

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.627332>

Патоморфологическая характеристика миокарда мышей с дисферлинопатией (линия Bla/J)

М.А. Савельева¹, С.Н. Бардаков², А.М. Емелин¹, Р.В. Деев³¹ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;³ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Дисферлинопатия — наследственная прогрессирующая мышечная дистрофия, причиной развития которой являются мутации в гене *DYSF*. Патоморфологические изменения поперечнополосатой скелетной мускулатуры детально описаны при снижении экспрессии дисферлина или при его полном отсутствии, в то время как данные о гистопатологии миокарда при дисферлинопатии фрагментарны и ограничены.

Цель исследования — оценить структурные изменения миокарда в разные возрастные периоды у мышей линии Bla/J, являющейся моделью дисферлинопатии.

Материалы и методы. Исследовали нокаутную по гену *DYSF* линию мышей Bla/J на сроках 3, 6 и 12 мес с момента рождения. Контрольную группу составили мыши линии Balb/C в возрасте 6 мес. Проводили иммунофлуоресцентную детекцию белка дисферлина в миокарде с оценкой его наличия и распределения в кардиомиоцитах. Анализировали структуру миокарда в парафиновых срезах с применением окраски гематоксилином и эозином, железным гематоксилином по Рего и ГОФПК по Ли. Провели морфометрию длины, толщины кардиомиоцитов и измерили периметр их ядер у мышей линии Bla/J.

Результаты. Дисферлин был выявлен только в миокарде мышей контрольной группы. При 95% доверительном интервале (ДИ) длина кардиомиоцитов мышей с нокаутом гена *DYSF* во всех возрастах была статистически значимо больше, чем у животных контрольной группы, максимально на 49,9 (45,9–57,4)%; толщина кардиомиоцитов — на 35,6 (32,9–37,9)%; периметр ядер кардиомиоцитов мышей линии Bla/J в возрасте 6 мес был меньше на 23,9 (20,2–27,5)%, чем у мышей линии Bla/J трёхмесячного возраста, и на 18,8 (8,5–19,7)% меньше по сравнению с контролем. У мутантных мышей выявлены прогрессирующая по сравнению с нормой гипертрофия кардиомиоцитов, нарастающая деформация кардиомиоцитов, разрушение их вставочных дисков, признаки гипоксии и некроза с исходом в фиброз. С увеличением возраста животных размер клеток миокарда уменьшался.

Заключение. Дефицит белка дисферлина приводит к значимым структурным изменениям миокарда у мышей линии Bla/J.

Ключевые слова: сердце; миокард; мыши линии Bla/J; дисферлинопатия.

Как цитировать:

Савельева М.А., Бардаков С.Н., Емелин А.М., Деев Р.В. Патоморфологическая характеристика миокарда мышей с дисферлинопатией (линия Bla/J) // Морфология. 2023. Т. 161, № 3. С. 9–18. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.627332>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.627332>

Changes in the pathomorphological condition of the myocardium in dysferlinopathy mice (Bla/J type)

Maria A. Savelyeva¹, Sergey N. Bardakov², Alexey M. Emelin¹, Roman V. Deev³

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

² S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

³ Russian Research Center of Surgery named after Academician B.V. Petrovsky, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Dysferlinopathy is heritable progressive muscular dystrophy caused by *DYSF* mutation. Currently, although skeletal muscle pathology has been defined, only fragmentary and limited myocardium histopathology data are available.

AIM: The study aimed to analyze the pathomorphological status of the myocardium in Bla/J mice models of dysferlinopathy at different ages.

MATERIALS AND METHODS: Data from two experimental groups were analyzed: Bla/J mice with *DYSF* knockout on 3, 6, and 12 months old and control wild-type Balb/C mice aged 6 months. The expressions and patterns of dyeing of protein dysferlin in the immunofluorescent search method were analyzed. These were held such parameters of the histological characteristic of the myocardium of three dyeing protocols (hematoxylin and eosin, iron hematoxylin by Rego, and hematoxylin-basic fuchsin-picric acid by Lie), and morphometry of the parameters of the cardiomyocytes (length, width of cardiomyocytes, and nuclear perimeter).

RESULTS: The immunofluorescent search method revealed high levels of dysferlin in the myocardium of the control group. Statistical analysis showed significant differences between Bla/J and Balb/C mice: the increasing length and width of cardiomyocytes in dysferlinopathy by 49.9% ((95% confidence interval, 45.9–57.4) and 35.6 (95% confidence interval, 32.9–37.9)), respectively. Nucleus perimeter was significantly reduced in the dysferlinopathy group with disease duration of 6 months (by 23.9 (95% confidence interval, 20.2–27.5) compared with the group with disease duration of 3 months and by 18.8% (95% confidence interval, 8.5–19.7)) and the control group. Consequently, progressive hypertrophy of cardiomyocytes, increasing deformation in cardiomyocytes, intercalated disk destruction, hypoxia features, and necrosis indication were observed, resulting in fibrosis. A pattern of cardiomyocyte size reduction dependent on the aging process was observed.

CONCLUSIONS: Dysferlin deficiency leads to significant damage in the myocardium of Bla/J mice.

Keywords: heart; myocardium; Bla/J mice; dysferlinopathy.

To cite this article:

Savelyeva MA, Bardakov SN, Emelin AM, Deev RV. Changes in the pathomorphological condition of the myocardium in dysferlinopathy mice (Bla/J type). *Morphology*. 2023;161(3):9–18. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.627332>

ОБОСНОВАНИЕ

Дисферлинопатия — это наследственная прогрессирующая мышечная дистрофия, проявляющаяся дистальным, проксимальным, проксимо-дистальным, а также врождёнными вариантами клинических фенотипов [1]. Её распространённость в мире составляет до 1:200 000 новорождённых [2, 3]. Наследование заболевания преимущественно аутосомно-рецессивное, однако описан и доминантный тип [4, 5]. Причиной развития дисферлинопатии служат мутации в гене *DYSF*, локализованном в коротком плече второй хромосомы [4]. Основной функцией дисферлина является обеспечение репарации сарколеммы и эндоплазматического ретикулума мышечных волокон поперечнополосатой скелетной мускулатуры, однако значение этого белка для цито- и гистофизиологии кардиомиоцитов остаётся недостаточно изученным.

L.V. Anderson и соавт. [6] в 1999 году установили, что дисферлин экспрессируется с 5–6-й недели эмбриогенеза и выявляется во многих тканях организма человека, но влияет преимущественно на развитие мышечной ткани [6, 7]. При дефиците дисферлина наиболее выраженные патологические изменения возникают в поперечнополосатой скелетной мышечной ткани. Накоплены обширные сведения о патоморфологических особенностях дистрофического процесса в скелетных мышцах как у животных, так и у людей [8–11]. Установлено, что в мышечных волокнах отмечаются разрывы и инвагинации сарколеммы, субсарколеммальные скопления везикул, вакуолизация, слияние митохондрий, расширение цистерн саркоплазматической сети, дезорганизация миофибрилл и Т-трубочек [8, 12]. Описанные изменения обусловлены неэффективностью внутриклеточной регенерации и, как следствие, некрозом, воспалением, липоидозом и фиброзом мышечных волокон [8, 13]. За последние 20 лет появились данные о значении дисферлина для функционирования миокарда [14–17]. Преимущественное исследование дистрофического процесса в скелетных мышцах обусловлено их приоритетным вовлечением и большей доступностью для гистологического исследования. Данные о гистопатологии миокарда при дисферлинопатии фрагментарны и ограничены, так как кардиомиопатия не имеет очевидных клинических проявлений до поздней стадии заболевания, а биопсийное исследование миокарда нецелесообразно.

Цель исследования — оценить патологические морфологические изменения в поперечнополосатой сердечной мышечной ткани при дисферлинопатии у мышей линии Bla/J в различные возрастные периоды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено наблюдательное одноцентровое проспективное сплошное контролируемое нерандомизированное

исследование. В качестве объекта исследования выбран миокард мышей, мутантных по гену *DYSF*, в качестве предмета — патоморфологические изменения миокарда модельных мышей линии Bla/J. Задачами исследования являлось определение и сравнение строения миокарда у мышей линии Bla/J с дисферлинопатией и мышей линии Balb/C без дисферлинопатии. Схема проведения исследования включала в себя качественную (наличие/отсутствие структурных и метаболических изменений) и количественную оценку кардиомиоцитов (исследование длины, толщины и периметра ядер кардиомиоцитов) на парафиновых срезах миокарда животных исследуемой и контрольной групп с последующей окраской и морфометрией. Изготовление парафиновых срезов проведено по классической методике [18]. Миокард левого желудочка мышей обеих групп исследован на наличие белка дисферлина с использованием иммунофлуоресцентного метода. Для этого фрагменты сердечной мышцы помещали в изопентан, охлаждённый в жидком азоте, толщина криосрезов — 10 мкм. Животных выводили из эксперимента путём декапитации.

Объекты (участники) исследования

В исследование включены мыши линии Bla/J, являющиеся моделью дисферлинопатии (линия создана путём вставки ретротранспозона в интрон 4) и мыши «дикого» типа линии Balb/C. Возраст животных — от 3 до 12 месяцев включительно.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе кафедры патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова (Санкт-Петербург).

Основной исход исследования

Конечная точка исследования — описать патогистологические характеристики миокарда мышей с дисферлинопатией и сравнить их с характеристиками миокарда здоровых мышей.

Анализ в подгруппах

Исследуемая группа представлена 7 самцами мышей линии Bla/J в качестве модели дисферлинопатии в возрасте 3, 6 и 12 мес (3, 3 и 1 особь соответственно). Контрольная группа включала 2 здоровых самцов мышей линии Balb/C в возрасте 6 мес. Сравнение проводили внутри каждой из групп, а также между каждой возрастной подгруппой линий Bla/J и Balb/C.

Методы регистрации исходов

Препараты парафиновых срезов миокарда окрашивали гематоксилином и эозином, железным гематоксилином по Рего для оценки сохранности поперечной исчерченности поперечнополосатой мышечной ткани миокарда [19], ГОФПК по Ли для выявления признаков гипоксического

повреждения кардиомиоцитов (ГОФПК — гематоксилин-основной фуксин-пикриновая кислота) [19].

Характеристику кардиомиоцитов осуществляли при помощи морфометрического учёта трёх параметров: расстояние между вставочными дисками (длина), толщина и периметр ядер (формат 2D в программе AxioVision v. 4.9.1, США).

На криосрезах ставили реакции с использованием первичных кроличьих моноклональных антител к дисферлину (ab124684, 1:200; Abcam, Великобритания). В качестве вторичных антител применяли Alexa Fluor 647 в разведении 1:200 (Invitrogen, США) с докраской ядер DAPI (Servicebio, Китай). Препараты сканировали в микроскопе Panoramic 250 Flash (3DHISTECH, Венгрия).

Этическая экспертиза

Экспериментальная работа с животными одобрена локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (протокол № 14 от 08.02.2019 г.). Содержание мышей и все манипуляции с ними осуществляли в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 2006).

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывали.

Для анализа результатов применён набор инструментов описательной и аналитической статистики, реализованный в программе Past v. 4.09 (Норвегия) [20]. Для проверки статистической однородности нескольких выборок использованы процедуры однофакторного (критерий Фридмана) и двухфакторного (критерий Краскела–Уоллиса) дисперсионного анализа. Центральные тенденции выборок представлены в виде средних значений (M) и медиан (Me) в зависимости от соответствия/несоответствия нормальному распределению. Дисперсия центральных тенденций представлена в виде 95% доверительных интервалов (ДИ), рассчитанных методом бутстрэпа и Монте-Карло. Для последующего выявления неоднородных групп применяли процедуры множественных сравнений — критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, для анализа корреляций — ранговый

коэффициент корреляции Спирмена. Линейная зависимость переменных описана с помощью уравнения парной линейной регрессии ($y=bx+a$), где b (slope — от *англ.* «наклон») — угловой коэффициент; a (intercept — от *англ.* «пересечение») — свободный член линии оценки, для которых также рассчитаны 95% ДИ. При проверке статистических гипотез ориентировались на p и 95% ДИ, а для изучаемых различий оценивали абсолютный и относительный размеры эффекта (effect size) [21, 22]. Относительный размер эффекта рассчитан по методу Коэна dC (Cohen). Доверительные интервалы для dC вычисляли с помощью электронной таблицы EffectSizeCalculator.xls и программы Effect Size Generator.xls. Для графической реализации данных использовали интерактивную программу BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные результаты исследования

У мышей линии Bla/J в возрасте 3 мес кардиомиоциты параллельно ориентированы, не деформированы, признаков дискомплексации нет. У животных в возрасте 6 мес расположение кардиомиоцитов непараллельное, а в возрасте 12 мес появляются признаки утраты комплексности ткани, волнообразная деформация мышечных клеток, также отмечено увеличение толщины (диаметра) кардиомиоцитов (рис. 1).

Морфометрические характеристики кардиомиоцитов животных Bla/J и контроля статистически значимо различались по ряду параметров (рис. 2).

Длина кардиомиоцитов мышей линии Bla/J на всех сроках была статистически значимо больше, чем у мышей контрольной группы, максимально — в возрасте 3 мес: 49,9 (45,9–57,4)% (95% ДИ), $p=5,4 \times 10^{-48}$ (табл. 1). При этом исследуемые подгруппы животных линии Bla/J статистически значимо отличались друг от друга при наличии тренда на уменьшение длины кардиомиоцитов при увеличении возраста животных. Это явление описано уравнением линейной регрессии: $y=-6,51x+254,33$ (95% ДИ: slope $-8,7$; $-4,2$; intercept 240,8; 267,9; $p=1,5 \times 10^{-6}$). Таким образом, возраст животных и длина кардиомиоцитов имеют линейное соотношение.

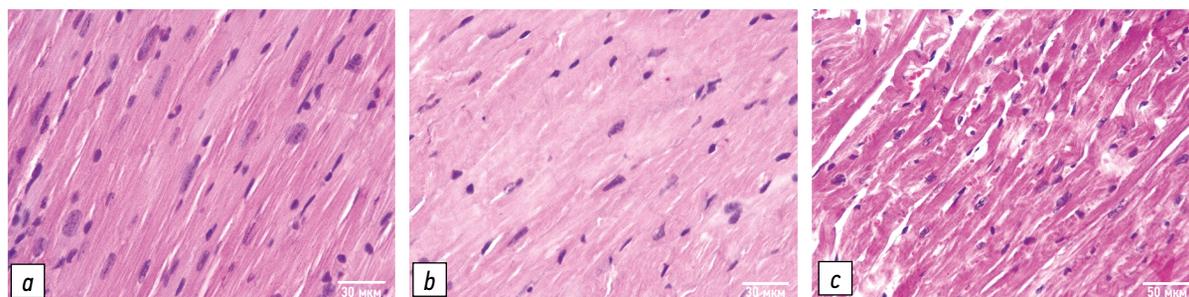


Рис. 1. Продольные срезы миокарда мышей линии Bla/J в возрасте 3 (a), 6 (b), 12 (c) мес. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 200$.
Fig. 1. Axial section of myocardium in Bla/J mice 3 (a), 6 (b), 12 (c) months old. Hematoxylin and eosin dying; $\times 200$.

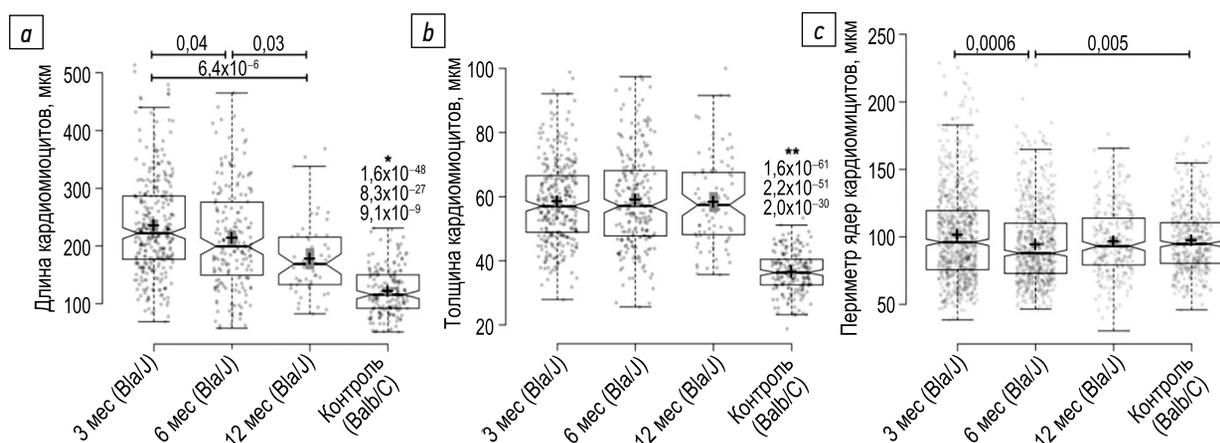


Рис. 2. Морфометрические характеристики кардиомиоцитов мышей линии Bla/J и Balb/C: *a* — длина кардиомиоцитов; *b* — толщина (диаметр) кардиомиоцитов; *c* — периметр ядер кардиомиоцитов; * значение *p* при сравнении каждой из групп Bla/J с Balb/C по характеристике «длина кардиомиоцитов», ** значение *p* при сравнении каждой из групп Bla/J с Balb/C по характеристике «толщина кардиомиоцитов».

Fig. 2. Morphometric characteristics of cardiomyocytes in Bla/J and Balb/C mice: *a* — cardiomyocytes length; *b* — cardiomyocytes width (diameter); *c* — cardiomyocytes nucleus perimeter; * *p*-value in «cardiomyocytes length» comparison of every group of Bla/J mice with Balb/C mice, ** *p*-value in «cardiomyocytes width (diameter)» comparison of every group of Bla/J mice with Balb/C mice.

Таблица 1. Различия морфометрических параметров кардиомиоцитов мышей линий Bla/J и Balb/C разных возрастов
Table 1. Differences in morphometric parameters of cardiomyocytes of compared Bla/J and Balb/C mice groups in different age

Сравниваемые группы	Размер абсолютного эффекта, мкм (95% ДИ)	Размер относительного эффекта, % (95% ДИ)	Размер эффекта по Коэну	<i>p</i>
Длина кардиомиоцитов				
Bla/J 3 мес и Bla/J 6 мес	21,39 (5,7–37,1)	12,8 (6,9–19,5)	–0,24	0,007
Bla/J 6 мес и Bla/J 12 мес	36,11(10,6–61,6)	37,9 (33,9–49,2)	–0,42	0,005
Bla/J 3 мес и Balb/C	113,7 (127,4–99,9)	49,9 (45,9–57,4)	–1,50	$5,4 \times 10^{-48}$
Bla/J 6 мес и Balb/C	92,3 (78,1–106,6)	42,9 (37,4–51,1)	–1,30	$8,7 \times 10^{-31}$
Bla/J 12 мес и Balb/C	56,2 (41,7–70,7)	34,6 (28,6–44,7)	–1,19	$7,0 \times 10^{-13}$
Толщина кардиомиоцитов				
Bla/J 3 мес и Balb/C	22,1 (24,1–20,0)	34,0 (30,3–36,9)	–1,9	$1,3 \times 10^{-71}$
Bla/J 6 мес и Balb/C	22,6 (24,8–20,2)	35,6 (32,9–37,9)	–1,9	$8,4 \times 10^{-59}$
Bla/J 12 мес и Balb/C	21,9 (24,3–19,4)	33,4 (29,8–37,1)	–2,3	$6,6 \times 10^{-47}$
Периметр ядер				
Bla/J 3 мес и Bla/J 6 мес	7,1 (0,1–6,4)	23,9 (20,2–27,5)	–0,11	0,04
Bla/J 6 мес и Balb/C	3,1 (24,8–20,2)	18,8 (8,5–19,7)	–1,9	$8,4 \times 10^{-59}$

Примечание: согласно вербальной шкале Коэна (абсолютные) значения *dC* от 0,2 до 0,5 трактуются как «слабый» эффект, от 0,5 до 0,8 — как «умеренный» эффект и значения *dC* $\geq 0,8$ — как «сильный» эффект.

Note: according to the Cohen verbal scale (absolute) *dC* values from 0.2 to 0.5 are interpreted as a “weak” effect, from 0.5 to 0.8 — as a “moderate” effect and *dC* values ≥ 0.8 as a “strong” effect.

Толщина (диаметр) кардиомиоцитов мышей всех возрастных подгрупп линии Bla/J была статистически значимо больше, чем в контрольной группе, причём максимально — в возрасте 6 мес: 35,6 (32,9–37,9)% (95% ДИ); $p=8,4 \times 10^{-59}$. Между исследуемыми возрастными животными линии Bla/J статистически значимых различий этого параметра не выявлено.

При оценке периметра ядер кардиомиоцитов, являющегося косвенным признаком синтетической активности клетки, установлено статистически значимое уменьшение этого параметра в подгруппе Bla/J (6 мес) на 23,9 (95% ДИ: 20,2–27,5)% по сравнению с подгруппой Bla/J (3 мес), $p=0,04$; и на 18,8 (95% ДИ: 8,5–19,7)% по сравнению с контрольной группой, $p=8,4 \times 10^{-59}$. Уменьшение периметра

ядер с увеличением времени наблюдения за опытной группой описано уравнением линейной регрессии: $y = -0,63x + 101$ (95% ДИ: slope $-1,1$; $-0,2$; intercept $98,4$; $104,6$; $p = 0,008$). Периметр ядер и продолжительность наблюдения за опытной группой имеют линейное соотношение.

При окрашивании железным гематоксилином у мышей линии Bla/J с 3 мес выявлены диффузный межмышечный фиброз миокарда, а также исчезновение поперечной исчерченности у части кардиомиоцитов и разрушение вставочных дисков (рис. 3, *a*). В контрольной группе (Balb/C) миокард был интактным с параллельно ориентированными кардиомиоцитами, сохранной поперечной исчерченностью, вставочные диски визуализировались, а фиброз отсутствовал (рис. 3, *c*).

При окрашивании ГОФПК по Ли у мышей линии Bla/J в возрасте 3 мес выявлены гипоксические изменения в виде диффузной фуксинофильной окраски кардиомиоцитов (рис. 3, *b*). В контрольной группе мышей (Balb/C) в миокарде отсутствовали признаки гипоксического повреждения (рис. 3, *d*).

При проведении иммунофлуоресцентной реакции с антителами к дисферлину в миокарде мышей линии Bla/J 3-месячного, 6-месячного, 12-месячного возраста белок не выявлен (на рис. 4, *a* представлены результаты исследования миокарда животных в возрасте 3 мес). У мышей контрольной группы результат был положительным (рис. 4, *b*), дисферлин представлен в виде включений в саркоплазме и в области вставочных дисков.

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

В миокарде мышей линии Bla/J наблюдались признаки нарушения структуры ткани с тенденцией к нарастанию патологических изменений от 3 к 12 мес. В контрольной группе (при наличии дисферлина) подобных изменений не выявлено, и это позволяет сделать вывод о том, что отсутствие дисферлина является основным фактором развития патоморфологических изменений миокарда.

Обсуждение основного результата исследования

У животных линии Bla/J состояние миокарда характеризовалось волнообразной деформацией кардиомиоцитов, нарушением параллельной ориентированности кардиомиоцитов и гипоксическим повреждением, чего ранее не наблюдалось в миокарде животных других артифициально полученных линий мышей с дисферлинопатией (линии A/J, C57BL/6J, SJL/J) [23].

Кроме того, установлено исчезновение вставочных дисков у животных с дисферлинопатией и значимое увеличение расстояния между вставочными дисками по сравнению с животными контрольной группы. Сходные

изменения, характеризующиеся разрушением до трети вставочных дисков кардиомиоцитов, были показаны ранее в миокарде мышей линии C57BL/6J на «поздних» сроках течения дисферлинопатии [24].

Значимое утолщение кардиомиоцитов у мышей линии Bla/J выявлено во всех возрастных группах. Причиной развития гипертрофии кардиомиоцитов, по всей вероятности, является ремоделирование Т-системы кардиомиоцитов в виде укорочения Т-трубочек, их аксиальной переориентации и разобщения с саркомерами [15, 25]. Данный патологический процесс ведёт к изменению гомеостаза кальция в кардиомиоцитах, определяющего функционирование сигнального пути кальций-кальмодулин [26, 27]. Гипертрофия миокарда также была описана у дисферлин-дефицитных мышей линии B6.129-Dys^{f^{tm1Kcam}}/J на 3-м месяце жизни в виде значимого увеличения отношения массы миокарда к массе тела в отличие от группы контроля (масса тела в обеих группах не имела статистически значимых различий). Кроме органного уровня, гипертрофические изменения наблюдались и в изолированных кардиомиоцитах дисферлин-дефицитных мышей в возрасте 3 мес в отличие от группы контрольных животных [28]. Таким образом, при прогрессировании дисферлинопатии у мышей с возрастом развивается гипертрофия кардиомиоцитов.

Межмышечный фиброз у мышей линии Bla/J выявлялся уже на 3-м месяце заболевания, в отличие от дисферлин-дефицитных мышей линии B6.129-Dys^{f^{tm1Kcam}}/J, у которых фиброз детектировался лишь на 20-м месяце жизни и проявлялся трёхкратным увеличением количества коллагена в строме органа по сравнению с контролем [15, 28]. У мышей линии A/J также не отмечено значимого фиброза [14]. В частности, доленое содержание коллагена нарастало с 2 до 3% в период с 2 до 18 мес наблюдения и не отличалось от контрольной линии мышей A/HeJ [14]. Подобная вариабельность выраженности фиброза миокарда среди различных линий дисферлин-дефицитных мышей требует дальнейших исследований.

Дисферлин в миокарде контрольной линии мышей Balb/C располагался перинуклеарно, в области вставочных дисков и в эндотелиоцитах, что соответствует ранее представленным сведениям [12, 14, 15, 25]. Ряд исследователей также указывают на наличие дисферлина в тубулярной системе кардиомиоцитов и вблизи кальциевых каналов L-типа и риадиноновых рецепторов [12, 25]. В миокарде мышей линии Bla/J дисферлин не выявлен, что является предполагаемой причиной развития каскада патологических изменений в миокарде.

Анализ исследований кардиопатологии у пациентов с поясно-конечностной мышечной дистрофией R2 позволяет провести ряд параллелей с результатами, полученными в нашей работе. В частности, описаны случаи дилатационной кардиомиопатии, характеризовавшиеся гипертрофией кардиомиоцитов в сочетании с увеличением размера ядер, интерстициальным фиброзом

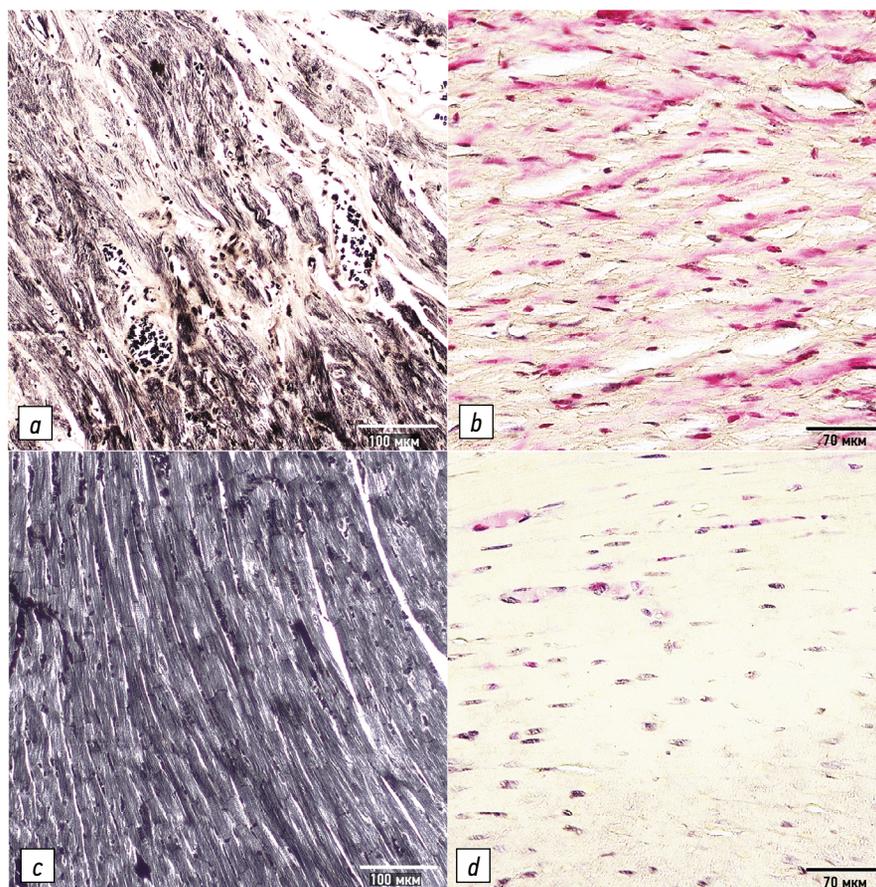


Рис. 3. Миокард мышей линии Bla/J (*a, b*) и Balb/C (*c, d*): *a* — 12 мес, межмышечный фиброз; *b* — 6 мес, множественные фуксинофильные включения в цитоплазме; *c* — 6 мес, отсутствие признаков фиброза; *d* — 6 мес, отсутствие фуксинофильных включений в кардиомиоцитах. Окраска железным гематоксилином по Рего (*a, c*); окраска ГОФПК по Ли (*b, d*); *a, c* — $\times 200$; *b, d* — $\times 400$.

Fig. 3. Myocardium of Bla/J (*a, b*) and Balb/C (*c, d*) mice: *a* — 12 months old, intermuscular fibrosis; *b* — 6 months old, multiple fuchsinophilic insertions in cytoplasm; *c* — 6 months old, no fibrosis features; *d* — 6 months old, no fuchsinophilic insertions in cytoplasm. Iron hematoxylin dying (*a, c*); hematoxylin-basic fuchsin-picric acid dying (*b, d*); *a, c* — $\times 200$; *b, d* — $\times 400$.

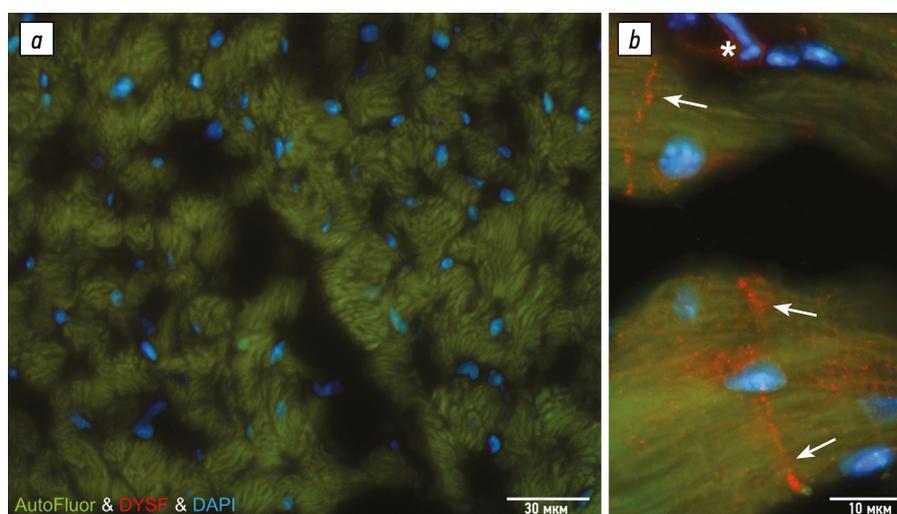


Рис. 4. Иммунофлуоресцентная реакция с антителами к дисферлину: *a* — поперечное сечение кардиомиоцитов мышей линии Bla/J; *b* — продольное сечение кардиомиоцитов мышей линии Balb/C, продукт реакции локализован перинуклеарно в области вставочных дисков (\rightarrow) и в эндотелиоцитах (*). Свечение в зелёном спектре — аутофлуоресценция белков цитоскелета, свечение в красном спектре — свечение системы детекции, свечение в синем спектре — докраска ядер DAPI; *a* — $\times 400$; *b* — $\times 1000$.

Fig. 4. Immunofluorescent reaction with dysferlin antibody: *a* — cross section of Bla/J mice cardiomyocytes; *b* — axial section Balb/C mice, the product of the reaction has perinuclear localisation and intercalated disks sites (\rightarrow) and in endothelium (*). Green spectrum fluorescence is auto fluorescence of the cytoskeleton, red spectrum fluorescence is fluorescence of the detection system, blue spectrum fluorescence is nuclear coloring with DAPI; *a* — $\times 400$; *b* — $\times 1000$.

или только с вариабельностью размера кардиомиоцитов и дезорганизацией их расположения [29, 30]. Однако диффузный фиброз и жировая инфильтрация миокарда могут быть обнаружены у пациентов с дисферлинопатией даже без клинико-инструментальных признаков кардиомиопатии [16]. Таким образом, в миокарде пациентов с дисферлинопатией могут наблюдаться структурные нарушения, в ряде случаев сопровождающиеся функциональными изменениями [30].

Ограничения исследования. Изучена только одна модель дисферлинопатии — линия Bla/J, что затрудняет экстраполяцию результатов на другие модели.

Кроме того, при планировании и проведении исследования размер выборки для достижения требуемой статистической мощности результатов не рассчитывался. В связи с этим полученная в ходе исследования выборка не может считаться в достаточной степени репрезентативной, что не позволяет экстраполировать полученные результаты и их интерпретацию на генеральную совокупность за пределами исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение структуры миокарда у дисферлин-дефицитных мышей линии Bla/J увеличивается с возрастом животных и включает гипертрофию кардиомиоцитов и миокардиальный фиброз. Отсутствие белка дисферлина является ключевым фактором развития патоморфогенеза кардиомиопатий у экспериментальных животных, в частности линии Bla/J.

Вовлечение миокарда в патологический процесс при дисферлинопатии подтверждается выявлением гипертрофии кардиомиоцитов у дисферлин-дефицитных линий мышей и пациентов с поясно-конечностной мышечной дистрофией R2. Вариативность выраженности фиброзных изменений в миокарде различных дисферлин-дефицитных мышей и пациентов ставит под сомнение облигатность данного морфологического признака.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Straub V., Murphy A., Udd B.; LGMD workshop study group. 229th ENMC international workshop: limb girdle muscular dystrophies — nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017 // *Neuromuscul Disord.* 2018. Vol. 28, N 8. P. 702–710. doi: 10.1016/j.nmd.2018.05.007
2. Mah J.K., Korngut L., Fiest K.M., et al. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of the muscular dystrophies // *Can J Neurol Sci.* 2016. Vol. 43, N 1. P. 163–177. doi: 10.1017/cjn.2015.311
3. Umakhanova Z.R., Bardakov S.N., Mavlikeev M.O., et al. Twenty-year clinical progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan // *Front Neurol.* 2017. Vol. 8. P. 145. doi: 10.3389/fneur.2017.00145
4. Bashir R., Strachan T., Keers S., et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p // *Hum Mol Genet.* 1994. Vol. 3, N 3. P. 455–457. doi: 10.1093/hmg/3.3.455

Полученные данные позволяют расширить представления о механизмах развития кардиомиопатии при дисферлинопатии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1346.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: М.А. Савельева — изготовление гистологических препаратов, обзор литературы, подготовка и написание текста статьи; С.Н. Бардаков — статистическая обработка полученных результатов, подготовка и написание текста статьи, редактирование текста; А.М. Емелин — подготовка графических материалов; Р.В. Деев — дизайн исследования, редактирование текста статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, agreement No. 075-15-2021-1346.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. M.A. Savelyeva — production of histological preparations, literature review, writing of the article; S.N. Bardakov — statistical processing of the results, writing and editing the article; A.M. Emelin — preparation of graphic materials; R.V. Deev — research design, editing the text of the article.

5. Folland C., Johnsen R., Botero Gomez A., et al. Identification of a novel heterozygous DYSF variant in a large family with a dominantly-inherited dysferlinopathy // *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022. Vol. 48, N 7. P. e12846. doi: 10.1111/nan.12846
6. Anderson L.V., Davison K., Moss J.A., et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development // *Hum Mol Genet.* 1999. Vol. 8, N 5. P. 855–861. Corrected and republished from: *Hum Mol Genet* 1999. Vol. 8. P. 1141. doi: 10.1093/hmg/8.5.855
7. Bulankina A.V., Thoms S. Functions of vertebrate ferlins // *Cells.* 2020. Vol. 9, N 3. P. 534. doi: 10.3390/cells9030534
8. Чернова О.Н. Особенности строения и репаративного гистогенеза поперечнополосатой скелетной мышечной ткани у мышей с генетически обусловленным дефицитом дисферлина: дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2021. EDN: DNCGFD

9. Ho M., Post C.M., Donahue L.R., et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency // *Hum Mol Genet.* 2004. Vol. 13, N 18. P. 1999–2010. doi: 10.1093/hmg/ddh212
10. Cárdenas A.M., González-Jamett A.M., Cea L.A., et al. Dysferlin function in skeletal muscle: possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies // *Exp Neurol.* 2016. Vol. 283(Pt A). P. 246–254. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.026
11. Gayathri N., Alefia R., Nalini A., et al. Dysferlinopathy: spectrum of pathological changes in skeletal muscle tissue // *Indian J Pathol Microbiol.* 2011. Vol. 54, N 2. P. 350–354. doi: 10.4103/0377-4929.81636
12. Hofhuis J., Bersch K., Büssenschütt R., et al. Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy // *J Cell Sci.* 2017. Vol. 130, N 5. P. 841–852. doi: 10.1242/jcs.198861
13. Hornsey M.A., Laval S.H., Barresi R., et al. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models // *Neuromuscul Disord.* 2013. Vol. 23, N 5. P. 377–387. doi: 10.1016/j.nmd.2013.02.004
14. Chase T.H., Cox G.A., Burzenski L., et al. Dysferlin deficiency and the development of cardiomyopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2B // *Am J Pathol.* 2009. Vol. 175, N 6. P. 2299–2308. doi: 10.2353/ajpath.2009.080930
15. Han R., Bansal D., Miyake K., et al. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury // *J Clin Invest.* 2007. Vol. 117, N 7. P. 1805–1813. doi: 10.1172/JCI30848
16. Nishikawa A., Mori-Yoshimura M., Segawa K., et al. Respiratory and cardiac function in japanese patients with // *Muscle Nerve.* 2016. Vol. 53, N 3. P. 394–401. doi: 10.1002/mus.24741
17. Tan S.M.L., Ong C.C., Tan K.B., et al. Subclinical cardiomyopathy in miyoshi myopathy detected by late gadolinium enhancement cardiac magnetic resonance imaging // *Int Heart J.* 2021. Vol. 62, N 1. P. 186–192. doi: 10.1536/ihj.20-354
18. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. 95 с. EDN: RTTUSB
19. Мавликеев М.О., Архипова С.С., Чернова О.Н., и др. Краткий курс гистологической техники: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет, 2020. 107 с.
20. Øyvind Hammer D.A.T.H., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. Vol. 4, N 1. Режим доступа: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
21. Kraemer H.C., Kupfer D.J. Size of treatment effects and their importance to clinical research and practice // *Biol Psychiatry.* 2006. Vol. 59, N 11. P. 990–996. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.014
22. Coe R. Effect size calculator. Cambridge CEM, 2000. Режим доступа: <https://lbecker.uccs.edu/>
23. Wenzel K., Geier C., Qadri F., et al. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts // *J Mol Med (Berl).* 2007. Vol. 85, N 11. P. 1203–1214. doi: 10.1007/s00109-007-0253-7
24. Bonda T.A., Szyńska B., Sokółowska M., et al. Remodeling of the intercalated disc related to aging in the mouse heart // *J Cardiol.* 2016. Vol. 68, N 3. P. 261–268. doi: 10.1016/j.jcc.2015.10.001
25. Hofhuis J., Bersch K., Wagner S., et al. Dysferlin links excitation-contraction coupling to structure and maintenance of the cardiac transverse-axial tubule system // *Europace.* 2020. Vol. 22, N 7. P. 1119–1131. doi: 10.1093/europace/euaa093
26. Maier L.S., Bers D.M. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond // *J Mol Cell Cardiol.* 2002. Vol. 34, N 8. P. 919–939. doi: 10.1006/jmcc.2002.2038
27. Шевченко Ю.Л., Плотницкий А.В., Судилова В.В., и др. Морфология маркеры иммобилизирующего интерстициального фиброза сердца // *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова.* 2022. Т. 17, № 3. 84–93. EDN: CAKXR doi: 10.25881/20728255_2022_17_3_84
28. Wei B., Wei H., Jin J.P. Dysferlin deficiency blunts β -adrenergic-dependent lusitropic function of mouse heart // *J Physiol.* 2015. Vol. 593, N 23. P. 5127–5144. doi: 10.1113/JP271225
29. Suzuki N., Takahashi T., Suzuki Y., et al. An autopsy case of a dysferlinopathy patient with cardiac involvement // *Muscle Nerve.* 2012. Vol. 45, N 2. P. 298–299. doi: 10.1002/mus.22247
30. Choi E.R., Park S.J., Choe Y.H., et al. Early detection of cardiac involvement in Miyoshi myopathy: 2D strain echocardiography and late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance // *J Cardiovasc Magn Reson.* 2010. Vol. 12, N 1. P. 31. doi: 10.1186/1532-429X-12-31

REFERENCES

1. Straub V, Murphy A, Udd B; LGMD workshop study group. 229th ENMC international workshop: limb girdle muscular dystrophies — nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul Disord.* 2018;28(8):702–710. doi: 10.1016/j.nmd.2018.05.007
2. Mah JK, Korngut L, Fiest KM, et al. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of the muscular dystrophies. *Can J Neurol Sci.* 2016;43(1):163–177. doi: 10.1017/cjn.2015.311
3. Umakhanova ZR, Bardakov SN, Mavlikeev MO, et al. Twenty-year clinical progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. *Front Neurol.* 2017;8:145. doi: 10.3389/fneur.2017.00145
4. Bashir R, Strachan T, Keers S, et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet.* 1994;3(3):455–457. doi: 10.1093/hmg/3.3.455
5. Folland C, Johnsen R, Botero Gomez A, et al. Identification of a novel heterozygous DYSF variant in a large family with a dominantly-inherited dysferlinopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022;48(7):e12846. doi: 10.1111/nan.12846
6. Anderson LV, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):855–861. Corrected and republished from: *Hum Mol Genet.* 1999;8(6):1141. doi: 10.1093/hmg/8.5.855
7. Bulankina AV, Thoms S. Functions of vertebrate ferlins. *Cells.* 2020;9(3):534. doi: 10.3390/cells9030534
8. Chernova ON. *Features of structure and reparative histogenesis of transverse striated skeletal muscle tissue in mice with genetically determined dysferlin deficiency* [dissertation]. Saint Petersburg; 2021. EDN: DNCGFD
9. Ho M, Post CM, Donahue LR, et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet.* 2004;13(18):1999–2010. doi: 10.1093/hmg/ddh212
10. Cárdenas AM, González-Jamett AM, Cea LA, et al. Dysferlin function in skeletal muscle: possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. *Exp Neurol.* 2016;283(Pt A): 246–254. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.026

11. Gayathri N, Alefia R, Nalini A, et al. Dysferlinopathy: spectrum of pathological changes in skeletal muscle tissue. *Indian J Pathol Microbiol.* 2011;54(2):350–354. doi: 10.4103/0377-4929.81636
12. Hofhuis J, Bersch K, Büssenschütt R, et al. Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *J Cell Sci.* 2017;130(5):841–852. doi: 10.1242/jcs.198861
13. Hornsey MA, Laval SH, Barresi R, Lochmüller H, Bushby K. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models. *Neuromuscul Disord.* 2013;23(5):377–387. doi: 10.1016/j.nmd.2013.02.004
14. Chase TH, Cox GA, Burzenski L, et al. Dysferlin deficiency and the development of cardiomyopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2299–2308. doi: 10.2353/ajpath.2009.080930
15. Han R, Bansal D, Miyake K, et al. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J Clin Invest.* 2007;117(7):1805–1813. doi: 10.1172/JCI30848
16. Nishikawa A, Mori-Yoshimura M, Segawa K, et al. Respiratory and cardiac function in Japanese patients with dysferlinopathy. *Muscle Nerve.* 2016;53(3):394–401. doi: 10.1002/mus.24741
17. Tan SML, Ong CC, Tan KB, et al. Subclinical cardiomyopathy in Miyoshi myopathy detected by late gadolinium enhancement cardiac magnetic resonance imaging. *Int Heart J.* 2021;62(1):186–192. doi: 10.1536/ihj.20-354
18. Korzhevskiy DE, Gilyarov AV. *Fundamentals of histologic technique.* Saint Petersburg: SpecLit; 2010. 95 p. (In Russ).
19. Mavlikeyev MO, Arkhipova SS, Chernova ON, et al. *Short course of histological techniques: educational manual.* Kazan': Kazanskij universitet; 2020. 107 p. (In Russ).
20. Øyvind Hammer DATH, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001;4(1). Available from: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
21. Kraemer HC, Kupfer DJ. Size of treatment effects and their importance to clinical research and practice. *Biol Psychiatry.* 2006;59(11):990–996. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.014
22. Coe R. *Effect size calculator.* Cambridge CEM; 2000. Available from: <https://lbecker.uccs.edu/>
23. Wenzel K, Geier C, Qadri F, et al. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med (Berl).* 2007;85(11):1203–1214. doi: 10.1007/s00109-007-0253-7
24. Bonda TA, Szynaka B, Sokołowska M, et al. Remodeling of the intercalated disc related to aging in the mouse heart. *J Cardiol.* 2016;68(3):261–268. doi: 10.1016/j.jjcc.2015.10.001
25. Hofhuis J, Bersch K, Wagner S, et al. Dysferlin links excitation-contraction coupling to structure and maintenance of the cardiac transverse-axial tubule system. *Europace.* 2020;22(7):1119–1131. doi: 10.1093/europace/euaa093
26. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):919–939. doi: 10.1006/jmcc.2002.2038
27. Shevchenko YuL, Plotnitsky AV, Sudilovskaya VV, et al. The morphology and markers of the immobilizing interstitial fibrosis of the heart. *Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center.* 2022;17(3):84–93. EDN: CAK0XR doi: 10.25881/20728255_2022_17_3_84
28. Wei B, Wei H, Jin JP. Dysferlin deficiency blunts β -adrenergic-dependent lusitropic function of mouse heart. *J Physiol.* 2015;593(23):5127–5144. doi: 10.1113/JP271225
29. Suzuki N, Takahashi T, Suzuki Y, et al. An autopsy case of a dysferlinopathy patient with cardiac involvement. *Muscle Nerve.* 2012;45(2):298–299. doi: 10.1002/mus.22247
30. Choi ER, Park SJ, Choe YH, et al. Early detection of cardiac involvement in Miyoshi myopathy: 2D strain echocardiography and late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance. *Journal of cardiovascular magnetic resonance. J Cardiovasc Magn Reson.* 2010;12(1):31. doi: 10.1186/1532-429X-12-31

ОБ АВТОРАХ

* Савельева Мария Анатольевна;

адрес: Россия, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр-т, д. 47;
ORCID: 0009-0008-5667-115X;
eLibrary SPIN: 9935-5416;
e-mail: savelyeva.mariaanat@yandex.ru

Бардаков Сергей Николаевич, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0002-3804-6245;
eLibrary SPIN: 2351-4096;
e-mail: epistaxis@mail.ru

Емелин Алексей Михайлович;

ORCID: 0000-0003-4109-0105;
eLibrary SPIN: 5605-1140;
e-mail: eamar40rn@gmail.com

Деев Роман Вадимович, канд. мед. наук, доцент;

ORCID: 0000-0001-8389-3841;
eLibrary SPIN: 2957-1687;
e-mail: romdey@gmail.com

AUTHORS' INFO

* Maria A. Savelyeva;

address: 47 Piskarevskij avenue, 195067 Saint Petersburg, Russia;
ORCID: 0009-0008-5667-115X;
eLibrary SPIN: 9935-5416;
e-mail: savelyeva.mariaanat@yandex.ru

Sergey N. Bardakov, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0002-3804-6245;
eLibrary SPIN: 2351-4096;
e-mail: epistaxis@mail.ru

Alexey M. Emelin;

ORCID: 0000-0003-4109-0105;
eLibrary SPIN: 5605-1140;
e-mail: eamar40rn@gmail.com

Roman V. Deev, MD, Cand. Sci. (Medicine), Assistant Professor;

ORCID: 0000-0001-8389-3841;
eLibrary SPIN: 2957-1687;
e-mail: romdey@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author