

УДК 611.73



МЫШИ B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ КАК ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ

М.В. Корокин¹, Е.В. Кузубова¹, А.И. Радченко¹, Р.В. Деев^{3,6}, И.А. Яковлев², А.В. Дейкин¹,
Н.С. Жунусов¹, А.М. Краюшкина¹, В.М. Покровский¹, О.А. Пученкова¹, К.Д. Чапров^{1,4},
Н.В. Екимова¹, С.Н. Бардаков⁵, О.Н. Чернова³, А.М. Емелин^{1,3}, И.С. Лимаев³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

² Общество с ограниченной ответственностью «Генотаргет», 121205, Россия, г. Москва, Инновационный центр «Сколково», ул. Нобеля, д. 7, пом. 48

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191015, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

⁴ Институт физиологически активных веществ федерального государственного бюджетного учреждения науки федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФВ РАН), 142432, Россия, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1

⁵ Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

⁶ Публичное акционерное общество «Институт стволовых клеток человека», 117292, Россия, г. Москва, пр-т 60-Летия Октября, д. 10а

E-mail: mkorokin@mail.ru

Получена 05.07.2022

После рецензирования 10.09.2022

Принята к печати 18.10.2022

Цель. Поведенческое и патоморфологическое фенотипирование мышей, нокаутных по гену *DYSF*, играющему важнейшую роль в развитии и прогрессировании дисферлинопатии.

Материалы и методы. В работе использована сублиния мышей B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ (Bla/J). В ходе исследования определяли мышечную активность при помощи следующих тестов: «Перевернутая сетка», «Сила хватки», «Удержание на проволоке», «Вынужденное плавание с грузом», «Удержание животного на скользком вертикальном стержне». Типично гистологическое и иммунофлуоресцентное исследование скелетной мускулатуры (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis*). Оценено наличие и распределение белка дисферлина, описаны общие гистологические изменения скелетной мышцы, характерные для мышей в возрасте 12 и 24 недель. Также выполнен морфометрический анализ с определением следующих параметров: доля некротизированных мышечных волокон; доля волокон с центрально расположенными ядрами; средний диаметр мышечного волокна.

Результаты. Тест «Сила хватки» и «Принудительное плавание с грузом» выявили снижение силы передних конечностей и выносливости у исследуемых мышей сублинии Bla/J по сравнению с контрольной линией. Сохранность физической работоспособности проверена при помощи тестов «Проволочный тест» и «Удержание животного на скользком вертикальном стержне», которые показали статистически значимое различие между исследуемыми мышами и контролем. Координация движений и мышечная сила конечностей, исследованных в тесте «Перевернутая сетка», в данных возрастных метках не изменена. Уменьшение силы хватки передних конечностей, снижение физической выносливости с возрастом отражает прогрессирование основного мышечного заболевания. Гистологическими методами в скелетной мускулатуре выявлены признаки миопатического паттерна повреждения: некротизированные мышечные

Для цитирования: М.В. Корокин, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, Р.В. Деев, И.А. Яковлев, А.В. Дейкин, Н.С. Жунусов, А.М. Краюшкина, В.М. Покровский, О.А. Пученкова, К.Д. Чапров, Н.В. Екимова, С.Н. Бардаков, О.Н. Чернова, А.М. Емелин, И.С. Лимаев. Мыши B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии. *Фармация и фармакология*. 2022;10(5):483-496. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496

© М.В. Корокин, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, Р.В. Деев, И.А. Яковлев, А.В. Дейкин, Н.С. Жунусов, А.М. Краюшкина, В.М. Покровский, О.А. Пученкова, К.Д. Чапров, Н.В. Екимова, С.Н. Бардаков, О.Н. Чернова, А.М. Емелин, И.С. Лимаев, 2022

For citation: M.V. Korokin, E.V. Kuzubova, A.I. Radchenko, R.V. Deev, I.A. Yakovlev, Deikin A.V., N.S. Zhunusov, A.M. Krayushkina, V.M. Pokrovsky, O.A. Puchenkova, K.D. Chaprov, N.V. Ekimova, S.N. Bardakov, O.N. Chernova, A.M. Emelin, I.S. Limaev. B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ mice as a genetic model of dysferlinopathy. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(5):483-496. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496

волокна, умеренная лимфо-макрофагальная инфильтрация, увеличение по сравнению с контролем доли волокон с центрально расположенными ядрами, среднего диаметра волокна. Белок дисферлин в тканях мышц не обнаружен. **Заключение.** С учетом результатов проведенных тестов показано, что отсутствие экспрессии гена *Dysf*^{-/-} у мышей сублинии Bla/J приводило к мышечной дистрофии с началом развития фенотипических проявлений болезни в 12 недель жизни и их пиком к 24 неделе. Патогистологические фенотипические проявления болезни в целом неспецифичны и соответствовали данным прижизненного патологоанатомического исследования у пациентов с диферлинопатией. Мыши исследуемой сублинии Bla/J являются репрезентативной моделью дисферлинопатии и могут быть использованы для оценки новых терапевтических средств для лечения данного заболевания.

Ключевые слова: дисферлинопатия; ген *Dysf*; миопатия Миоши; мышечная дистрофия; фенотипирование; нокаут; генотипирование; животные; мышиная модель; B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ

Список сокращений: Bla/J – B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ; КК – креатинкиназа; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ПЦР – полимеразная цепная реакция; п.о. – пар оснований, WT – мыши дикого типа; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; Gas M – *M. gastrocnemius medialis*; Gas L – *M. gastrocnemius lateralis*; tib – *M. tibialis*.

B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ MICE AS A GENETIC MODEL OF DYSFERLINOPATHY

M.V. Korokin¹, E.V. Kuzubova¹, A.I. Radchenko¹, R.V. Deev^{3,6}, I.A. Yakovlev², Deikin A.V.¹, N.S. Zhunusov¹, A.M. Krayushkina¹, V.M. Pokrovsky¹, O.A. Puchenkova¹, K.D. Chaprov^{1,4}, N.V. Ekimova¹, S.N. Bardakov⁵, O.N. Chernova³, A.M. Emelin^{1,3}, I.S. Limaev³

¹ Belgorod State National Research University, 85, Pobedy Str., Belgorod, Russia, 308015

² LLC “Genotarget”,

48/7, Nobel Str., Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia, 121205

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 41, Kirochnaya Str., St. Petersburg, Russia, 191015

⁴ Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences (IPAC RAS), 1, Severny Driveway, Chernogolovka, Russia, 142432

⁵ S. M. Kirov Military Medical Academy,

6, Academician Lebedev Str., St. Petersburg, Russia, 194044

⁶ PJSC “Human Stem Cells Institute”,

Bld. A, 10, 60-Letiya Oktyabrya Ave., Moscow, Russia, 117292

E-mail: mkorokin@mail.ru

Received 05 July 2022

After peer review 10 Sep 2022

Accepted 18 Oct 2022

The aim of the work was behavioral and pathomorphological phenotyping of the mice knockout for the *DYSF* gene, which plays an important role in the development and progression of dysferlinopathy.

Materials and methods. A B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ (Bla/J) mice subline was used in the work. During the study, a muscle activity was determined basing on the following tests: “Inverted grid”, “Grip strength”, “Wire Hanging”, “Weight-loaded swimming”, “Vertical Pole”. Histological and immunofluorescent examinations of skeletal muscles (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis*) were performed. The presence and distribution of the dysferlin protein was assessed, and general histological changes in the skeletal muscle characteristics of mice at the age of 12 and 24 weeks, were described. A morphometric analysis with the determination of the following parameters was performed: the proportion of necrotic muscle fibers; the proportion of fibers with centrally located nuclei; the mean muscle fiber diameter.

Results. The “Grip strength” test and the “Weight-loaded swimming” test revealed a decrease in the strength of the forelimbs and endurance in the studied mice of the Bla/J subline compared to the control line. The safety of physical performance was checked using the “Wire Hanging” test and the “Vertical Pole” test, which showed a statistically significant difference between the studied mice and control. The coordination of movements and muscle strength of the limbs examined in the “Inverted Grid” test did not change in these age marks. Decreased grip strength of the forelimbs, decreased physical endurance with age, reflects the progression of the underlying muscular disease. Histological methods in the skeletal muscles revealed signs of a myopathic damage pattern: necrotic muscle fibers, moderate lympho-macrophage infiltration, an increase in the proportion of fibers with centrally located nuclei, and an increase in the average fiber diameter compared to the control. The dysferlin protein was not found out in the muscle tissues.

Conclusion. Taking into account the results of the tests performed, it was shown that the absence of *Dysf*^{-/-} gene expression in Bla/J subline mice led to muscular dystrophy with the onset of the development of phenotypic disease manifestations at

the age of 12 weeks and their peak at 24 weeks. Histopathological phenotypic manifestations of the disease are generally nonspecific and corresponded to the data of intravital pathoanatomical examination in dysferlinopathy patients. The mice of the studied subline Bla/J are a representative model of dysferlinopathy and can be used to evaluate new therapeutic agents for the treatment of this disease.

Keywords: dysferlinopathy; DYSF gene; Myoshi's myopathy; muscular dystrophy; phenotyping; knockout; genotyping; animals; mouse model; B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ

Abbreviations: Bla/J – B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ; CK – creatine kinase; DNA – deoxyribonucleic acid; PCR – polymerase chain reaction; bp – base pairs; WT – wild-type mice; EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid; Gas M – *M. gastrocnemius medialis*; Gas L – *M. gastrocnemius lateralis*; tib – *M. tibialis*.

ВВЕДЕНИЕ

Дисферлинопатия – это фенотипически гетерогенная прогрессирующая мышечная дистрофия, вызванная мутациями в гене DYSF (2p13), который кодирует трансмембранный белок дисферлин (230 кДа), участвующий в восстановлении сарколеммы. [1]. Дисферлинопатия включает в себя пресимптоматический этап бессимптомного повышения уровня креатинкиназы (КК) в крови и манифестный этап, характеризующийся прогрессирующим поражением проксимальных и/или дистальных мышц конечностей [2]. Различают пять основных фенотипов дисферлинопатии: дистальная миопатия Миоши (OMIM # 254130), поясно-конечностная мышечная дистрофия R2 (LGMD R2, OMIM # 253601); дистальная миопатия переднего ложа голени (дистальная, с началом в передней большеберцовой мышце (DMAT, OMIM # 606768); проксимально-дистальная форма (переходная форма) и врожденный фенотип [3]. Дисферлин состоит из семи доменов C2 и является трансмембранным белком скелетных мышц, также экспрессируемый кардиомиоцитами и моноцитами [4]. Основная роль дисферлина – Ca²⁺ зависимая репарация участков повреждения сарколеммы [5]. Дисферлинопатия манифестирует в диапазоне от позднего подросткового возраста, раннего взрослого возраста, с последующим неуклонным повышением проявлений признаков заболевания [6].

Манифестация заболевания приходится на поздний подростковый возраст – ранний взрослый возраст с последующим неуклонным прогрессирующим мышечной слабости и утратой амбулаторного статуса в 35–45 лет [7].

Надлежащее проведение клинического испытания требует понимания особенностей прогрессирования заболевания и реагирования на различные показатели результатов с течением времени [8]. Сложность выбора показателей для клинических исследований дисферлинопатии определяется вариабельностью возраста манифестации, фенотипом, выраженностью мышечно-дистрофического процесса, переменной скоростью прогрессирования, модифицирующими факторами, которые в полной мере не выявлены [9]. Ранее показано, что оценка двигательной функции при дисферлинопатии, является надежными

методом объективизации, однако изменчивость скорости прогрессирования заболевания затрудняет демонстрацию реакции в небольших когортах [10, 11]. Установлено, что, несмотря на отсутствие экспрессии белка дисферлина в скелетных мышцах, наблюдается варьирование возраста манифестации, клинических проявлений и тяжести заболевания. Аналогичным образом, дисферлинопатия может прогрессировать с различной скоростью, даже при наличии одной и той же мутации [12, 13]. Описан ряд факторов, модифицирующих фенотип и скорость прогрессирования дисферлинопатии: степень и продолжительность физической активности и тип мутации (гомозиготность по нонсенс-мутациям), при отсутствии устойчивых клинико-генетических корреляций [14, 15].

ЦЕЛЬ. Поведенческое и патоморфологическое фенотипирование мышей, нокаутных по гену DYSF, играющему важнейшую роль в развитии и прогрессировании дисферлинопатии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

В работе использована сублиния мышей B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ (Bla/J), полученная из испытательного центра «Виварно-экспериментальный комплекс ООО «НИИ Митоинженерии МГУ». Когорты животных получены в результате скрещивания мышей линии A/J (#:000646), у которых была случайно обнаружена спонтанная инсерция в интроне 4, с мышами дикого типа C57BL/6J. Поддержание и размножение колонии проводили путем скрещивания мутантных животных между собой из одного помета.

Экспериментальные и контрольные (Bla/J, n=20; C57BL/6J, n=10 и 13) животные содержались в условиях беспатогенного вивария Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ БелГУ) в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) при температурном режиме от +22 до +26°C и имели свободный доступ к корму и воде. В работе руководствовались этическими принципами обращения с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS

№ 170). Все болезненные манипуляции с животными проводились в соответствии с регламентирующими стандартами: Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Экспериментальные исследования были одобрены Биоэтической комиссией Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 15/10 от 29.10.2021). Вивисекция проводилась в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (CETS No. 123).

Поведенческие тесты проводились преимущественно в утренние часы при фиксированном «домашнем» освещении (для минимизации стрессового фактора). Были сформированы репрезентативные группы экспериментальных животных (гомозиготные нокауты – Vla/J , $n=20$), тестирование групп проводили на двух возрастных точках 12 и 24 недель и контрольных животных без модификации генома (WT, $n=10$ и 13 соответственно).

Тест «Перевернутая сетка»

Перевернутая сетка представляет собой проволочную сетку 45×45 см с размером ячеек 12×12 мм с диаметром проволоки 1 мм, окруженную перегородкой размером 4 см, предотвращающей попытку мыши перелезть на другую сторону. Тест используется для оценки координации движений и мышечной силы обеих пар конечностей. Мышей помещали в центр проволочной сетки, которую переворачивали и устанавливали на высоте 50 см над мягкой поверхностью. Регистрировалось время падения животного или животное снималось с сетки, если время достигало 180 сек. Оценка теста проводилась в баллах: чем больше времени животному удалось удержаться, тем выше был его балл [16–18].

Тест «Сила хватки»

Установка представляет собой сетку из нержавеющей стали, подключенной к датчику для измерения силы хватки (в граммах) передних конечностей мыши. Животному давали ухватиться за горизонтальную сетку передними лапами, а затем мышь оттягивали назад за хвост, пока ее хватка не ослабевала, при этом задние лапы мыши не должны касаться сетки. Датчик измерения силы сохранял пиковое значение силы тяги. Тест используется для изучения функции нейромышечной системы. Для анализа использовались средние значения из 5 успешных измерений силы передних конечностей [19, 20].

Тест «Удержание на проволоке»

Тест основан на инстинкте мышей избегать падения. Мышь помещается на горизонтально натянутую проволоку с захватом всеми четырьмя конечностями (диаметр 3 мм, высота над поверхностью 60 см). Способность удерживаться на проволоке измеряется путем оценки времени удержания мыши до момента падения при помощи секундомера. В качестве итогового значения был взят наилучший результат двух попыток, пауза между которыми была 20 мин [21, 22].

Тест «Вынужденное плавание с грузом»

Физическую работоспособность животных в данном тесте оценивали по длительности плавания с грузом, который составляет 5% от массы тела (масса груза была найдена экспериментальным путем), прикрепленным к корню хвоста животного при помощи резиновой повязки. Массу животных определяли с точностью до 0,1 г, груз подбирали с точностью 0,01 г. Длительность тестирования (плавания) регистрировали при помощи секундомера с точностью до 1 сек. Окончанием эксперимента считался момент утомления животного, признаком которого являлась неспособность животного всплыть в течение 5 сек на поверхность воды или отказ от плавания (погружение на дно более, чем на 5 сек). Признаком утомления животного являлось нарушение моторно-координационной функции (вращением вокруг своей оси и заваливание на бок в толще воды).

Плавание проводили в сосудах из органического стекла с внутренним диаметром 30 см и высоты 60 см. Высота столба воды составляла 30 см, температура воды $23\pm 1^\circ\text{C}$ [23, 24].

Тест «Удержание животного на скользком вертикальном стержне»

В исследованиях на лабораторных животных для скрининга и оценки сохранности физической работоспособности использовалась в основном данная методика. Установка представляет из себя штатив с диаметром стержня 7 мм, высотой 60 см с установленным на верхушке пластиковым ограждением. Для проведения эксперимента животное помещали на одинаковом расстоянии от верхушки стержня строго вверх головой, не менее 1 м над полом. Фиксировали время падения животного со стержня при помощи секундомера. О сохранности физической работоспособности судили путем сравнения с контрольной группой [25].

Генотипирование трансгенных животных

Геномную ДНК для анализа получали с помощью биопсии уха (около 30 мг ткани). Биопсионный

материал помещали в лизирующий раствор, содержащий 100 мМ хлорида натрия, 50 мМ Трис-НСI (рН 8.0), 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 2 мг/мл протеиназы К и инкубировали при 55°C в течение 12–16 ч, после чего прогревали реакцию смесь при 85°C в течение 40 мин. Центрифугировали лизат с помощью лабораторной центрифуги Thermo SL16R (Thermo Scientific, США) в течение 1 мин при 10 000 g и использовали 1 мкл супернатанта в качестве матрицы в реакции ПЦР.

Использовали последовательности праймеров из протокола JAX (Protocol 26095), амплифицирующие одновременно участок ретротранспозона (в случае его присутствия) и участок геномной ДНК животного. В реакции использовали смесь из 3-х праймеров:

1) обратный праймер DYSF-R (5': CTT CAC TGG GAA GTA TGT CG), гомологичный последовательности смысловой цепи интрона 4 гена DYSF, является общим;

2) прямой праймер DYSF-F (5': TTC CTC TCT TGT CGG TCT AG), гомологичный последовательности антисмысловой цепи интрона 4 гена Dysf, является общим;

3) специфичный прямой праймер ETn-oR (5': GCC TTG ATC AGA GTA ACT GTC), гомологичный последовательности длинных концевых повторов

(3' LTR) в составе встраиваемого в 4 интрон ретротранспозона.

Реакционная смесь содержала 1x Taq Turbo буфер (Евроген, Россия), 0,2 мМ каждого dNTP (Евроген, Россия), 0,5 мкМ каждого прямого праймера и 1 мкМ общего обратного праймера, 2 единицы HS Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия). Программа амплификации состояла из следующих этапов:

1. Активация HS Taq ДНК-полимеразы при 95°C в течение 3 мин;
2. Денатурация при 95°C в течение 20 сек;
3. Отжиг при 60°C в течение 20 сек;
4. Элонгация при 72°C в течение 20 сек;
5. Циклическое повторение этапов 2–4 30 раз;
6. Конечная элонгация при 72°C в течение 2 мин.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 3% агарозном геле в 1x TAE буфере (40 мМ Трис-НСI, 20мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мкг/мл бромистого этидия) при 90 V в течение 60 мин.

Патогистологическое исследование

Материал включал тканевые фрагменты скелетных мышц *M. gastrocnemius medialis* (Gas M), *M. gastrocnemius lateralis* (Gas L), *M. tibialis* (tib), полученных от мышей линии Bla/J и мышей дикого типа (WT) с функциональным геном DYSF.

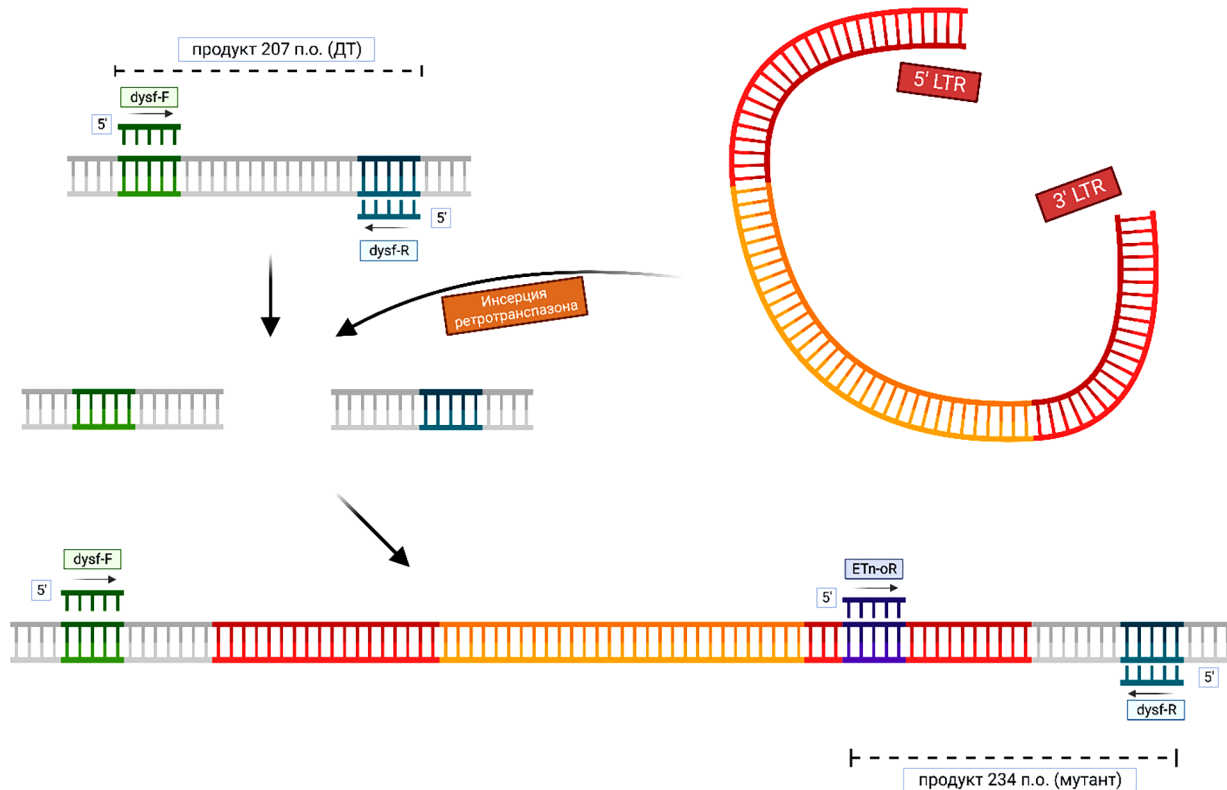


Рисунок 1 – Схема положения праймеров для амплификации геномного участка (дикий тип) и участка 3' LTR ретротранспозона (мутант)

Примечание: ДТ – дикий тип; DYSF-F – общий прямой праймер; DYSF-R – общий обратный праймер; ETn-OR – прямой праймер, гомологичный участку 3' LTR ретротранспозона; 5'LTR – 5'-длинные концевые повторы; 3'LTR – 3'-длинные концевые повторы.

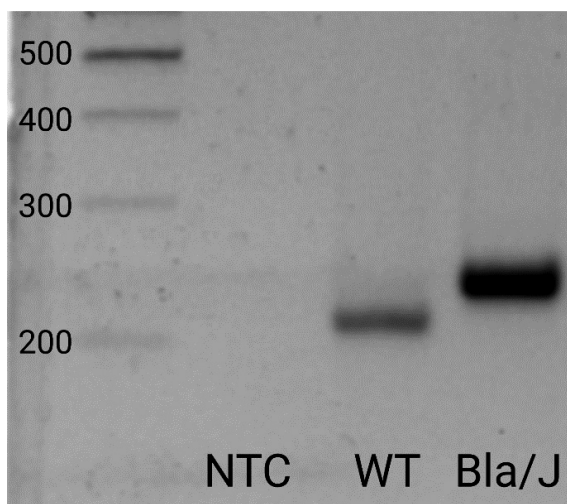


Рисунок 2 – Детектирование наличия ретротранспозона у Bla/J мышей методом ПЦР

Примечание: размер продукта WT (дикий тип) 204 п.о.; размер продукта Bla/J 237 п.о.; NTC – отрицательный контроль без матрицы.

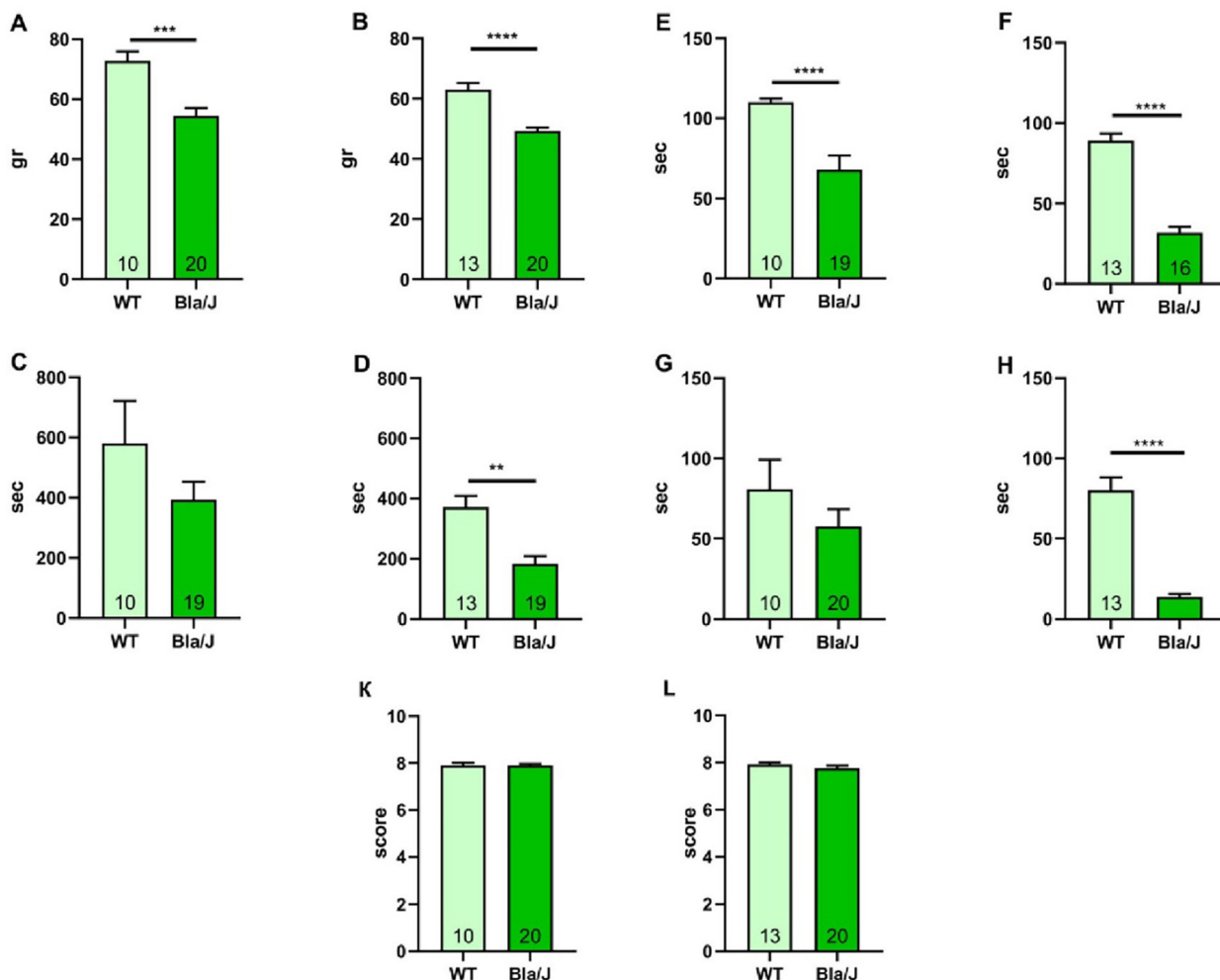


Рисунок 3 – Физиологические параметры мышей линии Bla/J

Примечание: анализ оценки силы хватки передних конечностей в тесте «Сила хватки» (A и B), выносливость в тесте «Принудительное плавание с грузом» (C и D), физическую работоспособность в тестах «Проволочный тест» (E и F) и «Удержание животного на скользком вертикальном стержне» (G и H), координации движений и мышечной силы конечностей в тесте «Перевернутая сетка» (K и L).

Экспериментальные Bla/J и контрольные мыши без модификации генома (WT) были протестированы в возрасте 12 (A, C, E, G, K) и 24 недель (B, D, F, H, L). Представлены медианы и стандартная ошибка среднего, количество животных указано в нижней части соответствующего столбца. Выборки проверены на нормальность, а статистическая достоверность оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни (** p < 0,01; *** p < 0,0004, **** p < 0,0001).

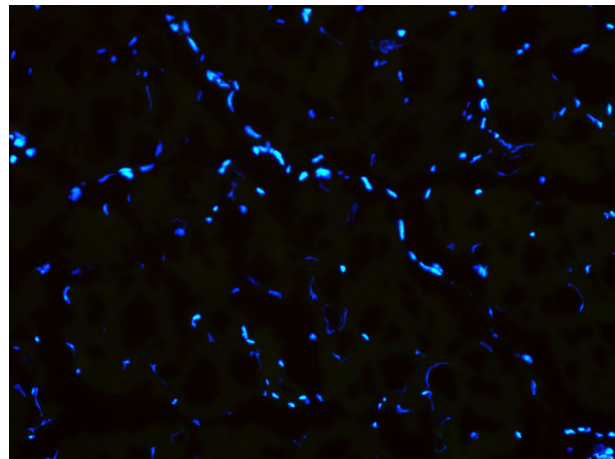
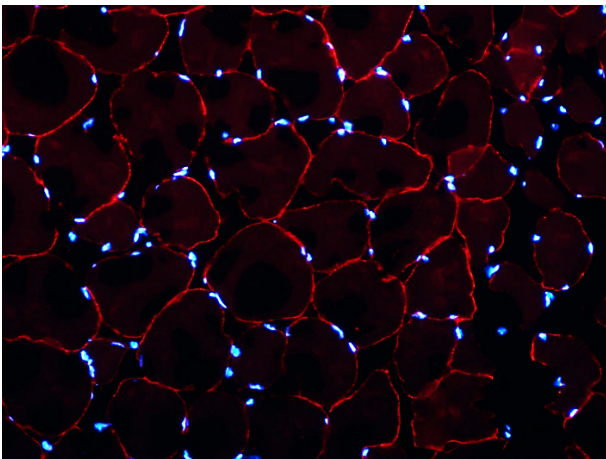


Рисунок 4 – Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к дисферлину

Примечание: А – мышь C57Bl; Б – мышь линии Bla/J. Красный цвет – детектируемый дисферлин саркоплазматической локализации, синий цвет – ядра. Докраска: DAPI. Ув. ×200

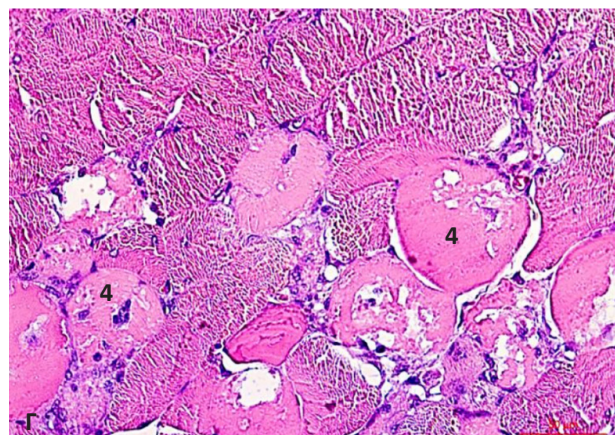
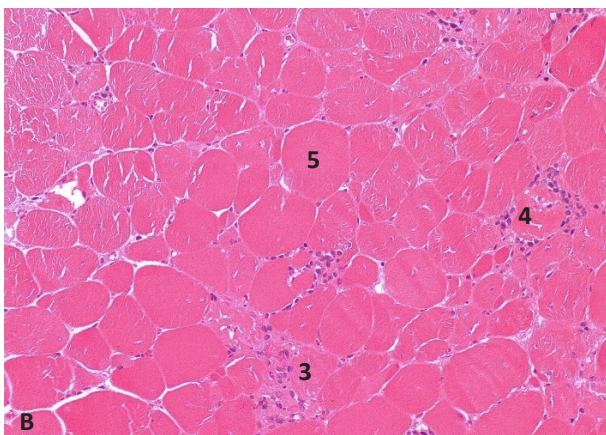
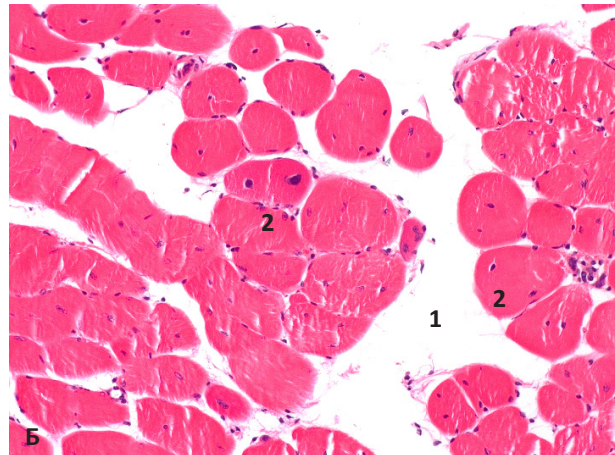
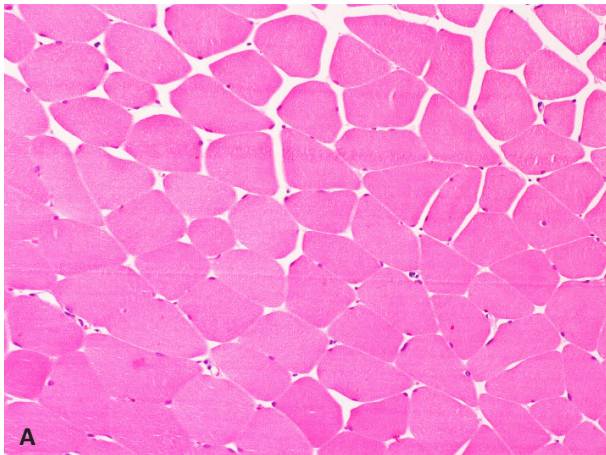


Рисунок 5 – Поперечно-полосатая скелетная мышечная ткань изученных животных

Примечание: А – контроль, C57Bl; Б–Г – Bla/J. 1 – эндомизиальный и перимизиальный отек; 2 – волокна с центрально расположенными ядрами; 3 – лимфо-макрофагальная инфильтрация вокруг некротизированных мышечных волокон; 4 – некротизированные мышечные волокна, в т.ч. с макрофагальной инвазией; 5 – округлые мышечные волокна. Окраска: эозин. Ув.: А–В ×200, Г ×400

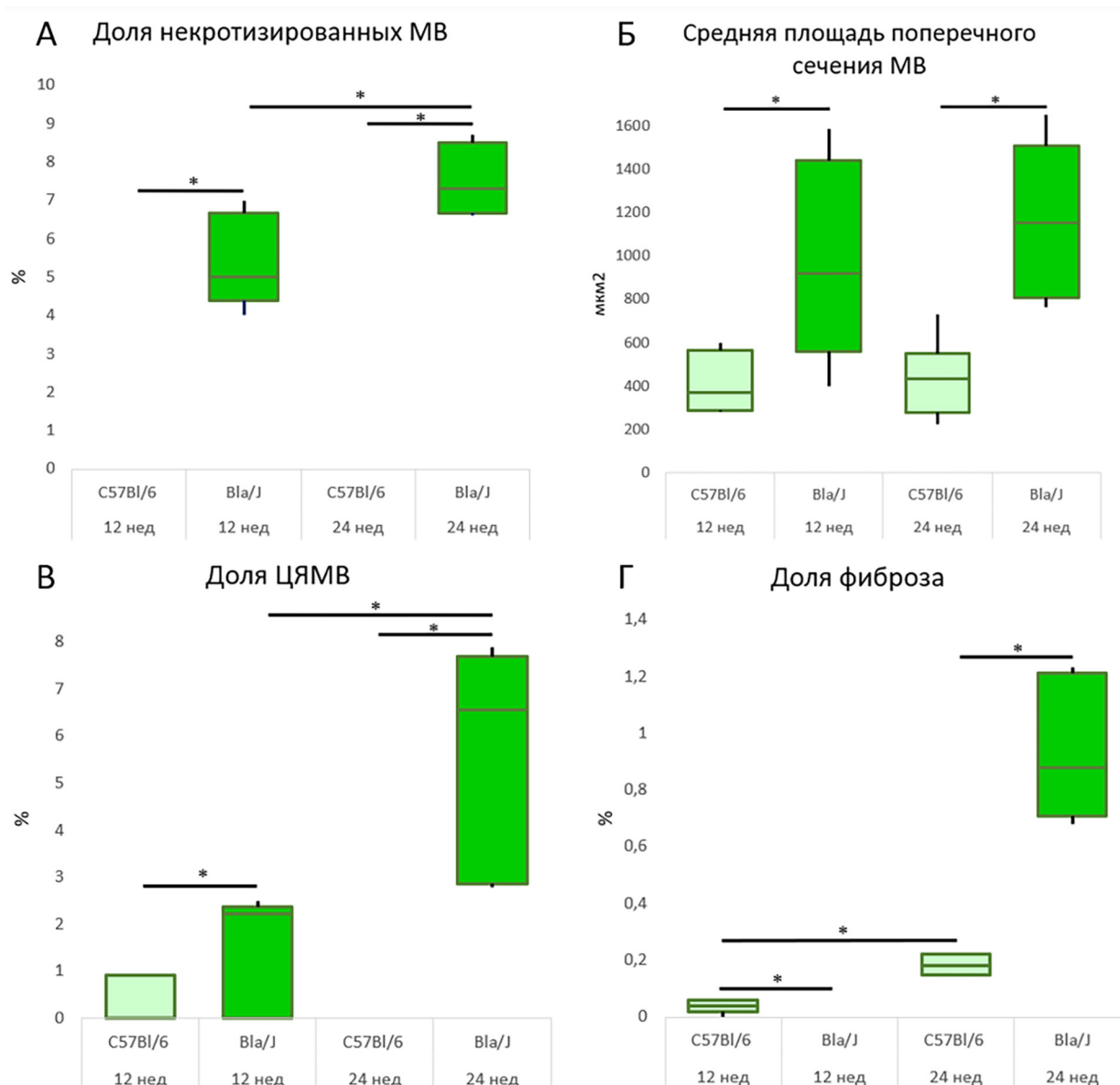


Рисунок 6 – Морфометрические параметры поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани мышей линии Bla/J на сроках 12 и 24 недель жизни

Примечание: А – доля некротизированных мышечных волокон; Б – Средняя площадь поперечного сечения мышечного волокна; В – доля centrally ядерных мышечных волокон (ЦЯМВ); Г – доля соединительной ткани в скелетной мышце (* $p < 0,05$)

Криоконсервированный материал переносили в камеру криостата Thermo Fisher Scientific HM525 NX (США), где ориентировали на замораживающей платформе в монтирующем геле NEG-50 (Richard-Allan Scientific, TS, США). Получали срезы толщиной 3–7 мкм. Предметные стекла с криосрезами на 10 мин фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (Биовитрум, Россия). Далее 3 раза по 5 мин промывали в буферном растворе Трис-HCL pH 7,4 (Невареактив, Россия); наносили раствор Background Block (Cell Marque, США), перемещали криосрезы во влажную камеру, где инкубировали в течение 1 ч. Протеиновый блок удаляли смыванием, затем на криосрезы наносили первичные рекомбинантные

моноклональные кроличьи антителами к дисферлину (клон: JAI-1-49-3; ab124684; Abcam, Великобритания), разведённые в соотношении 1:200 с раствором Diamond: Antibody Diluent (Cell Marque, 938B-05, США), в которых выдерживали криосрезы 2 ч при комнатной температуре во влажной камере. По прошествии времени срезы трехкратно промывали в буферном растворе Трис-HCL, после чего проводили 1-часовую инкубацию при комнатной температуре во влажной камере с вторичными козлиными анти-кролик антителами IgG H&L (Alexa Fluor 555, abcam, ab150078, Великобритания), разведёнными в соотношении 1:500 с раствором Diamond: Antibody Diluent. По прошествии часа, срезы промывали 4

раза в буферном растворе Трис-HCL, и инкубировали в рабочем растворе DAPI (Thermo FS, D1306, США) на протяжении 10 мин. Заключение осуществляли в монтирующую среду глицерогеля по Кайзеру.

Для изготовления парафиновых срезов, тканевый материал после фиксации подвергали стандартной гистологической проводке, заливке в парафин и микротомированию. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Фотодокументацию осуществляли с помощью компьютерного видеокомплекса (IBM PC + микроскоп Leica DM 1000, Германия) и пакета программ ImageScore-M (Россия).

В качестве оцениваемых параметров, для морфометрии на основании ранее проведенных исследований [26, 27], были выбраны: площадь поперечного сечения мышечного волокна, а также число волокон с интернализированным ядром и число некрозов по отношению к общему числу волокон в поле зрения.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью программы GraphPad Prism Software 8.0 ("GraphPad Software Inc", США). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела-Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве *post-hoc* анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни, соответственно, с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для формирования репрезентативных групп экспериментальных и контрольных животных, синхронизированных по возрасту, сначала получали соответствующее задачам эксперимента количество родственных производителей. Скрещивание гомозиготных мышей с мутацией производили с мышами такого же генотипа на том же генетическом фоне, полученными в предыдущих скрещиваниях. Потомство генотипировали методом конвенциональной ПЦР с использованием трёх праймеров, один из которых специфичен к мутации.

Схематическое изображение положения праймеров для амплификации встроенного ретротранспозона представлено на рисунке 1.

У мутантных мышей ретротранспозон размером более 6 тыс. пар оснований (п.о.) встроен в последовательность четвёртого интрона гена *DYSF*, что позволяло использовать систему из трёх праймеров для идентификации локализованной

мутации в аллеле. *DYSF-F* гомологичен участку геномной последовательности интрона, находящегося перед встраиваемой последовательностью ретротранспозона. Благодаря этому в случае отжига праймера на мутантном аллеле синтезируемая цепь не успеет амплифицироваться до участка, гомологичного обратному праймеру – ампликон размером более 6 тыс. п.о. не будет формироваться и накапливаться в большом количестве в ходе ПЦР. *ETn-oR* гомологичен участку ретротранспозона в составе длинных концевых повторов (со стороны 3' LTR), что в сочетании с обратным праймером *DYSF-F*, гомологичным участку геномной последовательности интрона, позволяет фланкировать 193 нуклеотидные пары. Такая схема расположения праймеров приводила к успешному разделению мутантных и дикотипных животных в результате проведения конвенциональной ПЦР (Рис. 2) [28, 29].

Но М. и соавт. было показано встраивание ретротранспозона в определённый участок интрона 4 (495 пар оснований от экзона 4 и около 4400 пар оснований до экзона 5) с замещением 6 п.о. [30]. Результаты проведённого нами генотипирования подтверждали наличие мутации в гомозиготной форме исследуемых животных.

В результате амплификации образцов животных дикого типа образовывался фрагмент размером 204 п.о. У животных *Bla/J*, гомозиготных по мутантной аллели, после амплификации последовательности гена *DYSF* формировался фрагмент длиной 237 п.о. (маркер 100+bp DNA Ladder).

Для исследования двигательной функции были сформированы репрезентативные группы экспериментальных животных (гомозиготные нокауты – *Bla/J*) ($n=20$), тестирование групп проводили на двух возрастных точках 12 и 24 недели и контрольных животных без модификации генома (*WT*) ($n=10$ и 13 соответственно).

Сила передних конечностей в тесте «Сила хватки» была значительно снижена у контрольных мышей по сравнению с мышами линии *Bla/J* в обеих возрастных точках (Рис. 3 А и В). При проведении теста «Принудительное плавание с грузом» (Рис. 3 С и D) было выявлено различие между контрольной группой мышей и экспериментальной в возрасте 24 недели и в возрасте 12 недель соответственно. Это свидетельствовало о снижении выносливости мышей в возрасте 24 недели при развивающейся патологии.

Были проведены тесты на сохранность физической работоспособности: «Удержание на проволоке» (Рис. 3 Е и F) и «Удержание животного на скользком вертикальном стержне» (Рис. 3 G и H). В результате проведенных тестов было выявлено, что в 24 недели наблюдалось снижение физической работоспособности у мышей линии *Bla/J* по сравнению с линией *C57BL/6J*.

Координация движений и мышечная сила конечностей в тесте «Перевернутая сетка» у животных обеих групп (Рис. 3 К и L) статистически значимо не различались. Таким образом, в данных возрастных отметках исследуемые показатели не изменялись.

При постановке иммунофлюоресцентных реакций с антителами к белку дисферлину в образцах мутантных животных указанный протеин не был обнаружен; в контрольных тканях выявлена сарколеммальная локализация дисферлина, что соответствует каноническим описаниям для скелетной мышечной ткани (Рис. 4).

Патогистологически изученная мышечная ткань при исследовании поперечных срезов характеризовалась возрастным нарастанием миопатического паттерна и нарушением архитектуры ткани. В отличие от поперечных срезов мышечной ткани мышей WT, волокна оцениваемых животных характеризовались полиморфностью поперечных сечений и неравномерностью. Кроме этого, по сравнению с мышцами WT, поперечное сечение у Bla/J было большего диаметра: в значительном количестве присутствовали так называемые круглые мышечные волокна. Для мышечной ткани исследуемых животных были характерны некрозы единичных мышечных волокон, чье число увеличивалось к возрасту 24 недели. Вокруг фокальных некрозов может быть отмечено скопление лейкоцитов, а также инвазия макрофагов под базальную мембрану волокна и фагоцитоз наркотизированной части саркоплазмы. Важным диагностическим критерием являлось выраженное число волокон с центрально расположенными ядрами (центральное ядро мышечные волокна), что в научной литературе трактуется как деструкция цитоскелета мышечных волокон и/или активная регенерационного процесса с появлением мышечных трубочек.

Обращает на себя внимание отек эндомизия и перимизия, а также маловыраженная лимфомакрофагальная инфильтрация (Рис. 5). С увеличением продолжительности жизни мутантных животных отмечалась гиперплазия эндомизия и перимизия, что выражалось в увеличении доли соединительной ткани в составе мышечного органа (Рис. 6).

При морфометрической оценке и статистической обработке основных параметров ткани установлены значимые отличия у мышей WT по числу наркотизированных мышечных волокон – как при сравнении показателя на сроках 12 и 24 недели, так и между линиями животных. Установлены внутри- и межгрупповые значимые различия по показателям: доля центральное ядерных мышечных волокон, средняя площадь поперечного сечения мышечных волокон и доля соединительной ткани (Рис. 6). Как показали ранее проведенные исследования,

увеличение поперечного сечения мышечных волокон следует рассматривать как компенсаторную рабочую гипертрофию в связи с гибелью части структурных единиц мышцы. При более длительном сроке наблюдения за животными установлен срыв этого процесса и постепенная атрофия мышцы, что в дальнейшем сопровождалось снижением этого показателя.

ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация репрезентативной *in vivo* модели дисферлинопатии имеет важное значение для поиска новых терапевтических мишеней и изучения фармакологической активности новых лекарственных средств, направленных на лечение эданной патологии. Основные линии мышечных моделей дисферлинопатии с полным отсутствием экспрессии дисферлина включают линии животных A/J^{dysf^{-/-}} (A/J), SJL/J^{dysf^{-/-}} (SJL/J) и Bla/J^{dysf^{-/-}} (Bla/J; B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ), которые имеют сходные, с незначительными изменениями, фенотипические проявления заболевания [31] и выраженную гистопатологию [32].

Результаты исследований, изучающих мышечную функцию у мышей с отсутствием экспрессии дисферлина (Dysf^{-/-}), показали противоречивые результаты. Отсутствие достаточной повторяемости и воспроизводимости результатов доклинических исследований, характеризующих линии мышечных дисферлинопатией, могут быть частично обусловлены разницей в тяжести заболевания и фенотипическими проявлениями у конкретных линий Dysf^{-/-} мышечных различного происхождения и/или отсутствием подходящих контрольных колоний мышечных дикого типа для их сравнения [33].

В ходе настоящего исследования нами были сформированы репрезентативные группы экспериментальных (гомозиготные нокауты Dysf^{-/-}– Bla/J) и контрольных животных (C57Bl/6), синхронизированных по возрасту, которые в дальнейшем были прогенотипированы методом конвенционной ПЦР. Авторы использовали последовательности праймеров из протокола JAX (Protocol 26095), амплифицирующие одновременно участок ретротранспозона (в случае его присутствия) и участок геномной ДНК животного. Отсутствие экспрессии гена DYSF у мышечных линий Bla/J приводило к мышечной дистрофии, вследствие чего заболевание начинало развиваться с 12 недели жизни животного, а пик фенотипических проявлений можно было наблюдать на 24 неделе.

При проведении поведенческого тестирования авторами было показано, что физическая активность и выносливость исследуемых животных понижается с возрастом в сравнении с контрольной группой. Что подтверждает тест «Сила хватки», в котором показатели снижались в сравнении с контролем на

22,2% в 12 недель, на 25,1% в 24 недели и на 9,5% между опытными группами в двух возрастных точках (54,47±2,659 и 49,27±1,157 соответственно). При проведении теста «Принудительное плавание с грузом» было выявлена разница в сравнении с контролем на 32,3% в 12 недель, на 50,5% в 24 недели и на 53,3% между опытными группами в двух возрастных точках (393,6±59,26 и 183,8±24,94). Сохранность физической работоспособности проверяли при помощи следующих тестов: «Проволочный тест» (68,00±8,809; 31,81±3,637) и «Удержание животного на скользком вертикальном стержне» (13,67±1,875), которые показали снижение результатов у исследуемых животных в 24 недели по сравнению с контролем на 64,4% и 82,9% соответственно. Данные по критериям координации движений и мышечной силы конечностей, исследуемые в тесте «Перевернутая сетка», в данных возрастах не изменялись.

Результаты, полученные в ходе проведения поведенческого тестирования, а именно уменьшение силы хватки передних конечностей и снижение физической выносливости с возрастом отражает прогрессирование основного мышечного заболевания у исследуемых животных. На основании этого можно сделать вывод о том, что изученная экспериментальная модель описывает клиническую картину дисферлинопатии у пациентов с данным заболеванием.

Также проведенное гистологическое исследование показало, что с увеличением продолжительности жизни мутантных животных отмечалась гиперплазия эндомизия и перимизия, что выражалось в увеличении доли соединительной ткани в составе мышечного органа. Установлены

внутри- и межгрупповые значимые различия по показателям: доля центральоядерных мышечных волокон; средняя площадь поперечного сечения мышечных волокон; доля соединительной ткани. Как показали ранее проведенные исследования, увеличение поперечного сечения мышечных волокон следует рассматривать как компенсаторную рабочую гипертрофию в связи с гибелью части структурных единиц мышцы. При более длительном сроке наблюдения за животными был установлен срыв этого процесса и постепенная атрофия мышцы, что в дальнейшем сопровождалось снижением этого показателя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием таких тестов, как: «Перевернутая сетка», «Сила хватки», «Удержание на проволоке», «Вынужденное плавание с грузом», «Удержание животного на скользком вертикальном стержне» было установлено, что отсутствие экспрессии гена *Dysf^{frmd}* у мышей сублинии *Bla/J B6.A-Dysf^{frmd}/GeneJ (Bla/J)* может приводить к мышечной дистрофии. Данная патология проявляла себя с начала развития фенотипических проявлений болезни с 12 недели жизни и пиком фенотипических проявлений к 24 неделе жизни животных. Патогистологические фенотипические проявления болезни в целом неспецифичны и соответствовали данным прижизненного патологоанатомического исследования у пациентов с диферлинопатией.

Мыши сублинии *B6.A-Dysf^{frmd}/GeneJ (Bla/J)* являются репрезентативной моделью дисферлинопатии и могут быть использованы для оценки новых терапевтических средств для лечения данного заболевания.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации, Соглашение №075-15-2021-1346.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Корокин – написание статьи, разработка дизайна исследования; Е.В. Кузубова – оценка и проведение поведенческих тестов, интерпретация результатов; А.И. Радченко – оценка и проведение поведенческих тестов, написание статьи; К.Д. Чапров – написание статьи, интерпретация результатов; А.В. Дейкин – анализ литературы; Н.С. Жунусов – подготовка когорт животных, генотипирование; А.М. Краюшкина – подготовка когорт животных, генотипирование; Н.В. Екимова – формализация списка литературы, наблюдение и уход за животными, хендлинг животных; О.А. Пученкова – забор образцов для гистологического исследования; Р.В. Деев – консультация по вопросам планирования, методологии и реализации эксперимента; С.Н. Бардаков – анализ литературы; О.Н. Чернова – пробоподготовка образцов для гистологического исследования, морфологическое описание срезов мышечной ткани; В.М. Покровский – планирование исследования, этапов экспериментальных работ; И.А. Яковлев – разработка дизайна и написание программы исследования; А.М. Емелин – пробоподготовка образцов для гистологического исследования, морфологическое описание срезов мышечной ткани; И.С. Лимаев – пробоподготовка гистологических срезов, работа с графическим материалом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Reash N.F., James M.K., Alfano L.N., Mayhew A.G., Jacobs M., Iammarino M.A., Holsten S., Sakamoto C., Tateishi T., Yajima H., Duong T., de Wolf B., Gee R., Bharucha-Goebel D.X., Bravver E., Mori-Yoshimura M., Bushby K., Rufibach L.E., Straub V., Lowes L.P.; Jain COS Consortium. Comparison of strength testing modalities in dysferlinopathy // *Muscle Nerve*. – 2022. – Vol. 66, No. 2. – P. 159–166. DOI: 10.1002/mus.27570
2. Contreras-Cubas C., Barajas-Olmos F., Frayre-Martínez M.I., Siordia-Reyes G., Guízar-Sánchez C.C., García-Ortiz H., Orozco L., Baca V. Dysferlinopathy misdiagnosed with juvenile polymyositis in the pre-symptomatic stage of hyperCKemia: a case report and literature review // *BMC Med. Genomics*. – 2022. – Vol. 15, No. 1. – Art. No. 139. DOI: 10.1186/s12920-022-01284-y
3. Bardakov S.N., Tsargush V.A., Carlier P.G., Nikitin S.S., Kurbatov S.A., Titova A.A., Umakhanova Z.R., Akhmedova P.G., Magomedova R.M., Zheleznyak I.S., Emelyantsev A.A., Berezhnaya E.N., Yakovlev I., Isaev A.A., Deev R.V. Magnetic resonance imaging pattern variability in dysferlinopathy // *Acta Myol*. – 2021. – Vol. 40, No. 4. – P. 158–171. DOI: 10.36185/2532-1900-059
4. Seo K., Kim E.K., Choi J., Kim D.S., Shin J.H. Functional recovery of a novel knockin mouse model of dysferlinopathy by readthrough of nonsense mutation // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. – 2021. – Vol. 1, No. 21. – P. 702–709. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.04.015
5. Kokubu Y., Nagino T., Sasa K., Oikawa T., Miyake K., Kume A., Fukuda M., Fuse H., Tozawa R., Sakurai H. Phenotypic Drug Screening for Dysferlinopathy Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells // *Stem Cells Transl. Med*. – 2019. – Vol. 8, No. 10. – P. 1017–1029. DOI: 10.1002/sctm.18-0280
6. Корокин М.В., Солдатов В.О., Гудырев О.С., Коклин И.С., Таран Э.И., Мишенин М.О., Корокина Л.В., Кочкаров А.А., Покровский М.В., Варакин М.В., Чупахин О.Н. Роль метаболизма кортизола в реализации патогенетических звеньев развития остеопороза – обоснование поиска новых фармакотерапевтических мишеней (обзор) // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 457–473. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-5
7. Fanin M., Angelini C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy // *Muscle Nerve*. – 2016. – Vol. 54, No. 5. – P. 821–835. DOI: 10.1002/mus.25367
8. Кузубова Е.В., Радченко А.И., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Новикова А.А., Степенко Ю.В., Дейкин А.В. Патологические состояния, ассоциированные с белком тау: механизмы развития и возможные биологические мишени для фармакологической коррекции тау-протеинопатии (обзор) // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 474–797. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-6
9. Moore U., Jacobs M., James M.K., Mayhew A.G., Fernandez-Torron R., Feng J., Snaan A., Eagle M., Bettinson K., Rufibach L.E., Lofra R.M., Blamire A.M., Carlier P.G., Mittal P., Lowes L.P., Alfano L., Rose K., Duong T., Berry K.M., Montiel-Morillo E., Pedrosa-Hernández I., Holsten S., Sanjak M., Ashida A., Sakamoto C., Tateishi T., Yajima H., Canal A., Ollivier G., Decostre V., Mendez J.B., Sánchez-Aguilera Praxedes N., Thiele S., Siener C., Shierbecker J., Florence J.M., Vandeveld B., DeWolf B., Hutchence M., Gee R., Prügel J., Maron E., Hilsden H., Lochmüller H., Grieben U., Spuler S., Tesi Rocha C., Day J.W., Jones K.J., Bharucha-Goebel D.X., Salort-Campana E., Harms M., Pestronk A., Krause S., Schreiber-Katz O., Walter M.C., Paradas C., Hogrel J.Y., Stojkovic T., Takeda S., Mori-Yoshimura M., Bravver E., Sparks S., Díaz-Manera J., Bello L., Semplicini C., Pegoraro E., Mendell J.R., Bushby K., Straub V.; Jain COS Consortium. Assessment of disease progression in dysferlinopathy: A 1-year cohort study // *Neurology*. – 2019. – Vol. 92, No. 5. – P. 461–474. DOI: 10.1212/WNL.0000000000006858
10. Harris E., Bladen C.L., Mayhew A., James M., Bettinson K., Moore U., Smith F.E., Rufibach L., Cnaan A., Bharucha-Goebel D.X., Blamire A.M., Bravver E., Carlier P.G., Day J.W., Díaz-Manera J., Eagle M., Grieben U., Harms M., Jones K.J., Lochmüller H., Mendell J.R., Mori-Yoshimura M., Paradas C., Pegoraro E., Pestronk A., Salort-Campana E., Schreiber-Katz O., Semplicini C., Spuler S., Stojkovic T., Straub V., Takeda S., Rocha C.T., Walter M.C., Bushby K.; Jain COS Consortium. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study // *Neurol. Genet*. – 2016. – Vol. 2, No. 4. – Art. ID: e89. DOI: 10.1212/NXG.000000000000089
11. Jacobs M.B., James M.K., Lowes L.P., Alfano L.N., Eagle M., Muni L.R., Moore U., Feng J., Rufibach L.E., Rose K., Duong T., Bello L., Pedrosa-Hernández I., Holsten S., Sakamoto C., Canal A., Sanchez-Aguilera Praxedes N., Thiele S., Siener C., Vandeveld B., DeWolf B., Maron E., Guglieri M., Hogrel J.Y., Blamire A.M., Carlier P.G., Spuler S., Day J.W., Jones K.J., Bharucha-Goebel D.X., Salort-Campana E., Pestronk A., Walter M.C., Paradas C., Stojkovic T., Mori-Yoshimura M., Bravver E., Díaz-Manera J., Pegoraro E., Mendell J.R.; Jain COS Consortium, Mayhew A.G., Straub V. Assessing Dysferlinopathy Patients Over Three Years With a New Motor Scale // *Ann. Neurol*. – 2021. – Vol. 6, No. 1. – P. 967–978. DOI: 10.1002/ana.26044
12. Mercuri E., Muntoni F. Muscular dystrophies // *Lancet*. – 2013. – Vol. 9, No. 381. – P. 845–860. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61897-2
13. Crudele J.M., Chamberlain J.S. AAV-based gene therapies for the muscular dystrophies // *Hum. Mol. Genet*. – 2019. – Vol. 28, No. 1. – P. 102–107. DOI: 10.1093/hmg/ddz128
14. Niewiadomski W., Palasz E., Skupinska M., Zylinski M., Steczkowska M., Gasiorowska A., Niewiadomska G., Riedel G. TracMouse: A computer aided movement analysis script for the mouse inverted horizontal grid test // *Sci. Rep*. – 2016. – Vol. 16, No. 6. – Art. ID: 39331. DOI: 10.1038/srep39331
15. Лысикова Е.А., Чапров К.Д. Нокаут генов α -, β -, и γ -синуклеинов у мышей приводит к изменению содержания ряда липидов в печени и плазме крови // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 448–456. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-4
16. Чапров К.Д., Тетерина Е.В., Роман А.Ю., Иванова Т.А., Голоборщев В.В., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Лысикова Е.А., Лыткина О.А., Королева И.В., Попова Н.Я., Антохин А.И., Овчинников Р.К., Кухарский М.С. Сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП на двух линиях мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина // *Молекулярная*

- биология. – 2021. Т. 55. – №1. – С. 152–163. DOI: 10.31857/S0026898421010031
17. Spurney C.F., Gordish-Dressman H., Guerron A.D., Sali A., Pandey G.S., Rawat R., Van Der Meulen J.H., Cha H.J., Pistilli E.E., Partridge T.A., Hoffman E.P., Nagaraju K. Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures // *Muscle Nerve*. – 2009. – Vol. 39, No. 5. – P. 591–602. DOI: 10.1002/mus.21211
 18. Reeves S.L., Fleming K.E., Zhang L., Scimemi A. M-Track: A New Software for Automated Detection of Grooming Trajectories in Mice // *PLoS Comput. Biol.* – 2016. – Vol. 12, No. 9. – Art. ID: No. e1005115. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005115
 19. Nagaraju K., Raben N., Loeffler L., Parker T., Rochon P.J., Lee E., Danning C., Wada R., Thompson C., Bahtiyar G., Craft J., Hooft Van Huijsduijnen, R., Plotz P. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97, No. 16. – P. 9209–9214. DOI: 10.1073/pnas.97.16.9209
 20. García-Campos P., Báez-Matus X., Jara-Gutiérrez C., Paz-Araos M., Astorga C., Cea L.A., Rodríguez V., Bevilacqua J.A., Caviedes P., Cárdenas A.M. N-Acetylcysteine Reduces Skeletal Muscles Oxidative Stress and Improves Grip Strength in Dysferlin-Deficient Bla/J Mice. *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, No. 12. – Art. No. 4293. DOI: 10.3390/ijms21124293
 21. Veniaminova E., Oplatchikova M., Bettendorff L., Kotenkova E., Lysko A., Vasilevskaya E., Kalueff A.V., Fedulova L., Umriukhin A., Lesch K.P., Anthony D.C., Strekalova T. Prefrontal cortex inflammation and liver pathologies accompany cognitive and motor deficits following Western diet consumption in non-obese female mice // *Life Sci.* – 2020. – Vol. 241. – Art. No. 117163. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117163
 22. Спасов А.А., Жуковская О.Н., Мальцев Д.В., Мирошников М.В., Скрипка М.О., Султанова К.Т., Морковник А.С. Анксиолитическая активность производных 11 Н-2,3,4,5-тетрагидро[1,3] диазепино[1,2-а]бензимидазола и 2-меркаптобензимидазола // *Биоорганическая химия*. – 2021. – Т. 46, № 1. – P. 92–100. DOI: 10.31857/S0132342320010145
 23. Полякова Л.В., Жукова Е.С., Иркаева А.М., Чугунова В.В., Щербатюк Т.Г., Позднякова М.А., Умнягина И.А. Концепция применения теста «вынужденное плавание с грузом» для экспериментального моделирования трудового процесса на лабораторных животных. Тезисы Девятой конференции специалистов по лабораторным животным Rus-LASA // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2021. – №4. DOI: 10.29296/2618723X-RusLASA2021-06
 24. Зайцева М.С., Иванов Д.Г., Александровская Н.В. Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины её вариабельности // *Биомедицина*. – 2015. – No. 4. – P. 30–42.
 25. Шустов Е.Б., Новиков В.С., Берзин И.А., Ким А.Е., Болотова В.Ц. Функциональное спортивное питание для единоборцев: разработка и критерии эффективности // *Биомедицина*. – 2017. – №1. – С. 10–23.
 26. Chernova O.N., Chekmareva I.A., Mavlikeev M.O., Yakovlev I.A., Kiyasov A.P., Deev R.V. Structural and ultrastructural changes in the skeletal muscles of dysferlin-deficient mice during postnatal ontogenesis // *Ultrastruct. Pathol.* – 2022. – Vol. 46, No. 4. – P. 359–367. DOI: 10.1080/01913123.2022.2105464
 27. Chernova O.N., Mavlikeev M.O., Kiyasov A.P., Bozo I.Y., Deev R.V. Reactive Changes in Elements of Stromal-Vascular Differons of Dysferlin-Deficient Skeletal Muscles after Procaine Injection // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2021. – Vol. 170, No. 5. – P. 677–681. DOI: 10.1007/s10517-021-05131-5
 28. Chakravorty S., Nallamilli B.R.R., Khadilkar S.V., Singla M.B., Bhutada A., Dastur R., Gaitonde P.S., Rufibach L.E., Gloster L., Hegde M. Clinical and Genomic Evaluation of 207 Genetic Myopathies in the Indian Subcontinent // *Front. Neurol.* – 2020. – No. 11. – Art. No. 559327. DOI: 10.3389/fneur.2020.559327
 29. Хухарева Д.Д., Гусева К.Д., Суханова Ю.А., Себенцова Е.А., Левицкая Н.Г. Физиологические эффекты острой неонатальной нормобарической гипоксии у мышей линии C57BL/6 // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2020. – Т. 70, № 4. – С. 515–527. DOI: 10.31857/S0044467720040048
 30. Ho M., Post C.M., Donahue L.R., Lidov H.G., Bronson R.T., Goolsby H., Watkins S.C., Cox G.A., Brown R.H. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency // *Hum. Mol. Gen.* – 2004. – Vol. 13, No. 18. – P. 1999–2010. DOI: 10.1093/hmg/ddh212
 31. Hornsey M.A., Laval S.H., Barresi R., Lochmüller H., Bushby K. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models // *Neuromuscul. Disord.* – 2013. – Vol. 23, No. 5. – P. 377–387. DOI: 10.1016/j.nmd.2013.02.004
 32. Grounds M.D., Terrill J.R., Radley-Crabb H.G., Robertson T., Papadimitriou J., Spuler S., Shavlakadze T. Lipid accumulation in dysferlin-deficient muscles // *Am. J. Pathol.* – 2014. – Vol. 184, No. 6. – P. 1668–1676. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.02.005
 33. Lloyd E.M., Xu H., Murphy R.M., Grounds M.D., Pinniger G.J. Dysferlin-deficiency has greater impact on function of slow muscles, compared with fast, in aged BLAJ mice // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, No. 4. – Art. ID: No. e0214908. DOI: 10.1371/journal.pone.0214908

АВТОРЫ

Корокин Михаил Викторович – доктор медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: korokin@bsu.edu.ru

Кузубова Елена Валерьевна – младший научный

сотрудник лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-2425-5027. E-mail: 1015artek1015@mail.ru

Радченко Александра Игоревна – младший

научный сотрудник лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-4554-2116. E-mail: sandrinkaradchenko@gmail.com

Деев Роман Вадимович – кандидат медицинских наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России; директор по науке ПАО «ИСКЧ». ORCID ID: 0000-0001-8389-3841. E-mail: romdey@gmail.com

Яковлев Иван Антонович – генеральный директор ООО «Генотаргет». ORCID ID: 0000-0001-8127-4078. E-mail: ivan@ivan-ya.ru

Дейкин Алексей Васильевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-9960-0863. E-mail: alexei@deikin.ru

Жунусов Никита Сергеевич – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-1969-3615. E-mail: nzhunu@mail.ru

Краюшкина Анастасия Михайловна – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-6830-3820. E-mail: krayushkina_2016@mail.ru

Покровский Владимир Михайлович – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-1493-3376. E-mail: pokrovskiy@bsu.edu.ru

Пученкова Олеся Андреевна – ординатор медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский

государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-7657-0937. E-mail: lesya759@yandex.ru

Чапров Кирилл Дмитриевич – младший научный сотрудник Лаборатория моделирования и геномной терапии заболеваний человека института физиологически активных веществ ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; младший научный сотрудник ИФАВ РАН. ORCID ID: 0000-0002-0258-1879. E-mail: chapkir@gmail.com

Екимова Наталья Викторовна – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-3629-048X. E-mail: ekimova@bsu.edu.ru

Бардаков Сергей Николаевич – врач-невролог, преподаватель кафедры нервных болезней ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации. ORCID ID: 0000-0002-3804-6245. E-mail: epistaxis@mail.ru

Чернова Ольга Николаевна – ассистент кафедры морфологии человека ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6310-9319. E-mail: olgachernova92@yandex.ru

Емелин Алексей Михайлович – ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России; аспирант кафедры патологической анатомии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-4109-0105. E-mail: eamar40rn@gmail.com

Лимаев Игорь Сергеевич – старший лаборант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0994-9787. E-mail: ig.limaev@gmail.com