной инфильтрации, липоидоз, полиморфизм МВ), рисунки 25-27. В этот период изменения как на светооптическом, так и на электронномикроскопическом уровнях были наиболее выраженными по сравнению с другими (более ранними) изучаемыми возрастами.

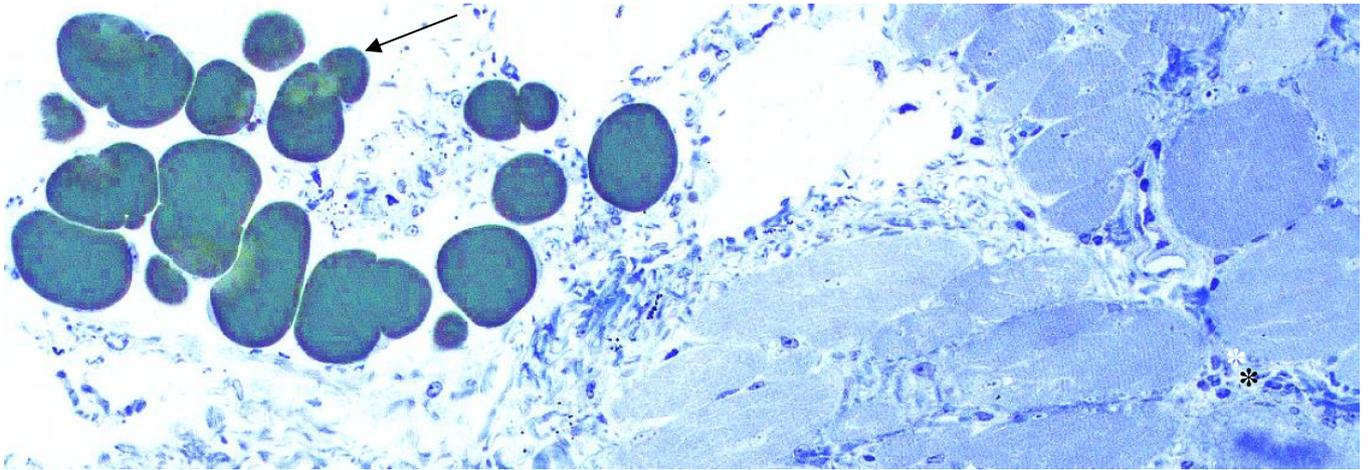


Рисунок 25 – Полиморфизм МВ, воспалительная инфильтрация (*) скелетной мышечной ткани, липоидоз (стрелка) в икроножной мышце мыши линии Vla/J, 12 мес. постнатального онтогенеза. Полутоновый срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. ×200

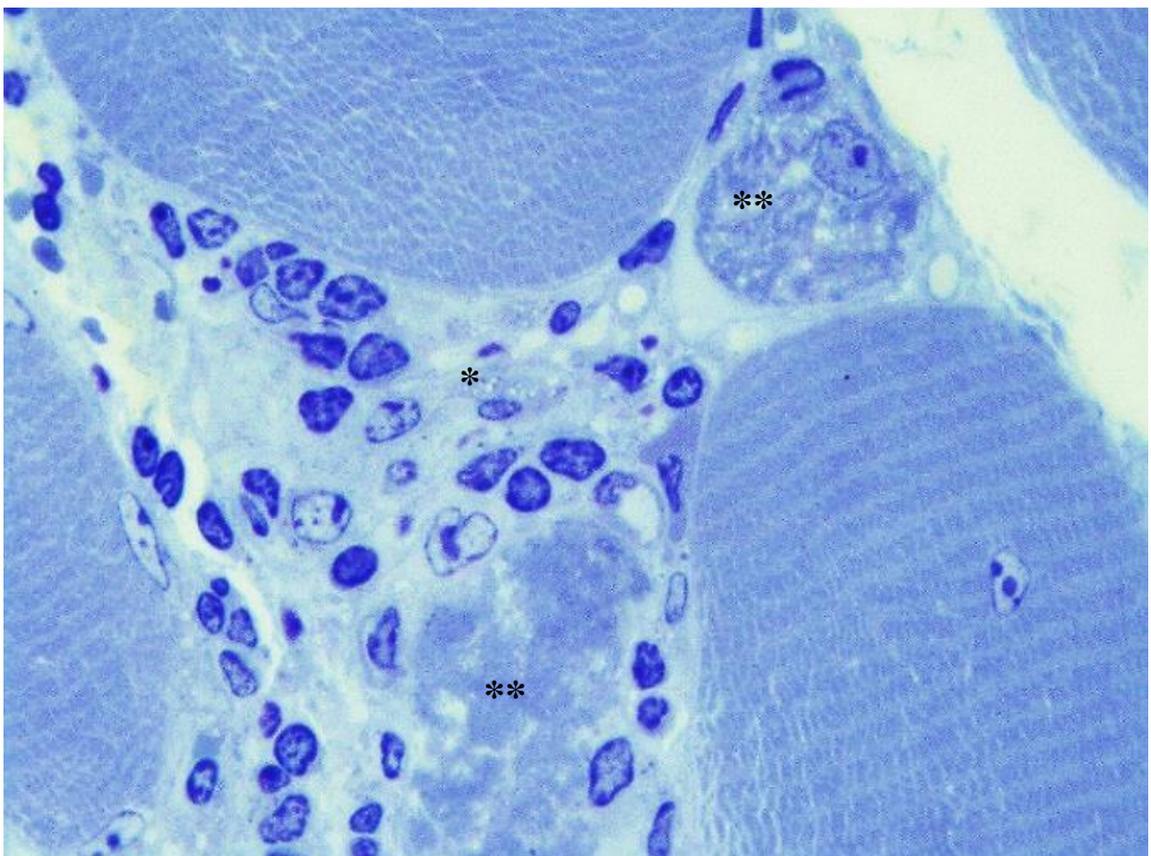


Рисунок 26 – Очаги лейкоцитарной инфильтрации (*) и некротизированные МВ (**). Икроножная мышца мыши линии Vla/J, 12 мес. постнатального онтогенеза. Полутоновый срез. Окраска: толуидиновый синий. Ув. ×630

Полиморфизм МВ (рисунки 25, 27) можно объяснить компенсаторной гипертрофией одних волокон (рисунок 27) и атрофией других. Воспалительный процесс неодинаков в разных участках мышц: наряду с участками лейкоцитарной инфильтрации (рисунок 26) встречаются участки со слабым иммунным ответом (рисунок 27). Последнее может быть связано с нарушением фагоцита при отсутствии дисферлина, т.к. его экспрессия при дисферлинопатиях снижается и в макрофагах. Доля погибших МВ в изучаемом возрасте животных была максимальной (что подтверждено морфометрически). На рисунке 27 представлен участок икроножной мышцы с большим количеством денегерирующих МВ, в которых видны дефекты сарколеммы, а рядом с ней, вероятно, апоптозные тельца. Гибель некоторых МВ путем апоптоза могла бы объяснить отсутствие лейкоцитов в описанном участке мышцы. Процесс апоптоза у животных сенильного возраста может быть физиологическим, однако в условиях постоянной гибели МВ такой способ гибели лишь усугубляет течение миодистрофии.

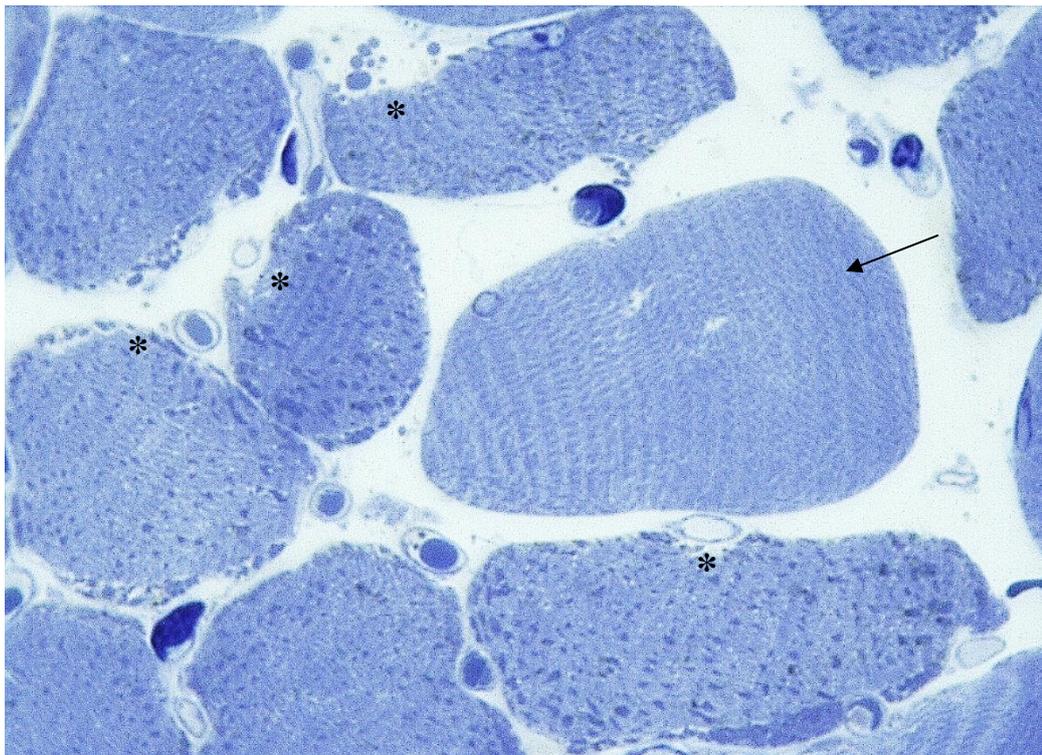


Рисунок 27 – Массовая гибель МВ (*) при слабом иммунном ответе. Компенсаторная гипертрофия МВ (стрелка). Полутонкий срез икроножной мышцы мыши линии Vla/J, 12 мес. постнатального онтогенеза. Окраска: толуидиновый синий. Ув. $\times 630$

В скелетных мышцах мышей 1 года жизни помимо дегенеративных изменений были обнаружены ЦЯМВ и мышечные трубочки (рисунок 28), что свидетельствует о сохранении способности как к внутриклеточной, так и клеточной регенерации. То же подтверждают и электронограммы мышц изучаемой возрастной группы.

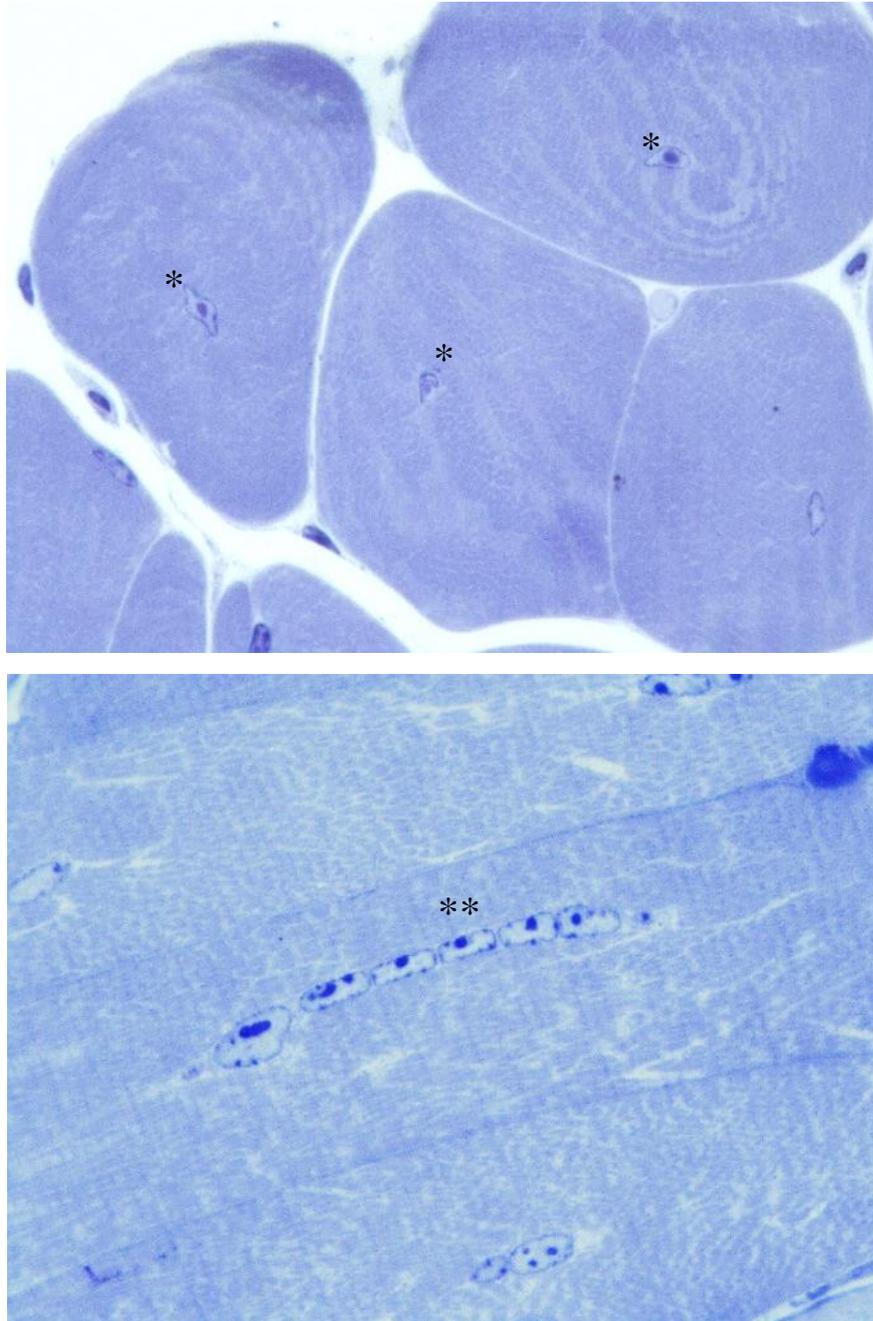


Рисунок 28 – Внутриклеточная регенерация в гипертрофированных МВ (*), появление мышечных трубочек (**). Полутонкие срезы икроножной мышцы мыши линии Vla/J, 12 мес. Окраска: толуидиновый синий. Ув.: $\times 630$

При изучении ультраструктуры мышцы линии В1а/Ј в возрасте 12 мес. были обнаружены многочисленные некротизированные МВ со следующими признаками дегенерации: миолиз с множественной вакуолизацией саркоплазмы, отсутствие границ сарколеммы, потеря поперечной исчерченности (рисунки 29, 30), отек саркоплазмы, разрывы и фрагментация пучков миофибрилл, полиморфизм митохондрий (рисунки 31, 32). В местах разрывов сарколеммы наблюдается скопление малых везикул (рисунки 30, 33), предположительно, это сформированные «патчи». В мышцах изучаемой возрастной группы выявлены скопления коллагеновых волокон (рисунки 31, 38, 39), что на светооптическом уровне соответствует фиброзу мышечной ткани.

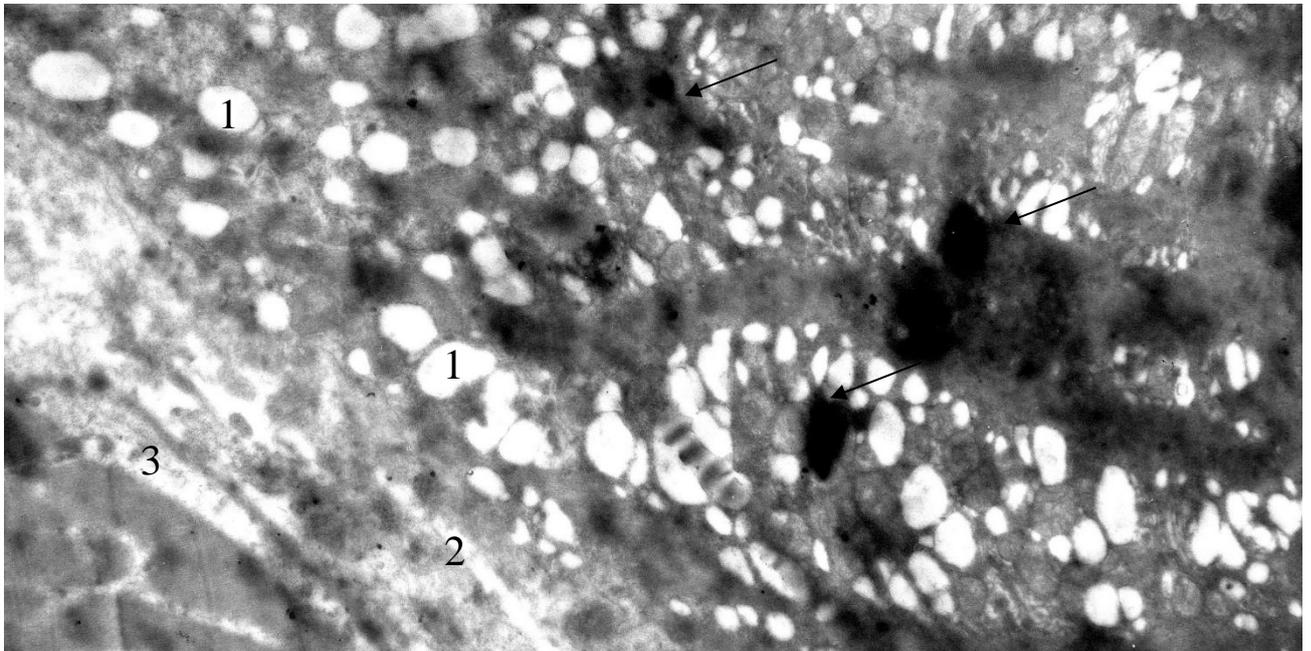


Рисунок 29 – Некротизированное МВ с зонами миолиза (стрелки), множественной вакуолизацией саркоплазмы (1) и отсутствием видимых границ сарколеммы. В соседнем МВ признаки дегенерации: субсарколеммный отек (3), снижение числа митохондрий. Икроножная мышца мышцы линии В1а/Ј, 12 мес. постнатального онтогенеза. Электронограмма. Ув. $\times 8900$

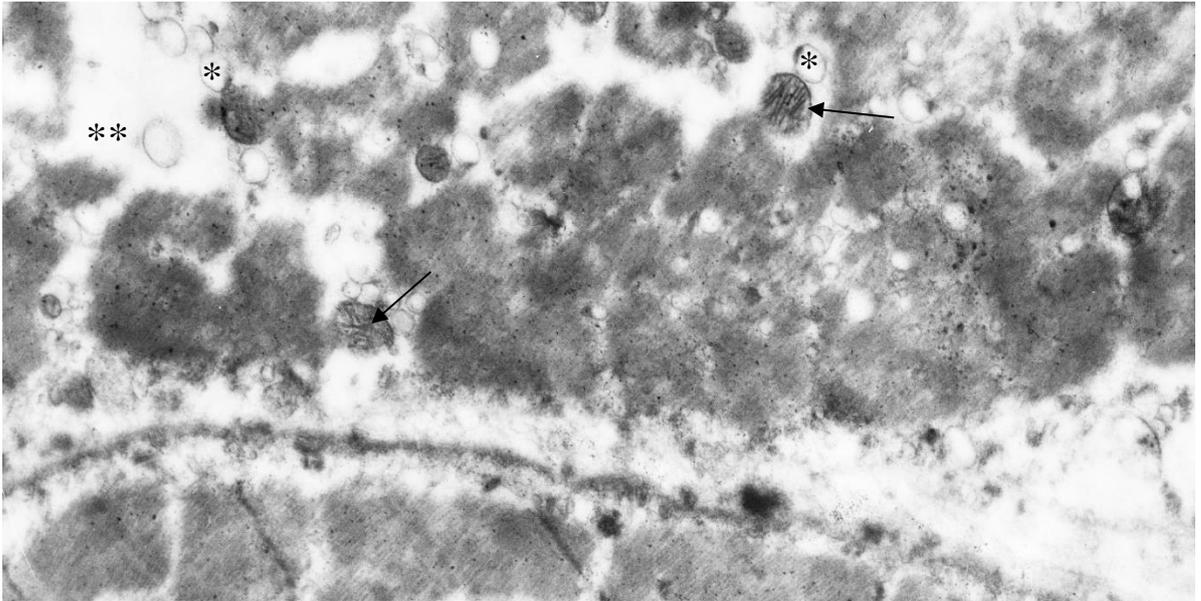


Рисунок 30 – Дегенерирующее МВ с множественной вакуолизацией (*) и отеком цитоплазмы (**), отсутствием границ и потерей поперечнополосатой исчерченности. Немногочисленные митохондрии с электронноплотным матриксом (стрелки). Икроножная мышца мыши линии В1а/Ј, 12 мес. Электронограмма. Ув. $\times 12000$

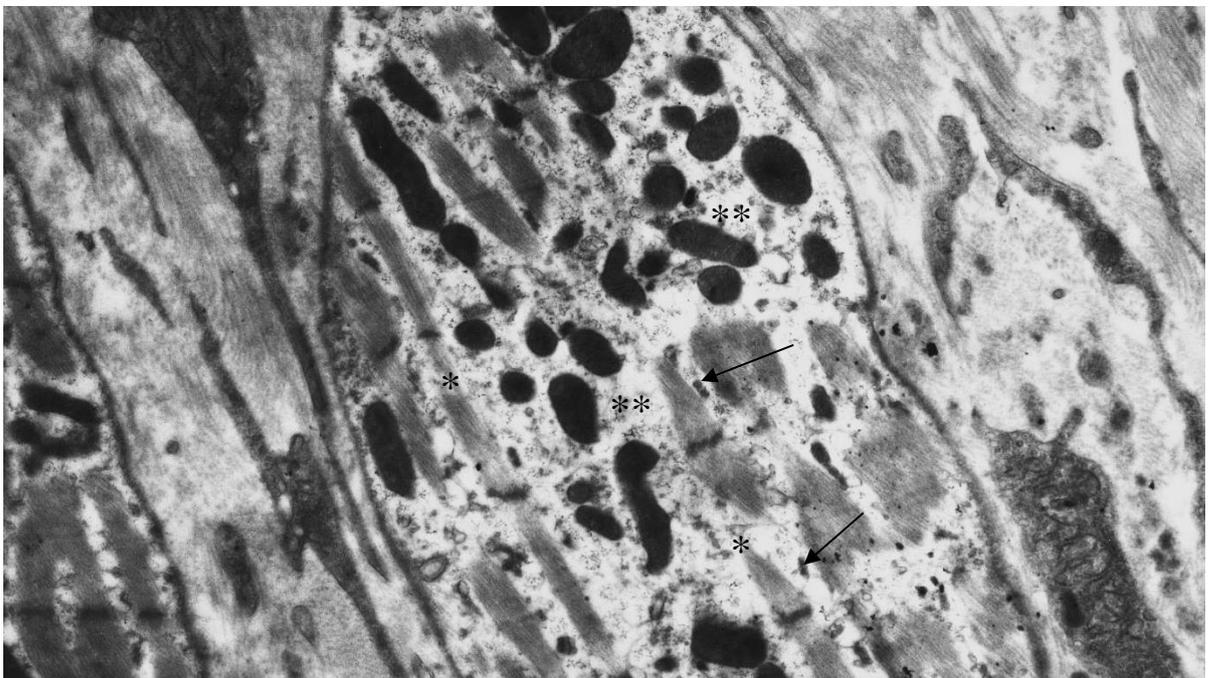


Рисунок 31 – Гибнущее МВ с разрывами и фрагментацией пучков миофибрилл (*), отеком саркоплазмы, полиморфизмом митохондрий (**), уплотнением триад (стрелки). Медиальная широкая мышца бедра мыши линии В1а/Ј, 12 мес. постанатального онтогенеза. Электронограмма. Ув. $\times 12000$

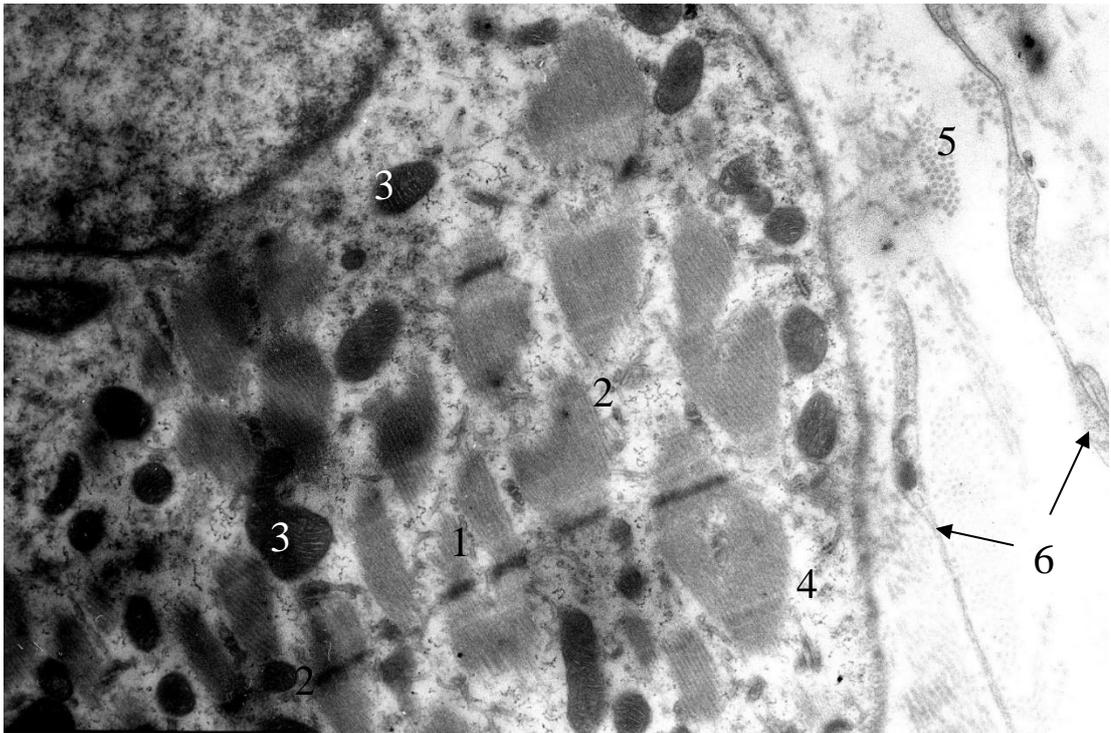


Рисунок 32 – Поврежденное МВ: истончение миофибрилл (1), разнонаправленные короткие фрагменты Т-трубочек (2), уплотнение крист митохондрий (3), отек саркоплазмы (4). Коллагеновые волокна (5), отростки фибробластов (6). Медиальная широкая мышца бедра мыши линии В1а/Ј, 12 мес. постанатального онтогенеза. Электронограмма, ув. $\times 14000$

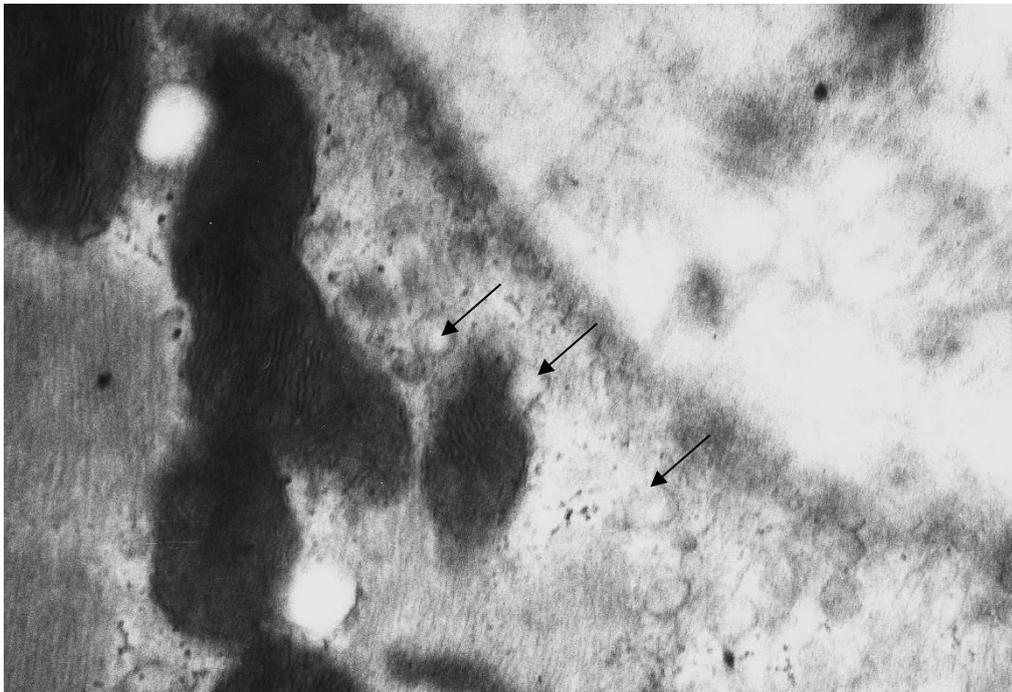


Рисунок 33 – Скопление везикул под сарколеммой (стрелки). Медиальная широкая мышца бедра мыши линии В1а/Ј, 12 мес. Электронограмма. Ув. $\times 34000$

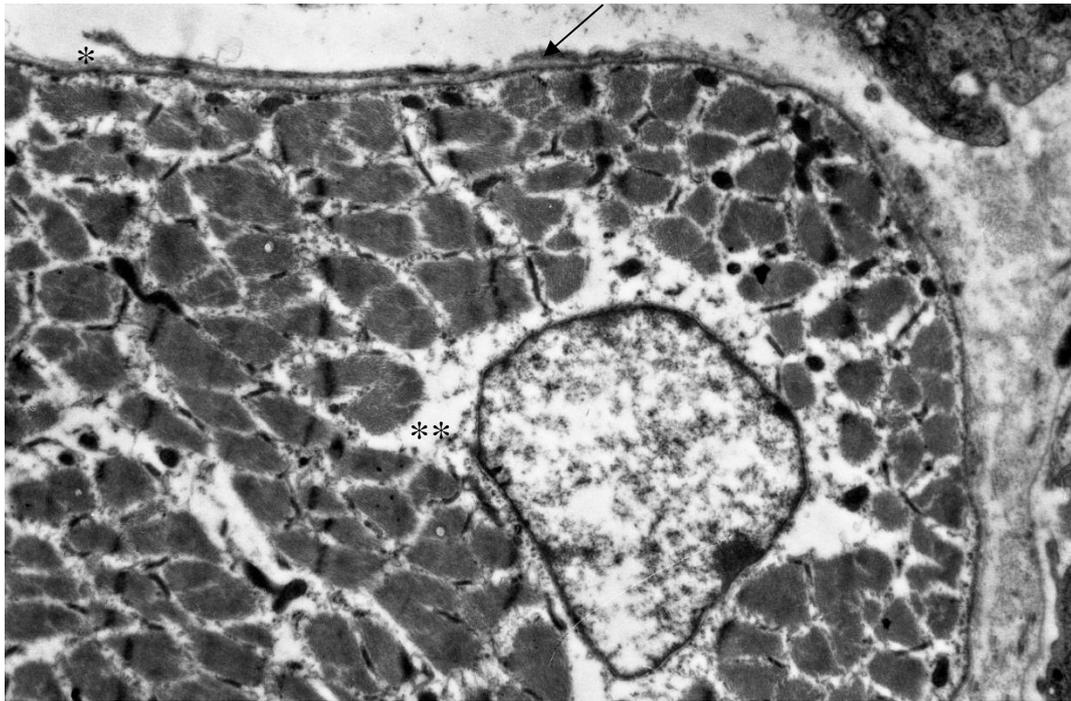


Рисунок 34 – Дегенерирующее MB с дефектами базальной мембраны: расслоением (*) и потерей гомогенности (стрелка). Отек саркоплазмы (**). Икроножная мышца мыши линии Vla/J, 12 мес. Электронограмма. Ув. $\times 9000$

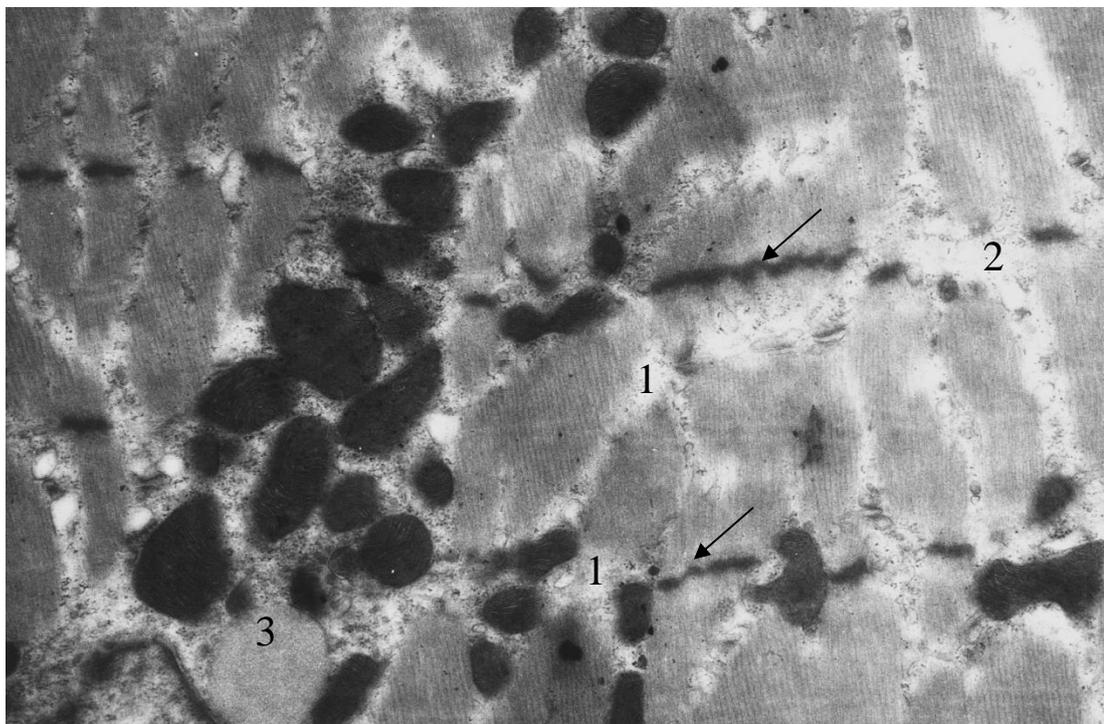


Рисунок 35 – Дегенерирующее MB с расширенными цистернами СПР (1), отеком саркоплазмы (2), липидным включением в околоядерной зоне (3) и дезорганизацией Z-линий (стрелки). Медиальная широкая мышца бедра мыши линии Vla/J, 12 мес. Электронограмма. Ув. $\times 14000$

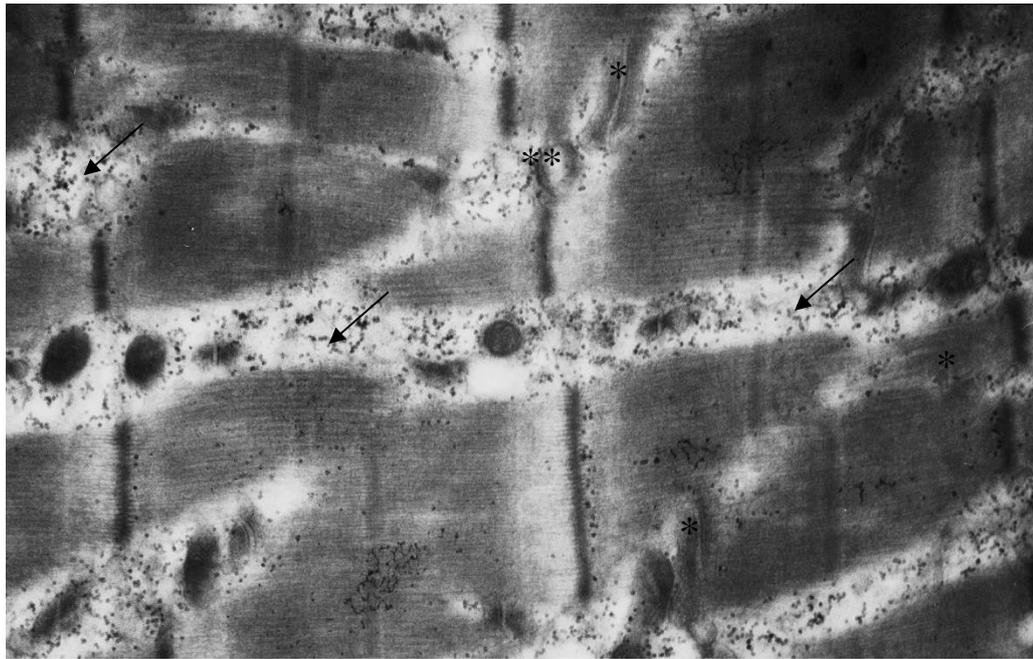


Рисунок 36 – Гликоген в расширенных цистернах саркоплазматического ретикулула (стрелки). Дезорганизация Т-трубочек (*), отек митохондрий (**). Электронограмма икроножной мышцы мыши линии Vla/J 12 мес. жизни. Ув. $\times 23000$

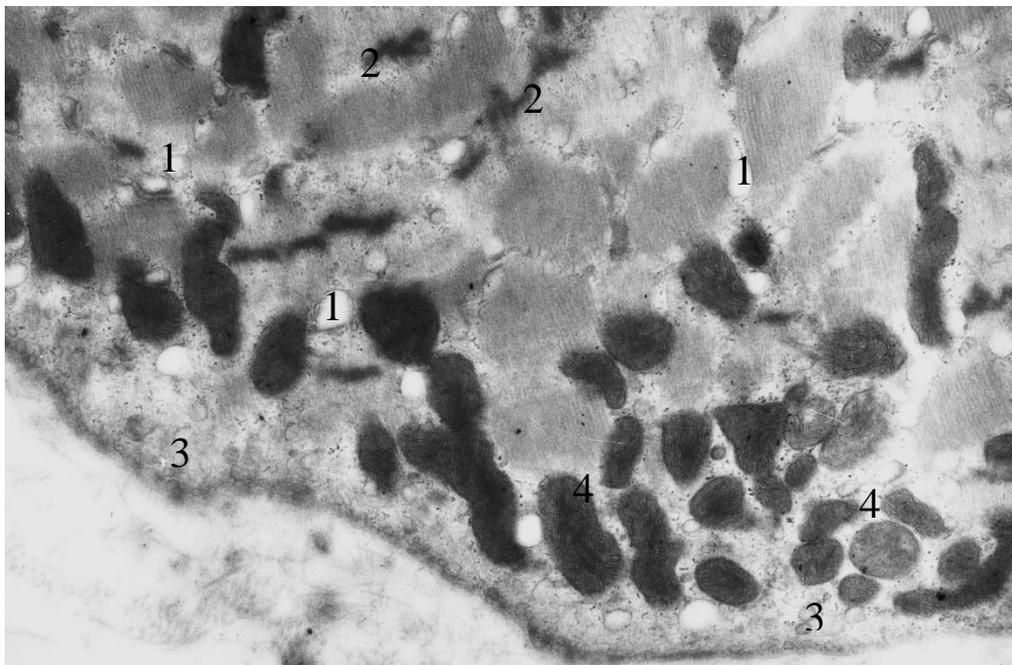


Рисунок 37 – Дегенерирующее МВ: вакуолизация цистерн саркоплазматического ретикулула (1), дезорганизация Z-линий (2), субсарколеммное скопление везикул (3), полиморфизм митохондрий с электроноплотными кристами (4). Медиальная широкая мышца бедра мыши линии Vla/J, 12 мес. Электронограмма. Ув. $\times 14000$

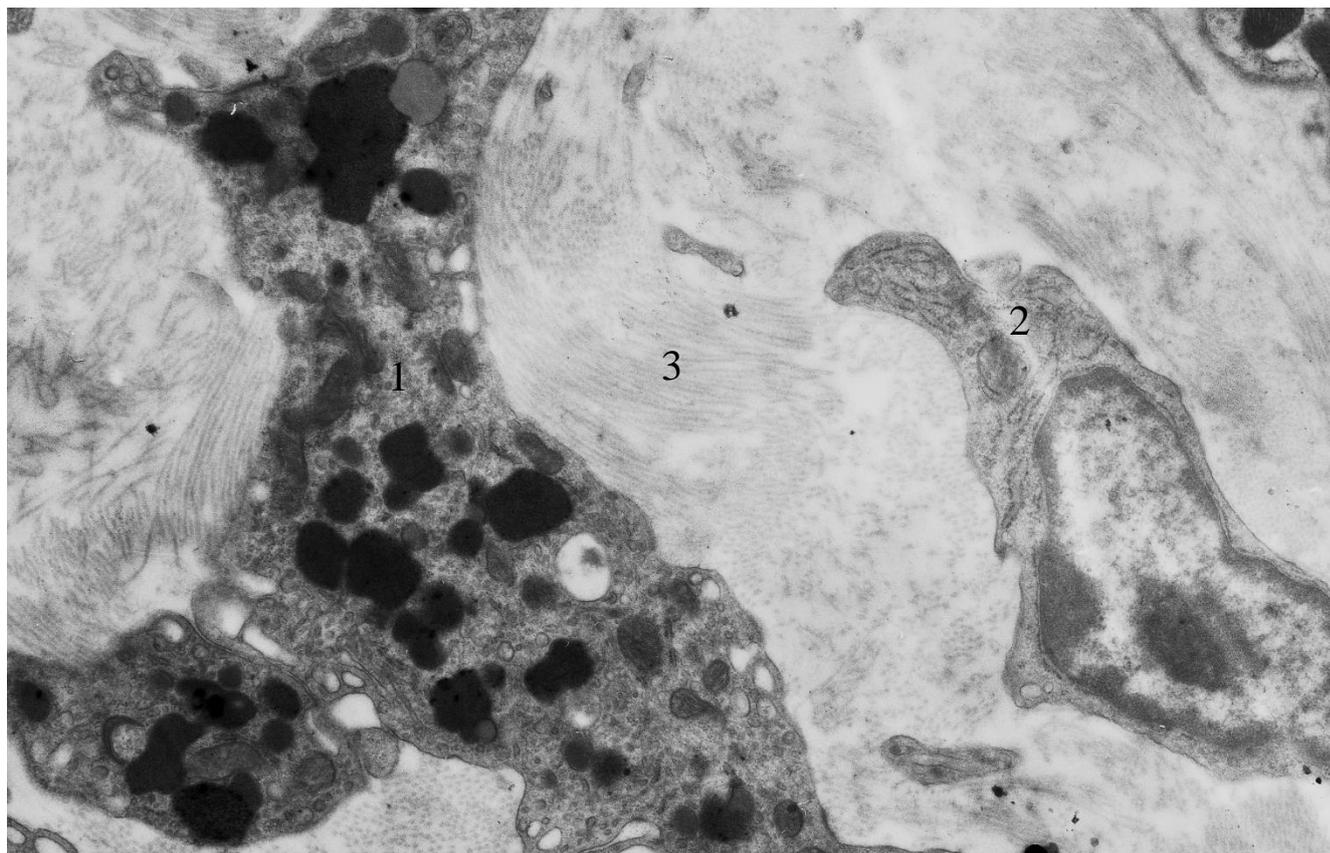


Рисунок 38 – Клетки (1 – макрофаг, 2 – фибробласт) в участке фиброза, 3 – коллагеновые волокна. Медиальная широкая мышца бедра мыши линии В1а/Ј, 12 мес. Электронограмма. Ув. $\times 12000$

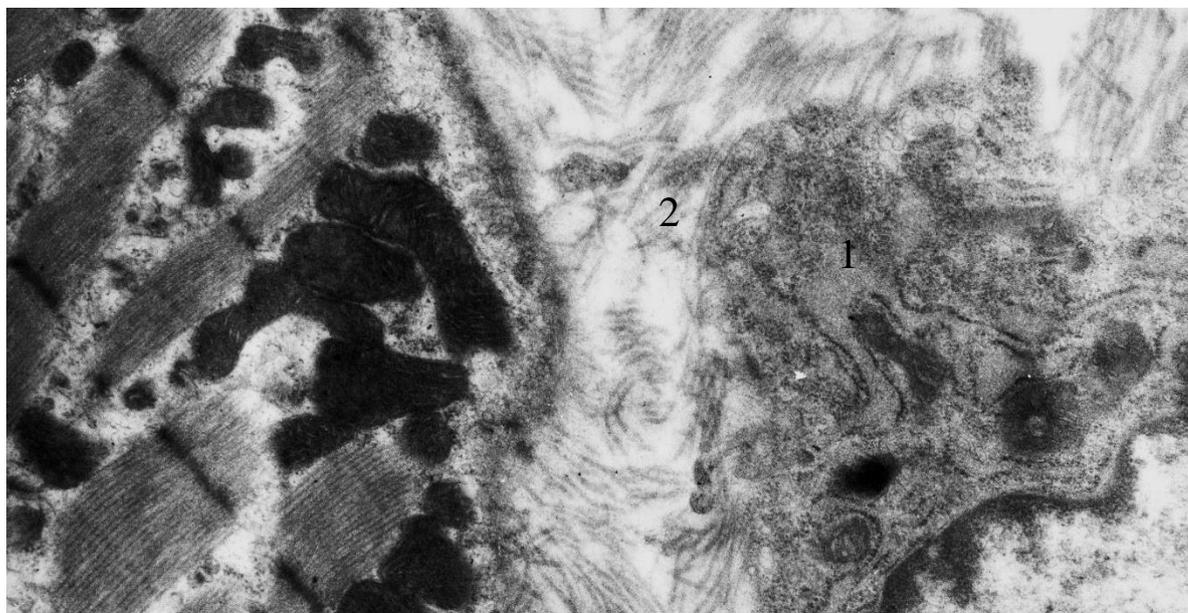


Рисунок 39 – Миосателлитоцит (1) среди коллагеновых волокон (2). Слева МВ с признаками дегенерации. Медиальная широкая мышца бедра мыши линии В1а/Ј, 12 мес. Электронограмма, ув. $\times 14000$

В дегенерирующих МВ были выявлены дефекты базальной мембраны (набухание, расслоение, нарушение гомогенности), отек саркоплазмы (рисунок 34), дезорганизация Z-линий, расширение цистерн СПР и пространства между миофибриллами (рисунки 34, 35, 37, дезорганизация Т-трубочек, отек митохондрий (рисунок 36), а также появление липидных включений в перинуклеарной зоне (рисунок 35). Последнее может быть обусловлено митохондриальной дисфункцией в условиях нарастающей гипоксии МВ при фиброзе.

Примечательно, что, несмотря на длительную дегенерацию МВ с фиброзом и липоидозом мышечной ткани, нарастающей гипоксии и повреждении митохондрий, в сенильном возрасте мышечной линии Vla/J пул миосателлитов все еще сохранен и даже среди скоплений фагоцитирующих клеток и коллагеновых волокон на электронограммах обнаруживаются единичные клетки-предшественницы миогенеза (рисунки 38, 39). Таким образом, клеточный тип регенерации МВ все еще возможен.

Таким образом, в ходе изучения патоморфологических изменений в скелетных мышцах дисферлиндефицитных мышечных линий на полутонких и ультратонких срезах были сделаны следующие выводы:

1. Изменения в ультраструктуре изученных скелетных мышц мышечных линий с дисферлинопатией были обнаружены в трех компонентах мышечных волокон: сарколемме (разрывы, инвагинации, субсарколеммные скопления везикул), митохондриях (полиморфизм, вакуолизация, слияние митохондрий) и сократительном аппарате (расширение цистерн саркоплазматического ретикулума, дезорганизация миофибрилл и Т-трубочек).
2. В процессе постнатального онтогенеза степень повреждения скелетных мышц возрастает. Повреждение мышечных волокон наблюдается с *первого* дня жизни.
3. Регенерация с течением времени усиливается, и к 1 году потеря мышечных волокон все еще компенсирована (гипертрофия мышечных волокон с центральной локализацией ядер), фиброз при этом минимальный и

обнаруживается преимущественно на ультраструктурном уровне, чем на светооптическом.

4. В процессе постнатального онтогенеза в скелетных мышцах мышей линии Vla/J увеличивается воспалительная инфильтрация.

Далее приведена гистологическая характеристика ППСМТ на разных сроках постнатального онтогенеза, разделенных на 4 группы (согласно классификации В.Г. Макарова [32], описанной в главе «Материалы и методы») у мышей с мутацией в гене *DYSF* и мышей дикого типа. Первыми представлены результаты показателей, относящихся мышечному дифферону (некроз МВ, пролиферация и дифференцировка клеток миогенной линии), затем сосудистому и соединительнотканному компонентам скелетных мышц.

3.3 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период молочного кормления мышей линий Vla/J и C57Bl/6

Исследование было проведено на мышах линий C57Bl/6 и Vla/J в возрастах 1, 10 и 20 сут. жизни. В обеих линиях данной возрастной группы на светооптическом уровне отсутствовали некротизированные МВ (в отличие от электронномикроскопического 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, $p < 0,01$, рисунок 40). К 20 сут. показатель был примерно одинаковым у мышей обеих линий (185,15 (139,81; 245,23) мкм² у Vla/J и 205,52 (155,8; 256,8) мкм² у C57Bl/6, $p = 0,061$).

Доля миогенин-позитивных ядер достоверно выше у C57Bl/6 во всех изучаемых точках описываемой группы. Вероятно, у данной линии миогенная дифференцировка продолжается и после рождения, в то время как у мышей линии Vla/J она уже завершена.

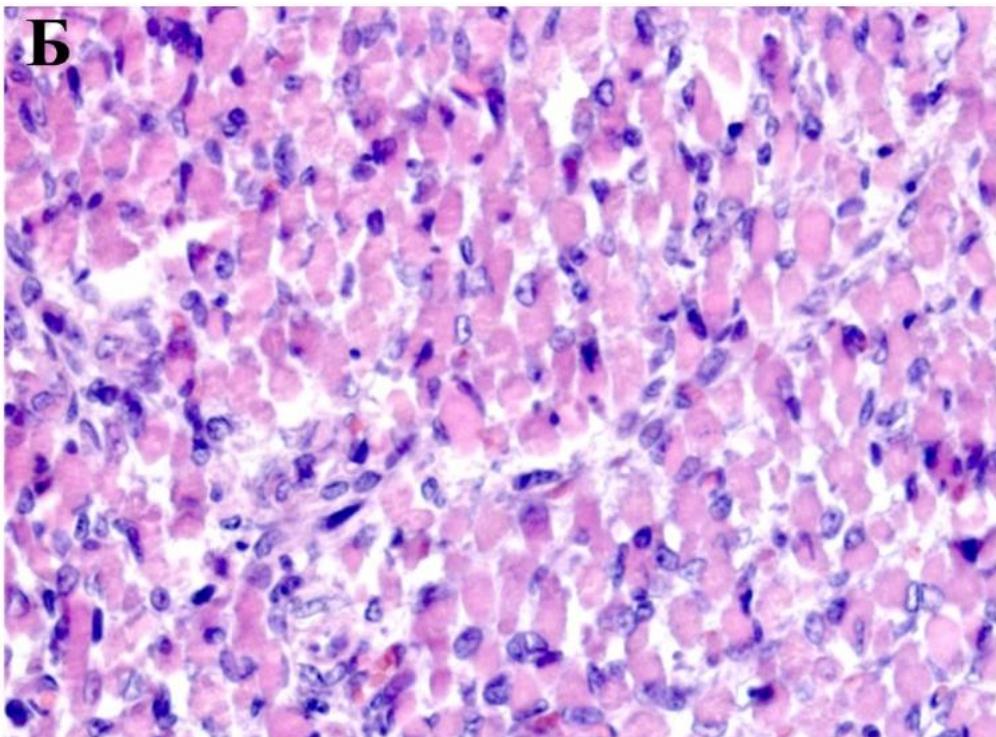
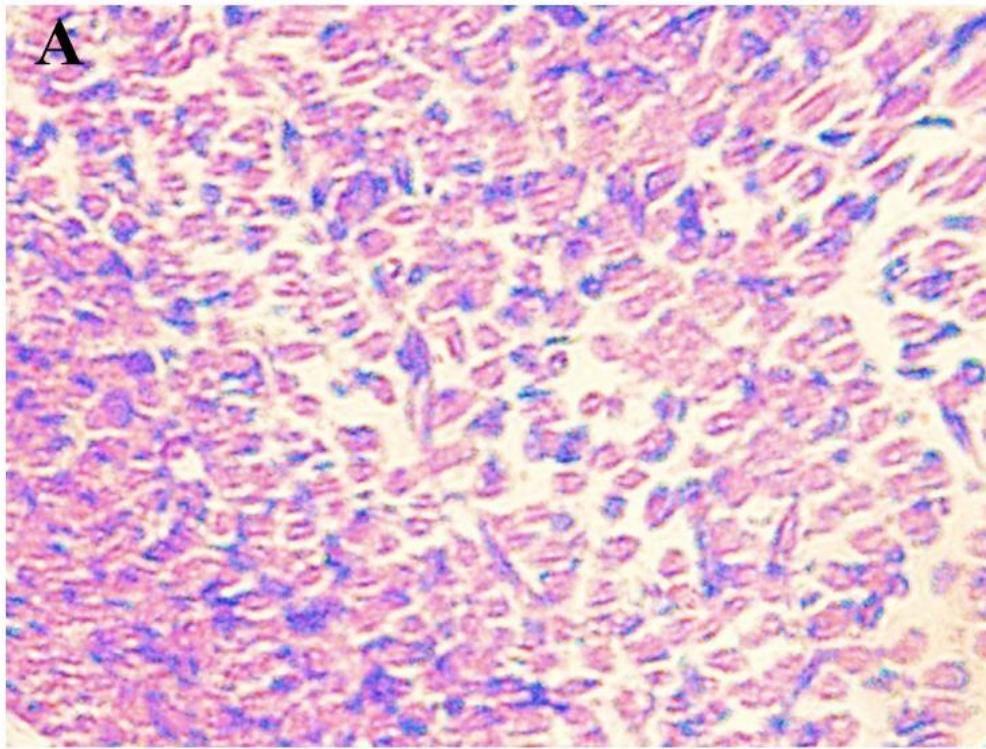


Рисунок 40 – Поперечные срезы мышц голени мышей линий C57Bl/6 (А) и Bla/J (Б), 1 сут. жизни. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: ×400

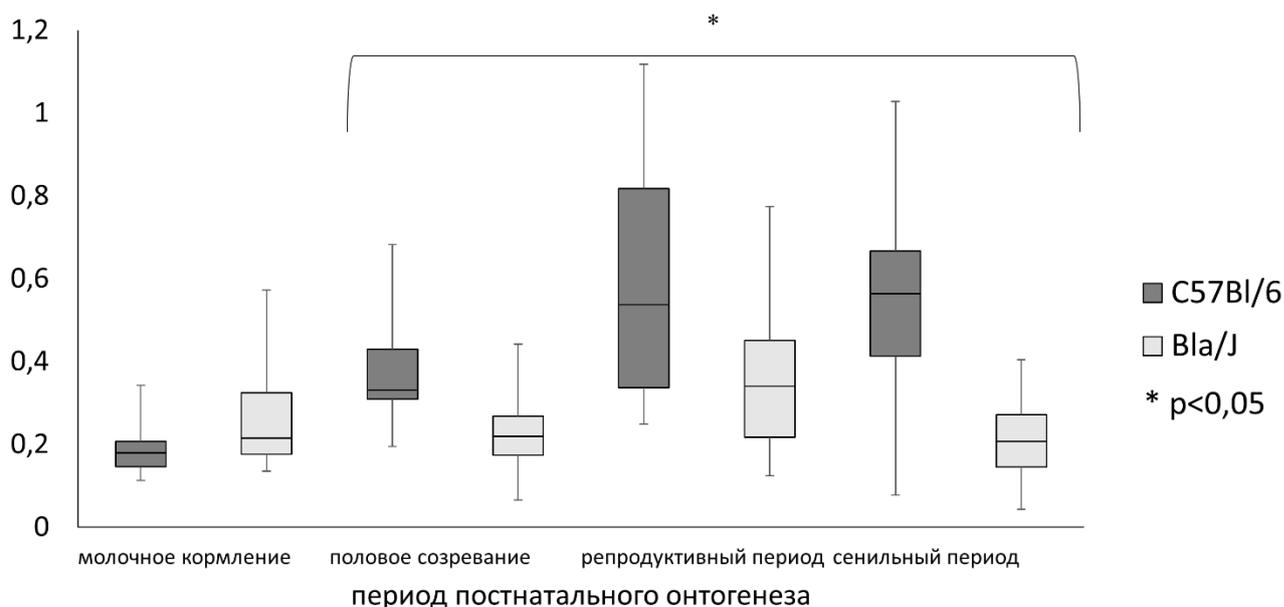


Рисунок 41 – «Сосудистая плотность» в икроножной мышце в ходе постнатального развития мышцей линий C57Bl/6 и Bla/J

Показатель сосудистой плотности на 1 сут. жизни оказался выше у C57Bl/6. К 20 сут. у особей дикого типа значение сосудистой плотности снижался, а у линии с дефицитом дисферлина, наоборот, возрастал и достоверно отличался (40,0 (27,13; 44,9)% у линии мышцей Bla/J и 16,44 (14,81; 18,14)% у линии мышцей C57Bl/6, $p=0,0029$, рисунок 41).

Таким образом, в икроножных мышцах мышцей с генетически обусловленным дефицитом дисферлина в течение первого месяца жизни на светооптическом уровне патоморфологические изменения обнаружены не были (в отличие от ультраструктурных изменений). Общая тенденция в динамике изучаемых показателей в обеих линиях была во многом схожа.

3.4 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период полового созревания мышцей линий Bla/J и C57Bl/6

В этом периоде были изучены мышцей мышцей 1 и 2 мес. жизни. На первом мес. в икроножных мышцах обеих линий животных были выявлены единичные некротизированные МВ – 1,06 (0; 2,3)% у C57Bl/6 и 0 (0; 1,03)% у Bla/J, $p=0,55$, но

уже в 2 мес. показатель значительно повысился у мышей дисферлиндефицитной линии и составил 7,31 (6,82; 11,9)%, у дикого типа он был равен 0 (0; 1,3)%, $p=0,067$ (рисунок 42). Обращает на себя внимание то, что 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 составляет 0 (0; 0,49)%, у *Vla/J* – 0 (0; 0,77)%, $p=0,86$. Невыраженная пролиферативная активность у последних может быть связана с отсутствием выраженной альтерации скелетной мышечной ткани.

У мышей линии *Vla/J* доля ЦЯМВ повышалась с 0 (0; 0,8) % в 1 мес. до 2,22 (0; 2,38) % в 2 мес. ($p=0,1$) в то время как у мышей дикого типа показатель составил 0,7 (0,57; 0,96), $p=0,07$ (рисунок 43). 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) $\mu\text{м}^2$ в 1 мес. до 768,63 (425,9; 1158,72) $\mu\text{м}^2$ в 2 мес., $p<0,01$.

Аналогичная динамика прослеживалась у мышей с мутацией в гене *DYSF* и в соотношении быстрых и медленных МВ, которое возрастало 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)%, т.е. совсем не было синтеза медленных МВ (рисунки 44, 45). Ввиду наличия некротизированных МВ в 2 мес. у мыши линии *Vla/J* появление медленных МВ может быть результатом реактивности скелетных мышц в ответ на повреждение. Известно, что на 5 сут. после повреждения МВ появляется синтез медленных волокон [79].

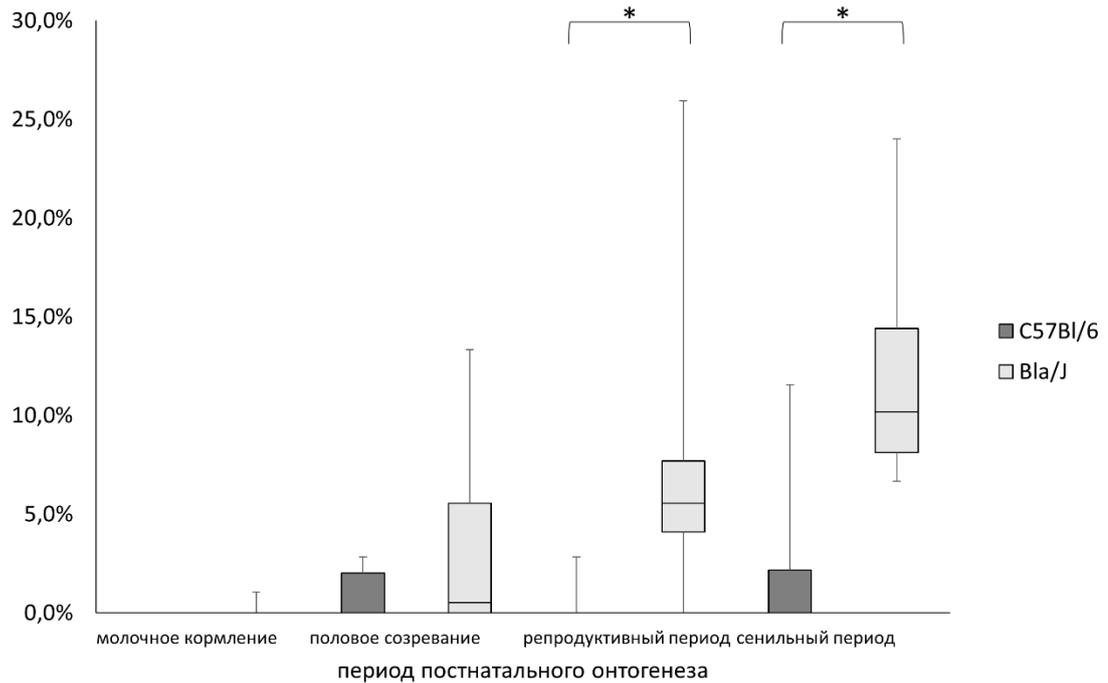


Рисунок 42 – Количество некротизированных мышечных волокон в икроножной мышце в динамике постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

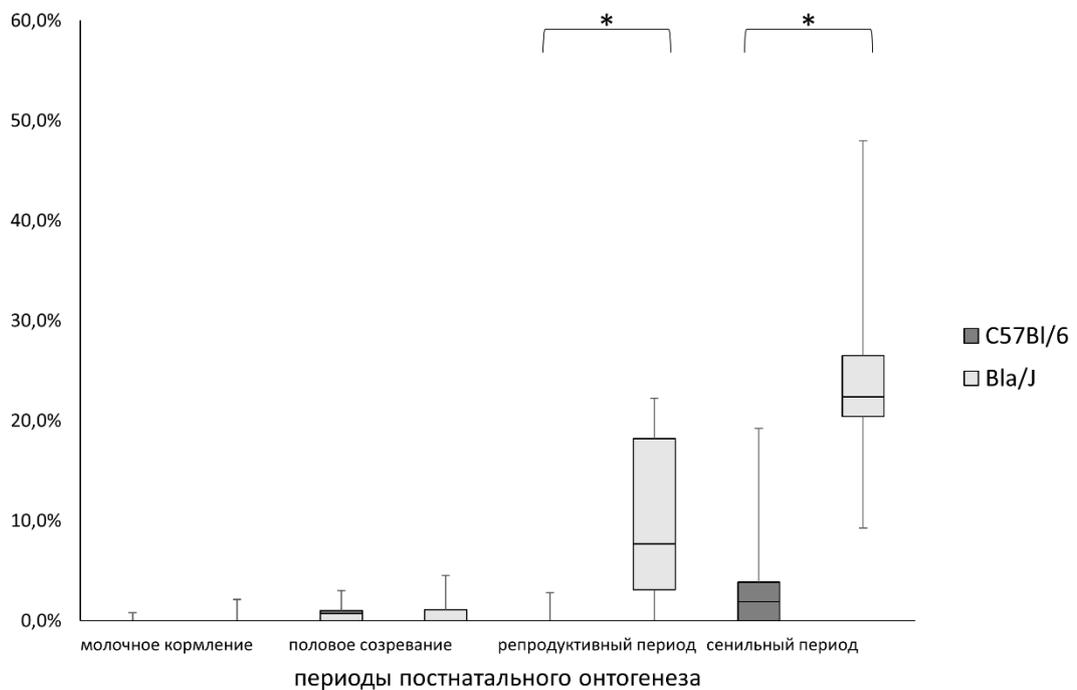


Рисунок 43 – Доля центральноядерных мышечных волокон в икроножной мышце в постнатальном онтогенезе у мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

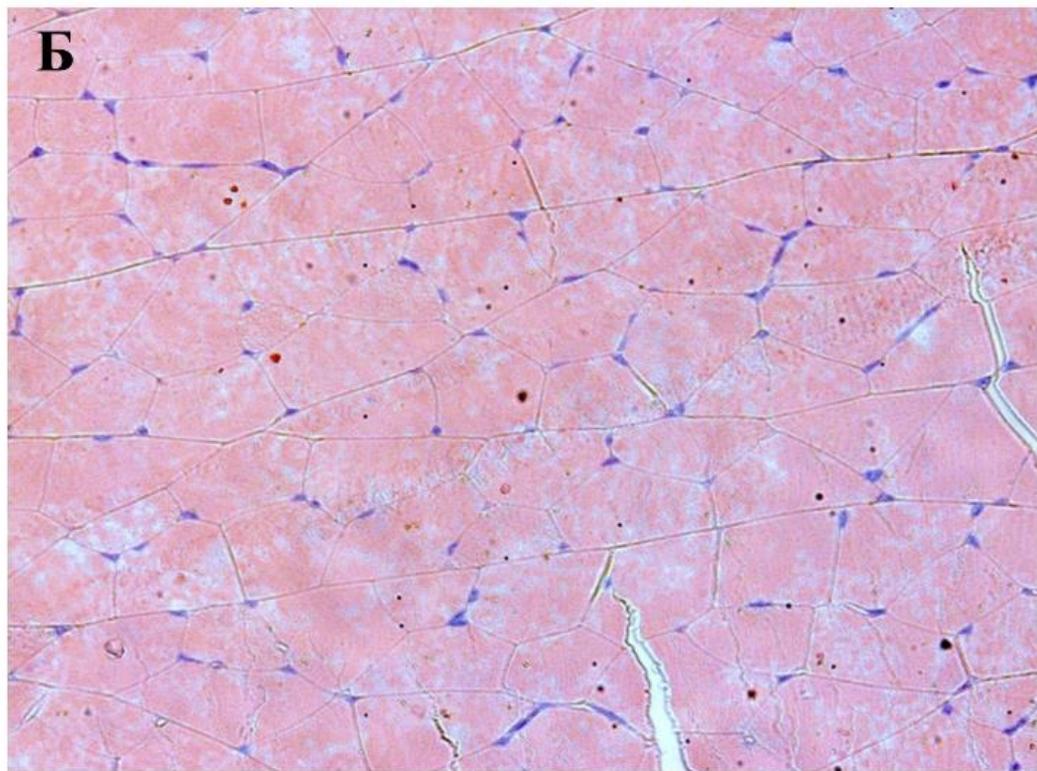
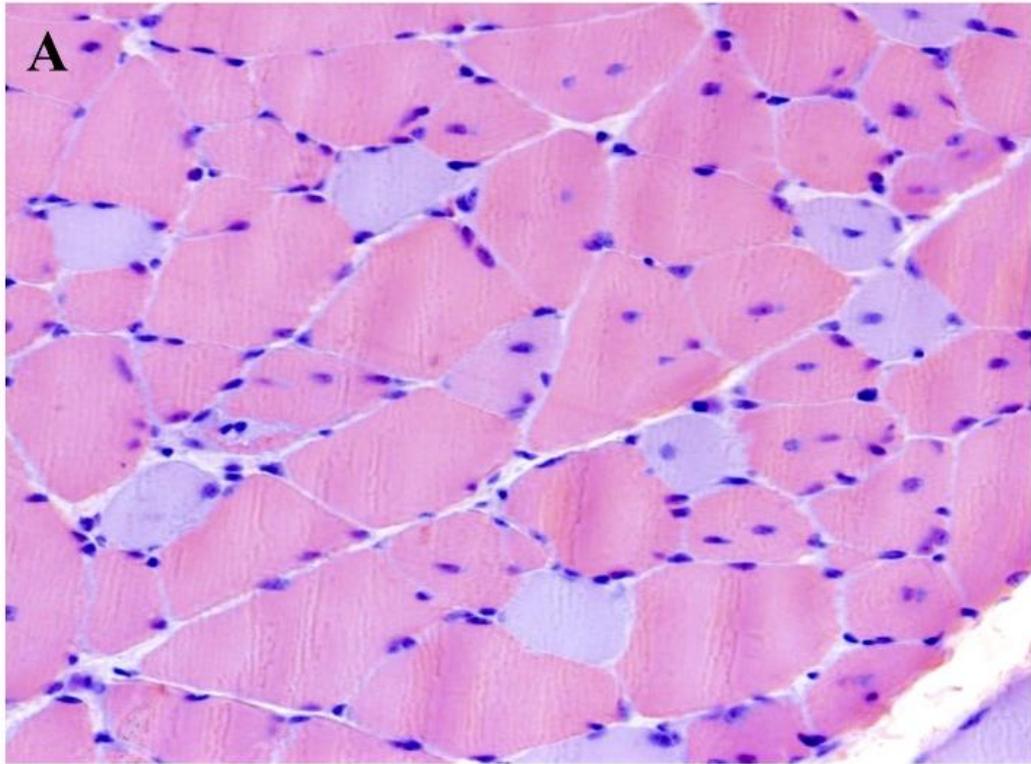


Рисунок 44 – Поперечные срезы икроножной мышцы: А – мышцы линии Bla/J, Б – C57Bl/6, 3 мес. Иммуногистохимическая реакция с Ат к МНС fast. Докраска: гематоксилин. Ув.: $\times 400$

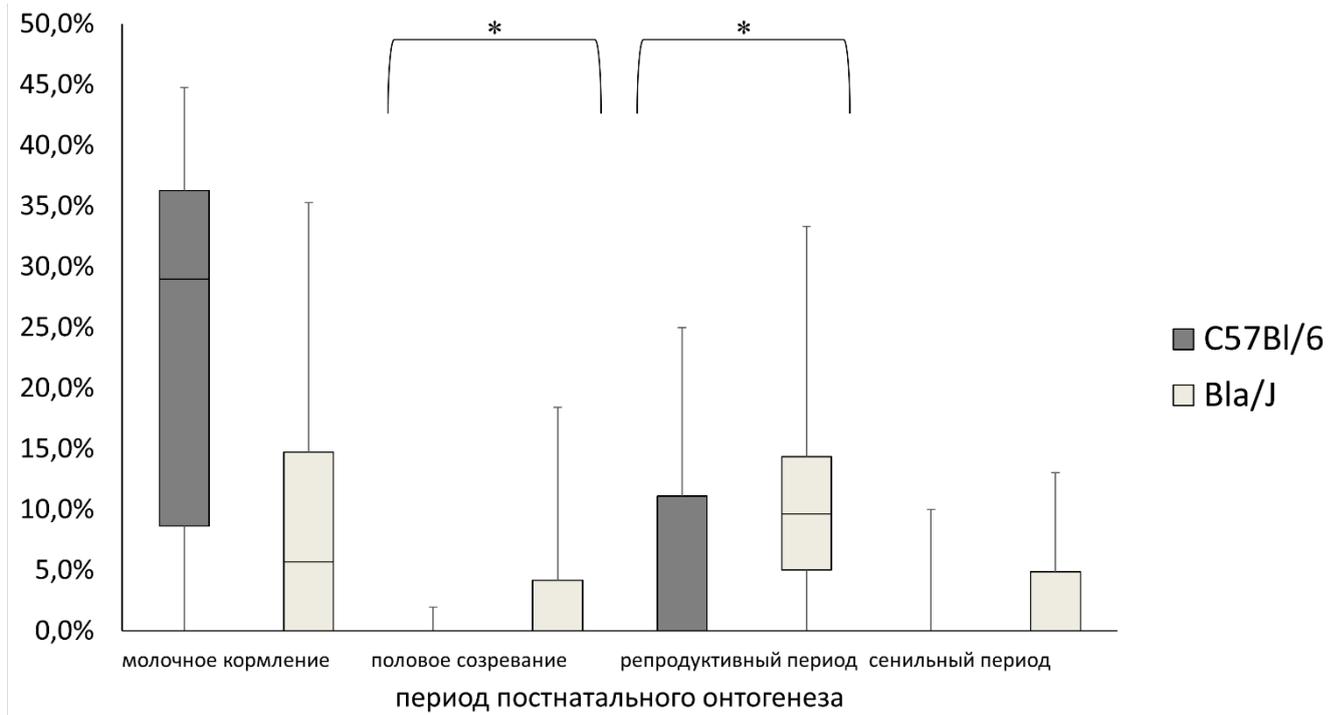


Рисунок 45 – Соотношение мышечных волокон, экспрессирующих быстрые и медленные цепи миозинов в икроножной мышце в ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

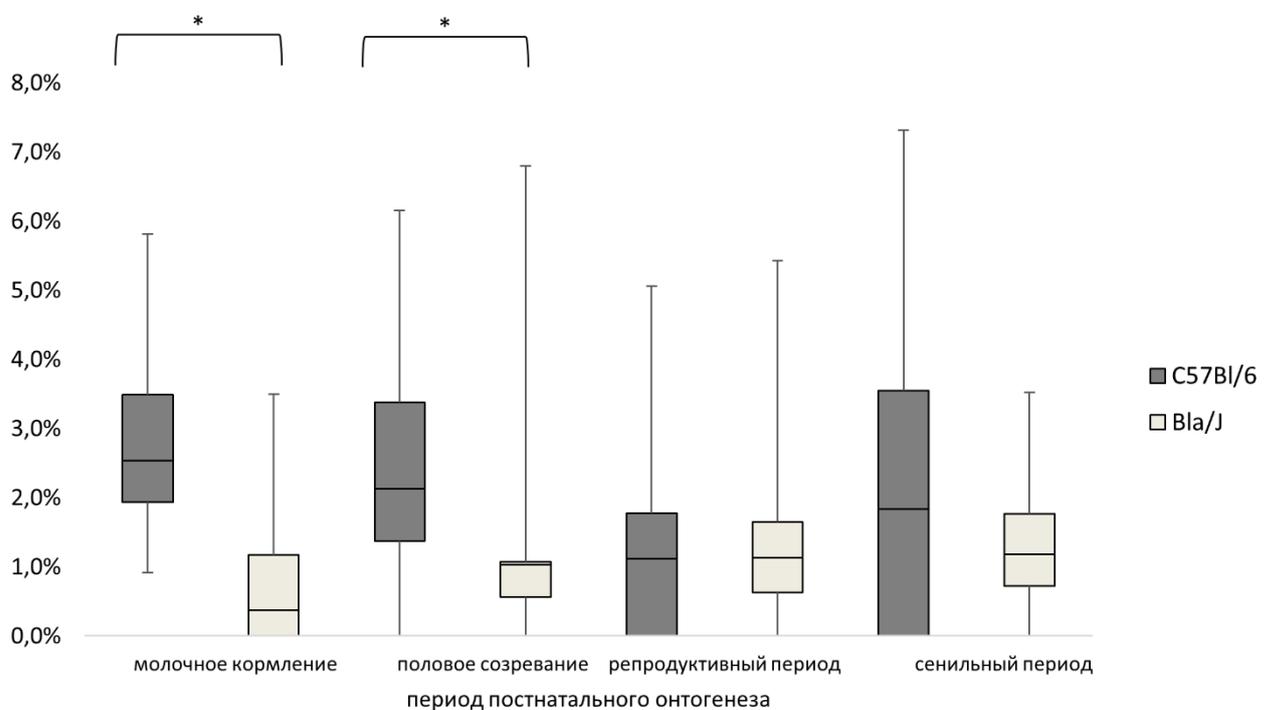


Рисунок 46 – Доля миогенин-положительных ядер в икроножной мышце в ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

Показатель поздней миогенной дифференцировки в описываемой возрастной группе был выше у мышей линии C57Bl/6 и был равен 1,69 (1,4; 2,77)% и 2,4 (1,4; 3,5)% в 1 и 2 мес., соответственно, $p=0,59$. В линии Vla/J показатель на аналогичных сроках равнялся 1,05 (1,02; 1,07)% и 0,75(0; 1,01)%, $p=0,67$ (рисунок 46).

Похожие изменения наблюдались и в значениях сосудистой плотности: так, у мышей линии C57Bl/6 показатель равнялся 34,14 (32,19; 40,38)%, у мышей линии Vla/J – 23,4 (13,12; 31,87)% в 2 мес, $p=0,07$. 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 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.

3.5 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в репродуктивный период мышей линий Vla/J и C57Bl/6

Данный период подразделяется на 2 возрастные подгруппы: молодой возраст (от 3 до 6 мес.) и зрелый возраст (от 7 до 10 мес.). В первой подгруппе были изучены скелетные мышцы мышей в возрасте 3, 4 и 5 мес., во второй – 7 и 9 мес.

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 (рисунок 47), $p<0,05$. Показатель у мышей дикого типа был минимальным вплоть до 9 мес. (0 (0; 0,5)%).

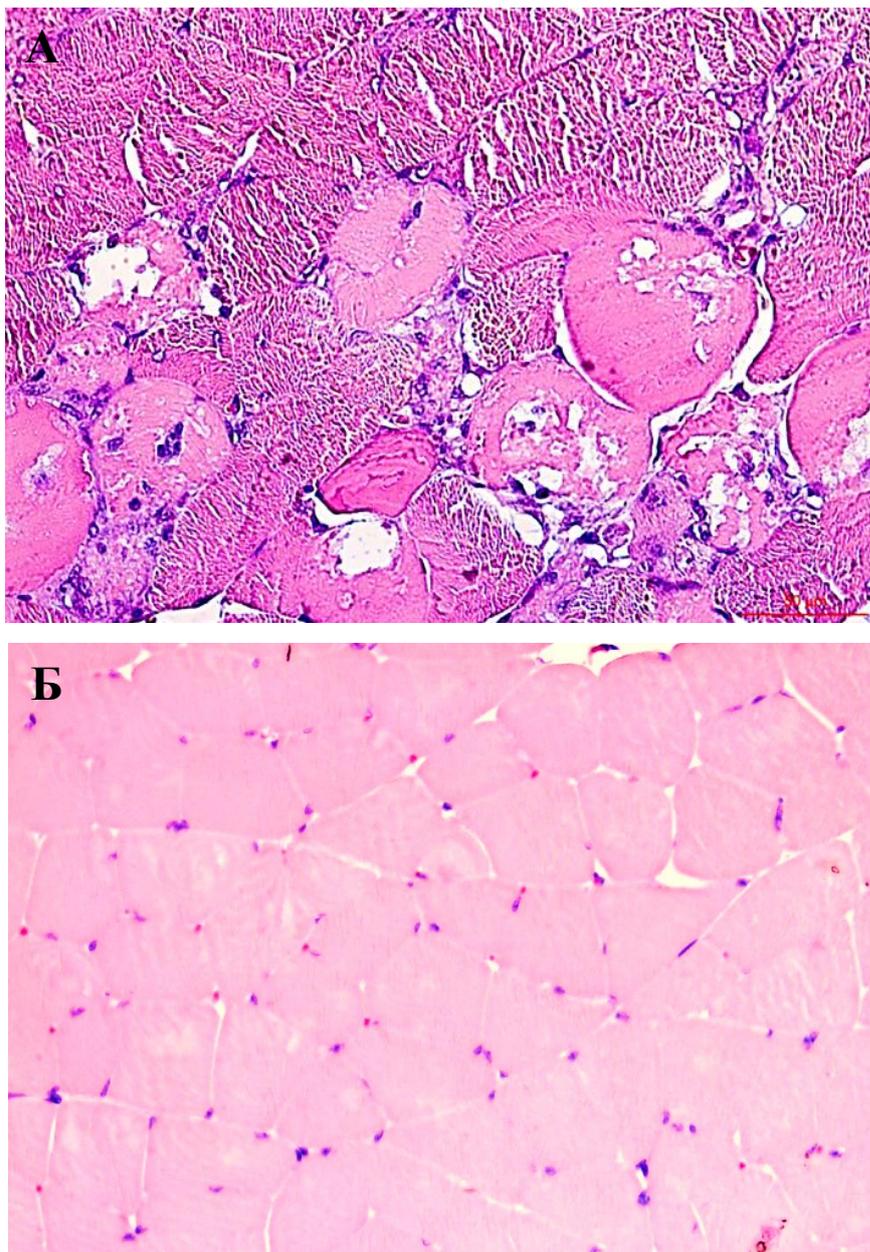


Рисунок 47 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 5 мес. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: $\times 400$

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 к 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., $p=0,017$. У дисферлиндефицитных мышей значения составили 0,98 (0;1,26)% ($p=0,049$) и 3,89 (1,7;5,5)% ($p=0,23$) в 7 и 9 мес., соответственно, $p=0,01$. В целом в репродуктивном периоде мышей линии Bla/J пролиферация ядер компонентов миогенного дифферона была достоверно ниже по

сравнению с мышами дикого типа (рисунок 48), что можно трактовать как снижение пролиферативной активности в отсутствие дисферлина на фоне постоянно активирующегося миогенеза.

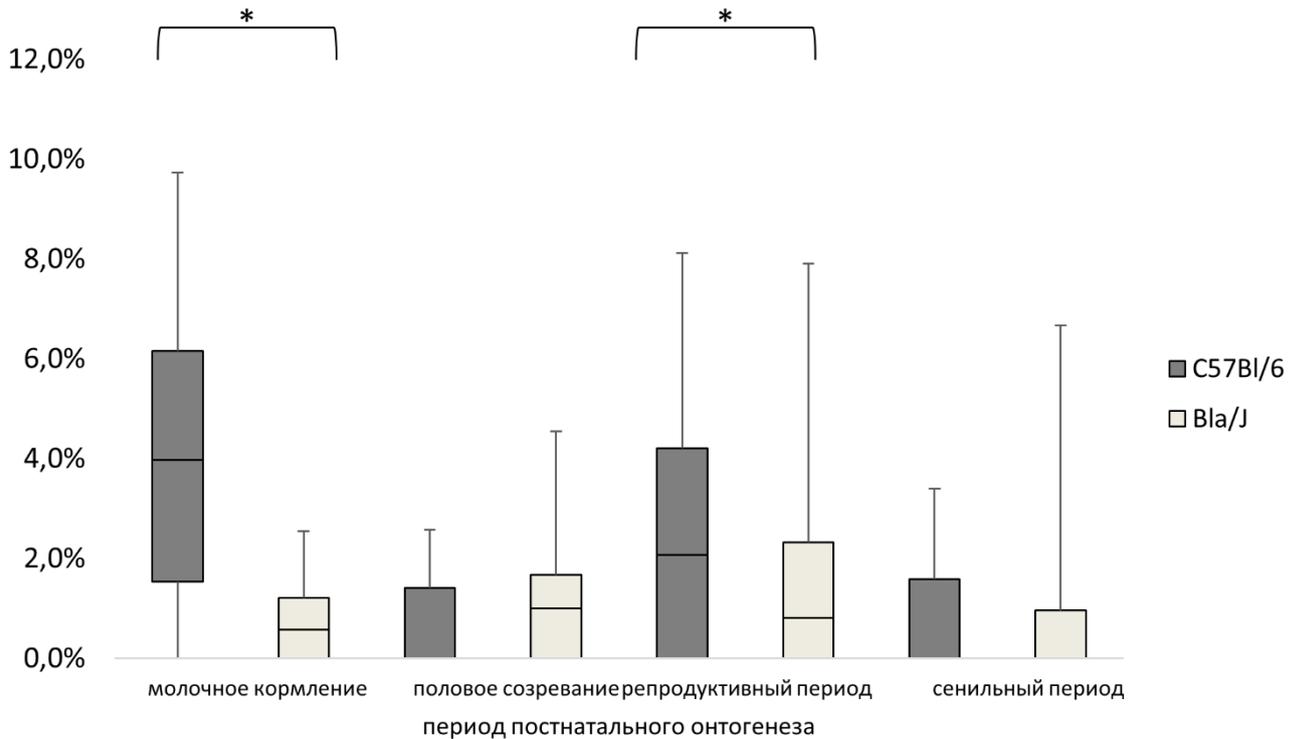


Рисунок 48 – Ki-67-позитивные ядра мышечных волокон и миогенных клеток икроножной мышцы в ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

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, т.к. интернализация ядер – результат слияния центральных ядерных миобластов в миотубы, у которых ядра еще не мигрировали на периферию волокна. 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) мкм² в линии Vla/J, а у C57Bl/6, наоборот, повысился к 9 мес. – 1163,55 (895,22; 1442,25) мкм², $p < 0,001$. Полученные данные подтверждают компенсаторную гипертрофию МВ на фоне постоянно гибнущих волокон в условиях отсутствия дисферлина.

К 7 месяцам постнатального развития в икроножной мышце животного дикого типа вновь появляется синтез медленных МВ (6,66 (4,94; 8,40)%), что до этого наблюдалось лишь до первого месяца жизни. Показатель в этом возрасте был примерно такой же, как у мышей линии Vla/J того же возраста – 6,61 (2,01; 14,12)%, $p = 0,81$. В 9 мес. показатель оказался выше у мыши линии C57Bl/6 (15,39 (13,63; 20,00)% и 12,25(8,87; 16,26)% у Vla/J, $p = 0,19$) и оставался выше до 18 мес. (рисунок 45).

В изменении доли миогенин-положительных 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)% в группе с мутацией в гене *DYSF* и 0,32 (0; 0,9)% у дикого типа, $p = 0,96$. К 9 мес. показатель возрос до 1,53 (0,9; 1,6)% в линии Vla/J и до 1,02 (0; 1,7)% в линии C57Bl/6, $p = 0,47$ (рисунки 46, 49). 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 мышей линии Vla/J.

В образцах скелетных мышц голени мышей линии Vla/J репродуктивного периода наблюдалось снижение показателей сосудистой плотности (рисунок 50), пролиферации эндотелиоцитов (рисунок 51) и пролиферации ядер клеток стромы (рисунок 52) по сравнению с мышцами линии C57Bl/6. Это может быть связано со снижением синтеза дисферлина в эндотелиоцитах [212] и макрофагах [96] при мутациях в гене *DYSF*.

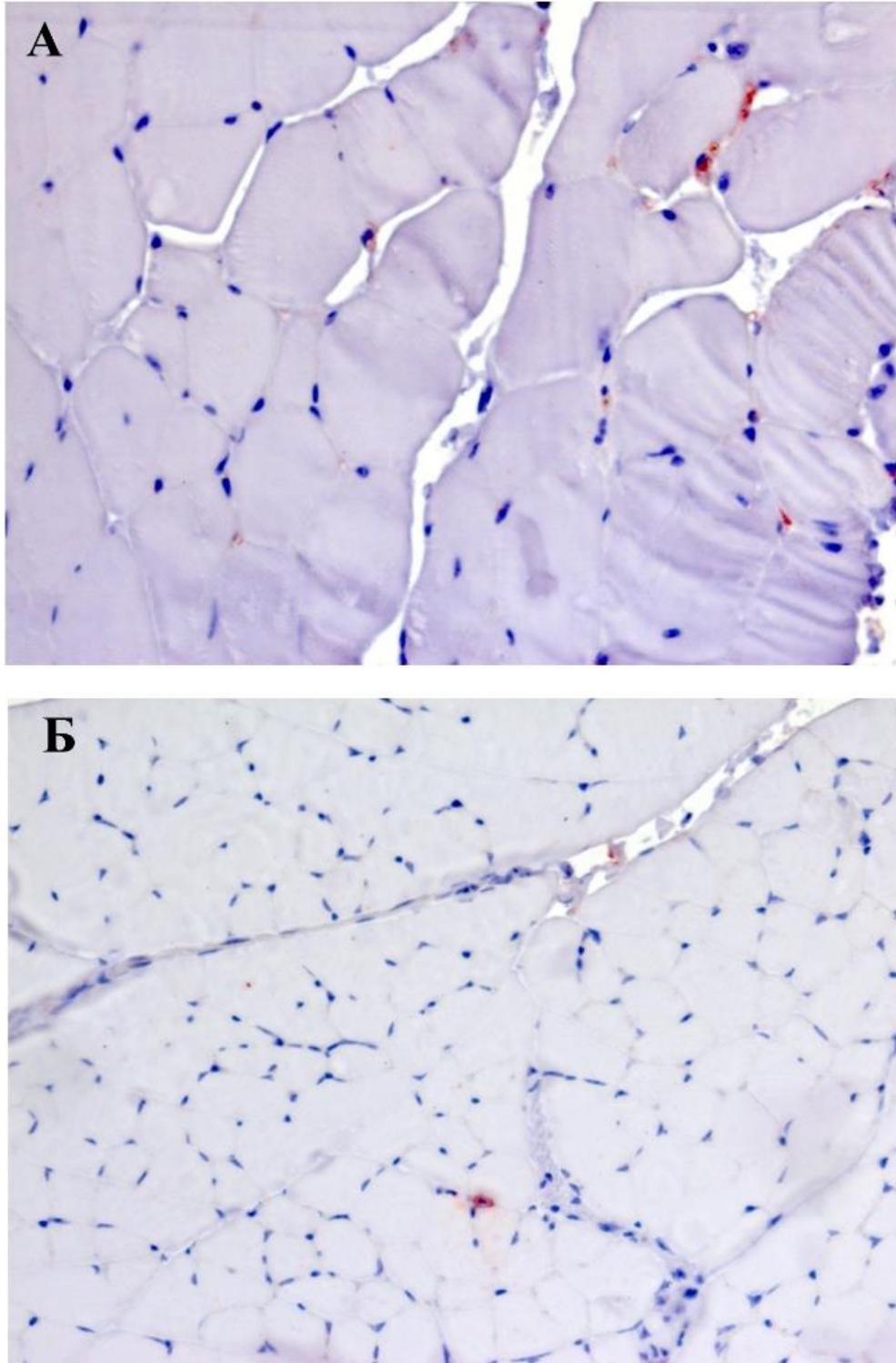


Рисунок 49 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 4 мес. ИГХ реакция с Ат к миогенину. Докраска: гематоксилин. Ув.: ×400

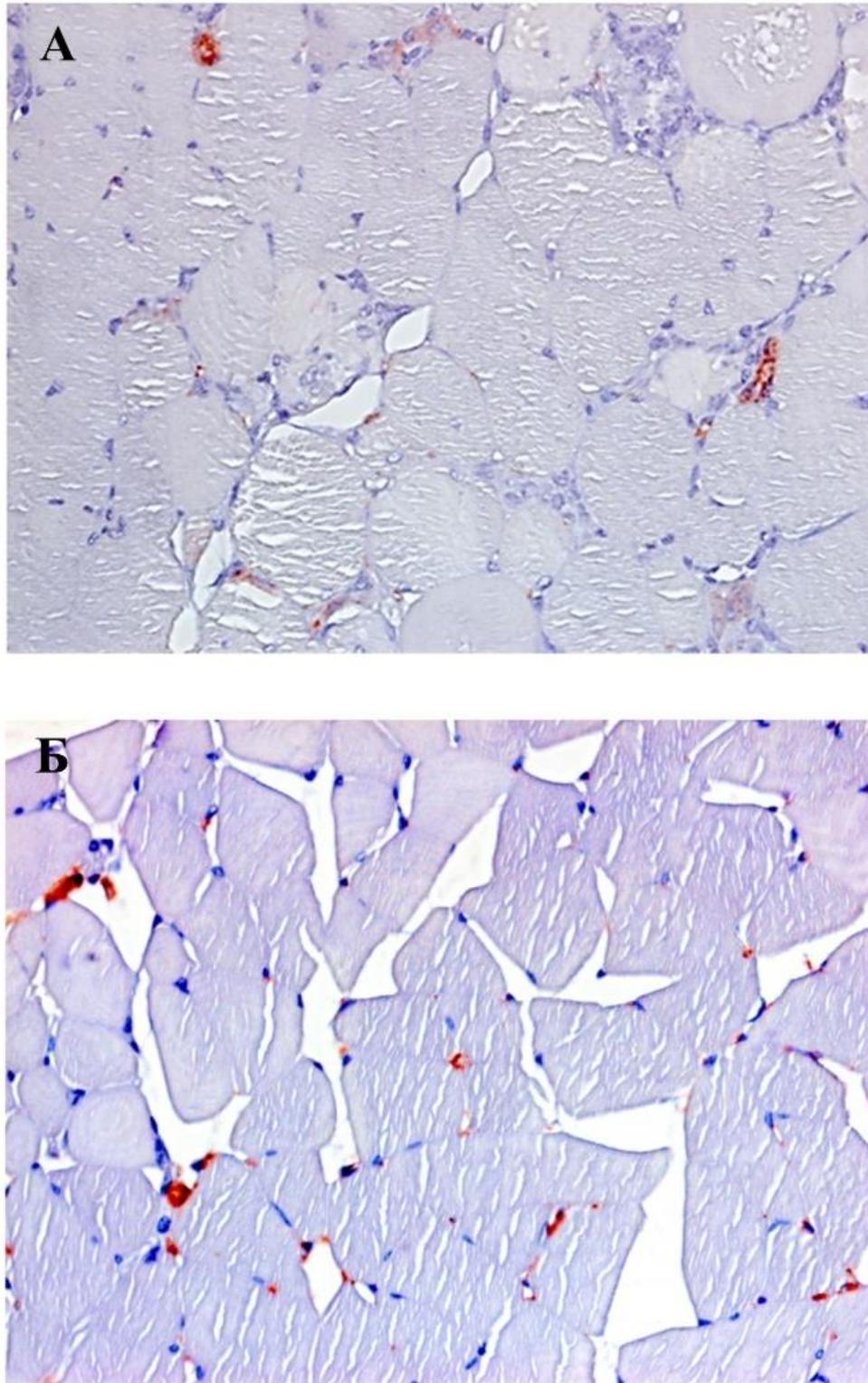


Рисунок 50 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 7 мес. ИГХ реакция с Ат к α -SMA. Докраска: гематоксилин. Ув.: $\times 400$

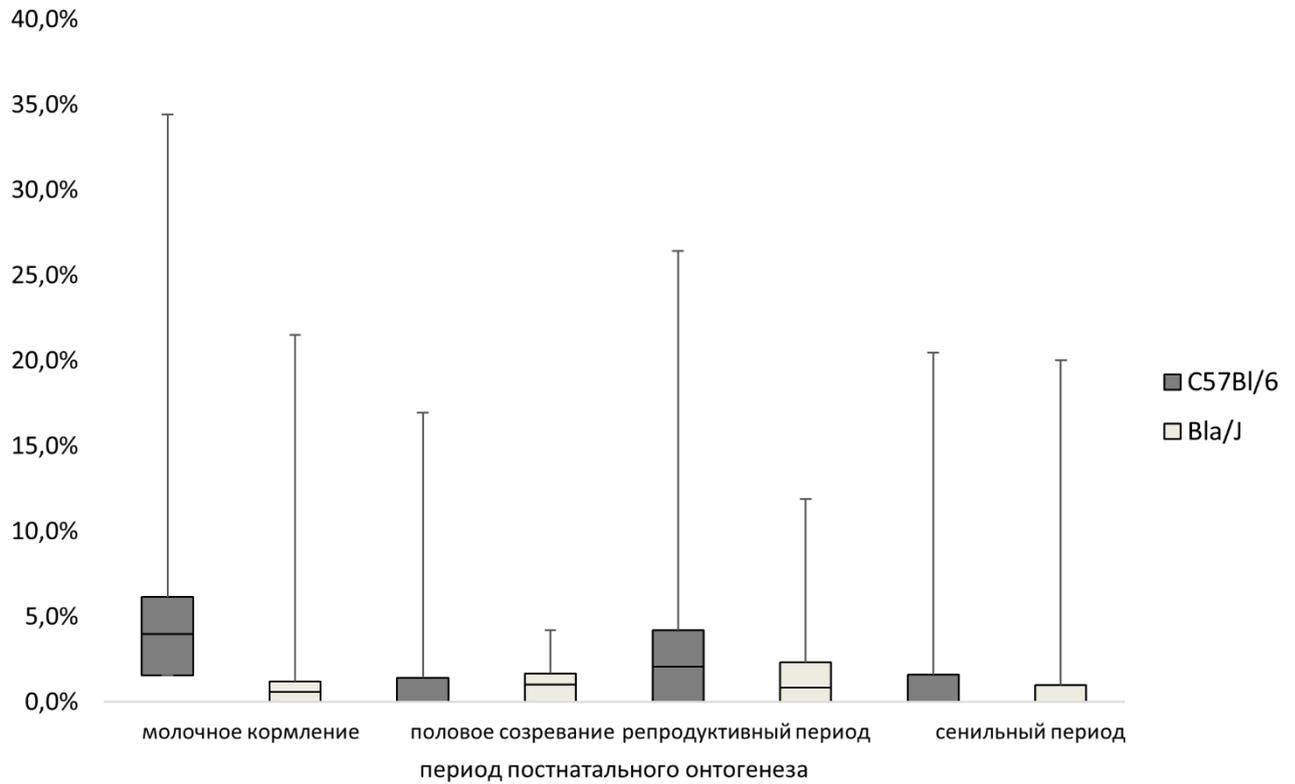


Рисунок 51 – Ki-67-позитивные эндотелиальные клетки сосудов икроножной мышцы в ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

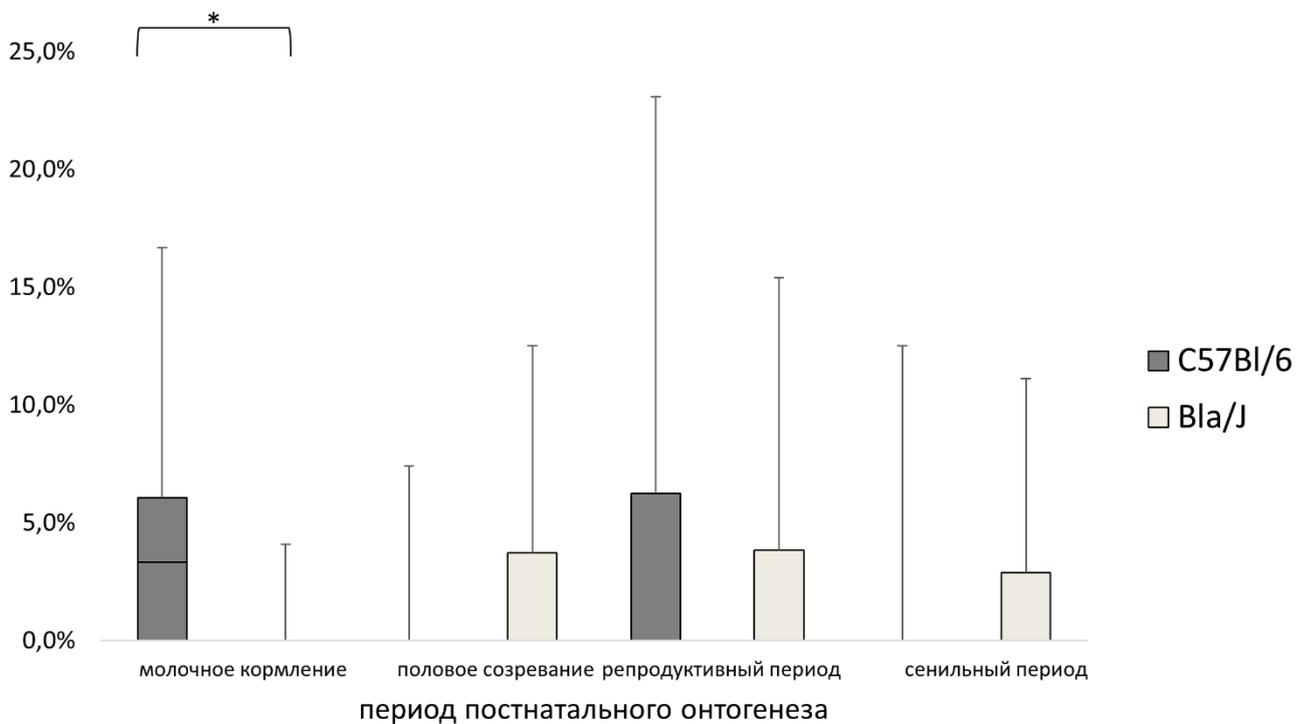


Рисунок 52 – Ki-67-позитивные клетки стромы икроножной мышцы в ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, * $p < 0,05$

3.6 Морфометрическая характеристика поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в период выраженных старческих изменений мышц линий В1а/Ј и С57В1/6

В описываемом периоде были изучены патоморфологические показатели срезов икроножных мышц мышей в возрасте 12, 15 (группа предстарческого периода) и 18 мес. (старческий период).

Было установлено, что доля некротизированных МВ возрастала с 9 до 18 мес. у мышей 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 С57В1/6 и 14,44 (11,96; 18,07)% у мышей линии В1а/Ј, $p < 0,001$, что делает очевидным вклад дисферлина в восстановление целостности МВ. 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 мышей линии С57В1/6 на этом сроке показатель составил 6,04 (3,84; 13,02)%, $p = 0,001$ и был максимальным для мышей этой линии на всех изучаемых сроках. Следовательно, существует прямая 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 мышей линии В1а/Ј 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 своего максимума показатель достиг у линии В1а/Ј 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) $\mu\text{м}^2$, $p < 0,05$ (рисунок 53). Из этого следует, что у мышей с дисферлинопатией вплоть до 9 мес. наблюдается компенсаторная гипертрофия МВ, которая в последующем сменяется атрофией ввиду истощения камбиального резерва скелетных мышц.

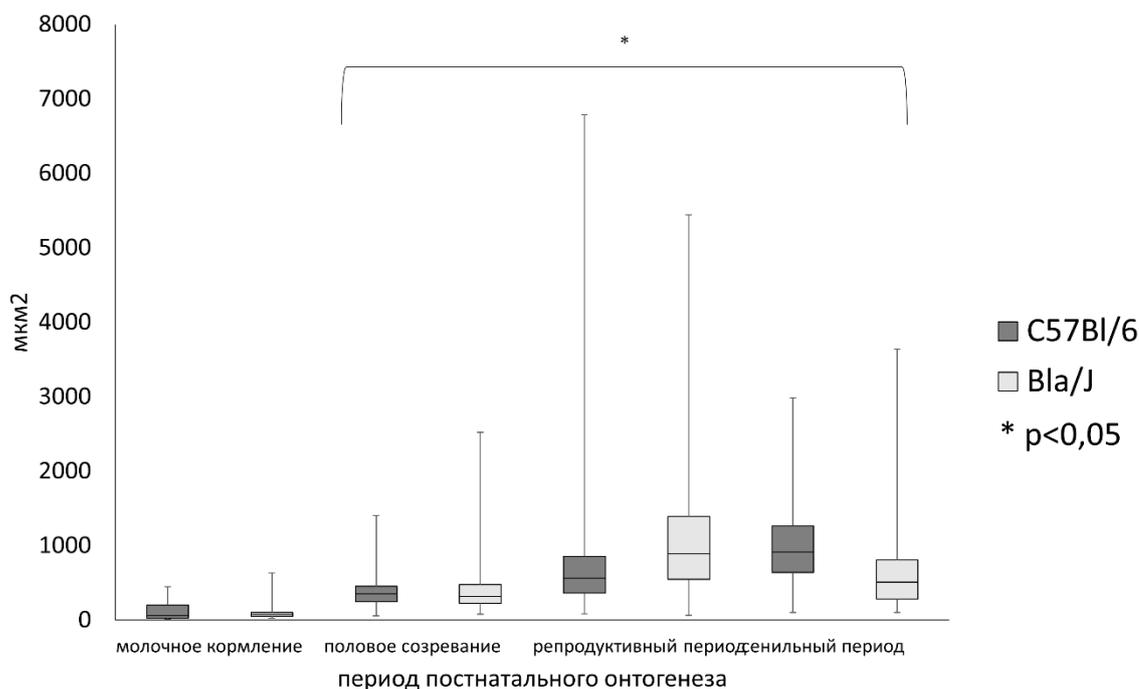


Рисунок 53 – Средняя площадь поперечного сечения мышечных волокон в икроножной мышце в ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J

Доля миогенин-позитивных ядер в изучаемой возрастной группе отличалась у мышей двух линий и на всех изучаемых сроках оставалась выше у мышей линии C57Bl/6. У мышей линии Bla/J показатель снижался с 1,75 (1,17; 2,10)% в 12 мес. до 0,97 (0,65; 1,32)% в 18 мес., $p < 0,05$, 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.

Как в репродуктивном, так и в сенильном периодах жизни мышей линии Bla/J было выявлено достоверно более высокое содержание соединительной ткани по сравнению с мышами дикого типа (рисунки 54, 55), что свидетельствует о субституции скелетных мышц в результате длительной гибели MB на фоне отсутствия дисферлина.

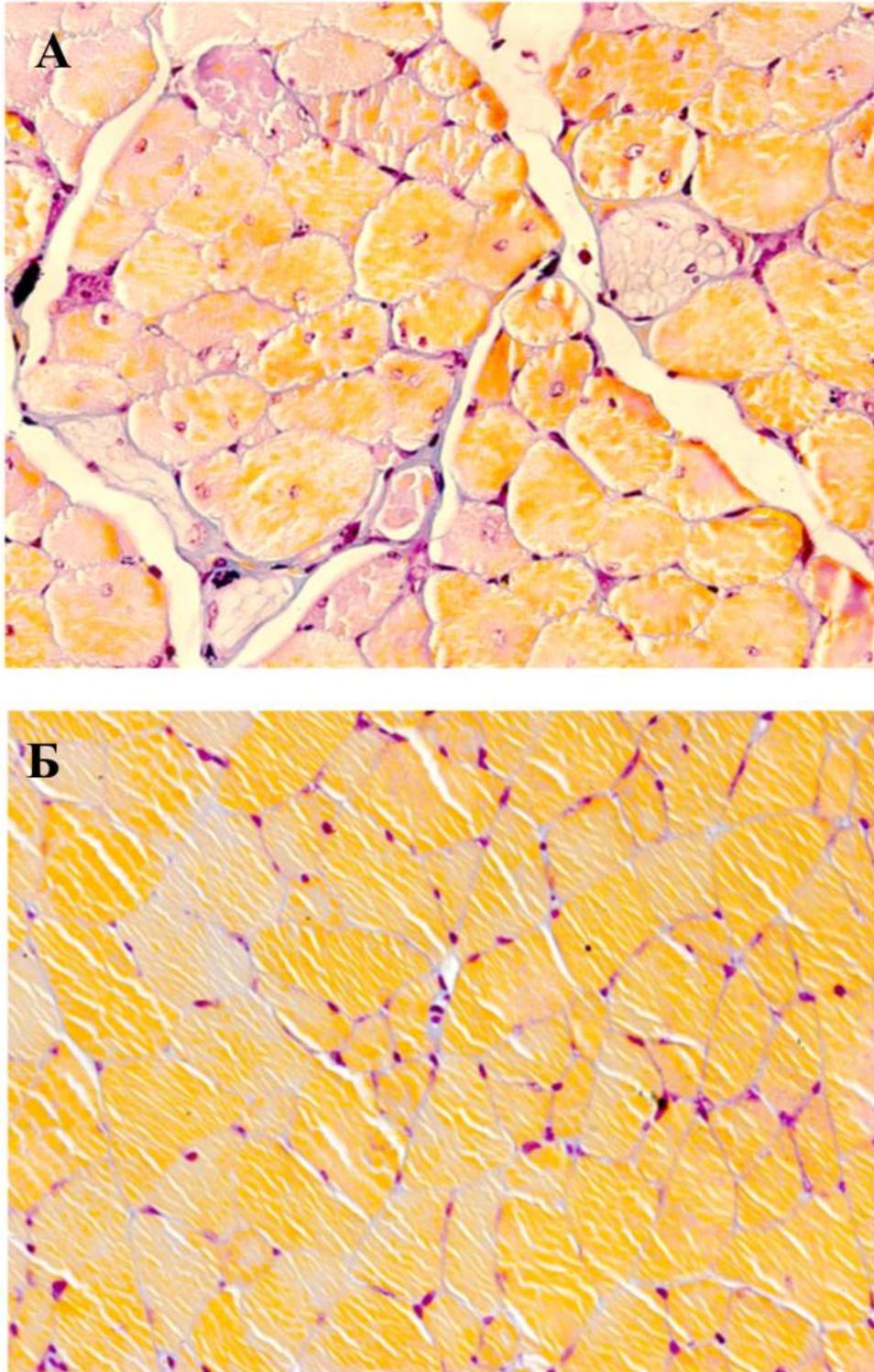


Рисунок 54 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 15 мес. Окраска: по Маллори. Ув.: ×400

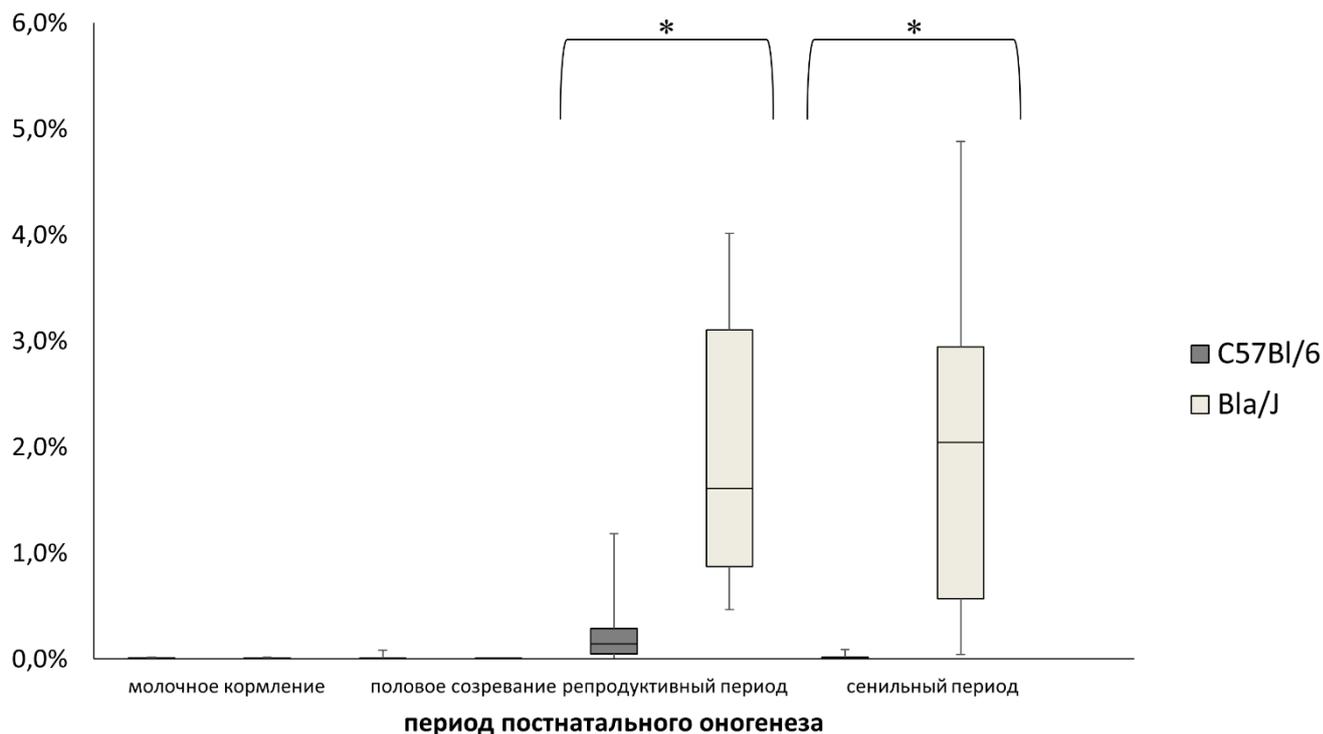


Рисунок 55 – Доля соединительной ткани в икроножной мышце ходе постнатального онтогенеза мышей линий C57Bl/6 и Bla/J, $p < 0,05$

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 поврежденного 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 Bla/J с 3 мес. жизни с постепенным ростом показателя до 18 мес.

Доля миогенин-позитивных ядер была ниже у мышей с отсутствием дисферлина по сравнению с контрольной группой с максимальным значением показателя у первой группы в 4 мес. В дальнейшей потенциал миогенной дифференцировки снижался, что может быть связано со снижением пула постоянно делящихся при миодистрофии МСЦ. Постепенное увеличение размеров МВ у мышей линии Vla/J до 7 мес. сменилось их последующей атрофией. Выявлено снижение сосудистой плотности в постнатальном онтогенезе мышей линии Vla/J, вакуолизация эндотелия и истончение базальной мембраны капилляров, что подтверждает участие дисферлина в ангиогенезе. Сосудистая плотность была выше в контрольной группе с максимальным значением 90,0 (78,3; 94,1)% в 7 мес., в то время как для мышей линии Vla/J этот показатель составил 40,91 (29,41; 50,91)% в 5 мес. Поражение кровеносных сосудов может быть одним из патогенетических механизмов усиления альтерации скелетной мышечной ткани в отсутствие адекватной васкуляризации и, как следствие, ишемии мышц.

Таким образом, отсутствие синтеза дисферлина скелетными мышцами вносит существенный вклад в гибель МВ на протяжении всей жизни мышей с мутацией в каузальном гене.

По результатам проведенной работы составлена таблица с референсными значениями гистологических показателей состояния скелетных мышц в постнатальном онтогенезе мышей линий Vla/J и C57Bl/6, которые могут применяться для оценки эффективности таргетной терапии дисферлинопатий (таблица 7).

Таблица 7 – Средние значения показателей состояния скелетных мышц в постнатальном онтогенезе у мышей линий
Bla/J и C57Bl/6

Показатель	Линия мышей/ возраст	Значение показателя (медиана (1 квартиль; 3 квартиль))													
		1 сут.	10 сут.	20 сут.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	7 мес.	9 мес.	12 мес.	15 мес.	18 мес.	
Доля ЦЯМВ, %	C57Bl/6	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0,49 (0;1,7)	0,7 (0,57;0, 96)	0 (0;0,93)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0 (0;1,95)	0 (0;1,7)	6,04 (3,84; 13,02)
	Bla/J	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0 (0;0,88)	2,22 (0;2,38)	3,13 (0;4,95)	1,92 (0;4,99)	17,78 (17,31; 19,15)	6,56 (2,86; 7,69)	18,94 (18,23; 19,84)	26,15 (21,05; 28,69)	20,97 (16,67; 22,22)	22,72 (20,38; 27,22)	
Доля некротизирова нных МВ, %	C57Bl/6	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	1,06 (0;2,31)	0 (0;1,32)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0 (0;0,55)	0 (0;1,57)	0 (0;2,07)	3,33 (0;6,01)	
	Bla/J	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0 (0;1,03)	7,31 (6,81; 11,9)	9,37 (4,39; 14,19)	5,01 (4,39; 6,67)	7,31 (6,66; 8,51)	6,25 (3,79; 7,41)	4,08 (3,69; 4,97)	7,99 (7,53; 8,46)	10,17 (9,37; 14,51)	14,49 (11,96; 18,07)	
Средняя площадь поперечного сечения МВ, мкм ²	C57Bl/6	28,59 (20,19; 37,38)	75,12 (60,73; 112,51)	205,52 (155,78; 256,85)	378,92 (289,29; 513,37)	330,49 (230,84; 434,49)	369,54 (287,79; 563,42)	620,50 (397,95; 904,64)	698,21 (505,65; 940,85)	432,98 (278,54; 551,97)	1163,55 (895,22; 1442,25)	820,11 (595,84; 1119,59)	1296,76 (744,91; 1784,58)	1181,58 (795,33; 1486,26)	
	Bla/J	57,57 (43,83; 73,55)	69,29 (53,96; 90,73)	185,15 (139,81; 245,27)	282,29 (208,15; 379,95)	768,64 (425,99; 918,51)	918,51 (562,33; 1107,52)	1107,52 (739,29; 1075,73)	1075,73 (675,58; 1154,35)	1154,35 (810,38; 621,90)	621,90 (392,03; 935,36)	513,06 (259,92; 893,49)	465,97 (274,51; 695,44)	702,21 (515,08; 949,79)	

						1158,72)	1442,32)	1614,49)	1725,62)	1509,61)				
Доля миогенин- позитивных ядер, %	C57Bl/6	1,97 (1,55; 2,72)	2,44 (1,82; 3,17)	2,96 (2,51; 3,68)	1,69 (1,41; 2,78)	2,41 (1,41; 3,51)	1,14 (0,76; 1,63)	0 (0;1,69)	1,65 (1,42; 2,63)	0,33 (0;0,91)	1,03 (0;1,71)	1,88 (0;3,03)	1,42 (1,14; 2,21)	3,41 (0,53; 4,50)
	Bla/J	0 (0;0,42)	0,23 (0,22; 0,30)	1,45 (1,16; 2,09)	1,05 (1,03; 1,08)	0,75 (0,00; 1,08)	0,77 (0,16; 1,80)	1,30 (1,11; 2,45)	1,21 (0,87; 1,85)	0,68 (0,00; 0,86)	1,54 (0,92; 1,61)	1,75 (1,17; 2,10)	0,88 (0,00; 1,66)	0,98 (0,66; 1,33)
Соотношение МНС slow/fast МВ, %	C57Bl/6	17,33 (8,67; 23,15)	28,18 (17,44; 34,71)	36,28 (25,29; 40,03)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	6,67 (4,94; 8,40)	15,38 (13,64; 20,00)	6,01 (2,50; 10,88)	0 (0;0)	0 (0; 3,26)
	Bla/J	12,50 (7,56; 14,43)	22,53 (13,51; 30,25)	0 (0;0)	0 (0;0,48)	5,09 (0; 11,34)	12,62 (5,45; 22,31)	9,19 (5,15; 12,04)	8,51 (4,74; 10,53)	6,62 (2,06; 14,13)	12,25 (8,89; 16,27)	5,88 (0;7,14)	0 (0;0)	0 (0;0)
Доля Ки-67 позитивных мышечных клеток, %	C57Bl/6	6,67 (6,06; 8,52)	3,24 (2,18; 3,78)	1,61 (1,07; 2,43)	0 (0;0,49)	0 (0;1,41)	1,47 (0,91; 2,86)	0 (0;1,12)	0 (0;0)	3,93 (1,84; 5,31)	1,72 (0;4,17)	0,77 (0;1,84)	0 (0;1,33)	0 (0;1,50)
	Bla/J	1,28 (1,06; 1,72)	3,71 (3,06; 4,41)	0,23 (0;0,51)	0 (0;0,77)	1,77 (1,3; 3,12)	1,32 (0,00; 2,08)	0 (0;1,58)	0 (0;0)	0,98 (0;1,26)	3,90 (1,71; 5,50)	0 (0;2,08)	0 (0;1,41)	0,33 (0;0,91)
Доля Ки-67 позитивных клеток стромы, %	C57Bl/6	0 (0; 0)	2,39 (0;4,08)	3,33 (0;6,06)	0 (0;0)	0 (0;3,95)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;6,56)	7,69 (0;10,0)	0 (0; 5,26)	0 (0; 1,39)	0 (0;0)
	Bla/J	0 (0;1,47)	7,05 (0; 11,44)	0 (0;0)	0 (0;0)	4,83 (0;11,4)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	2,80 (0;4,05)	7,50 (2,92; 9,68)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2,28 (0;3,24)

Доля Ki-67 позитивных эндотелиоцитов, %	C57Bl/6	0 (0;0)	2,24 (0;3,25)	6,67 (0; 11,76)	0 (0;12,5)	0 (0;5,00)	0 (0;8,33)	0 (0;0)	8,33 (0;10,1)	9,55 (0;23,3)	0 (0; 14,29)	0 (0; 10,26)	5,55 (0; 16,67)	0 (0;0)
	Bla/J	0 (0;0)	3,73 (2,09; 4,70)	4,69 (0; 10,28)	0 (0; 4,55)	7,0 (1,0;11, 87)	0 (0;4,58)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;4,17)	14,28 (9,73; 18,18)	0 (0; 8,38)	0 (0; 15,48)	3,13 (0;10,0)
Сосудистая плотность, %	C57Bl/6	26,53 (15,81; 30,35)	24,58 (18,32; 33,97)	16,44 (14,81; 18,14)	31,93 (29,48; 46,67)	34,15 (32,19; 40,38)	28,87 (26,81; 33,16)	38,30 (31,30; 50,99)	56,05 (42,39; 67,89)	90,00 (78,30; 94,51)	43,59 (40,44; 68,20)	36,90 (26,37; 43,21)	69,64 (51,07; 84,13)	60,99 (52,94; 80,35)
	Bla/J	21,54 (18,56; 25,36)	17,65 (16,67; 19,57)	40,00 (27,14; 44,99)	21,77 (19,60; 23,23)	23,40 (13,13; 31,88)	25,58 (19,64; 51,85)	37,93 (35,29; 45,83)	40,91 (29,41; 50,91)	33,49 (29,67; 41,91)	17,06 (13,66; 23,72)	26,19 (17,80; 27,44)	17,20 (13,76; 19,96)	27,38 (24,56; 28,57)
Доля фиброза, %	C57Bl/6	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0,01)	0 (0;0)	0,04 (0,02; 0,12)	2,83 (0,65; 5,54)	0,64 (0,32; 0,79)	0,04 (0,02; 0,06)	0,18 (0,15; 0,22)	0,06 (0,04; 0,13)	0 (0;0,01)	0 (0;0)	0,02 (0,01; 0,03)
	Bla/J	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	3,25 (1,53; 5,10)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0,85 (0,68; 1,18)	2,72 (2,02; 3,23)	1,54 (0,85;2, 34)	2,52 (1,08;2, 68)	2,94 (2,04;3, 14)

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО РАБДОМИОГЕНЕЗА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ Vla/J И C57Bl/6

4.1 Химическое повреждение и воспаление мышечного регенерата

С целью оценки синтеза дисферлина в условиях реактивного гистогенеза на срезах икроножных мышц была проведена иммунофлуоресцентная реакция с Ат к дисферлину. На рисунке 56 показана экспрессия дисферлина в поврежденной мышце мыши линии C57Bl/6 и отсутствие дисферлина у мыши линии Vla/J на 4 сут. после повреждения в месте инъекции.

Доля некротизированных МВ – один из наиважнейших показателей динамики восстановления 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, $p < 0,05$) [13]. У животных 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 суткам возрос до 7,36 (5,35; 9,85)%, рисунки 57, 58). 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 [77, 96]. Предполагается, что у макрофагов в отсутствие синтеза дисферлина нарушен процесс переключения с провоспалительных на противовоспалительные клетки, что приводит к длительному воспалительному ответу и отсутствию восстановления скелетных мышц [50]. В норме заплатка, образующаяся при крупных повреждениях сарколеммы, в течение нескольких минут фагоцитируется макрофагами и замещается участком нормальной сарколеммы. Сигнал «съешь меня» макрофагам посылают молекулы фосфатидилсерина на поверхности МВ. Однако, в отсутствие дисферлина снижается и содержание фосфатидилсерина, что не приводит к фагоцитозу и последующему восстановлению МВ [174]. Снижение эффективности фагоцитоза

при дефиците дисферлина также приводит к персистированию некротизированных МВ и увеличение их числа у мышей линии B1a/J [77].

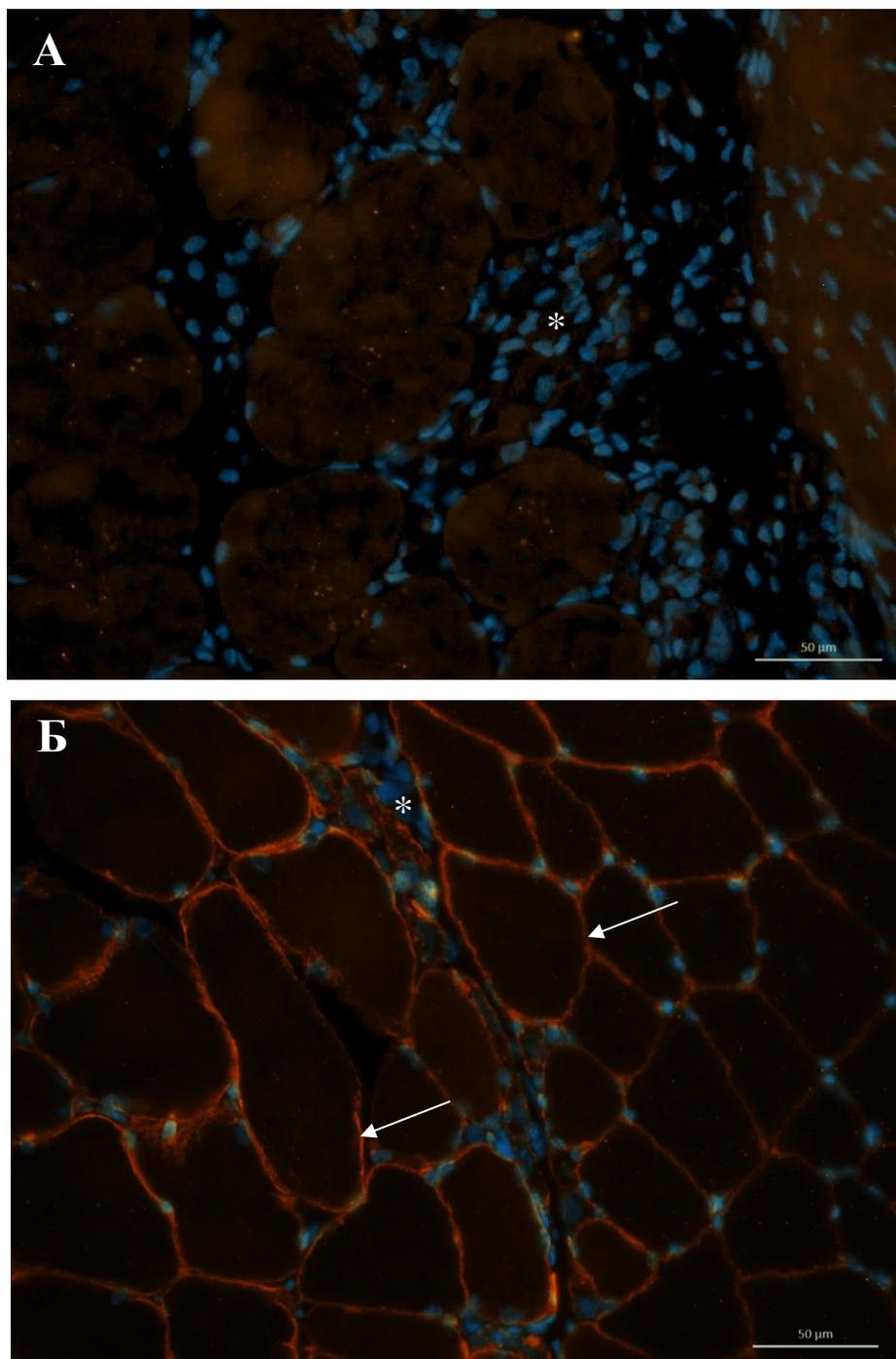


Рисунок 56 – Срезы икроножной мышцы мышей линии B1a/J (А) и C57Bl/6 (Б), 4 сут. после повреждения новокаином. Лейкоцитарная инфильтрация в месте инъекции (*). Синтез дисферлина в сарколемме мышц контрольной группы (стрелки). Иммунофлуоресцентная реакция с Ат к дисферлину. Докраска ядер: DAPI. Ув.: ×400

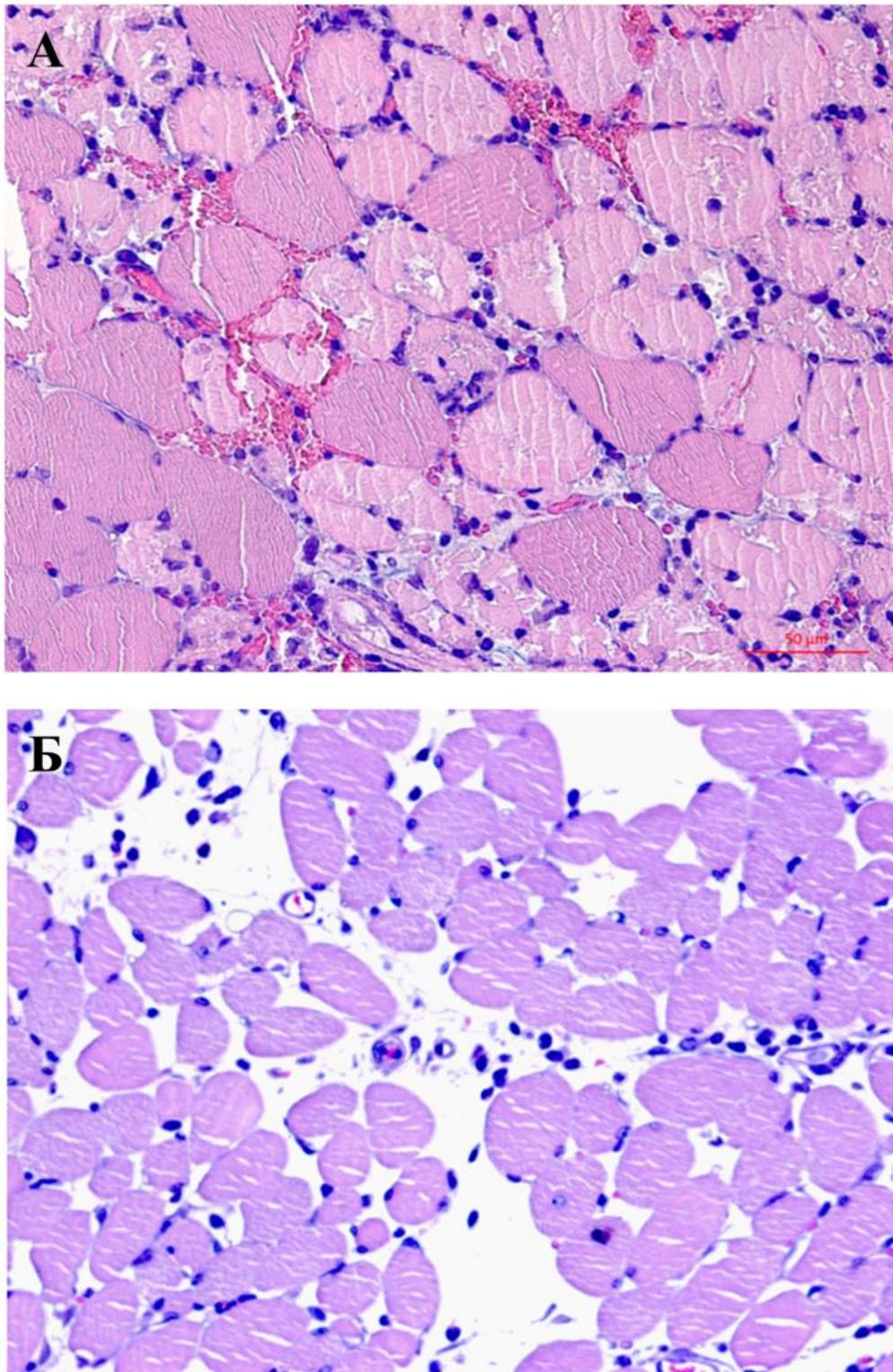


Рисунок 57 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Vla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 4 сут. после повреждения новокаином. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: ×400

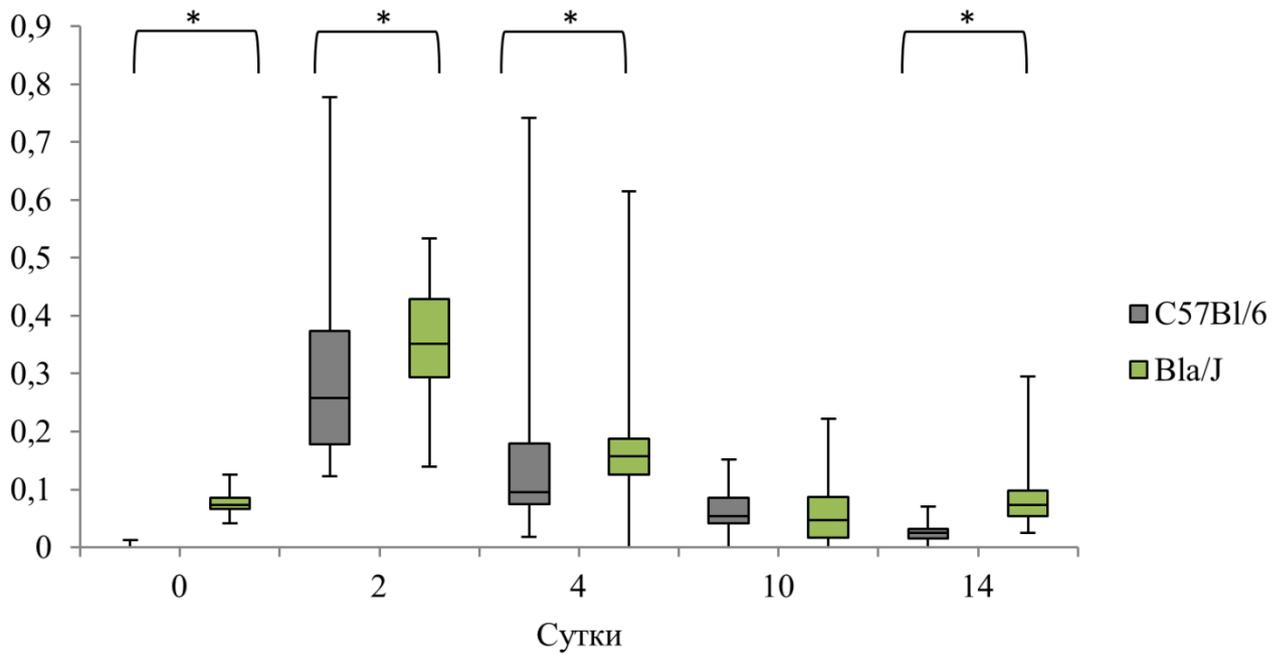


Рисунок 58 – Доля некротизированных мышечных волокон в икроножной мышце после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

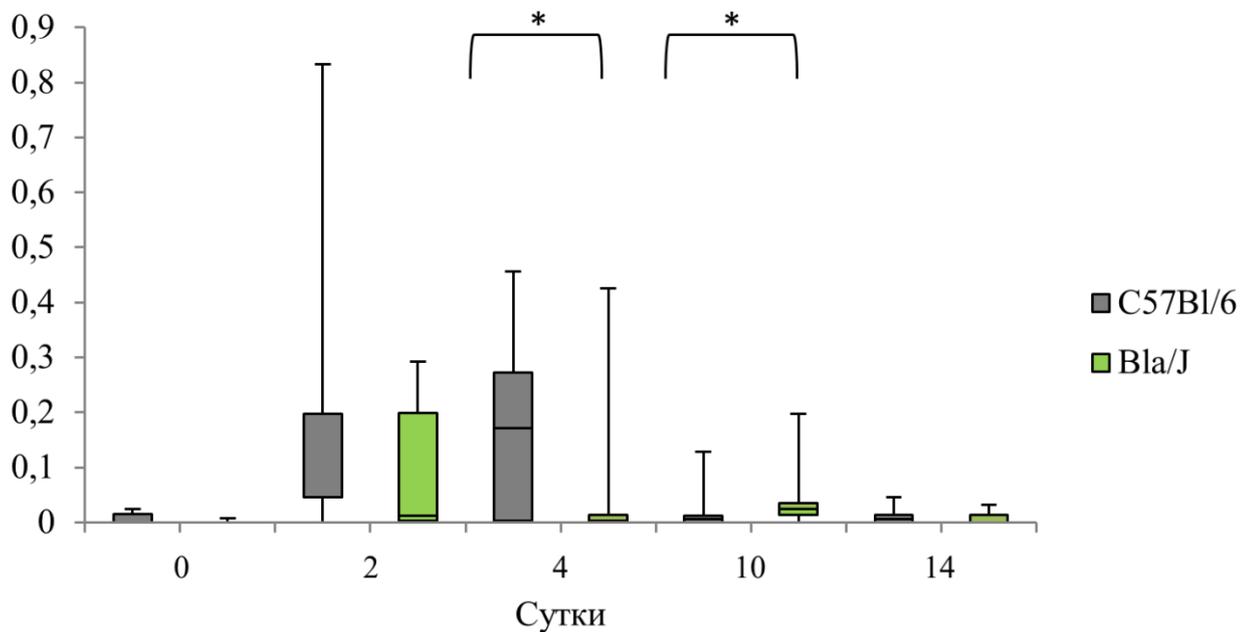


Рисунок 59 – Доля Ki-67-позитивных ядер в мышечных волокнах и миогенных клетках регенерата икроножной мышцы после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

4.2 Проллиферация и дифференцировка структур мышечного регенерата

Проллиферативные 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 (рисунки 59, 60), 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 травмы.

Важно отметить, что динамика снижения ИП отличалась у мышей разных линий: у мышей линии Vla/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 Vla/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 [192].

Примечательно, что динамика ИП в строме практически повторяла таковую и в миогенном диффероне: доля Ki-67 позитивных ядер количественно была примерно одинаковой во всех точках, она также была ниже у мышей контрольной группы лишь на 10 сут. (рисунок 61) и составила 0 (0; 2,69)% против 4,34 (2,69; 6,52)% у мышей экспериментальной группы, $p < 0,05$. Проллиферация ядер и в мышечных клетках, и в интерстиции снижалась быстрее у мышей линии Vla/J между 2 и 4 сут. (примерно на 8-9%, в то время как в контрольной группе – на 3-4%), а у линии C57Bl/6 – между 4 и 10 сут. (приблизительно на 14%, у мышей линии Vla/J примерно на 0-2%). Данное наблюдение свидетельствует о менее интенсивном и более позднем завершении пролиферации у Vla/J.

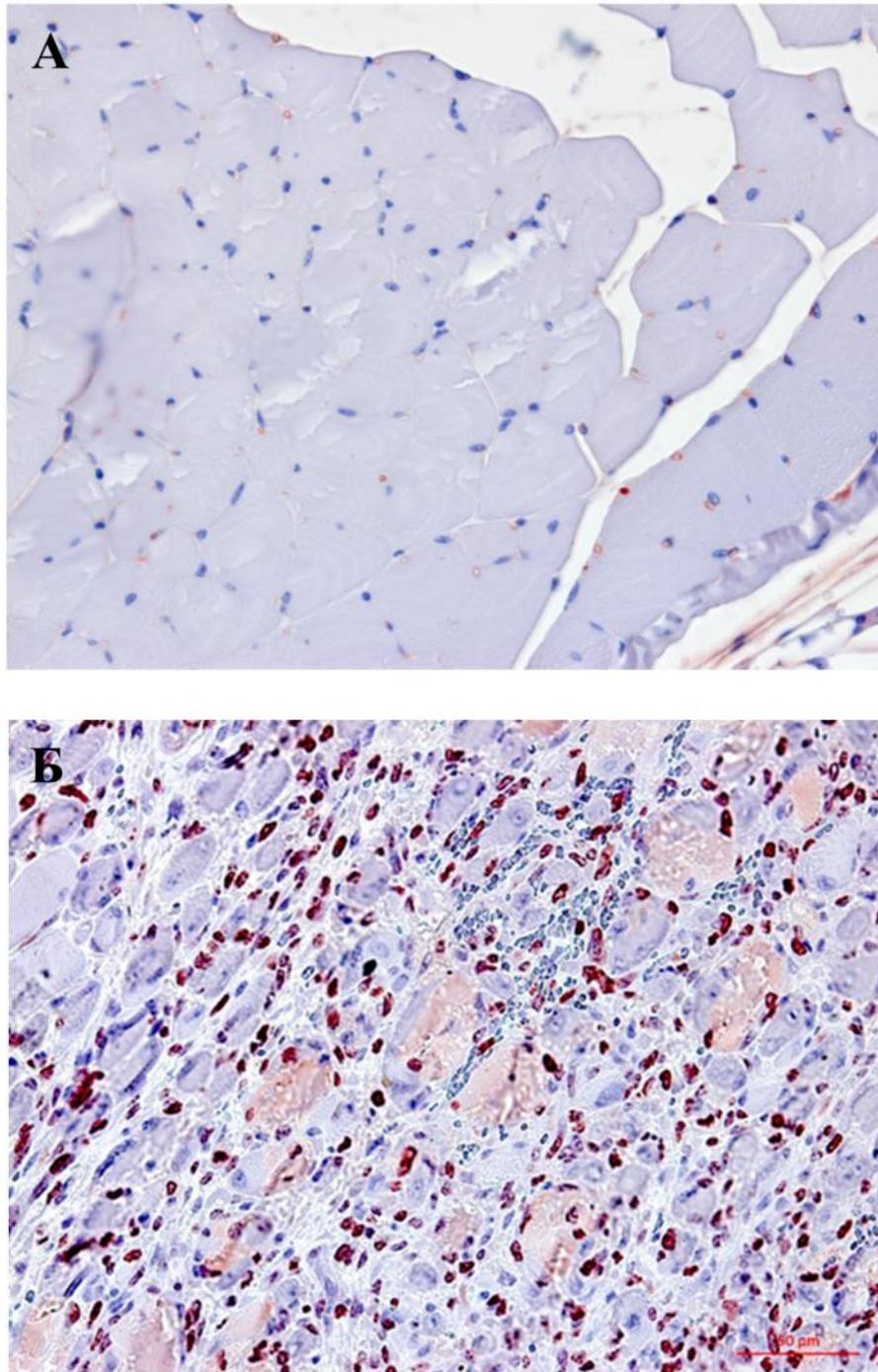


Рисунок 60 – Срезы икроножной мышцы мышей линий B1a/J и C57Bl/6 (А и Б, соответственно), 4 сут. после повреждения новокаином. ИГХ реакция с Ат к Ki-67. Докраска: гематоксилин. Ув.: ×400

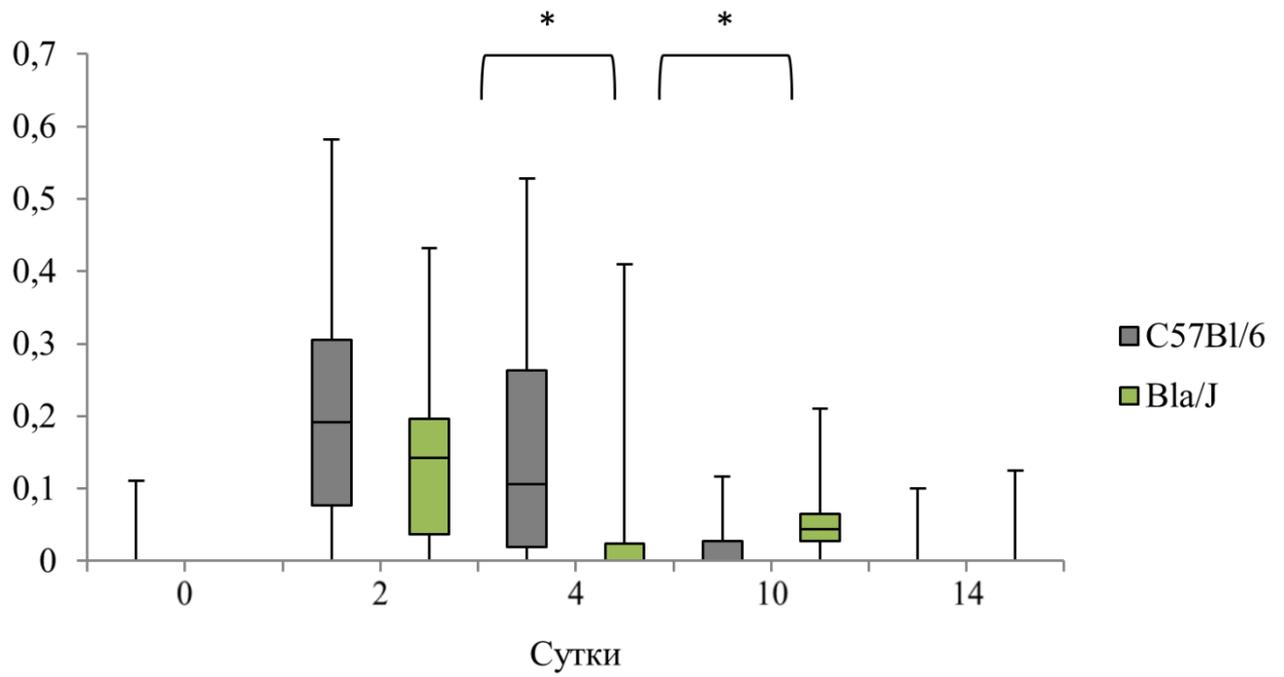


Рисунок 61 – Доля Ki-67-позитивных ядер в строме икроножной мышцы после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

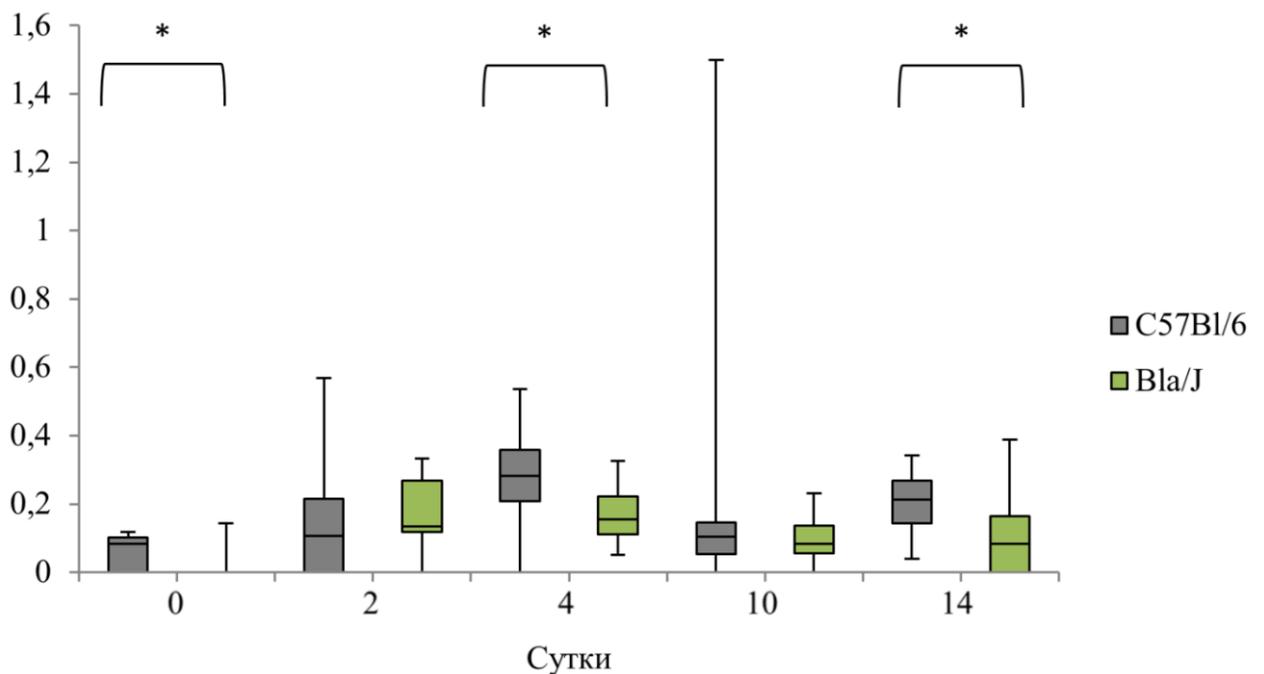


Рисунок 62 – Доля Ki-67-позитивных ядер в эндотелиоцитах сосудов регенерата икроножной мышцы после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

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 (рисунок 62). 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 дисферлиндефицитных мышей недостаточно. Это может быть связано с отсутствием дисферлина в эндотелиоцитах, где доказано его участие в ангиогенезе [209].

Миогенную дифференцировку как показатель успешности регенерации оценивали по доле миогенин-позитивных ядер. Максимум у обеих линий пришелся на 4 сут. с постепенным снижением показателя к 10 сут. (рисунки 63, 64).

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 [66]. Описано, что миобласты мутантных по *DYSF* мышей линий SJL/J и A/J при слиянии *in vitro* формируют тонкие МВ, содержание всего несколько ядер и характеризуются сниженной экспрессией мышечно-специфичных генов (*Muf5*, *Myod*, *Myog*, *Myh1* и *Ttn*). При этом в изучаемых культурах клеток было выявлено

повышение экспрессии ряда провоспалительных генов, преимущественно семейства NF- κ B, что косвенно подтверждает обратную корреляцию между степенью воспаления и активностью миогенеза [82].

Интернализация ядер в клетках миогенного дифферона отражает процессы внутриклеточной регенерации МВ, при этом ядра МВ с периферии волокна смещаются к центру (рисунок 65).

Кроме того, центральное расположение ядер наблюдается во вновь формирующихся МВ [200]. Так как данная локализация ядер снижает сократительную способность МВ, после слияния миобластов ядра мигрируют на периферию [67]. Поэтому при подсчете доли ЦЯМВ учитывались не только регенерирующие МВ, но также мышечные трубочки.

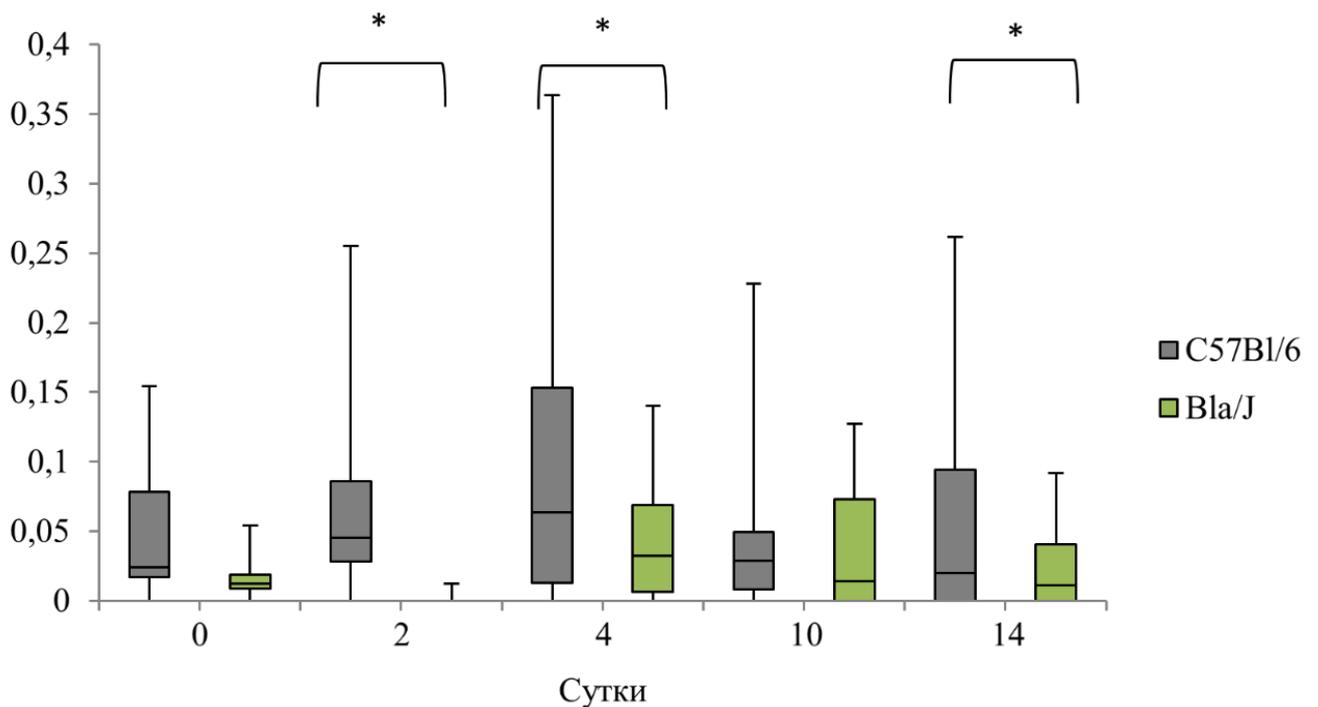


Рисунок 63 – Доля миогенин-позитивных ядер в икроножной мышце после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

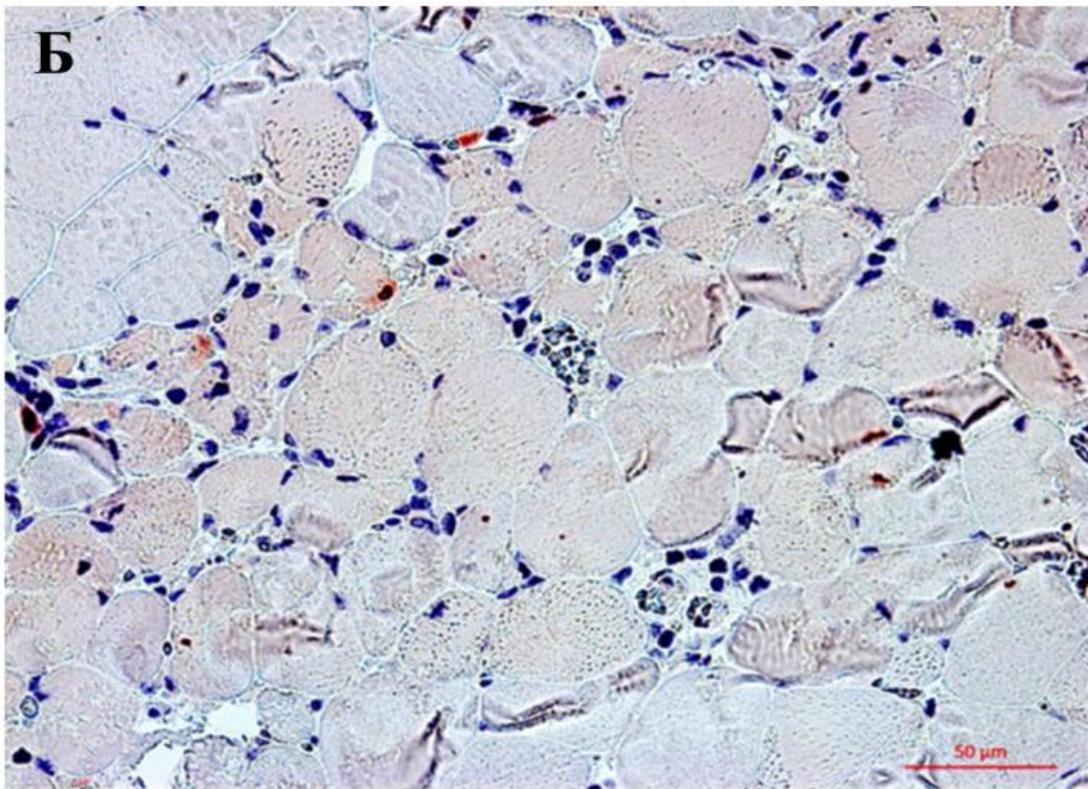
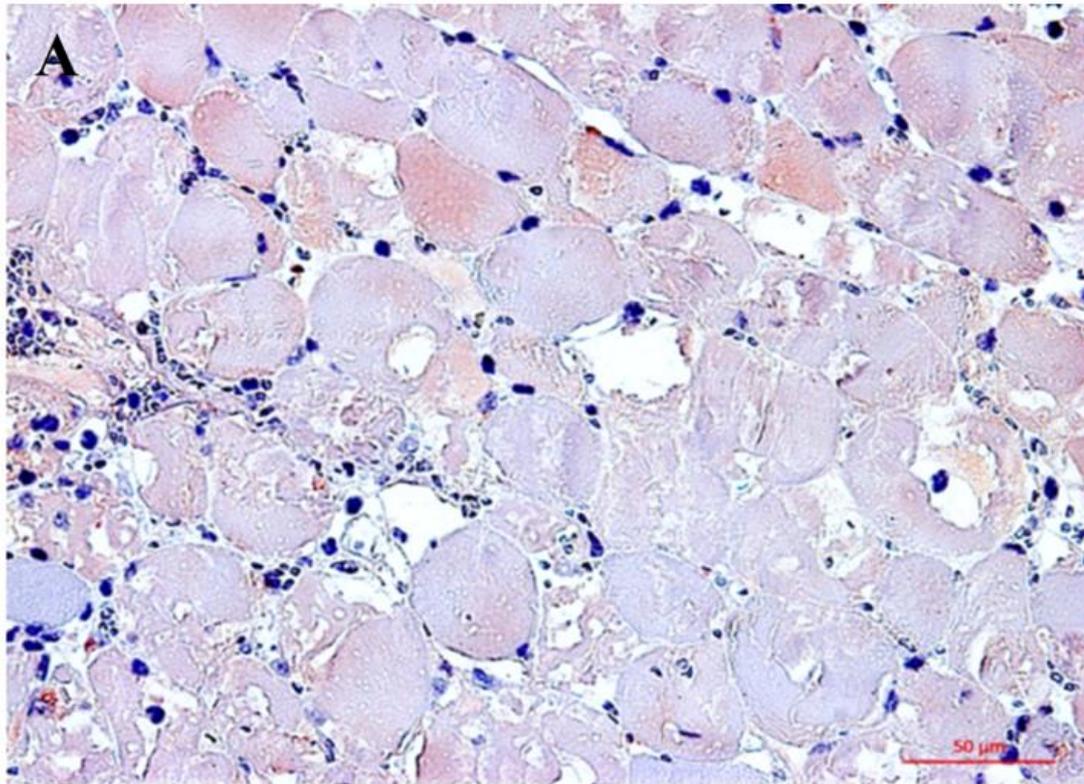


Рисунок 64 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 2 сут. после повреждения новокаином. ИГХ реакция с Ат к миогенину. Докраска: гематоксилин. Ув.: ×400

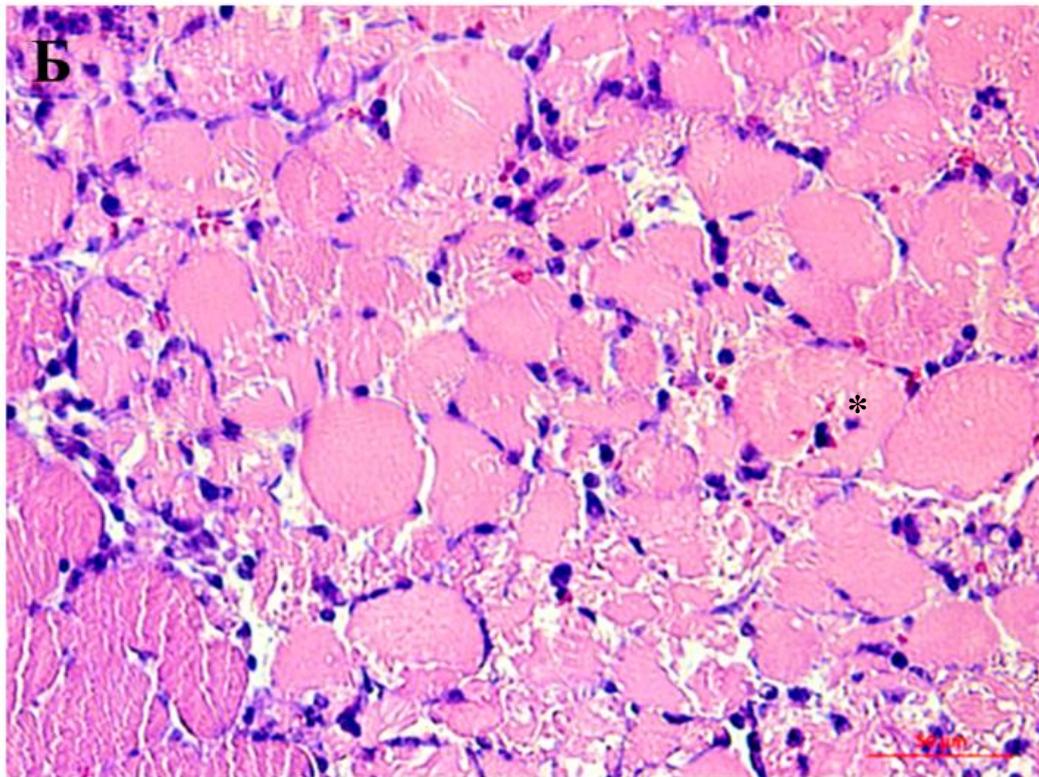
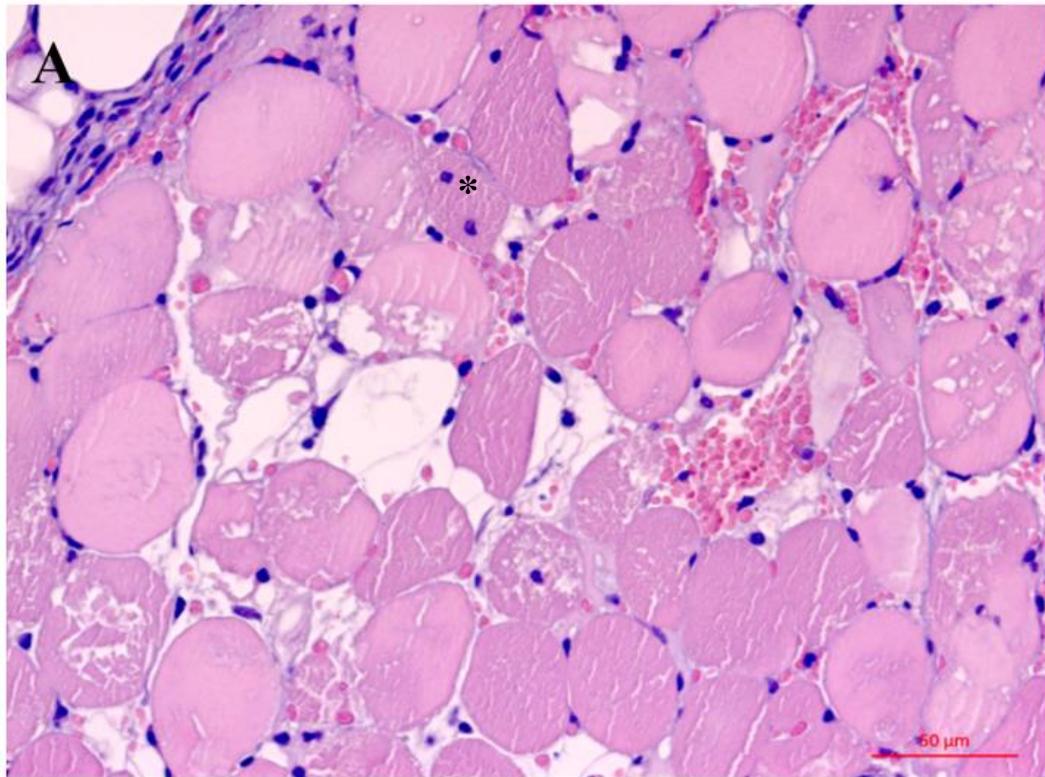


Рисунок 65 – Срезы икроножной мышцы мышей линий V1a/J (А) и C57Bl/6 (Б), 2 сут. после повреждения новокаином. Центральнаядерные мышечные волокна (*). Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: ×400

Показатель доли ЦЯМВ был минимальным для обеих линий мышей на 2 сут., у мышей линии В1а/Ј 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 (рисунок 66). 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 В1а/Ј и 46,15 (34,30; 58,46)% у мышей линии С57В1/6, $p=0,45$). Полученный результат следует трактовать скорее как замедленный рабдомиогенез в условиях отсутствия дисферлина, а не проявление миодистрофии, так как доля ЦЯМВ к 14 сут. после повреждения была значительно выше по сравнению с интактным контролем той же линии. Меньшая доля ЦЯМВ у мышей линии В1а/Ј в ответ на повреждение может быть связана со снижением числа миобластов как результат истощения пула миосателлитоцитов [209] и нарушением слияния миобластов. Описано замедление слияния миобластов в культуре клеток от пациентов с дисферлинопатиями [95]. Предполагаемый механизм связан с изменением внутри- и влеклеточной концентрации ионов кальция, что является важным условием в процессе формирования МВ. Кроме того, в культуре клеток мышей А/Ј и SJL/Ј было выявлено повышение провоспалительного белка NF- κ B, а после его ингибирования целастролом (противовоспалительным агентом) наблюдали активацию миогенеза [82].

Другим показателем, отражающим состояние МВ, является средняя площадь поперечного сечения МВ. Этот параметр на всех сроках был выше у мышей В1а/Ј (рисунок 67), 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) μm^2 (рисунок 67), что связано с появлением большего по сравнению с экспериментальной группой количества миотуб (рисунок 68).

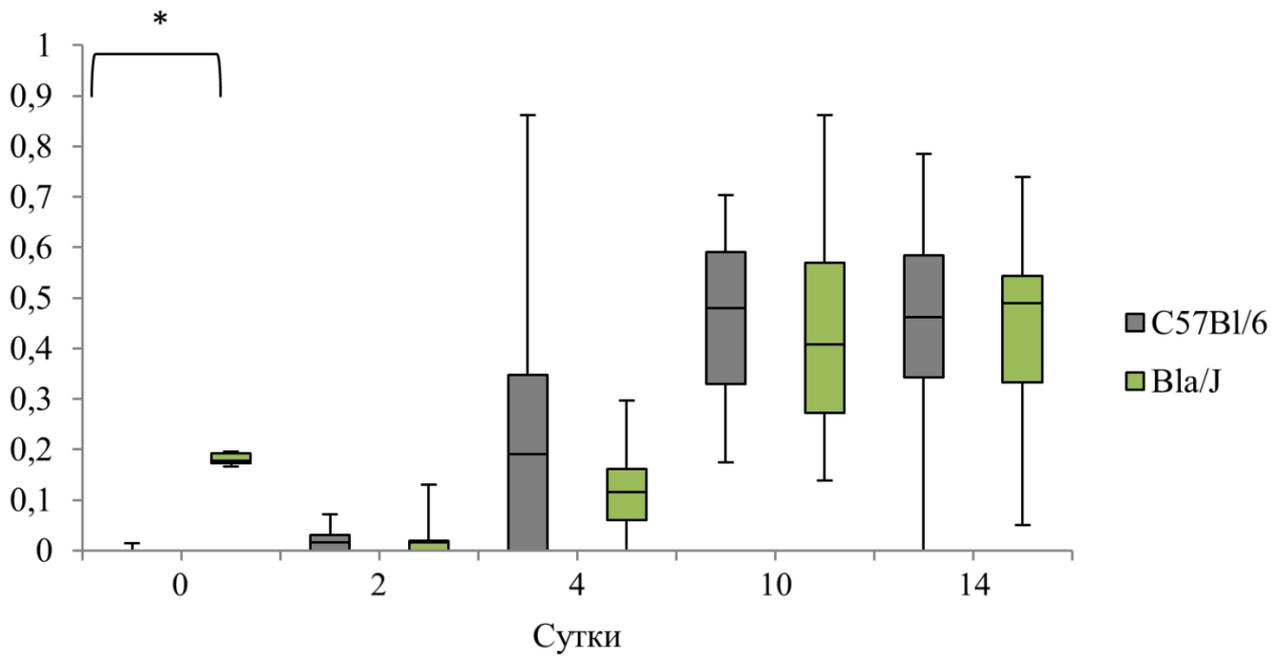


Рисунок 66 – Доля центральоядерных мышечных волокон в икроножной мышце после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

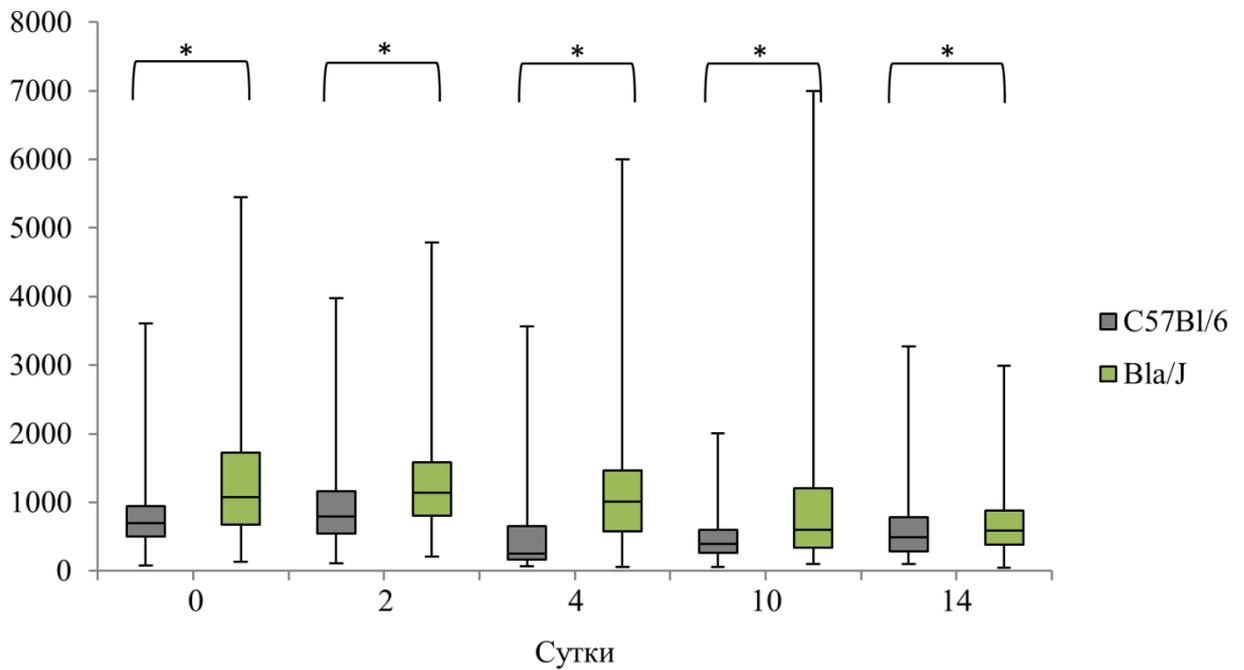


Рисунок 67 – Средняя площадь поперечного сечения МВ икроножной мышцы после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

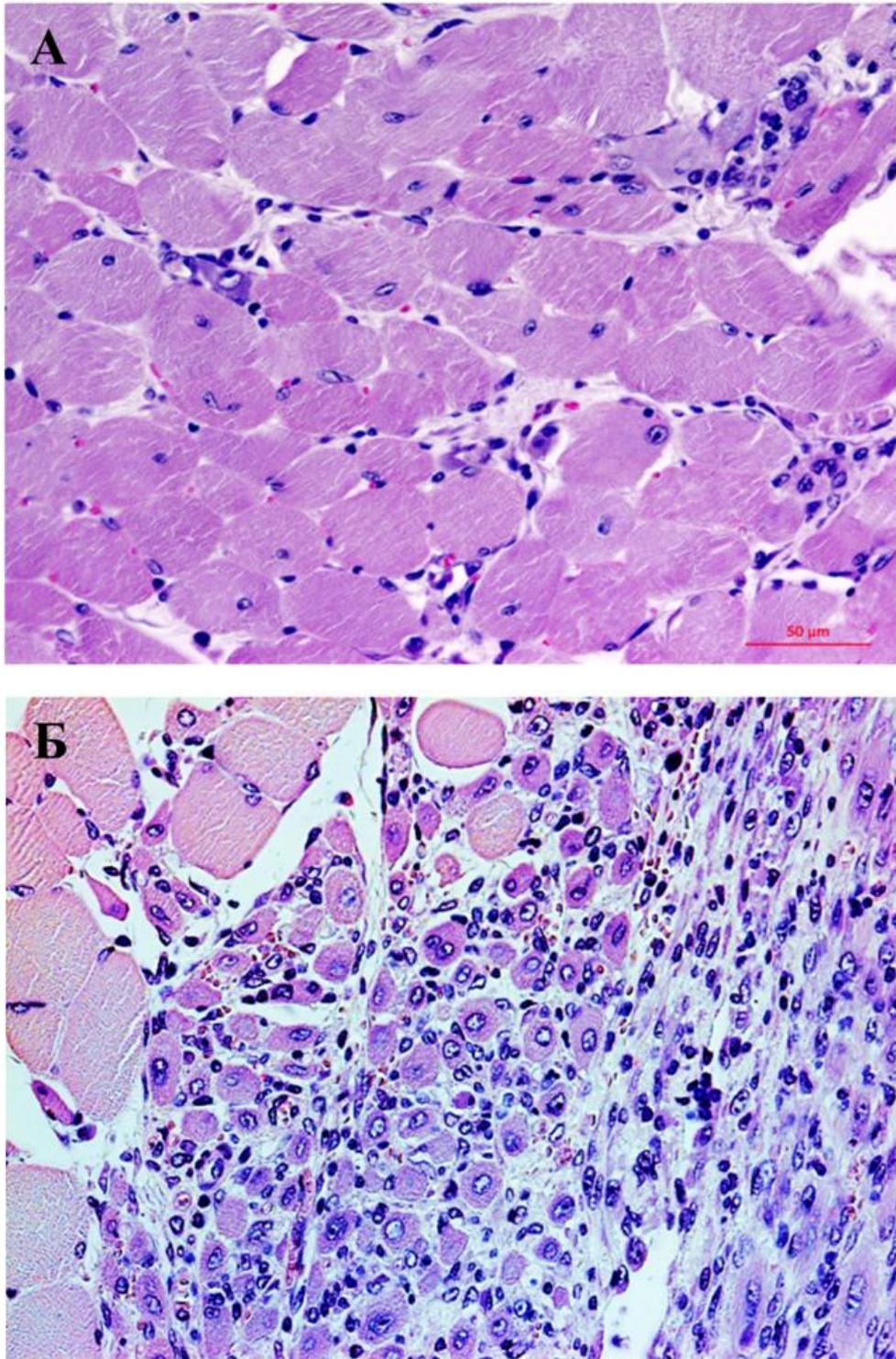


Рисунок 68 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и С57Bl/6 (Б), 4 сут. после повреждения новокаином. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: ×400

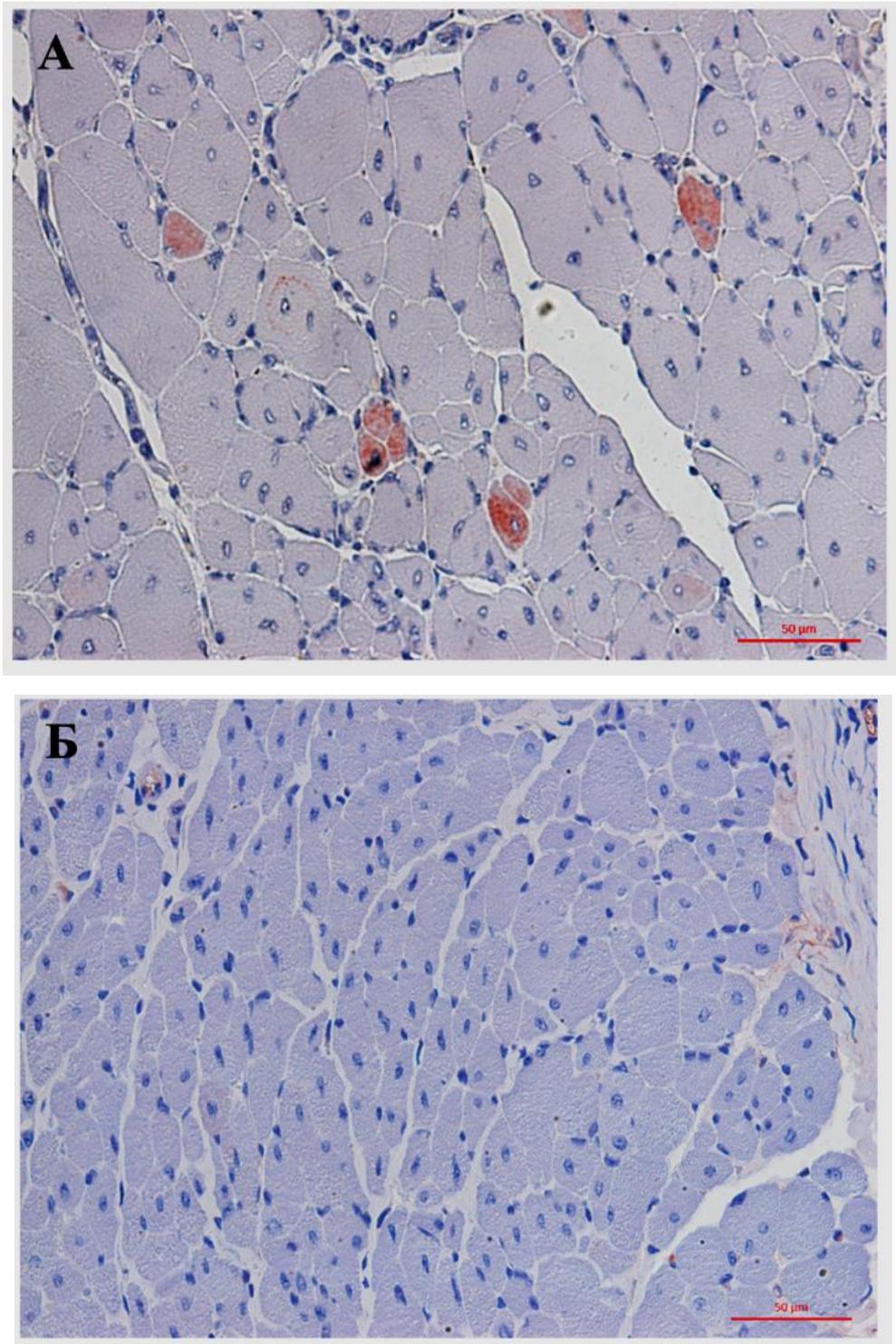


Рисунок 69 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Vla/J (А) и С57В1/6 (Б), 14 сут. после повреждения новокаином. ИГХ реакция с Ат к МНС slow. Докраска гематоксилином. Ув.: ×400

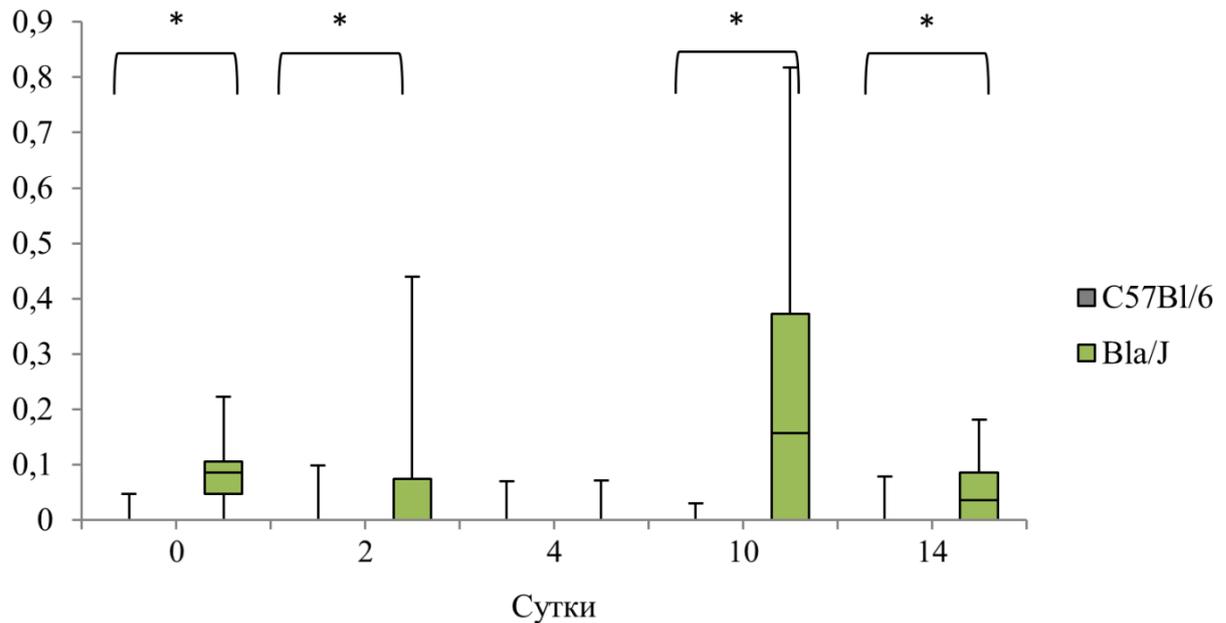


Рисунок 70 – Соотношение мышечных волокон, экспрессирующих тяжелые цепи медленных миозинов в регенерате икроножной мышцы после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

У мышей линии Bla/J содержание медленных мышечных волокон было выше на всех изучаемых сроках (рисунки 69, 70). По-видимому, это связано с преимущественной гибелью волокон, экспрессирующих МНС fast, за которой следует образование медленных МВ, более устойчивых к повреждению в условиях дефицита дисферлина.

Ранее описано уменьшение количества МНС fast-позитивных волокон у мышей SJL с мутацией в гене *DYSF* [146], а также преимущественная потеря быстрых мышечных волокон у пациентов с дисферлинопатиями [124]. Вероятно, большая сохранность МНС slow-позитивных МВ связана с наличием в них большего числа митохондрий, которые выступают буфером для ионов кальция [204]. Наличие липидных капель в этих волокнах у пациентов с дисферлинопатиями [124] может быть результатом нарушения метаболизма жирных кислот в митохондриях.

Описано, что после внутримышечной инъекции кардиотоксина у мышей первыми появляются МyHC-emb и МyHC-neo (3 сут.), а затем – на 4-5 сут. – МyHC

fast и MyHC slow. К 14 сут. после повреждения синтез быстрых и медленных волокон совпадает с их содержанием в неповрежденной скелетной мышце [89]. В онтогенезе первыми формируются MyHC-emb, затем MyHC-neo, MyHC slow и последними – MyHC fast [207]. Первые быстрые МВ появляются у мышей незадолго до рождения и содержат 70% эмбриональной изоформы, 30% неонатальной и следы MyHC slow [40]. Таким образом, последовательность формирования различных типов МВ в репаративном гистогенезе скелетных мышц повторяет таковую в онтогенезе.

4.3 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. эксперимента 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, $p < 0,05$, рисунки 71, 72). Отставание показателей у последних, вероятно, связано со сниженной экспрессией дисферлина в эндотелиоцитах.

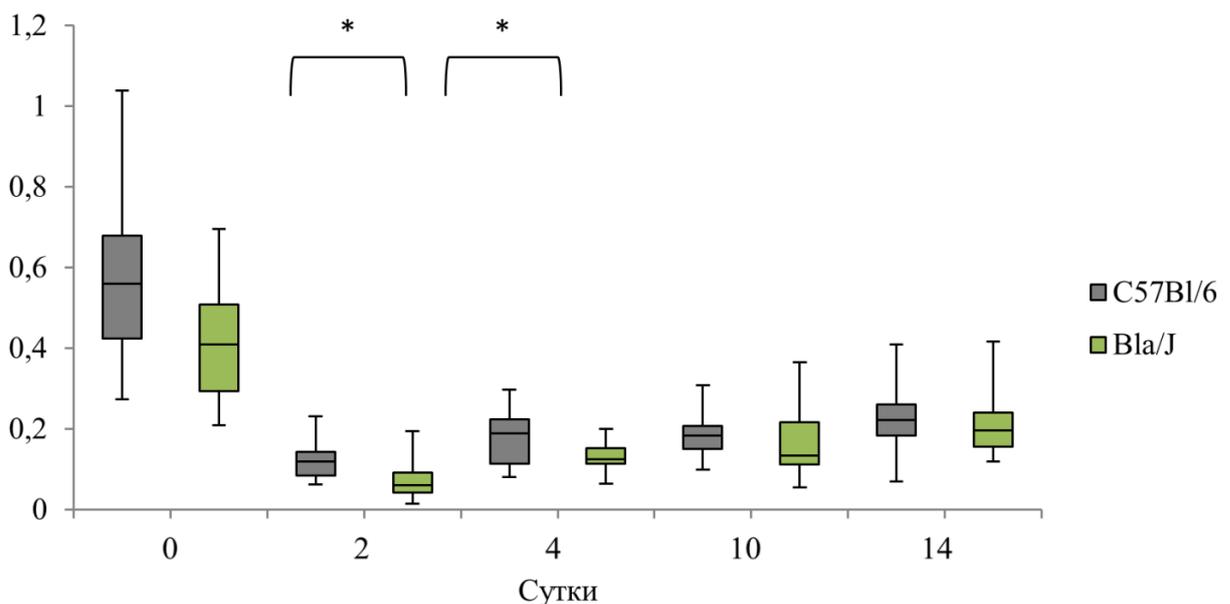


Рисунок 71 – «Сосудистая плотность» икроножной мышцы после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

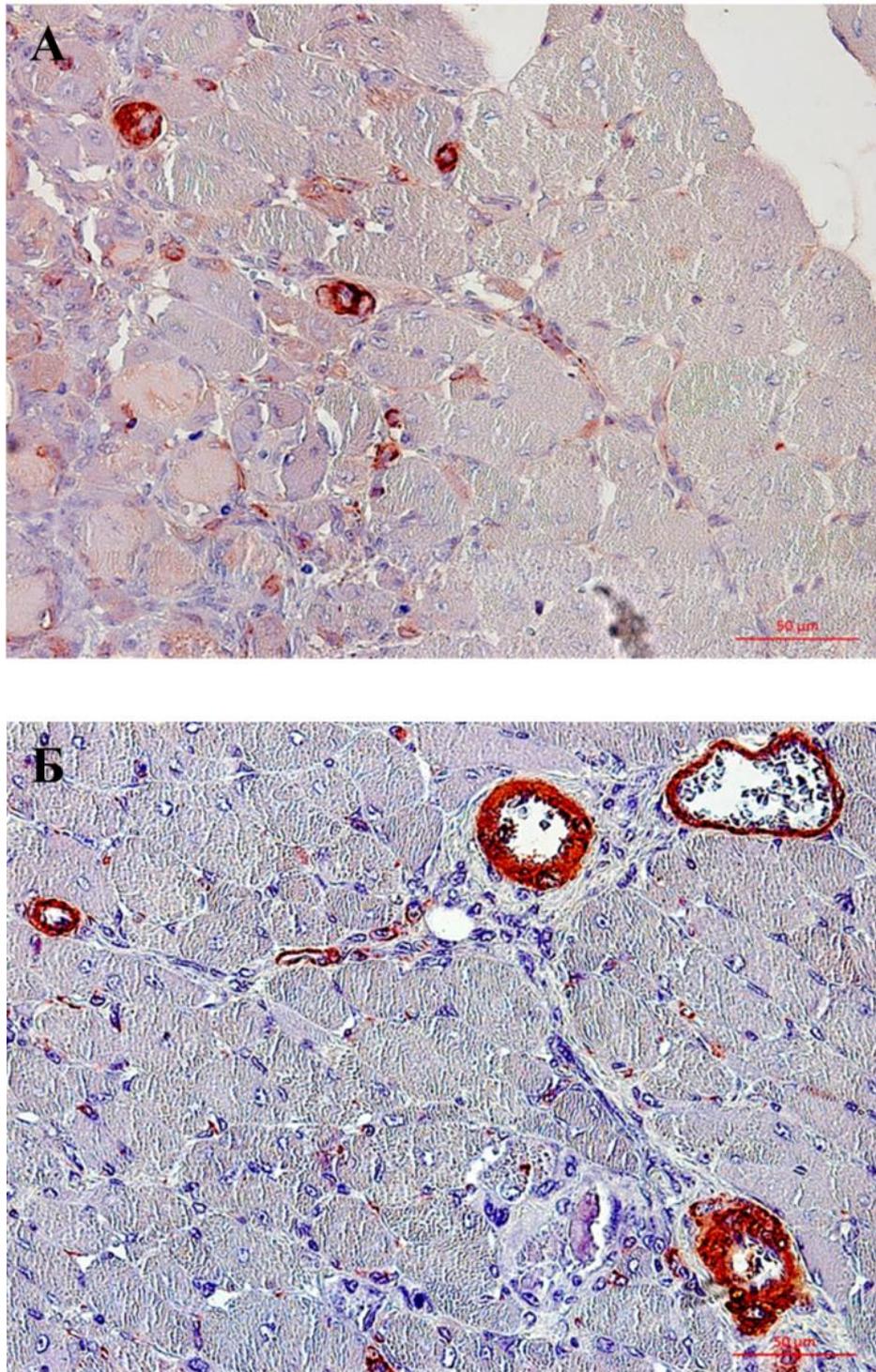


Рисунок 72 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Bla/J (А) и С57В1/6 (Б), 10 сут. после повреждения новокаином. ИГХ реакция с Ат к α -SMA. Докраска: гематоксилин. Ув.: $\times 400$

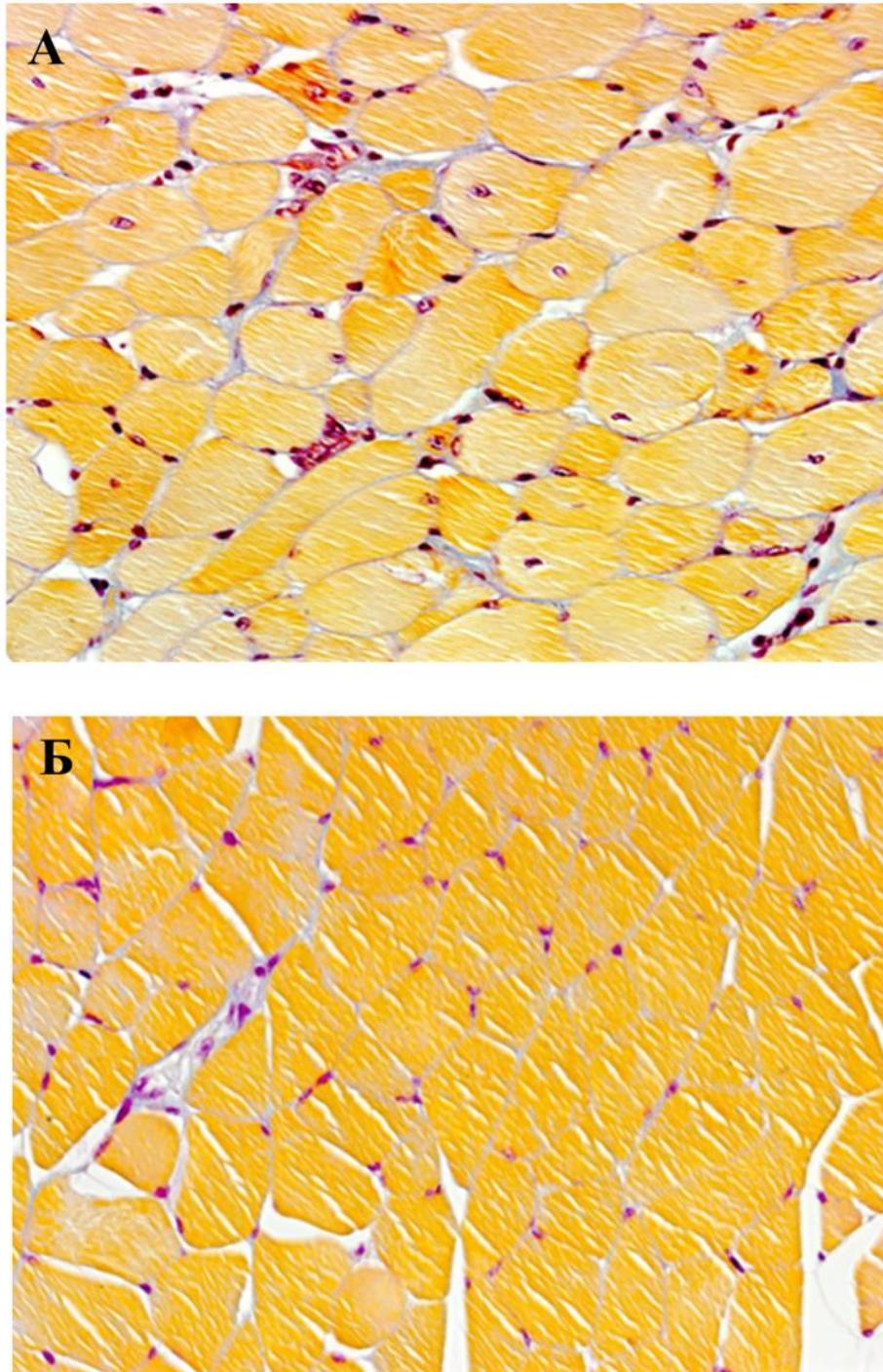


Рисунок 73 – Срезы икроножной мышцы мышей линий Vla/J (А) и C57Bl/6 (Б), 4 сут. после повреждения новокаином. Окраска: по Маллори. Ув.: ×400

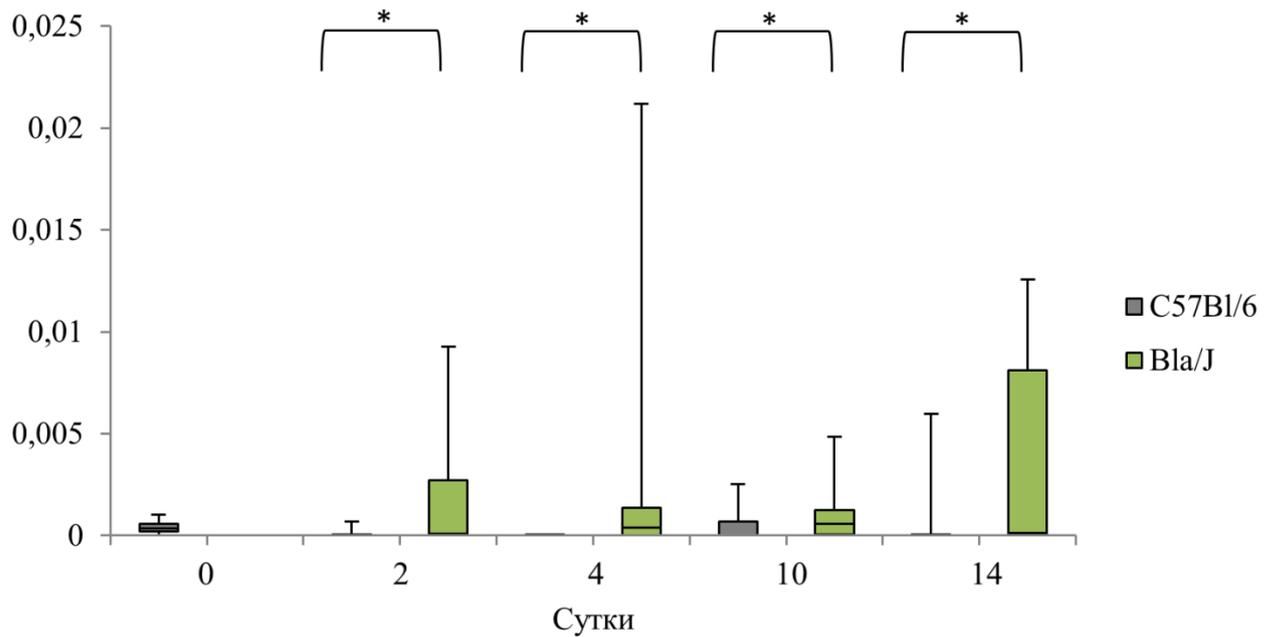


Рисунок 74 – Доля соединительной ткани в икроножной мышце у мышей линий B1a/J и C57Bl/6 после повреждения новокаином, * – $p < 0,05$

Различия в доле соединительной ткани (СТ) хоть и были статистически достоверны во всех изучаемых сроках, однако едва превышали 0,05% у мышей B1a/J (максимум 0,06 (0,01; 0,12)% на 10 сут., рисунки 73, 74). Таким образом, внутримышечное введение новокаина не оказывает фиброзирующего влияния на скелетные мышцы изучаемых линий мышей в первые 14 сут. после инъекции.

Результаты описанной исследовательской 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 замедленны, 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. Стоит принимать во внимание, что экспрессия дисферлина при описываемой патологии отсутствует не только в мышечных волокнах, но и в других компонентах мышц: эндотелии

сосудов, макрофагах, что, вероятно, способствует более длительному по сравнению с контролем воспалительному ответу в ответ на острое повреждение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репаративному гистогенезу скелетных мышц посвящен ряд научных работ советских и российских гистологов (А.А. Клишова, Р.К. Данилова, И.А. Одинцовой, В.В. Валиуллина, А.П. Киясова и др.). Подробно описаны события, происходящие в мышечном регенерате под воздействием различных повреждающих факторов. Была показана пластичность скелетной мышечной ткани. Были изучены камбиальные резервы скелетных мышц, а также определено, что репаративный гистогенез поперечнополосатой скелетной мышечной ткани повторяет события эмбрионального гистогенеза [1, 2, 5, 6, 12-17, 21, 22]. Полученные данные позволили создать прочную базу теоретических и практических знаний, основываясь на которых была спланирована и проведена настоящая работа. Несмотря на то, что описанию репаративных процессов в поперечнополосатой скелетной мышечной ткани посвящены значимые монографии, а истории изучения этих процессов уже более 150 лет [230, 234, 251], вопрос «мутантного» рабдомиогистогенеза остается открытым [8, 9], а исследования в этом направлении только начинаются и приобретают все большее значение.

В связи с развитием генных и клеточных технологий крайне важно понимание процессов регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани при наследственной мышечной патологии как с точки зрения изучения их патофизиологии (гистофизиологии), так и для разработки способов таргетной терапии. В связи с отсутствием достаточных данных об изменении скелетных мышц на протяжении онтогенеза у мутантных мышей, а также отсутствием данных о реактивности скелетных мышц в условиях мутации в гене *DYSF* целью данного исследования стало определить особенности онтогенетического и репаративного рабдомиогенеза поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мышей с дефицитом дисферлина.

Для достижения поставленной цели были изучены структура и ультраструктура поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мышей линии

Vla/J и мышей дикого типа в ходе их постнатального онтогенеза, а также описана последовательность событий, происходящих при химически индуцированном повреждении скелетных мышц.

Было проведено ультраструктурное исследование состояния икроножной мышцы, медиальной широкой мышцы бедра и диафрагмы мышцей линии Vla/J в возрастах 1, 20 сут., 3, 12 мес. жизни, соответствующие 4 периодам онтогенеза мышцей согласно классификации В.Г. Макарова [32]. Первые дегенеративные изменения в поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мутантных мышцей были выявлены на электронномикроскопическом уровне с 1 сут. жизни (в то время как изменения на светооптическом уровне были выявлены со 2 мес. жизни) и проявлялись в виде нарушения целостности сарколеммы и вакуолизации саркоплазмы. На последующих сроках жизни мышцей с дисферлинопатией дегенеративные изменения были выявлены в митохондриях (слияние, полиморфизм, просветление матрикса, вакуолизация), сократительном аппарате МВ (дезорганизация Т-трубочек, разрывы и истончение миофибрилл), ядре (высокая складчатость, появление включений). Было обнаружено скопление макрофагов в скелетной мышечной ткани и большое количество коллагеновых волокон в соединительнотканном матриксе, что является проявлениями развития воспалительного процесса и последующего фиброза, соответственно. Примечательно, что миосателлитоциты были обнаружены в скелетных мышцах мышцей сенильного возраста, следовательно, камбиальный резерв в условиях прогрессирующей гибели МВ остается в определенной степени сохранным. Нельзя исключить, что эта особенность характерна только для изученной линии мышцей.

При патогистологическом анализе процессов, протекающих в постнатальном онтогенезе, был выявлен ряд различий между двумя изучаемыми линиями мышцей и закономерностей в динамике изучаемых показателей. Доля некротизированных МВ была выше у мышцей линии Vla/J во всех изучаемых сроках и, начиная с 9 мес. жизни, этот показатель возрастал, что свидетельствует о «срыве» компенсаторных механизмов ППСМТ, которые обеспечивались гипертрофией сохранных МВ и пулом миосателлитоцитов. Средняя площадь поперечного сечения МВ была

достоверно выше начиная со 2 мес. жизни у животных с мутацией в гене *DYSF*, но с 9 мес. показатель, наоборот, был выше в контрольной группе. Почти на всех изучаемых сроках доля миогенин-позитивных ядер была ниже у мышей линии Vla/J. Это можно трактовать возможным снижением (но не полным исчезновением) пула миосателлитоцитов, активированных в условиях постоянной альтерации и воспаления в поперечнополосатой скелетной мышечной ткани.

Таким образом, постнатальный гистогенез поперечнополосатой скелетной мышечной ткани в условиях генетически обусловленного дефицита дисферлина характеризуется более высокой долей некротизированных МВ, компенсаторной гипертрофией МВ с последующей их атрофией, снижением пролиферативной активности и уровня миогенной дифференцировки миогенных клеток-предшественниц по сравнению с мышами дикого типа. Из этого следует, что дисферлин выполняет ключевую роль в поддержании гомеостаза МВ путем участия в физиологической регенерации.

Установлено, что с 5 мес. жизни показатель сосудистой плотности был выше у мышей линии C57Bl/6 и оставался выше до последнего изучаемого возраста – 18 мес. Было выявлено повышение доли стромального компонента у мышей линии Vla/J на протяжении жизни. Из вышесказанного можно заключить, что в условиях отсутствия дисферлина изменения затрагивают не только МВ, но и другие клеточные диффероны, присущие скелетной мышце как органу.

Для изучения реактивности скелетной мышечной ткани была выбрана химическая модель повреждения, т.к. она позволяет точно дозировать объем повреждающего агента и прецизионно вводить его внутримышечно. При патогистологическом исследовании скелетных мышц мышей двух линий после локального введения 0,5% р-ра новокаина было выявлено, что репаративный гистогенез в условиях отсутствия дисферлина проходит те же стадии, что и в нормальной мышечной ткани, однако с некоторыми отличиями: альтерация протекает интенсивнее с большей долей некроза, процессы восстановления замедленны, пролиферативная активность снижена, дифференцировка отсроченная [30]. Эти процессы обусловлены еще и тем, что естественное течение

мышечной дистрофии создает неблагоприятные условия для восстановления скелетных мышц после острого повреждения. Следует принимать во внимание, что синтез дисферлина при мутациях в гене *DYSF* отсутствует не только в МВ, но и в других клеточных типах скелетных мышц: эндотелии сосудов и макрофагах, что, вероятно, способствует более длительному по сравнению с контрольной группой воспалительному ответу при повреждении.

Было установлено, что в условиях напряженно протекающей физиологической и репаративной регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мышей *Bla/J* химическое повреждение мышцы приводит к снижению пролиферации эндотелиоцитов и, следовательно, васкуляризации у мышей линии *Bla/J*, снижению пролиферации клеток стромы и увеличению, вероятно, за счет синтетических процессов, фиброза в месте повреждения по сравнению с мышами дикого типа [33]. Из вышесказанного следует, что отсутствие дисферлина в реактивно измененной поперечнополосатой скелетной мышечной ткани замедляет не только скорость репаративной регенерации МВ, но и компонентов стромального и сосудистого дифферонов скелетной мышцы.

Таким образом, белок дисферлин вносит существенный вклад в постоянно протекающие процессы постнатального гистогенеза и регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани. В отсутствии экспрессии продукта гена снижается не только репаративная способность сарколеммы и, как результат, развивается некроз с формированием очагов воспаления, 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, так как они отражают количественную оценку событий, развивающихся во всех клеточных дифферонах в составе скелетных мышц.

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 у мышей Vla/J обширный химический некроз мышцы приводит к снижению васкуляризации 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 мышцы 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 дислипидопатий, поскольку учитывает изменения не только миогенного, но и других дифференсов в составе поперечнополосатой скелетной мышечной ткани, а также позволяет провести количественную оценку изменений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ат – антитела

АЭК – аминоэтилкарбазол

ГЭ – гематоксилин и эозин

ИГХ – иммуногистохимия

ИП – индекс пролиферации

ИФ – иммунофлуоресценция

КК – креатинкиназа

МВ – мышечное волокно

МГ53 – митсугмин 53

МСЦ – миосателлиты

ПКМД2В – поясно-конечностная мышечная дистрофия, тип 2В

ППСМТ – поперечнополосатая скелетная мышечная ткань

СПР – саркоплазматический ретикулум

СТ – соединительная ткань

ЦЯМВ – центральоядерные мышечные волокна

ANGPT – ангиопоэтин (angiotensinogen-converting enzyme)

HGF – фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor)

IGF-1 – фактор роста инсулина-1 (insulin growth factor-1)

МНС – тяжелые цепи миозина (myosin heavy chains)

СОХ – циклооксигеназа (cyclooxygenase)

НIER – раскрытие эпитопов, индуцируемое нагреванием (heat-induced epitope retrieval)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Валиуллин В.В. Влияние тироксина на фенотип интактных и денервированных скелетных мышц морской свинки / В.В. Валиуллин, Н.П. Резвяков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1983. – Т. 96. – № 9. – С. 38-40.
2. Валиуллин В.В. Нейротрофический контроль синтеза миозинов медленной мышцы морской свинки / В.В. Валиуллин, Р.Р. Исламов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1991. – Т.111. – № 2. – С. 201-203.
3. Гистология (введение в патологию): учебник. / [Улумбеков Э. Г. и др.]; под ред. Э. Г. Улумбекова. – М.: Гэотар Медицина, 1997. – 950 с.
4. Гистология, эмбриология, цитология: учебник. / [Афанасьев Ю. И. и др.]; под ред. Ю. И. Афанасьева. – 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2012. – 800 с.
5. Данилов Р.К. Морфология раневого процесса / Р.К. Данилов // Морфология. – 1993. – Т. 104. – № 1-2. – С. 149.
6. Данилов, Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы / Р.К. Данилов. – СПб.: ВМедА им. С.В. Кирова, 2008. – 308 с.
7. Данилов Р.К. Руководство по гистологии./ [Данилов Р. К. и др.]; под ред. Р.К. Данилова. – СпецЛит Россия, 2011. – 768 с.
8. Деев Р.В. Вызовы, стоящие перед современной гистологией / Р.В. Деев // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 96-97.
9. Деев Р.В. Об удовлетворенности преподаванием дисциплины "гистология, эмбриология, цитология" / Р.В. Деев // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 97.
10. Дыбан А.П. Трансгенные млекопитающие в биологии развития / А.П. Дыбан // Онтогенез. – 1989. – 20(6). – С. 577.
11. Заварзин А.А. Основы сравнительной гистологии: учеб. пособие для спец. "Биология" / А.А. Заварзин. - Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1985. – 400 с.
12. Исламов Р.Р. Иммуногистохимическое изучение m. Lumbrikalis крысы в разные сроки ишемии после аллотрансплантации в переднюю камеру глаза / Р.Р. Исламов, А.П. Киясов, В.В. Валиуллин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1991. – Т. 112. – № 11. – С. 545-546.

13. Исламов Р.Р. Необратимые ишемические повреждения в скелетной мышце отсеченной конечности, зависящие от продолжительности ишемии и температуры / Р.Р. Исламов, А.П. Киясов // Морфология. – 1994. – Т. 106. – С. 145-150.
14. Исламов Р.Р. Нейротрофический контроль пластичности скелетной мышцы млекопитающих / Р.Р. Исламов, В.В. Валиуллин // Неврологический вестник. – 2014. – Т. 46. – № 3. – С. 56-64.
15. Киясов А.П. Регенерация скелетной мышцы крысы после внутримышечной инъекции новокаина / А.П. Киясов, А.А. Гумерова, С.В. Фомин // Тезисы Межвузовской научной конференции «Морфология раневого процесса», С-Петербург, 1992.
16. Клишов А.А. Процессы пролиферации и дифференциации в гистогенезе скелетной мышечной ткани у человека / А.А. Клишов, Р.К. Данилов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. –1980. – № 7. – С. 37.
17. Клишов, А.А. Гистогенез и регенерация тканей / А.А. Клишов. - Л.: Медицина, 1984. – 232 с.
18. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
19. Кумар В. Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану / Кумар В., Аббас А.К., Фаусто Н., Астер Дж. К.; пер. с англ.; под ред. Е.А. Коган, Р.А. Серова, Е.А. Дубовой, К.А. Павлова. В 3 т. Том 1: главы 1-10. - М.: Логосфера, 2016. – 624 с.
20. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники.-Л.: Медгиз, 1961. – 340 с.
21. Одинцова И.А. Миосателлитоциты-камбиальный резерв поперечнополосатой мышечной ткани / И.А. Одинцова, М.Н. Чепурненко, А.С. Комарова // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 2-14.
22. Одинцова И.А. Регенерационный гистогенез в кожно-мышечной ране (экспериментально-гистологическое исследование): диссертация на соискание степени д-ра мед. наук: 03.00.25 / Одинцова Ирина Алексеевна; [Воен.-мед. Академия им. С.М. Кирова] – СПб, 2004. – 404 с.

23. Озернюк Н.Д. Сателлитные клетки мышечной системы и регуляция восстановительного потенциала мышц / Н.Д. Озернюк, О.В. Балан // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2007. – № 6. – С. 650-660.
24. Резвяков, Н.П. Морфометрическое и гистохимическое изучение «трофического» влияния нервов на скелетные мышцы и вкусовые луковицы: Автор. дис. к.м.н. / Н.П. Резвяков; Казань, 1973. -22с.
25. Резвяков Н.П. Общие закономерности дифференцировки и пластичности скелетных мышц: Автореф. дис. д-ра мед. наук. - Казань, 1982.- 251с.
26. Ромейс Б. Патогистологическая техника / Б.Ромейс. – М., 1953. – 650 с.
27. Румянцев П.П. Ультраструктура клеток и синтез ДНК при регенерации скелетных мышц / П.П. Румянцев, Е.В. Дмитриева, Н.В. Сеина // Цитология. – 1977. – Т. 19, № 12. – С. 1333-1339.
28. Саркисов, Д.С. Регенерация и ее клиническое значение / Д.С. Саркисов. - М.: Медицина, 1979. – 284 с.
29. Старостина И.Г. Создание рекомбинантного аденовируса, кодирующего кодон-оптимизированный ген дисферлина, и анализ экспрессии рекомбинантного белка в культуре клеток *in vitro* / И.Г. Старостина, В.В. Соловьева, К.Г. Шевченко, Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.А. Ризванов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7, №3. – С.25-28
30. Студитский А.Н. Восстановление органов и тканей живого организма. Стенограмма публичной лекции. Изд. «Знание», Москва, 1952. – 40 с.
31. Студитский А.Н. Трансплантация мышц у животных. – М.:Медицина, 1977. – 248 с.
32. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. Под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. СПб. Изд. Лема, 2013. – 116 с.
33. Чернова О.Н. Реактивные изменения элементов стромально-сосудистых дифферонов поперечнополосатой скелетной мышцы после повреждения новокаином в условиях дефицита дисферлина / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев,

- А.П. Киясов, И.Я. Бозо, Р.В. Деев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2020. - 11(170). – С. 646-650.
34. Чернова О.Н. Репаративный рабдомиогенез у мышей, мутантных по гену DYSF / О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, А.К. Зейналова и др. // Гены и Клетки. – 2019. – №2. – С. 32-39.
35. Чернова О.Н. Экспериментальные модели для изучения регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани / О.Н. Чернова, И.Н. Корсаков, Д.П. Самчук и др. // Гены и Клетки. – 2015. – №4. – С. 127-140.
36. Шубникова Е. А. Мышечные ткани. Под ред. Ю. С. Ченцова. М.: Медицина, 2001. — 240 с.
37. Aasen T. Dysferlin-Deficient Muscular Dystrophy Identified Through Laboratory Testing for Elevated Aminotransferases / T. Aasen, H. Achdjian, Y. Usta Y etc. // ACG Case Rep J. – 2016. – №3 (2). – P. 127-129.
38. Abdullah N. Quantitation of the Calcium and Membrane Binding Properties of the C2 Domains of Dysferlin / N. Abdullah, M. Padmanarayana, N. J. Marty, C. P. Johnson // Biophysical Journal. – 2014. – №106 (2). – P. 382-389.
39. Abou-Khalil R. Autocrine and paracrine angiopoietin 1/Tie-2 signaling promotes muscle satellite cell self-renewal / R. Abou-Khalil, F. Le Grand, G. Pallafacchina et al. // Cell stem cell. – № 5. – P. 298-309.
40. Agbulut O. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice / O. Agbulut, P. Noirez P, F. Beaumont et al. // Biol Cell. – 2003. – №95. – P. 399-406.
41. Ampong B.N. Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor / B.N. Ampong, M. Imamura, T. Matsumiya, M. Yoshida et al. // Acta Myol. – 2005. – 24. – P. 134-144.
42. Andermarcher E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis / E. Andermacher, M. Surani, Gherardi, E. // Dev. Genet. – 1996. – №18. – P. 254-266.
43. Anderson L.V. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development / L.V. Anderson, J.A. Moss, C. Young, M.J. Cullen et al. // Hum Mol Genet. – 1999. – 8 (5). – P. 855-861.

44. Aoki M. Dysferlinopathy / M. Aoki // GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. – 2004. PMID: 20301480
45. Aoki M. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy / M. Aoki, J. Liu, I. Richard et al. // Neurology. – 2001. – 57. – P. 271-278.
46. Armulik A. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises / A. Armulik, G. Genove, C. Betsholtz // Dev Cell – 2011. – №21. – P. 193-215.
47. Arnold L. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis / L. Arnold, A. Henry, F. Poron et al. // J Exp Med. – 2007. – №204. – P. 1057-1069.
48. Azakir B.A. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle / B.A. Azakir, S. Di Fulvio, C. Therrien, M. Sinnreich // PLoS ONE. – 2010. – №5 (4). – e10122.
49. Babai F. Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos I. Skeletal muscle / F. Babai, J. Musevi-Aghdam, W. Schurch et al. // Differentiation. 1990. – №44. – P. 132-142.
50. Baek J.H. Dysferlinopathy Promotes an Intramuscle Expansion of Macrophages with a Cyto-Destructive Phenotype / J.H. Baek, G.M. Many, F.J. Evesson et al. // Am. J. Pathol. – 2017. – №187 (6). – P. 1245-1257.
51. Bailey P. The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult / P. Bailey, T. Holowacz, A.B. Lassar // Current Opinion in Cell Biology. – 2001. – №13 (6). – P. 679-689.
52. Bakkar N. IKK/NF- κ B regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis / N. Bakkar, J. Wang, K.J. Ladner et al. // J Cell Biol. – 2008. – 180. – P. 787-802.
53. Bansal D. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy / D. Bansal, K.P. Campbell // Trends Cell Biol. – 2004. – №14 (4). – P. 206-213.
54. Berkes C. A. MyoD and the transcriptional control of myogenesis / C.A. Berkes, S.J. Tapscott // Semin. Cell Dev. Biol. – 2005. – №16. – P. 585-595.

55. Berry S.E. Multipotential mesoangioblast stem cell therapy in the mdx/utrn^{-/-} mouse model for Duchenne muscular dystrophy / S.E. Berry, J. Liu, E.J. Chaney, E.J. et al. – Regenerative medicine. – 2007. – №2. – P. 275-288.
56. Birchmeier C. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells / C. Birchmeier, H. Brohmann // Curr Opin Cell Biol. – 2000. – P. 725-730.
57. Biressi S. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development / S. Biressi, M. Molinaro, G. Cossu // Dev. Biol. – 2007. – №308. – P. 281-293.
58. Bober E. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells / E. Bober, T. Franz, H. Arnold et al. // Development. – 1994. – №120. – P. 603-612
59. Bondesen B.A. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration / B.A. Bondesen, S.T. Mills, K.M. Kegley et al. // Am J Physiol Cell Physiol. – 2004. – №287. – P. 475-483.
60. Borgonovo B. Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system / B. Borgonovo, E. Cocucci, G. Racchetti et al. // Nat. Cell Biol. – 2002. – №4. – P. 955-962.
61. Boucher E. Plasma membrane and cytoskeleton dynamics during single-cell wound healing / E. Boucher, C.A. Mandato // Biochim Biophys Acta. – 2015. – №1853 – P. 2649-2661.
62. Brüss M. Dysferlinopathy as an extrahepatic cause for the elevation of serum transaminases / M. Brüss, J. Homann, G.J. Molderings // Med Klin. – 2004. – №99 (6). – P. 326-329.
63. Buckingham M. The formation of skeletal muscle: from somite to limb / M. Buckingham, L. Bajard, T. Chang et al. // J Anat. – 2003. – №202 (1). – P. 59–68.
64. Bushby, K.M. Dysferlin and muscular dystrophy / K.M. Bushby // Acta Neurol Belg. – 2000. – №100 (3). – P. 142-145.
65. Cacciottolo M. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations / M. Cacciottolo, G. Numitone, S. Aurino et al. // European Journal of Human Genetics. – 2011. – №19 (9). – P. 974-980.

66. Cacciottolo M. Reverse engineering gene network identifies new dysferlin-interacting proteins / M. Cacciottolo, V. Belcastro, S. Laval et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – №286. – P. 5404-5413.
67. Cadot B. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3 / B. Cadot, V. Gache, E. Vasyutina et al. // *EMBO Rep.* – 2012. – №13 (8). – P. 741-744.
68. Cai C. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin / C. Cai, N. Weisleder, J.K. Ko et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – 284. – P. 15894-15902.
69. Cai C. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery / C. Cai, H. Masumiya, N. Weisleder et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – №11. – P. 56-64.
70. Campbell, C.P. Dysferlin and muscle membrane repair / C.P. Campbell, R. Han // *Curr Opin Cell Biol.* – 2007. – №19 (4). – P. 409-416.
71. Canepari M. Actin sliding velocity on pure myosin isoforms from dystrophic mouse muscles / M. Canepari, R. Rossi, O. Pansarasa et al. // *Muscle Nerve.* – 2009. – №40. – P. 249-256.
72. Cezanne L. Organization and dynamics of the proteolipid complexes formed by annexin V and lipids in planar supported lipid bilayers / L. Cezanne, A. Lopez, F. Loste et al. // *Biochemistry* – 1999. – №38. – P. 2779-2786.
73. Chal J. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro / J. Chal, O. Pourquie // *Development.* – 2017. – 144(12). – P. 2104-2122.
74. Chal J. Recapitulating early development of mouse musculo-skeletal precursors of the paraxial mesoderm in vitro / J. Chal, Z. Tanoury, M. Oginuma, M. et al. // *BioRxiv.* – 2018. — №145 (6). – P. 1-15.
75. Chargé S.B. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration / S.B. Chargé, M.A. Rudnicki // *Physiol Rev.* – 2004. – №84 (1). – P. 209-238.
76. Chevallier A. Role of the somitic mesoderm in the development of the thorax in bird embryos. II. Origin of thoracic and appendicular musculature / A. Chevallier // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – №49. – P. 73-88.

77. Chiu Y.H. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy // Y.H. Chiu, M.A. Hornsey, L. Klinge et al. // *Hum Mol Genet.* – 2009. – №18 (11). – P. 1976-1989.
78. Christ B. Early stages of chick somite development / B. Christ, C.P. Ordahl // *Anat Embryol (Berl).* – 1995. – №191 (5). – P. 381-396.
79. Ciciliot S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications / S. Ciciliot, S. Schiaffino // *Curr Pharm Des.* 2010. – №16 (8). – P. 906-914.
80. Cocucci E. Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both / E. Cocucci, G. Racchetti, P. Podini, J. Meldolesi // *Traffic.* – 2007. – №8. – P. 742-757.
81. Cocucci E. Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a non-acidic route / E. Cocucci, G. Racchetti, P. Podini et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – 15. – P. 5356-5368.
82. Cohen T. Myogenesis in dysferlin-deficient myoblasts is inhibited by an intrinsic inflammatory response / T. Cohen, T. Partridge // *Neuromuscul Disord.* – 2012. – №22 (7). – P. 648-658.
83. Collins J. Congenital muscular dystrophies: toward molecular therapeutic interventions / J. Collins, C.G. Bonnemann // *Curr Neurol Neurosci.* – 2010. – №10. – P. 83-91.
84. Conboy I.M. The regulation of Notch signaling controls cell activation cell fate determination in postnatal myogenesis / I.M. Conboy, T.A. Rando // *Dev. Cell.* – 2002. №3. – P. 380-392.
85. Cooper S.T. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology / S.T. Cooper, P.L. McNeil // *Physiol Rev.* – 2015. – №95 (4). – P. 1205-1240.
86. Cornelison D.D. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells / D.D. Cornelison, B.J. Wold // *Dev Biol.* – 1997. – №191. – P. 270-283.

87. Cornely R. Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signaling / R. Cornely, C. Rentero, C. Enrich et al. // *IUBMB Life*. – 2011. – №63. – P. 1009-1017.
88. Cossu G. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect / G. Cossu, R. Kelly, S. Di Donna et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – №92. – P. 2254-2258.
89. d'Albis. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals / A. d'Albis, L. Brocca, O. Pansarasa et al. // *Eur J Biochem*. – 1988. – №174 (1). – P. 103-110.
90. d'Antona G. Structural and functional alterations of muscle fibres in the novel mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy / G. d'Antona, L. Brocca, O. Pansarasa et al. // *J Physiol*. – 2007. – №584. – P. 997-1009.
91. Davenport HA. *Histological and Histochemical Technics*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1960.
92. Davis D.B. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains / D.B. Davis, K.R. Doherty, A.J. Delmonte, E.M. McNally // *J Biol Chem*. – 2002. – №277 (25). – P. 22883-22888.
93. Davis Larry E. Experimental influenza B viral myositis / E. Davis Larry, M. Kornfeld // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2001. – №187. – P. 61-67.
94. Dawkins-Hall L.S. Novolink Kit IHC Protocol. January 2012
DOI:10.13140/RG.2.2.32037.50402
95. de Luna N. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro" / N. de Luna, E. Gallardo, M. Soriano et al. // *J Biol Chem*. – 2006. – №281 (25). – P. 17092-17098.
96. de Morrée, A. Dysferlin regulates cell adhesion in human monocytes / A. de Morrée, B. Flix, I. Bagaric et al. // *J Biol Chem*. – 2013. – №288 (20). – P. 14147-14157.
97. Defour A. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion / A. Defour, J.H. Van der Meulen, R. Bhat et al. // *Cell Death Dis*. – 2014. – №5. – e1306.

98. Deguchi S. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells / S. Deguchi, M. Sato // *Biorheology*. – 2009. – №46. – P. 93-105.
99. Di Fulvio S. Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation // S. Di Fulvio, B.A. Azakir, C. Therrien, M. Sinnreich // *PLoS ONE*. – 2011. – №6 (12). – e28563.
100. Diaz-Manera J. Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy / J. Diaz-Manera, T. Touvier, A. Dellavalle et al. // *Cell death & disease*. – 2020. – №1. – e61.
101. Doherty K.R. Normal myoblast fusion requires myoferlin / K.R. Doherty, A. Cave, D.B. Davos et al. // *Development*. – 2005. – №132 (24) – P. 5565-5575.
102. Donato R. Functions of S100 proteins / R. Donato, B.R. Cannon, G. Sorci et al. // *Curr. Mol. Med.* – 2013. – №13. – P. 24-57.
103. Draeger A. Ceramide in plasma membrane repair / A. Draeger, E.B. Babiychuk // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2013. – №216. – P. 341-353.
104. Durbeej M. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models / M. Durbeej, K.P. Campbell K.P // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – №12 (3). – P. 349-361.
105. Emans N. Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles / N. Emans, J.P. Gorvel, C. Walter et al. // *J. Cell Biol.* – 1993. – №120. – P. 1357-1369.
106. Endo T. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion / T. Endo // *Bone*. – 2015. – №80. – P 2-13.
107. Evesson F.J. Reduced Plasma Membrane Expression of Dysferlin Mutants Is Attributed to Accelerated Endocytosis via a Syntaxin-4-associated Pathway / F.J. Evesson, R.A. Peat, A. Lek, et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – №285 (37). – P. 28529-28539.
108. Feinstein B. Morphological studies of motor units in normal human muscles / B. Feinstein, B. Lindegrd, E. Nyman, G. Wohlfart // *Acta Anat*, – 1955. – №23. – P. 127-142.

109. Fernandes T.L. Muscle injury – physiopathology, diagnosis, treatment and clinical presentation / T.L. Fernandes, A. Pedrinelli, A.H. Hernandez // *Rev. Bras. Ortop.* – 2011. – №46 (3). – P. 247-255.
110. Ferrari G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors / G. Ferrari, M.G. Cusella-De Angelis, M. Coletta et al. // *Science.* – 1998. – №279. – P. 1528-1530.
111. Fidziańska A. Human ontogenesis. I. Ultrastructural characteristics of developing human muscle / A. Fidziańska // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 1980. – №39 (4). – P. 476-486.
112. Foster A.H. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers / A.H. Foster, B.M. Carlson // *Anesth. Analg.* – 1980. – №59 (10). – P. 727-736.
113. Fougousse F. The muscle-specific enolase is an early marker of human myogenesis / F. Fougousse, F. Edom-Vovard, T. Merkulova, et al. // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 2001. – №22. – P. 535-544.
114. Frenette J. Complement activation promotes muscle inflammation during modified muscle use / J. Frenette, B. Cai, J.G. Tidball // *Am J Pathol.* – 2000. – №156. – P. 2103-2110.
115. Frontera W.R. Skeletal muscle: a brief review of structure and function / W.R. Frontera, J. Ochala // *Calcif Tissue Int.* – 2015. – №96 (3). – P. 183-95.
116. Furst D.O. Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly / D.O. Furst, M. Osborn, K. Weber // *J. Cell Biol.* – 1989. – №109. – P. 517-527.
117. Galli R. Skeletal Myogenic Potential of Adult Neural Stem Cells / R. Galli, U. Borello, A. Gritti et al. // *Nature Neurosci.* – 2000. – №3. – P. 986-991.
118. Gilbert-Honick J. Vascularized and Innervated Skeletal Muscle Tissue Engineering / J. Gilbert-Honick, W. Grayson // *Adv Healthc Mater.* – 2020. – 9(1). – e1900626.
119. Gilroy D.W. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties / D.W. Gilroy, P.R. Colville-Nash et al. // *Nat Med.* – 1999. – №5. – P. 698-701.

120. Gnocchi V. Further Characterization of the Molecular Signature of Quiescent and Activated Mouse Muscle Satellite Cells / V. Gnocchi, R. White, Y. Ono et al. // *PLoS One*. – 2009. – №4 (4). – e5205.
121. Goebel H.H. Muscle Disease: Pathology and Genetics / H.H. Goebel, C.A. Sewry, R.O. Weller // Wiley. Second edition, 2013. – 111 p.
122. Gozen I. Pore dynamics in lipid membranes / I. Gozen, P. Dommersnes // *Eur Phys J Spec Top*. – 2014. – №223. – P. 1813-1829.
123. Gros J. A two-step mechanism for myotome formation in chick / J. Gros, M. Scaal, C. Marcelle // *Dev. Cell*. – 2004. – №6. – P. 875-882.
124. Grounds M.D. Lipid accumulation in dysferlin-deficient muscles / M.D. Grounds, J.R. Terrill, H.G. Radley-Crabb et al. // *Am. J. Pathol*. – 2014. – №184 (6). – P. 1668-1676.
125. Guesdon J.L. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques / J.L. Guedson, T. Ternynck, S. Avrameas et al. // *J Histochem Cytochem*. – 1979. – 27(8). – P. 1131-9.
126. Han W.Q. Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells / W.Q. Han, M. Xia, M. Xu et al. // *Journal of Cell Science*. – 2012. – №125 (5). – P. 1225-1234.
127. Hasty P. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene / P. Hasty, A. Bradley, J.H. Morris et al. // *Nature*. – 1993. – №364. – P. 501-506.
128. Hayat M. Basic Techniques For Transmission Electron Microscopy 1st Edition. Academic Press, 1986 – Science – 411.
129. Hirata H. Non-channel mechanosensors working at focal adhesion-stress fiber complex / H. Hirata, H. Tatsumi, K. Hayakawa, M. Sokabe // *Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol*. – 2015. – №467. – P. 141-155.
130. Hornsey M.A. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models / M.A. Hornsey, S.H. Laval, R. Barresi et al. // *Neuromuscular Disorders*. – 2013. – №23 (5). – P. 377-387.

131. Horst D. Comparative expression analysis of Pax3 and Pax7 during mouse myogenesis / D. Horst, S. Ustanina, C. Sergi et al. // *Int. J. Dev. Biol.* – 2006. – №50. – P. 47-54.
132. Huang Y. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle / Y. Huang, A. de Morree, A. van Remoortere et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – №17. – P. 1855-1866.
133. Hutcheson D.A. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin / D.A. Hutcheson, J. Zhao, A. Merrell et al. // *Genes Dev.* – 2009. – №23. – P. 997-1013.
134. Izzedine H. Loss of podocyte dysferlin expression is associated with minimal change nephropathy / H. Izzedine, I. Brocheriou, B. Eymard et al. // *Am J Kidney Dis.* – 2006. – №48 (1). – P. 143-150.
135. Jacob M. The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos. An ultrastructural study / M. Jacob, B. Christ, H.J. Jacob // *Anat. Embryol.* – 1979. – №157. – P. 291-309.
136. Jacquot S. Optimizing PCR for Mouse Genotyping: Recommendations for Reliable, Rapid, Cost Effective, Robust and Adaptable to High-Throughput Genotyping Protocol for Any Type of Mutation / S. Jacquot, N. Chartoire, F. Piguet // *Curr Protoc Mouse Biol.* – 2019. – 9(4). – e65.
137. James E.G. The muscle protein dysferlin accumulates in the Alzheimer brain / E.G. James, D. Palamand, J. Strider et al. // *Acta Neuropathol.* – 2006. – №112 (6). – P. 665-671.
138. Johnson C. P. Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion / C.P. Johnson, E. R. Chapman // *J. Cell Biol.* – 2010. – №191. – P. 187-197.
139. Kakulas B.A. Embryology and histology of skeletal muscle. Diseases of Muscle. Pathological Foundations of Clinical Myology, 4th ed. / B.A. Kakulas, R.D. Adams // Philadelphia: Harper and Row, 1985. 853 p.
140. Kasper C.E. Skeletal muscle damage and recovery / C.E. Kasper, L.A. Talbot, J.M. Gaines // *AACN Clin Issues.* – 2002. – №13 (2). – P. 237-247.

141. Kato K. Single-cell transplantation determines the time when *Xenopus* muscle precursor cells acquire a capacity for autonomous differentiation / K. Kato, J.B. Gurdon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1993. – №90. – P. 1310-1314.
142. Kay J.G. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes / J.G. Kay, M. Koivusalo, X. Ma et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2012. – №23. – P. 2198-2212.
143. Keller A. Activation of the gene encoding the glycolytic enzyme beta-enolase during early myogenesis precedes an increased expression during fetal muscle development / A. Keller, M.-O. Ott, N. Lamande et al. // *Dev.* – 1992. – №38. – P. 41-54.
144. Kerr J.P. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca^{2+} homeostasis in skeletal muscle / J.P. Kerr, C.W. Ward, R.J. Bloch // *Front Physiol.* – 2014. – №5. – P. 1-5. doi:10.3389/fphys.2014.00089
145. Kerr J.P. Dysferlin stabilizes stress-induced Ca^{2+} -signaling in the transverse tubule membrane / J.P. Kerr, A.P. Ziman, A.L. Mueller et al. // *Proc Natl Acad Sci.* – 2013. – №110 (51). – P. 20831-20836.
146. Kobayashi K. Dysferlin and Animal Models for Dysferlinopathy / K. Kobayashi, T. Izawa, M. Kuwamura, J. Yamate // *Journal of Toxicologic Pathology.* – 2012. – №25 (2). – P. 135-147.
147. Kobayashi K. The distribution and characterization of skeletal muscle lesions in dysferlin-deficient SJL and A/J mice / K. Kobayashi, T. Izawa, M. Kuwamura et al. // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2010. – №62 (5). – P. 509-517.
148. Kostallari E. Pericytes in the myovascular niche promote post-natal myofiber growth and satellite cell quiescence / E. Kostallari, Y. Baba-Amer, S. Alonso-Martin et al. // *Development.* – 2015. – №142. – P. 1242-1253.
149. Krahn M. Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients / M. Krahn, C. Beroud, V. Labelle et al. // *Hum Mutat.* – 2008. – №30. – P. 345-375.
150. Krivickas L.S. Contractile properties of single muscle fibers in myotonic dystrophy / L.S. Krivickas, T. Ansved, D. Suh, W.R. Frontera // *Muscle Nerve.* – 2000. – №23. – P. 529-537.

151. Kwee B.J. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering / B.J. Kwee, D.J. Mooney // *Curr Opin Biotechnol.* – 2017. – 47. – P. 16-22.
152. Lamboley C.R. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle / C.R. Lamboley, R.M. Murphy, M.J. McKenna, G.D. Lamb // *J Physiol.* – 2014. – №592. – P. 1381-1395.
153. Landi F. Sarcopenia: An Overview on Current Definitions, Diagnosis and Treatment / F. Landi, R. Calvani, M. Cesari et al // *Curr Protein Pept Sci.* – 2018. – 19(7). – P. 633-638.
154. Lang C.T. Placental dysferlin expression is reduced in severe preeclampsia / c.T. Lang, K.B. Markham, N.J. et al. // *Placenta.* – 2009. – №30 (8). – P. 711-718.
155. Langen R.C. Tumor necrosis factor- α inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization / R.C. Langen, J.L. Van der Velden, A.M. Schols et al. // *FASEB J.* – 2004. – №18. – P. 227-237.
156. Le Grand F. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis / F. Le Grand, M.A. Rudnicki // *Curr Opin Cell Biol.* – 2007. – №19. – P. 628-633.
157. Lennon N.J. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing / N.J. Lennon, A. Kho, B.J. Bacsikai et al. // *J Biol Chem.* – 2003. – №278 (50). – P. 50466-50473.
158. Liesa M. A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease / M.A. Liesa, M. Palacin, A. Zorzano // *Physiol. Rev.* – 2009. – №89 (3). – P. 799-845.
159. Liu J. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration / J. Liu, D. Saul, K.O. Böker et al. // *Biomed Res Int.* – 2018: 1984879.
160. Liu W. Estimating prevalence for limb-girdle muscular dystrophy based on public sequencing databases / W. Liu, S. Pajusalu, N.J. Lake et al. // *Genet Med.* – 2019. – doi: 10.1038/s41436-019-0544-8.
161. Lostal W. Efficient recovery of dysferlin-deficiency by dual-associated vector-mediated gene transfer / W. Lostal, M. Bartoli, N. Bourg, C. Roudant // *Hum Mol Genet.* – 2010. – №19(10). – P. 1897-1907.

162. Lu H. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair / H. Lu, D. Huang, R.M. Ransohoff, L. Zhou // *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2011. – №25. – P. 3344-3355.
163. Lyons G.E. Alpha-Actin proteins and gene transcripts are colocalized in embryonic mouse muscle / G.E. Lyons, M.E. Buckingham, H.G. Mannherz // *Development*. – 1991. – №111. – P. 451-454.
164. Lyons G.E. The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo / G.E Lyons, M. Ontell, R. Cox, R. et al. // *J. Cell Biol.* – 1990. – №111. – P. 1465-1476.
165. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction // B. Martinac // *J. Cell Sci.* – 2004. – №117. – P. 2449-2460.
166. Marx U. Organotypic tissue culture for substance testing / U. Marx // *J. Biotechnol.* – 2010. – №148 (1). – P. 1-2.
167. Matsuda C. The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72) / C. Matsuda, K. Miyake, K. Kameyama et al. // *PLoS Curr.* – 2012. – №4. – doi: 10.1371/5035add8caff4.
168. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers / A. Mauro // *J Biophys Biochem Cytol.* –1961. – №9 (2). – P. 493.
169. McGreevy J.W. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy / J.W. McGreevy, C.H. Hakim, M.A. McIntosh et al. // *Dis. Model. Mech.* – 2015. – №8 (3). – P. 195-221.
170. McNally E.M. Caveolin-3 in muscular dystrophy / E.M. McNally, E. de Sa Moreira, D.J. Duggan, et al. // *Hum Mol Genet.* – 1998. – №7. – P. 871-877.
171. Mellgren R.L. Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane / R.L. Mellgren, W. Zhang, K. Miyake, P.L. McNeil // *J. Biol. Chem.* – 2007. – №282. – P. 2567-2575.
172. Merly F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation / F. Merly, L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, M.F. Gardahaut // *Muscle Nerve*. – 1999. – №22. – P. 724-732.

173. Messina G. Skeletal muscle differentiation of embryonic mesoangioblasts requires Pax3 activity / G. Messina, D. Sirabella, S. Monteverdee et al. // *Stem Cells*. – 2008. – №27 (1) – P. 157-164.
174. Middel V. Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair / V. Middel, L. Zhou, M. Takamiya et al. // *Nature Communications*. – 2016. – №7. – P. 12875-12886.
175. Miljkovic, N. Aging of Skeletal Muscle Fibers / N. Miljkovic, J.-Y. Lim, MD, I. Miljkovic et al. // *Ann Rehabil Med*. – 2015. – №39 (2). – P. 155-162.
176. Mills S.E. *Histology for Pathologists* / S.E. Mills // Lippincott Williams & Wilkins 2008, 1329 p.
177. Molkenin J.D. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins / J.D. Molkenin, B.L. Black, J.F. Martin, E.N. Olson // *Cell*. – 1995. – №83. – P. 1125-1136.
178. Morley J. E. Pharmacologic Options for the Treatment of Sarcopenia / J.E. Morley // *Calcif Tissue Int*. – 2016. – 98(4). – P. 319-33.
179. Morrison S.J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer / S.J. Morrison, J. Kimble // *Nature*. – 2006. – №441 (7097). – 1068e74.
180. Murphy M. Origin of vertebrate limb muscle: the role of progenitor and myoblast populations / M. Murphy, G. Kardon // *Curr. Top. Dev. Biol*. – 2011. – №96. – P. 1-32.
181. Naidoo P. EM investigation of myoblast origin in regenerating hamster skeletal muscle explants / P. Naidoo // *J. Struct. Biol*. – 1992. – №109. – P. 160-167.
182. Nagaraju K. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B / K. Nagaraju, R. Rawat, E. Veszelszky et al. // *Am J Pathol*. – 2008. – №172 (3). – P. 774-785.
183. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts/ B. Nichols // *J. Cell Sci*. – 2003. – №116. – P. 4707-4714.
184. Ochala J. Thin filament proteins mutations associated with skeletal myopathies: defective regulation of muscle contraction / J. Ochala // *J Mol Med*. – 2008. – №86. – P. 1197-1204.

185. Ontell M. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study / M. Ontell, K. Kozeka // *Am J Anat.* – 1984. – №171 (2). – P. 133-148.
186. Ordahl C.P. Myogenic lineages within the developing somite. In *Molecular Basis of Morphogenesis* / C.P. Orchard, ed. by M. Bernfield // New York: John Wiley and Sons, 1993. – P. 165-176.
187. Ott M.O. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo / M.O. Ott, E. Bober, G. Lyons et al. // *Development.* – 1991. – №111. – P. 1097-1107.
188. Paciello O. Canine inflammatory myopathy associated with Leishmania Infantum infection / O. Paciello, G. Olivab, L. Gradonic et al. // *Neuromuscular Disorders.* – 2009. – №19 (2). – P. 124-130.
189. Pantelic M.N. Stem Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering / M.N. Pantelic, M.L. Larkin // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2018. – 24(5). – P. 373-391.
190. Park M. Methamphetamine-induced Occludin Endocytosis Is Mediated by the Arp2/3 Complex-regulated Actin Rearrangement / M. Park, H. Kim, B. Lim et al. // *J Biol Chem.* – 2013. – №288 (46). – P. 33324–33334.
191. Partridge T.A. The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy / T.A. Partridge // *FEBS J.* – 2013. – №280 (17). – P. 4177-4186.
192. Politi P.K. Bupivacaine-induced regeneration of rat soleus muscle: ultrastructural and immunohistochemical aspects / P.K. Politi, S. Havaki, P. Menta et al. // *Ultrastruct. Pathol.* – 2006. – №30 (6). – P. 461-469.
193. Posey A.D. Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth / A.D. Potey, A. Jr. Demonbreun, E.M. McNally // *Curr Top Dev Biol.* – 2011. – №96. – P. 203-230.
194. Pownall M.E. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos / M.E. Pownall, C.P. Emerson // *Dev. Biol.* – 1992. – №151. – P. 67-79.
195. Prisk V. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation/ V. Prisk, J. Huard // *Histol Histopathol.* – 2003. – №18. – P. 1243-1256.

196. Rahimov F. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy / F. Rahimov, L.M. Kunkel // *J. Cell. Biol.* – 2013. – №201 (4). – P. 499-510.
197. Relaix F. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. / F. Relaix, D. Rocancourt, A. Mansouri, M. Buckingham // *Nature*. – 2005. – №435. – P. 948-953.
198. Rezvanpour A. The S100A10-annexin A2 complex provides a novel asymmetric platform for membrane repair / A. Rezvanpour, L. Santamaria-Kisiel, G.S. Shaw // *J Biol Chem.* – 2011. – №286 (46). – P. 40174-40183.
199. Robinson J.M. While dysferlin and myoferlin are coexpressed in the human placenta, only dysferlin expression is responsive to trophoblast fusion in model systems / J.M. Robinson, W.E. Ackerman, N.J. Behrendt, D.D. Vandre // *Biol Reprod.* – 2009. – №81 (1). – P. 33-39.
200. Roman W. Nuclear positioning in skeletal muscle / W. Roman, E. Gomess, R. Semin // *Cell Dev. Biol.* – 2018. – №82. – P. 51-56.
201. Roostalu U. In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma / U. Roostalu, U. Strähle // *Dev Cell.* – 2012. – №22 (3). – P. 515-529.
202. Sampaolesi M. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs / M. Sampaolesi, S. Blot, G. D'Antona et al. // *Nature*. – 2006. – №444. – P. 574-579.
203. Santamaria-Kisiel L. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family / L. Santamaria-Kisiel, A.C. Rintala-Dempsey, G.S. Shaw // *Biochem. J.* – 2006. – №396. – P. 201-214.
204. Santo-Domingo J. Calcium uptake mechanisms of mitochondria / J. Santo-Domingo, N. Demarex // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – №1797 (6). – P. 907-912.
205. Sarasa-Renedo A. Role of RhoA/ROCK-dependent actin contractility in the induction of tenascin-C by cyclic tensile strain / A. Sarasa-Renedo, V. Tunc-Civelek, M. Chiquet // *Exp. Cell Res.* – 2006. – №312. – P. 1361-1370.
206. Schiaffino S. Skeletal muscle repair and regeneration / S. Schiaffino, T. Partridge // Springer, 2008. – 385 p.

207. Schiaffino S. Developmental myosins: expression patterns and functional significance / S. Schiaffino, A. Rossi, V. Smerdu et al. // *Skelet Muscle*. – 2015. – №5 (22). – doi: 10.1186/s13395-015-0046-6.
208. Schmalbruch H. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles / H. Schmalbruch, D.M. Lewis // *Muscle Nerve*. – 2000. – №23 (4). – P. 617-626.
209. Schultz E. Skeletal muscle satellite cells: Changes in proliferation potential as a function of age / E. Schultz, B.H. Lipton // *Mech. Ageing Dev.* – 1983. – №20. – P. 377-383.
210. Seale P. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells / P. Seale, M.A. Rudnicki // *Dev. Biol.* – 2000. – №218. – P. 115-124.
211. Sharner J. The muscle satellite cell at 50: the formative years / J. Sharner, P.S. Zammit // *Skelet. Muscle*. – 2011. – №1. – P. 1-13.
212. Sharma, A. A new role for muscle repair protein Dysferlin in Endothelial Cell Adhesion and Angiogenesis -R2 / A. Sharma, C. Yu, C. Leung, A. Trane // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2010. – №30 (11). – P. 2196-2204.
213. Shelton G.D. Canine and feline models of human inherited muscle diseases / G.D. Shelton, E. Engvall // *Neuromuscul. Disord.* – 2005. – №15 (2). – P. 127-138.
214. Shin J. Wasting mechanisms in muscular dystrophy / J. Shin, M.M. Tajrishi, Y. Ogura et al. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2013. – №45 (10). – P. 2266-2279.
215. Skrahina T. Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins / T. Skrahina, A. Piljic, C. Schultz // *Exp. Cell Res.* – 2008. – №314. – P. 1039-1047.
216. Stockdale F.E. Myogenic cell lineages / F.E. Stockdale // *Dev. Biol.* – 1992. – №154. – P. 284-298.
217. Sudhof T.C. Synaptotagmins: why so many? / T.C. Sudhof // *J. Biol. Chem.* – 2002. – №277. – P. 7629-7632.
218. Sun C. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update / C. Sun, L. Shen, Zh. Zhang et al. // *Genes (Basel)*. – 2020. – 11(8):837.

219. Taher L. Global gene expression analysis of murine limb development / L. Taher, N.M. Collette, D. Murugesh et al. // PLoS One. – 2011. – №6 (12). – e28358.
220. Tardieux I. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells / I. Tardieux, P. Webster, J. Ravesloot et al. // Cell. – 1992. – №71. – P. 1117-1130.
221. Tidball James G. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration / S. Tidball James, S. Armando Villalt // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2010. – №298 (5). – P. 1173-1187.
222. Torrente Y. Human circulating AC133+ stem cells replenish the satellite cell pool, restore dystrophin expression and ameliorate function upon transplantation in murine dystrophic skeletal muscle / Y. Torrente, A. Belicchi, M. Sampaolesi et al. // J Clin Invest. – 2004. – №114. – P. 182-195.
223. Toumi H. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? / H. Toumi, T. Best // Br. J. Sports Med. – 2003. – №37 (4). – P. 284-286.
224. Tseng C.W. Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin Contributes to Inflammation and Muscle Tissue Injury / C.W. Tseng, P. Kyme, J. Low et al. // PLoS One. – 2009. – №4 (7). – e6387.
225. Vainzof M. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases / M. Vainzof, D. Ayub-Guerrieri, P.C. Onofre et al. // J. Mol. Neurosci. – 2008. – №34. – P. 241-248.
226. Vaughan E.M. Lipid domain-dependent regulation of single-cell wound repair / E.M. Vaughan, J.S. You, H.Y. Elsie et al. // Mol. Biol. Cell – 2014. – №25. – P.1867-1876.
227. Voges D. Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy-X-ray crystallography study / D. Voges, R. Berendes, A. Burger et al. // J. Mol. Biol. – 1994. – №238. – P. 199-213.
228. Waddell L.B. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch / L.B. Waddell, F.A. Lemckert, X.F. Zheng et al. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2011. – №70. – P. 302-313.

229. Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury / A. Wagatsuma // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2007. – №298. – P. 151-159.
230. Waldeyer W. Über die Veränderungen der quergestreiften Muskeln bei der Entzündung und dem Typhus – Prozess, sowie über die Regeneration derselben nach Substanzdefecten / W. Waldeyer // *Vircheress Arch path Anat Physiol*. – 1865. – №34. – 473-514.
231. Wang H. NF- κ B regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes / H. Wang, E. Hertlein, N. Bakkar et al. // *Mol Cell Biol*. – 2007. – №27. – P. 4374-4387.
232. Wang X. Effects of interleukin-6, leukemia inhibitory factor, and ciliary neurotrophic factor on the proliferation and differentiation of adult human myoblasts / X. Wang, H. Wu, Z. Zhang et al. // *Cell Mol Neurobiol*. – 2008. – №28. – P. 113-124.
233. Washington N. L. FER-1 regulates Calcium-mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis / N. L. Washington, S. Ward // *Journal of Cell Science*. – 2006. – №119. – P. 2552-2562.
234. Weber C.O. Ueber die Neubildung quergestreifter Muskelfasern, insbesondere die regenerative Neubildung derselben nach Verletzungen / C.O. Weber // *Virchows Archiv*. – 1867. – №39. – P. 216-253
235. Wehling M. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice / M. Wehling, M.J. Spencer, J.G. Tidball // *J Cell Biol*. – 2001. – №155. – P. 123-131.
236. Weisleder N. Mitsugumin 53 (MG53) facilitates vesicle trafficking in striated muscle to contribute to cell membrane repair / N. Weisleder, H. Takeshima, J. Ma // *Commun. Integr. Biol*. – 2009. – №2. – P.225-226.
237. Wenzel K. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts / K. Wenzel, C. Geier, F. Qadri et al. // *J Mol Med* – 2007. – №85. – P. 1203-1214.
238. Wu L.G. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms / L.G. Wu, E. Hamid, W. Shin, H.C. Chiang // *Annu. Rev. Physiol*. – 2014. – №76. – P. 301-331.

239. Yasunaga, S. OTOF Encodes Multiple Long and Short Isoforms: Genetic Evidence That the Long Ones Underlie Recessive Deafness DFNB9 / S. Yasunaga, M. Grati, S. Chardenoux et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – №67. – P. 591-600.
240. Yildiz K. Myotoxic effects of levobupivacaine, bupivacaine and ropivacaine in a rat model / K. Yildiz, S.N. Efesoy, S. Ozdamar et al. // *Clin. Invest. Med.* – 2011. – №34 (5). – E273.
241. Yu X. Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exon skipping / X. Yu, B. Bao, Y. Echigoya et al. // *Am. J. Transl. Res.* – 2015. – №7 (8). – P. 1314-1331.
242. Yucel N. Principles of regenerative medicine. Third edition / ed. by A. Atala // Academic Press, 2018. – 1454 p.
243. Zacharias U. AHNAK1 abnormally localizes in muscular dystrophies and contributes to muscle vesicle release / U. Zacharias, B. Purfurst, V. Schowel et al. // *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 2011. – №32. – P. 271-280.
244. Zaid A. Disease exacerbation by etanercept in a mouse model of alphaviral arthritis and myositis / A. Zaid, N.E. Rulli, M.S. Rolph et al. // *Arthritis Rheum.* – 2011. – №63 (2). – P. 488-491.
245. Zaidel-Bar R. The contractome--a systems view of actomyosin contractility in non-muscle cells / R. Zaidel-Bar, G. Zhenhuan, C. Luxenburg // *J. Cell. Sci.* – 2015. – №128 (12). – P. 2209-2217.
246. Zalin R.J. Prostaglandins and myoblast fusion / R.J. Zalin // *Dev Biol.* – 1977. – №59. – P. 241-248.
247. Zalin R.J. The role of hormones and prostanoids in the in vitro proliferation and differentiation of human myoblasts / R.J. Zalin // *Exp Cell Res.* – 1987. – №172. – P. 265-281.
248. Zampieri M. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant / M. Zampieri, L. Garcia, E. Parrish // *Neuromuscul Disord.* – 1999. – №9. – P. 72-80.

249. Zatz M. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes / M. Zatz, M. Vainzof, M.R. Passos-Bueno // *Curr Opin Neurol.* – 2000. – №13. – P. 511-517.
250. Zechel K. Stability differences of muscle F-actin in formamide in the presence of Mg^{2+} and Ca^{2+} / K. Zechel // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – №742. – P. 135-141.
251. Zenker F.A. Über die Veraenderungen der willkührlichen Muskeln im Typhus abdominalis. Leipzig, Germany / F.A. Zenker // Leipzig: F. C. W. Vogel. –1864. – 170 p.
252. Zhang H. Mouse models of laminopathies / H. Zhang, J.E. Kieckhaefer, K. Cao // *Aging. Cell.* – 2013. – №12 (1). – P. 2-10.