

А.В. Иванова, С.А. Смирнихина, А.В. Лавров

Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,
Москва, Российская Федерация

Перспективы этиотропного лечения дисферлинопатий

Дисферлинопатии относятся к фенотипически гетерогенной группе нервно-мышечных заболеваний, причиной которых являются мутации в гене *DYSF*, вследствие которых нарушается экспрессия белка дисферлина в клетках скелетной мышечной ткани человека. Патологии носят аутосомно-рецессивный характер наследования, распространенность составляет 1:200 000. К дисферлинопатиям относятся такие заболевания, как миопатия Миоши с первичным поражением дистальных фрагментов нижних конечностей и пояснично-конечностная мышечная дистрофия типа 2Б с первичным поражением проксимальных фрагментов и нижних, и верхних конечностей, а также дистальная миопатия переднего ложа голени (ДМПЛГ). На сегодняшний день существуют различные патогенетические и симптоматические способы терапии наследственных мышечных дистрофий, однако очень мало зарегистрированных препаратов для этиологического лечения этих заболеваний. В настоящем обзоре рассмотрены основные современные методы генной терапии, которые могут быть применены в целях лечения дисферлинопатий, такие как прохождение стоп-кодона, пропуск экзона, оверэкспрессия других генов, перенос гена, сплайсосо-опосредованный трансплайсинг, а также описаны последние экспериментальные исследования с использованием этих методов. В заключение экзон-скиппинг и транс-сплайсинг выделены как наиболее оптимальные подходы в терапии миодистрофий, в частности дисферлинопатий.

Ключевые слова: дисферлин, дисферлинопатия, генная терапия, ПКМД типа 2Б

Для цитирования: Иванова А.В., Смирнихина С.А., Лавров А.В. Перспективы этиотропного лечения дисферлинопатий. Вестник РАМН. 2021;76(3):307–316. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1379>

307

Введение

Генная терапия — совокупность экспериментальных методов лечения, основанных на изменении генетического аппарата соматических клеток в целях исправления дефектов, вызванных мутациями в структуре ДНК. Появившись в начале 1970-х годов, генная терапия только недавно вышла на новый уровень в качестве разрешенной терапии некоторых наследственных заболеваний [1]. Проводимые исследования в этой области позволяют в ближайшее время ожидать существенное расширение перечня одобренных препаратов.

Мышечные дистрофии — одни из самых распространенных групп наследственных патологий [2]. Они связаны с мутациями в генах, кодирующих саркомерные, саркомерные, ядерные структурные белки и фермен-

ты. Мышечные дистрофии классифицируют по возрасту появления, типу наследования или по вовлеченности определенных групп мышц [3]. Среди миодистрофий выделяют пояснично-конечностные мышечные дистрофии (ПКМД), для которых, как следует из названия, характерно преимущественное поражение мышц конечностей. ПКМД наследуются как по аутосомно-доминантному, так и по аутосомно-рецессивному типам наследования. В зависимости от затронутого мутацией белка различают дисферлинопатии, дистрофинопатии, кальпаинопатии [4]. Чаще всего, с частотой 1:30 000, встречается миодистрофия Дюшенна, которую вызывают нарушение функции или утрата белка дистрофина, кодируемого геном *DMD* в хромосоме X. К более редким относятся, в частности, дисферлинопатии — группа мышечных дистрофий с распространенностью 1:200 000.

A.V. Ivanova, S.A. Smirnikhina, A.V. Lavrov

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Prospects for the Etiotropic Treatment of Dysferlinopathy

*Dysferlinopathies belong to a phenotypically heterogeneous group of neuromuscular diseases caused by mutations in the *DYSF* gene, which disrupt the expression of dysferlin protein in human skeletal muscle cells. These pathologies are of an autosomal recessive inheritance pattern, their prevalence is 1: 200000. Dysferlinopathies include diseases such as Miyoshi myopathy with primary lesion of the distal fragments of the lower extremities and limb-girdle muscular dystrophy type 2B with primary lesion of the proximal fragments of both the lower and upper limbs, also distal myopathy with anterior tibial onset (DMAT). Nowadays, there are various pathogenetic and symptomatic treatments for hereditary muscular dystrophies but there are very few registered drugs for the etiological treatment of these diseases. This review discusses the main modern methods of gene therapy that can be used to treat dysferlinopathies, such as stop-codon passing, exon skipping, overexpression of other genes, gene transfer, splicosome-mediated trans-splicing, and also describes the latest experimental studies using these methods. In conclusion, exon-skipping and trans-splicing have been identified as the most optimal approaches in the treatment of muscular dystrophies, in particular dysferlinopathies.*

Keywords: dysferlin, dysferlinopathy, genetic therapy, LGMD2B

For citation: Ivanova AV, Smirnikhina SA, Lavrov AV. Prospects for the Etiotropic Treatment of Dysferlinopathy. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2021;76(3):307–316. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1379>

Дисферлинопатии

Дисферлинопатии — фенотипически гетерогенная группа нервно-мышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, при которых происходит утрата или нарушение функции белка дисферлина в скелетной мышечной ткани, что обусловлено мутациями в гене *DYSF* (*DYStrophy-associated Fer-1-like*) [5].

К дисферлинопатиям относят миопатию Миоши, поясно-конечностную мышечную дистрофию типа 2Б (ПКМД типа 2Б), дистальную миопатию переднего ложа голени (ДМПЛГ), а также вторичные дисферлинопатии, возникающие вследствие развития кавеолино- и кальпаинопатий [6]. Помимо этих клинических фенотипов, существуют также так называемые проксимодистальные формы, некоторые формы гиперкреатинфосфокиназемии и псевдометаболические синдромы [7]. В клинический полиморфизм могут давать вклад гены-модификаторы [8], например *ANXA1* и *ANXA2*, которые определяют тяжесть клинических проявлений дисферлинопатий [9]. В результате проведенных исследований было выявлено, что, поскольку их уровни экспрессии коррелируют с тяжестью заболевания независимо от клинической изменчивости фенотипа, эти гены могут считаться модификаторами лишь условно. Учитывая, что принципиальное различие в клиническом фенотипе между пациентами с миопатиями Миоши и ПКМД типа 2Б заключается в типе мышц, вовлеченных первоначально, обнаружение гена-модификатора может выявить механизм вовлечения мышц, характерный для специфических типов мышечной дистрофии. О наличии генов-модификаторов, влияющих на первичное поражение определенных групп мышц, на данный момент неизвестно. Считается, что ПКМД типа 2Б и миопатия Миоши являются аллельными формами гена с одной и той же мутацией, с чем связаны фенотипические различия [8, 10].

К основным клиническим проявлениям этих заболеваний относятся слабость и атрофия мышц, воспалительные процессы в мышечной ткани, встречаются такие симптомы, как кардиомиопатия. Тяжесть симптоматики сильно варьирует — от практически бессимптомного течения с изолированным увеличением креатинфосфокиназы в крови до тяжелых инвалидирующих форм. В подавляющем большинстве случаев пациенты с данными патологиями интеллектуально сохранены. Далее рассмотрены клинические характеристики основных фенотипов дисферлинопатий.

Миопатия Миоши относится к дистальным миопатиям с типичными симптомами мышечной дистрофии. У большинства пациентов в детском возрасте нет мышечной слабости, и многие из них занимаются спортом. Симптомы обычно развиваются в возрасте от 15 до 30 лет. Пациенты замечают, что не могут ходить на цыпочках или подниматься по лестнице [11]. Возможно появление боли в икрах. Икроножные мышцы атрофируются, снижаются рефлексы растяжения мышц голеностопного сустава. Первичное вовлечение икроножных и подошвенных мышц считается клиническим признаком миопатии Миоши, отличающим ее от других дистальных мышечных дистрофий. Со временем мышечная слабость может распространяться на мышцы пояса нижних конечностей, однако в мышцах переднего отдела в конечном итоге также проявляется слабость.

На ранней стадии заболевания вовлечения мышц верхних конечностей обычно не происходит. По мере прогрессирования заболевания у пациентов может раз-

виться слабость проксимального отдела ног и рук в различной степени. Слабость мышц сгибателей колена (подколенное сухожилие) может быть более выражена, чем разгибателей колена (четырёхглавая мышца), что имеет значение для выбора места биопсии. Заболевание прогрессирует переменнно, при этом некоторые пациенты остаются довольно стабильными с симптоматикой слабости дистальных отделов, в то время как у других может быть более агрессивное течение с участием проксимальных мышц.

В дебютной стадии сывороточные уровни креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и альдолазы значительно повышены. Характерным лабораторным признаком для миопатии Миоши является сильно повышенный уровень креатинфосфокиназы в сыворотке крови: от 20 до 150 раз выше нормы (обычно от 5000 до 20 000 МЕ/л при нормальном значении 200 Е/л). В некоторых случаях чрезвычайно высокий уровень креатинфосфокиназы обнаруживают во время рутинных анализов крови до развития клинических проявлений [12].

При биопсии атрофичной икроножной мышцы обычно обнаруживают обширный фиброз и жировое замещение с потерей большинства мышечных волокон. С другой стороны, при исследовании биоптата четырёхглавой мышцы с менее выраженным симптомом слабости можно обнаружить только минимальные изменения (изменчивость размеров волокон, центральных ядер). Биопсия бессимптомной мышцы проксимального отдела руки также может быть относительно неинформативной. В биоптате мышцы подколенного сухожилия можно выявить промежуточные гистологические изменения с поразительной изменчивостью размера волокон и многочисленными некротическими и регенерирующими волокнами. Как дистрофин, так и дистрофин-ассоциированные белки нормально экспрессируются в мышечных волокнах [3].

Главное отличие ПКМД типа 2Б от миопатии Миоши — первичное поражение проксимальных групп мышц. Симптоматика проявляется в позднем подростковом возрасте и, как правило, медленно прогрессирует. Мышечная слабость преобладает в проксимальных мышцах бедер, мышцы плечевого пояса вовлекаются реже, а в некоторых случаях — гораздо позже. Вовлечение в процесс дистальных мышц ног может произойти спустя несколько лет прогрессирования. У некоторых больных начальное проявление ПКМД типа 2Б характеризуется одновременным вовлечением в процесс и дистальных, и проксимальных групп мышц нижних конечностей, что необходимо учитывать при диагностике [12].

Дистальная миопатия переднего ложа голени является достаточно редкой формой дисферлинопатии и дебютирует со слабости передней большеберцовой мышцы в возрасте от 14 до 30 лет. Заболевание стремительно прогрессирует с вовлечением проксимальной мускулатуры как нижних, так и верхних конечностей. Большинство пациентов утрачивают способность ходить через 10–20 лет от начала заболевания [13].

Впервые дистальная миопатия переднего ложа голени описана в 2001 г. в испанской семье с четырьмя больными родственниками. У всех пациентов в возрасте от 20 до 28 лет появилось изолированное поражение передних большеберцовых мышц с последующей слабостью в проксимальных мышцах нижней конечности. Были отмечены существенные атрофические изменения преимущественно в проксимальной мускулатуре, более выраженные в сгибателях колена и бедра, чем в разгибателях. Через 5–8 лет слабость распространилась на сгиба-

тели запястья и пальцев, а также проксимальные мышцы верхних конечностей. Они потеряли способность ходить в возрасте от 31 до 50 лет. Уровень креатинфосфокиназы в сыворотке был повышен от 20 до 70 раз [14].

В целом клинические проявления дисферлинопатий очень вариабельны. У части пациентов происходит первичное поражение в дистальной мускулатуре. Например, в случае миопатии Миоши сначала поражаются икроножные и подошвенные мышцы, затем вовлекаются мышцы бедер и ягодиц. Также возможны случаи, когда проксимальное ослабление мускулатуры превалирует над дистальным, как в ПКМД: мышечная слабость и атрофические изменения начинаются в мышцах тазового и плечевого поясов. У пациентов в пределах одной семьи возможны поражения совершенно разных групп мышц [7, 15–17].

При изучении корреляций между генотипом и фенотипом у пациентов с недостатком дисферлина [27] было показано, что у 14 из 40 обследованных больных проявилась смешанная симптоматика, характерная как для миопатии Миоши, так и для ПКМД типа 2Б. Еще у 10% пациентов был выявлен псевдометаболический синдром: зафиксированы болезненные отеки в дистальной части ног без симптомов атрофии и мышечной слабости, а у 5% больных — изолированная гиперкреатинфосфокиназемия без выраженных мышечных симптомов.

Дистрофические изменения преимущественно в мышцах тазового пояса свидетельствуют о ПКМД типа 2Б, в то время как атрофия мышц голени указывает на миопатию Миоши. При первичном обследовании пациента выявить патологические изменения в мышечной ткани позволяют КТ и МРТ. Атрофические изменения мышечных тканей голени часто предшествуют появлению клинических симптомов — поражению икроножных мышц с течением времени часто распространяется и на мышцы задней стороны бедра, задолго до того, как этот процесс приведет к выраженной клинической симптоматике. В редких случаях дистальной миопатии переднего лежа голени патологический процесс изначально визуализируется в передней большеберцовой мышце, однако с течением времени (как правило, за несколько лет) распространяется и на икроножную мышцу [19].

Некротический процесс в мышцах — один из патогистологических признаков дисферлинопатий. На ранней стадии заболевания тканевые изменения могут быть минимальны, характерны признаки регенерации — волокна с центрально расположенными ядрами. Исследование мышечной ткани у пациентов с дисферлинопатией на ультраструктурном уровне показало наличие в мембранах повреждений и накопление субсарколеммных везикул и вакуолей [20]. Также показано, что у пациентов с дисферлинопатией наблюдаются амилоидоподобные отложения и воспалительные инфильтраты, которые сходны с проявлениями классического полимиозита (аутоиммунного заболевания, характеризующегося диффузным воспалением мышц), однако отличаются с точки зрения цитологических и иммунологических показателей [21]. Ошибочное диагностирование полимиозита при ПКМД типа 2Б — распространенное явление. Эти два заболевания имеют некоторые общие симптомы, в том числе асимметричную слабость конечностей, повышенный уровень креатинфосфокиназы и электромиографические изменения, указывающие на повреждение мышц. Кроме того, результаты гистохимического исследования скелетных мышц свидетельствуют о различной степени миофиброза, некроза мышечных волокон и инфильтра-

ции воспалительных клеток. Основным методом дифференциальной диагностики этих заболеваний является анализ экспрессии дисферлина в присарколемном пространстве с помощью иммуногистохимического анализа или Вестерн-блота. Для пациентов с ПКМД типа 2Б результаты иммуногистохимического анализа или Вестерн-блота указывают на недостаток или отсутствие дисферлина в пораженном мышечном волокне и отрицательный результат или низкую экспрессию МНС-I, в то время как при полимиозите дисферлин сохраняет нормальное расположение [21]. ПКМД типа 2Б и полимиозит очень похожи клинически и, следовательно, при дополнительных исследованиях очень трудно различимы. Однако терапевтические схемы для этих заболеваний совершенно разные. Полимиозит является иммунологическим заболеванием и хорошо реагирует на гормональную и иммунодепрессивную терапию; таким образом, использование гормонов или иммунодепрессантов рекомендуется на ранней стадии для контроля прогрессирования заболевания [22]. Кроме того, некоторые исследования показали, что пациенты с ПКМД типа 2Б могут страдать от мышечной слабости после гормонотерапии, и было очень трудно восстановить мышечную силу после прекращения гормонального лечения, что указывало на то, что использование глюкокортикоидов может ухудшить состояние пациентов с ПКМД типа 2Б [23].

Для дисферлинопатий характерен высокий уровень креатинфосфокиназы в крови, как правило, превышающий норму в десятки раз (на ранних стадиях — 50–100 раз) и сохраняющийся на протяжении всего заболевания. Наряду со слабостью и атрофией дистальных мышц, значительное увеличение креатинфосфокиназы может являться признаком дисферлинопатии. По мере прогрессирования заболевания уровень креатинфосфокиназы и его диагностическая ценность снижаются [12].

Уровень дисферлина оценивают в биоптатах мышечной ткани больного, однако для этих целей можно использовать и CD14+ моноциты периферической крови, так как было показано, что *DYSF* в них также экспрессируется [24]. Эффективная мембранная регуляция необходима для ряда важных функций моноцитов/макрофагов, включающих рецептор-опосредованный фагоцитоз, секрецию цитокинов и рецепторов сигнальной регуляции посредством Rho семейства небольших GTP (например, Rac1, RhoA и Cdc42). Исследователи предполагают, что дефицит дисферлина может влиять на функцию моноцитов, учитывая участие дисферлина в мембранной регуляции в мышечных клетках и наличие дисферлина в моноцитах. Возможно, что нарушение функций макрофагов (предшественниками которых являются моноциты) может играть определенную роль в воспалительных реакциях, происходящих у многих пациентов с дисферлинопатией.

Внедрение в повседневную практику иммунологических методов анализа и методов молекулярной генетики существенно расширило возможности диагностики дисферлинопатий. Следует отметить, что для точной диагностики дисферлинопатии необходимо комбинированное применение различных методов.

Дисферлин

Дисферлин относится к семейству ферлин-1-подобных белков, в которую также входят отоферлин, миоферлин и др. Ферлин-1-подобные белки имеют гомо-



Рис. 1. Структура белка дисферлина. Дисферлин состоит из семи последовательно соединенных C2-доменов с Ca²⁺-связывающей активностью, трех Fer-доменов, двух доменов DYSF, один из которых находится в другом, и трансмембранного домена T

логию с белком FER-1 нематоды *Caenorhabditis elegans*. У человека кодируется геном *DYSF*, расположенным на второй хромосоме в локусе 2p13.2. Ген содержит 55 экзонов, его длина в геноме составляет около 150 тыс. пар нуклеотидов, длина кодирующей последовательности — 6243 пары нуклеотидов. Белок дисферлин размером 237кДа представлен в широком диапазоне тканей, преимущественно экспрессируется в мышечных тканях, а также в кардиомиоцитах, моноцитах периферической крови [25] и в клетках префронтальной коры головного мозга, плаценты и костного мозга (по данным BioGPS). Дисферлин в организме присутствует в различных изоформах, но локализуется преимущественно в сарколемме, а также ассоциирован с цитоплазматическими везикулами.

Структура белка дисферлина схематично представлена на рис. 1.

Основной функцией дисферлина является его участие в репарации плазматической мембраны [28]. При повреждении мембраны внеклеточный кальций проникает в мышечные волокна, образуя зону с высоким содержанием кальция. Клеточные везикулы, содержащие дисферлин на поверхности своей мембраны, в месте образовавшегося повреждения и в присутствии повышенной концентрации кальция сливаются друг с другом и с плазматической мембраной, образуя своеобразную «заплатку» [29]. В этом процессе дисферлин играет свою роль на этапе слияния, облегчая везикулярный докинг и собственно слияние с плазматической мембраной, путем взаимодействия с другими молекулами дисферлина на мембране и везикулах, а также с аннексинами и некоторыми другими белок-связывающими партнерами. Известно, что к везикулам, которые связывает дисферлин в процессе репарации, также относятся лизосомы. Наконец была показана роль дисферлина в эндотелиальной клеточной адгезии и ангиогенезе [30]: было выяснено, что дисферлин участвует в восстановлении клеточной мембраны в мышцах и других клетках посредством слияния лизосом, этот механизм приводит к сборке мембранного патча. При репарации сарколеммы количество связанного с лизосомами мембранного белка (Lamp-1) уменьшается в сарколемме миоцитов у мышей с нокаутом гена дисферлина, что указывает на то, что экспрессия *DYSF* важна для процесса репарации, связанного с лизосомами. В клетках эндотелия коронарных артерий крупного рогатого скота дисферлин группируется в макромолекулярных мембранного патча после стимуляции Fas-лигандом (FasL), и сайленсинг гена дисферлина устраняет FasL-индуцированное нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации в изолированных небольших коронарных артериях [30, 31]. Помимо этой основной функции, дисферлин может координировать ремоделирование цитоскелета через взаимодействие с компонентами фокальной адгезии. Дисферлин взаимодействует с β-парвином (аффиксином) — интегрин-связанным киназосвязывающим белком, который участвует в связи между интегрином и цитоскелетом, при этом он колокализуется с дисферлином в сарколемме нормальной скелетной мышцы человека. Показано, что C-конец дисферлина связывается с N-концевым доменом гомологии калпонины аффиксина и участвует в восстановлении

клеточной мембраны [32]. Также известно, что в белковом комплексе с дисферлином присутствуют такие молекулы фокальной адгезии, как винкулин, актинин, талин и α-тубулин, которые также участвуют в процессе репарации сарколеммы, взаимодействуя с дисферлином [33]. Дисферлин может быть вовлечен в секрецию цитокинов и/или хемокинов [34, 35]. Дисферлин был связан с SNARE-опосредованными экзоцитотическими событиями, включая высвобождение цитокинов и секрецию кислой сфингомиелиназы. Установлено, что дисферлин стимулировал SNARE-опосредованное смешивание липидов с чувствительностью к кальцию: дисферлин ассоциируется с синтаксином 4 и SNAP-23, двумя повсеместно экспрессируемыми белками SNARE (Soluble NSF Attachment REceptor), ранее участвовавшими в экзоцитозе лизосом [36].

Поиск мутаций гена *DYSF* — сложная задача из-за большого размера гена и отсутствия мутационных «горячих точек». При миопатиях встречаются миссенс-мутации, короткие делеции и дупликации, распределенные по гену [15, 17–18, 20, 37]. Спектр мутаций детально разобран в работе M. Krahn et al. [38] и суммарно отражен в табл. 1.

Предполагают также наличие генетических или экологических факторов модификации, которые влияют на клиническую вариабельность данного заболевания [39].

Причины дисферлинопатий — мутации, приводящие к нарушению экспрессии гена *DYSF* и/или функции белка дисферлина. Основным способом подтверждения диагноза дисферлинопатии является поиск мутаций в гене. Однако на практике возникают сложности в обнаружении мутаций в гене *DYSF* из-за его большого размера и отсутствия участков гена, где чаще всего встречаются мутации [18, 40]. На сегодняшний день описано более 450 различных мутаций в гене, большинство из них являются однонуклеотидными заменами. Более 330 патогенных мутаций было идентифицировано в экзонах или вблизи экзон-интронных соединений [37]. Также есть сложности, связанные с определением компаунд-гетерозигот на молекулярном уровне. Нередко обнаруживается только одна из двух ожидаемых мутаций гена *DYSF*.

Таблица 1. Спектр мутаций гена *DYSF*

Тип мутаций	Доля, %
Делеции и инсерции	24–30
Делеции	17–18
Вне рамки считывания	15–20
В пределах рамки считывания	1–3
Инсерции	7–12
Вне рамки считывания	7–12
В пределах рамки считывания	0
Точечные мутации	48–64
Миссенс-мутации	19–46
Нонсенс-мутации	18–29
Интронные мутации	11–23

Подходы к терапии

На сегодняшний день активно разрабатывается и тестируется множество терапевтических методов. Существует несколько подходов, направленных на лечение дисферлинопатий, в частности такие, как иммуномодулирующая терапия, использование стволовых клеток, заместительная и лекарственная терапия, а также генотерапевтические методы [17, 26].

Иммуномодулирующая терапия включает использование препаратов, подавляющих воспаление, чтобы иммунный ответ пациента на дегенеративные процессы в мышцах не вызывал дополнительную гибель мышечных клеток. Эта стратегия используется, чтобы управлять воспалительной симптоматикой при мышечных дистрофиях, но все еще находится на стадии разработки для применения при дисферлинопатиях. На базе Jain Foundation проводят исследования с целью поиска возможных мишеней для иммуномодулирования дисферлинопатий. В качестве таких мишеней рассматривают ингибитор системы комплемента CD55 и цитокин IL-34, который способствует дифференцировке моноцитов и макрофагов через колониестимулирующий фактор-1 (по данным Jain Foundation Inc.).

Терапия стволовыми клетками включает доставку пациентам новых мышечных стволовых клеток, несущих нормальные копии гена *DYSF*, так что эти стволовые клетки дифференцируются в новые мышечные волокна, которые могут продуцировать функциональный белок дисферлин. Хотя считалось, что индуцированные стволовые клетки обладают ограниченной способностью к дифференцировке, т.е. они генерируют клетки из ткани, из которой они были получены. С конца 1990-х годов различные исследования показали, что при некоторых условиях стволовые клетки, полученные из ткани взрослого человека, проявляют так называемую пластичность. Y. Jiang et al. в 2002 г. получили из костного мозга мультипотентные взрослые прогениторные клетки (Multipotent Adult Progenitor Cells, MAPCs) [41]. Доктором M. Reyes было предложено использовать такие стволовые клетки в качестве клеточной терапии дисферлинопатий с исследованием лабораторных животных — мышей линии A/J. Группа исследователей охарактеризовала популяцию периваскулярных стволовых клеток из скелетных мышц, называемых мышечными MAPCs. Мышечные MAPCs, трансплантированные внутримышечно мышам mdx (мышинной модели мышечной дистрофии Дюшенна), показали значительный вклад в регенерацию мышц. Таким образом, MAPCs в качестве источника стволовых клеток могут иметь много преимуществ по сравнению с сателлитными клетками: их можно легко изолировать, они могут быть выращены *in vitro* в больших количествах, легко трансдуцированы, трансплантированы внутривенно и внутриартериально, обеспечивая широкое биораспределение, и, что наиболее важно, могут быть изолированы из аллогенных и аутологичных источников. Исследование применения MAPCs для терапии дисферлинопатий продолжается [42].

Существуют исследования, подтверждающие, что укороченный белок дистрофин с восстановленной рамкой считывания сохраняет свою функциональность. Подобные исследования, направленные на восстановление рамки считывания в гене *DYSF*, также показали, что укороченный дисферлин сохраняет функциональность. Таким образом, в качестве примера возможных методов генной терапии для лечения дисферлинопатий имеет смысл рас-

смотреть несколько современных методик, некоторые из них уже используются в терапии миодистрофии Дюшенна. Эта патология встречается чаще, чем дисферлинопатии, и на данный момент для нее уже разработаны различные методы терапии. Миодистрофия Дюшенна вызывается нарушением экспрессии гена *DMD*, кодирующего белок дистрофин и находящегося в хоромосоме X. В свою очередь, дистрофин локализуется на цитоплазматической поверхности сарколеммы и имеет своей основной функцией поддержание цитоскелета.

В генотерапевтических исследованиях существуют два основных подхода — *in vivo* и *ex vivo*. Генная терапия *in vivo* подразумевает редактирование генов или введение их нормальных копий непосредственно в организм, тогда как *ex vivo* — генетическую модификацию клеток в лаборатории с их последующей трансплантацией.

Учитывая, что миодистрофии, в частности дисферлинопатии, вызваны мутациями в генах, кодирующих белки, связанные с деятельностью мышечных клеток, на данный момент перспективным подходом является генная терапия, позволяющая корректировать генетический материал клетки (РНК или ДНК), так как она может позволить этиотропное лечение заболевания [43].

Прохождение стоп-кодона. В зависимости от характера мутации, вызвавшей генетическую патологию, и от предполагаемого результата терапии можно использовать различные методы манипуляции с геном. К ним относится, например, метод прохождения стоп-кодона [44, 45], который используют для восстановления рамки считывания. Некоторые антибиотики позволяют клетке игнорировать преждевременные стоп-мутации при синтезе белка, таким образом в результате синтезируется полноценный белок. Этот метод, к сожалению, показал достаточно низкую эффективность при терапии миодистрофии Дюшенна.

Пропуск экзона. Большое количество патогенных мутаций в гене *DYSF* приводит к сдвигу рамки считывания. У некоторых пациентов с протяженными делециями *DYSF* наблюдается облегченная симптоматика дисферлинопатии, что позволяет предположить, что некоторые участки гена могут быть удалены без значительного влияния на функцию белка. На данный момент экзон-скиппинг с помощью антисмысловых олигонуклеотидов — один из передовых методов терапии мышечной дистрофии Дюшенна [46]. Примером терапии являются такие препараты, как Drisapersen компании GlaxoSmithKline, в настоящее время находящийся в третьей фазе клинических исследований, и Eteplirsen компании AVI BioPharma. Эти препараты нацелены на пропуск 51-го экзона гена дистрофина.

Было показано, что дисферлин с протяженной делецией может сохранять свою функциональность. В исследовании M. Krahn et al. описана больная с миопатией Миоши с гомозиготной делецией экзонов 2–40 гена *DYSF*. В возрасте 30 лет у нее наблюдали проксимальную слабость с трудностями при подъеме по лестнице и беге и повышенную концентрацию креатинфосфокиназы в сыворотке (от 2000 до 4000 МЕ/л; в норме — < 200 МЕ/л). При биопсии выявили умеренную дистрофическую картину: при нормальном размере мышечных волокон было отмечено большое количество центральных ядер. В возрасте 44 лет пациентка испытывала проблемы с ходьбой, но тем не менее не испытывала трость. Таким образом, показано, что укороченный дисферлин функционирует и приводит к развитию относительно мягкого фенотипа миодистрофии с поздним началом [6].

Экзон-скиппинг. Этот метод предполагает пропуск экзона, в котором находится нонсенс-мутация, с помощью связывания антисмысловых олигонуклеотидов или использования системы CRISPR, благодаря чему синтезируется функциональный белок неполной длины. На данный момент известно, что этот метод используется в терапии миодистрофии Дюшенна. Используя антисмысловые олигонуклеотиды, также можно включить экзон в процесс сплайсинга, воздействуя ими на сайленсеры — короткие участки, ингибирующие сплайсинг пре-мРНК, если он был пропущен в результате мутации. Существуют исследования, согласно которым данный метод подходит и для дисферлинопатий. Например, доказано, что после пропуска экзона 32 белок дисферлин сохраняет свою функциональность [47], также было показано, что пропуск экзонов 26–27 и 28–29 позволяет получить функциональный дисферлин [27]. Исследования, направленные на анализ структуры белка дисферлина и определение возможных мишеней для терапевтического экзон-скиппинга, продолжаются [46].

Перманентный экзон-скиппинг с использованием технологии CRISPR — перспективный метод в современных доклинических исследованиях миодистрофии Дюшенна. В надежде добиться клинического успеха параллельно с миодистрофией Дюшенна пропуски экзонов и модуляция сплайсинга также изучаются при других мышечных дистрофиях, таких как ПКМД типа 2Б, дистальная миопатия переднего ложа голени, миотоническая дистрофия и мерозин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия типа 1А (ВМД1А) [48].

Группа ученых изучала восстановление функции дисферлина после удаления экзона 32 в клетках пациентов [47]. Экзон-скиппинг был осуществлен с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в миобластах, взятых у пациентов с ПКМД типа 2Б и миопатией Миоши, имеющих мутации в экзоне 32 гена *DYSF*. Эффективность экзон-скиппинга оценивали с помощью количественных тестов *in vitro*, отражающих восстановление мышечной ткани и мембран. В результате подтверждено, что функция дисферлина восполнена экспрессией усеченного дисферлина (белка, генерируемого после экзон-скиппинга) в исследуемых клетках. Было установлено, что укороченный дисферлин стабилен в модифицированных клетках пациентов. Молекулярная масса такого дисферлина (238 кДа) близка к полноразмерной изоформе, составляющей 241 кДа. Этот белок появляется уже через 48 ч после начала лечения. Была произведена оценка функции белка с помощью различных тестов. Совместная локализация с помеченным сарколеммным белком кавеолоином-3 подтвердила мембранную локализацию укороченного дисферлина. В результате теста, связанного с восстановлением клеточных мембран после их повреждения бифотонным лазером, было показано, что благодаря терапии функция репарации мембран была восстановлена практически полностью. Результаты теста осмотического шока показали, что восстановление дисферлина с помощью лечения АОН защищает клетки пациента от механического стресса.

В исследовании, посвященном мультиэкзон-скиппингу в гене *DYSF*, не только описан первый в истории успешный эксперимент по многократному пропуску экзонов в гене *DYSF*, но и идентифицированы две новые потенциальные мишени для экзон-скиппинга в целях терапии дисферлинопатий. Для эксперимента были созданы плазмидные конструкции, содержащие репортерную последовательность GFP и ген *DYSF* с исследуемыми

делециями, которые были трансфицированы в клетки, взятые у пациентов с дисферлинопатией. Результаты исследования показали, что делеции экзонов *DYSF* 26–27 и 28–29 не критичны для репарации клеточной мембраны. Таким образом, эти экзоны можно считать многообещающими терапевтическими мишенями для экзон-скиппинга, тогда как экзоны 19–21, 20–21 и 46–48 необходимы для правильного регенеративного процесса, так что они не смогут стать перспективными целями для такого вида генной терапии. Затем исследователи разработали смеси антисмысловых морфолино-фосфородиамидатных олигомеров для пропуска экзонов 26–27 и 28–29 гена *DYSF*. Смеси были трансфицированы в клетки, взятые у пациентов с дисферлинопатией. Авторы показали экспрессию усеченных форм РНК и восстановление репаративной функции дисферлина в фибробластах пациентов с дисферлинопатией. Эти результаты показывают, что функциональное восстановление поврежденной мембраны *in vitro* возможно посредством антисмыслового опосредованного экзон-скиппинга экзонов 28–29 гена *DYSF* с помощью смеси антисмысловых морфолино-фосфородиамидатных олигомеров, а также что антисмысловые морфолино-фосфородиамидатные олигомеры являются перспективными терапевтическими средствами для лечения пациентов с мутациями, которые находятся в экзонах 28–29 гена *DYSF* [27].

Экзон-скиппинг посредством АОН имеет некоторые недостатки. В качестве наиболее значимого можно выделить временный характер терапевтического эффекта. АОН — это короткие олигонуклеотиды, которые быстро разрушаются в клетке, поэтому их действие ограничено по времени и для постоянного поддержания эффекта необходимо их еженедельное введение. Также существенным недостатком можно считать высокую стоимость препаратов, например, терапия одного пациента на год этеплирсеном обходится в 892 000 долл. (по данным Institute for Clinical and Economic Review, 2019 г.). Кроме того, перед созданием препарата необходимо доказать, что в конкретной ситуации такой терапевтический подход возможен, т.е. что укороченный белок будет функционально активен.

Сплайсосо-опосредованный транс-сплайсинг. Метод сплайсосо-опосредованного транс-сплайсинга, также известный как SMaRT (spliceosome-mediated RNA trans-splicing), используют в разработке терапии муковисцидоза, гемофилии А, спинальной мышечной атрофии и некоторых других наследственных патологий, в том числе миодистрофии Дюшенна [49]. Транс-сплайсинг редко встречается в эукариотических клетках, и в исследовательских и терапевтических целях проводится индуцирование этого процесса при участии сплайсосомы. Транс-сплайсинг происходит, когда процесс сплайсинга идет на нескольких пре-мРНК, переходя с одной молекулы на другую. В результате такого процесса формируется зрелая мРНК с новым экзонным составом.

Данный метод позволяет корректировать мутации на уровне транскрипции, что приводит к восстановлению экспрессии нормального белка. Для того чтобы воспользоваться методом SMaRT, нужна олигонуклеотидная пре-транс-сплайсинговая молекула (ПТМ). Структурно она состоит из связывающего домена — комплементарного интрону участка, нужного для связывания с целевой пре-мРНК; сайта сплайсинга, нужного для инициации процесса, а также кодирующего домена — последовательности, которая будет внедрена в пре-мРНК и заменит

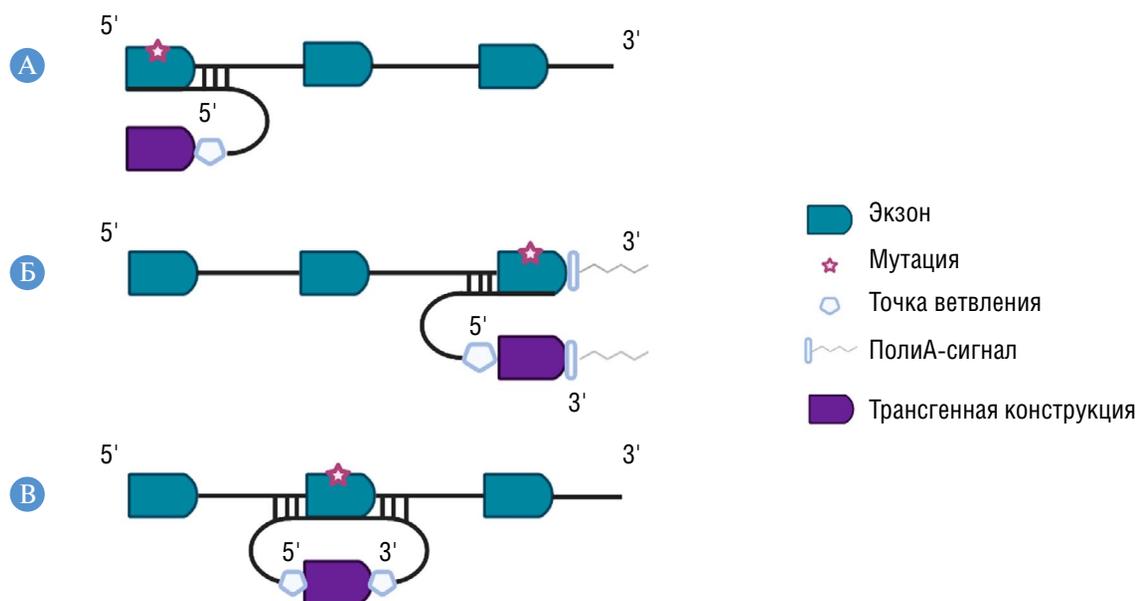


Рис. 2. Основные направления SMaRT: А — 5' транс-сплайсинг; Б — 3' транс-сплайсинг; В — замена внутреннего экзона. Пре-транс-сплайсинговая молекула (ПТМ) комплементарно присоединяется к РНК-мишени и скрывает эндогенный сайт сплайсинга, одновременно предоставляя свой собственный сайт, который с помощью сплайсосомы предоставляет терапевтическую РНК-последовательность

собой ее целевой фрагмент [50]. Схематично процесс изображен на рис. 2.

С помощью этого метода проведено экспериментальное исследование с целью репарации мутаций мРНК β-глобина, вызывающих такие заболевания крови, как серповидно-клеточная анемия и β-талассемия. β-талассемия, известная также как болезнь Кули или средиземноморская анемия, связана с недостаточностью или полным отсутствием продукции цепей β-глобина. Генетически она обусловлена наличием мутаций в сайтах сплайсинга пре-мРНК, которые нарушают процесс созревания мРНК β-глобина. Используя подход SMaRT, исследователям удалось восстановить около 5% мРНК β-глобина, ассоциированной с серповидно-клеточной анемией, и порядка 36% мРНК, ассоциированной с β-талассемией, и, хотя репарация прошла не полностью, результат может иметь терапевтический эффект [51].

В 2015 г. группа исследователей осуществила замену экзонов (31–55, 32–55, 36–55, 37–55) с помощью 3' сплайсосомо-опосредованного транс-сплайсинга на миобластах от пациентов с диагностированной ПКМД типа 2Б, а также на мышечной модели: пре-транс-сплайсинговая молекула с последовательностью экзонов человеческого *DYSF* в ААВ-векторе инъецировали в передние большеберцовые мышцы четырехмесячных мышшей линии *Dysf*^{-/-}, и через 4 нед транс-сплайсингованный транскрипт *DYSF* обнаружили во всех инъецированных мышцах. Секвенирование этих транскриптов подтвердило наличие неповрежденной химерной последовательности мышечного и человеческого *DYSF* с точной границей между последовательностями мышши и человека. С помощью флуоресцентного иммуоокрашивания на поперечных срезах мышц исследователи обнаружили в саркомере устойчивую экспрессию дисферлина [52]. Следует отметить, что в результате данного исследования не было обнаружено неспецифических продуктов транс-сплайсинга в экспериментальных образцах.

Перенос гена. Классическая генная терапия подразумевает внесение полного гена либо мини-гена в клетку

для того, чтобы с этой матрицы синтезировался функциональный белок.

Возможность переноса в клетку функционального гена дикого типа с целью восстановления функции белка является перспективным методом генной терапии мышечных дистрофий. Для создания генетических конструкций представляют интерес аденоассоциированные векторы (ААВ), способные доставлять ДНК как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки, а также обеспечивающие достаточный уровень экспрессии трансгенов [27]. Однако у данной технологической платформы есть недостатки, требующие более тщательного изучения. В частности, аденоассоциированные векторы трансдуцируют мышечную ткань с низкой эффективностью, а их введение связано с возникновением гуморального иммунного ответа и формированием пула специфических антител [53]. Изучение макаков-резусов (вида, который является естественным хозяином аденоассоциированных векторов), инфицированных аденоассоциированными векторами дикого типа, показало, что у всех животных, кроме инфицированных интраназальным путем, было обнаружено четырехкратное увеличение анти-ААВ-антител, т.е. развился гуморальный иммунный ответ на капсидные белки аденоассоциированных векторов [54]. Антитела против ААВ-2 были обнаружены в сыворотке и синовиальной жидкости у пациентов с заболеваниями суставов. Нейтрализующую активность в отношении ААВ определяли путем оценки способности жидкости или сыворотки ингибировать трансдукцию аденоассоциированных векторов хондроцитами *in vitro*. Синовиальная жидкость и сыворотка от всех пациентов ингибировали трансдукцию хондроцитов векторами ААВ [55]. Также в случае с мышечными дистрофиями недостатком аденоассоциированных векторов можно считать ограниченный размер трансгена (приблизительно 4700 пар нуклеотидов), что не позволяет использовать полный ген из-за большого размера кодирующей последовательности гена *DYSF* (6243 п.н.). Тем не менее метод двойного транс-сплайсинга позволяет обойти размерный лимит. Этот метод заключается в том, что кодирующую

последовательность гена *DYSF* клонируют в виде двух отдельных частей в два аденоассоциированных вектора. В результате естественной способности аденоассоциированных векторов к конкатемеризации происходит объединение двух частей кДНК, что приводит к экспрессии полноразмерного белка дисферлина [56].

Внутримышечная инъекция дисферлин-дефицитных миобластов линии H2K, содержащих два рекомбинантных аденоассоциированных векторов, мышам линии A/J (модель с дисферлинопатией) привела к экспрессии полноразмерного дисферлина, продолжающейся по крайней мере в течение одного года, системные инъекции в хвостовую вену мышей этой конструкции привели к системной экспрессии белка [57]. Затем было проведено гистологическое исследование, которое показало, что трансплантированные мышам миобласты стимулируют регенеративный процесс. В результате гистологического исследования отмечены такие признаки, как большее количество вариантов размеров волокон, округлые миофибриллы, базофильные волокна и центральные ядра. В целом эти данные свидетельствуют о том, что в результате генной терапии удалось улучшить состояние мышечной ткани, и в целом о перспективности использования данной стратегии для лечения дисферлинопатий.

В 2010 г. было проведено исследование с использованием белка минидисферлина человека для восстановления повреждений сарколеммы в клетках модельных мышей с дисферлинопатией [6]. Ввиду большого размера гена *DYSF* прямой перенос кДНК целиком в клетки затруднен, поэтому использование мРНК минидисферлина, укороченной формы белка, обнаруженной у пациента с мягкой формой дисферлинопатии, рассматривается как альтернативная стратегия. Делеция экзонов 2–40 приводила к сдвигу рамки считывания и синтезу нефункционального белка. Однако биоинформационный анализ предполагаемых открытых рамок считывания в транскрипте с делецией выявил криптический кодон инициации трансляции, локализованный на 22 п.н. ниже нативного кодона инициации трансляции, который восстанавливал рамку в экзоне 41.

Альтернативная трансляция усеченного транскрипта из 1899 нуклеотидов приводит к получению минидисферлина весом 73 кДа. В нем сохраняется С-конец дисферлина (от 1471 до 2080), включая два последних домена С2 и N-концевой трансмембранный домен. Таким образом, работа продемонстрировала возможность обнаружения протяженных делеций гена *DYSF* при системном скрининге пациентов со слабым фенотипическим проявлением дисферлинопатии. К сожалению, несмотря на восстановление скорости репарации мембраны на мышинной модели в условиях *in vitro*, в условиях *in vivo* экспрессия мини-гена дисферлина в мышцах не привела к улучшению их состояния на гистологическом уровне, что может быть связано с тем, что способности к восстановлению мембраны недостаточно для восстановления всей функциональности дисферлина. Дополнительные домены С2, отсутствующие в этом мини-дисферлине, могут иметь значение в его полноценной функциональной роли [6].

Оверэкспрессия других генов. Существуют различные исследования, связанные с оверэкспрессией гомологичных дисферлину белков при его дефиците. Одним из таких исследований является анализ экспрессии миоферлина у пациентов с дисферлинопатией [58]. Миоферлин — новый белок с неизвестной функцией с высокой гомологией с дисферлином, предполагалось, что его экспрессия может

компенсировать эффект от утраты дисферлина [59]. Чтобы проверить эту гипотезу, была исследована экспрессия миоферлина иммуноблотом и иммуногистохимическим анализом в мышцах пяти пациентов с дисферлинопатией. Иммуногистохимический и электронно-микроскопический анализ показали, что миоферлин и дисферлин расположены вдоль мембраны нормальных мышечных клеток. Несмотря на сохранение миоферлина в дисферлинопатических мышечных экстрактах белков, его распределение вдоль мембран существенно снижалось. В другом исследовании у четырех пациентов с ПКМД типа 2Б иммуноблот-анализ выявил повышенное содержание миоферлина, однако двое из них имели более тяжелое течение заболевания (один из них ходит только с поддержкой, а другой не может подняться по лестнице), в то время как двое других пострадали слабее (один из них может подняться по лестнице с посторонней помощью, у второго отмечается слабость только в нижних конечностях). Из чего авторы сделали вывод, что оверэкспрессия миоферлина не компенсирует отсутствие дисферлина в мышцах с дисферлинопатией. На данный момент известно, что компенсаторный процесс не решает проблему дефицита дисферлина и, как следствие, нарушения функции сарколеммальной репарации [60].

У трангенных мышей с оверэкспрессией миоферлина проверяли гипотезу о том, что миоферлин, гомологичный дисферлину, может компенсировать отсутствие дисферлина [61]. При лазерном повреждении мембран мышечных клеток выявлено, что восстановление мембраны не является достаточным для коррекции дефицита дисферлина. В клетках с оверэкспрессией миоферлина не обнаружено клеточных аномалий *in vitro*. Однако оверэкспрессия миоферлина не корректирует репаративную функцию *in vivo*.

Заключение

На сегодняшний день существует множество патогенетических и симптоматических способов лечения наследственных мышечных дистрофий, тогда как этиологических биоинженерных подходов, разрешенных к использованию, — буквально единицы. Наиболее распространена миодистрофия Дюшенна, соответственно, большинство разрабатываемых терапевтических методик направлено на лечение этой патологии. Нужно отметить, что более редкие нервно-мышечные наследственные патологии, такие как дисферлинопатии, также исследуются, но в меньшей степени. Известно, что некоторые терапевтические подходы, действенные в случае с миодистрофией Дюшенна, подходят и для лечения дисферлинопатий, в частности метод пропуска экзонов. Также интересен метод сплайсосо-мо-опосредованного транс-сплайсинга, который также имеет хороший потенциал в качестве подхода к терапии дисферлинопатий. Таким образом, экзон-скиппинг и транс-сплайсинг следует рассматривать как наиболее оптимальные подходы в терапии миодистрофий, в частности дисферлинопатий.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. А.В. Иванова — сбор и обработка материала, написание и редактирование текста; С.А. Смирнихина — сбор и обработка материала, написание и ре-

дактирование текста; А.В. Лавров — сбор и обработка материала, написание и редактирование текста. Все авторы внесли существенный вклад в выполнение поисково-аналитической работы при написании обзорной статьи, прочли рукопись и одобрили ее направление на публикацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aposhian HV. The use of DNA for gene therapy — the need, experimental approach, and implications. *Perspect Biol Med.* 1970;14(1):98–108. doi: <https://doi.org/10.1353/pbm.1970.0011>
2. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991;1(1):19–29. doi: [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90039-u](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90039-u)
3. Barohn RJ, Amato AA, Griggs RC. Overview of distal myopathies: from the clinical to the molecular. *Neuromuscul Disord.* 1998;8(5):309–316. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(98\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(98)00030-3)
4. Escolar D, O'Carroll P, Leshner R. Treatment and Management of Muscular Dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2011;343–372. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0372-6.00019-0>
5. Aoki M. *Dysferlinopathy*. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds). Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 1993.
6. Krahn M, Wein N, Bartoli M, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med.* 2010;2(50):50–69. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000951>
7. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol.* 2007;64(8):1176–1182. doi: <https://doi.org/10.1001/archneur.64.8.1176>
8. Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, et al. Identical Mutation in Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B or Miyoshi Myopathy Suggests a Role for Modifier Gene(s). *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):871–877. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.871>
9. Cagliani R, Magri F, Toscano A, et al. Mutation finding in patients with dysferlin deficiency and role of the dysferlin interacting proteins annexin A1 and A2 in muscular dystrophies. *Hum Mutat.* 2005;26(3):283. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.9364>
10. Weiler T, Greenberg CR, Nylén E, et al. Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet.* 1996;59(4):872–878.
11. Wang M, Guo Y, Fu Y, Jia R, Chen G. Atypical Miyoshi distal myopathy: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2016;12(5):3068–3072. doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3716>
12. Urtizberea JA, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, Levy N. Dysferlinopathies. *Neurol India.* 2008;56(3):289–297. doi: <https://doi.org/10.4103/0028-3886.43447>
13. Liewluck T, Pongpakdee S, Witoonpanich R, et al. Novel DYSF mutations in Thai patients with distal myopathy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009;111(7):613–618. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.05.001>
14. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol.* 2001;49(1):130–134.
15. Krahn M, Bérout C, Labelle V, et al. Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E345–E375. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.20910>
16. Fanin M, Angelini C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. *Muscle Nerve.* 2016;54(5):821–835. doi: <https://doi.org/10.1002/mus.25367>
17. Magri F, Govoni A, Del Bo R, et al. Natural history and peculiar aspects in LGMD2B. XIII International Congress on Neuromuscular Diseases (ICNMD XIII). Nice, France, July 5–10, 2014.
18. Nguyen K, Bassez G, Bernard R, et al. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum Mutat.* 2005;26(2):165. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.9355>
19. Celik M, Ertaşoglu H. Phenotypic variation in dysferlinopathy. *J Neurol Sci.* 2009;26(1).
20. Kobayashi K, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Dysferlin and animal models for dysferlinopathy. *J Toxicol Pathol.* 2012;25(2):135–147. doi: <https://doi.org/10.1293/tox.25.135>
21. Benveniste O, Romero NB. Myositis or dystrophy? Traps and pitfalls. *Presse Med.* 2011;40(4,Pt2):e249–e255. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2010.11.023>
22. Anh-Tu Hoa S, Hudson M. Critical review of the role of intravenous immunoglobulins in idiopathic inflammatory myopathies. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;46(4):488–508. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2016.07.014>
23. Hoffman EP, Rao D, Pachman LM. Clarifying the boundaries between the inflammatory and dystrophic myopathies: insights from molecular diagnostics and microarrays. *Rheum Dis Clin North Am.* 2002;28(4):743–757. doi: [https://doi.org/10.1016/s0889-857x\(02\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0889-857x(02)00031-5)
24. Meregalli M, Navarro C, Sitzia C, et al. Full-length dysferlin expression driven by engineered human dystrophic blood derived CD133+ stem cells. *FEBS J.* 2013;280(23):6045–6060. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.12523>
25. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown RH Jr. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol.* 2002;51(1):129–133. doi: <https://doi.org/10.1002/ana.10080>
26. Wein N, Avril A, Bartoli M, et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum Mutat.* 2010;31(2):136–142. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.21160>
27. Lee JJA, Maruyama R, Duddy W, Sakurai H, Yokota T. Identification of Novel Antisense-Mediated Exon Skipping Targets in DYSF for Therapeutic Treatment of Dysferlinopathy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;13:596–604. doi: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.10.004>
28. Lukyanenko V, Muriel JM, Bloch RJ. Coupling of excitation to Ca²⁺ release is modulated by dysferlin. *J Physiol.* 2017;595(15):5191–5207. doi: <https://doi.org/10.1113/JP274515>
29. Vincent AE, Rosa HS, Alston CL, et al. Dysferlin mutations and mitochondrial dysfunction. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(11):782–788. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.08.008>
30. Han WQ, Xia M, Xu M, et al. Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt5):1225–1234. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.094565>
31. Cytoplasmic Vesicles — Advances in Research and Application: 2013 Edition. P. 18.
32. Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, et al. Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(4):334–340. doi: <https://doi.org/10.1093/jnen/64.4.334>
33. Azakir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Sinnreich M. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2010;5(4):e10122. Published 2010 Apr 12. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010122>
34. Mariano A, Henning A, Han R. Dysferlin-deficient muscular dystrophy and innate immune activation. *FEBS J.* 2013;280(17):4165–4176. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.12261>

35. Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skeletal Muscle*. 2011;1(10). doi: <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-10>
36. Codding SJ, Marty N, Abdullah N, Johnson CP. Dysferlin Binds SNAREs (Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Factor (NSF) Attachment Protein Receptors) and Stimulates Membrane Fusion in a Calcium-sensitive Manner. *J Biol Chem*. 2016;291(28):14575–14584. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727016>
37. Blandin G, Beroud C, Labelle V, et al. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Hum Mutat*. 2012;33(3):E2317–E2331. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.22015>
38. Krahn M, Bérout C, Labelle V, et al. Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat*. 2009;30(2):E345–E375. doi: <https://doi.org/10.1002/humu.20910>
39. Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology*. 2003;60(11):1799–1804. doi: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000068333.43005.12>
40. Shin HY, Jang H, Han JH, et al. Targeted next-generation sequencing for the genetic diagnosis of dysferlinopathy. *Neuromuscul Disord*. 2015;25(6):502–510. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.03.006>
41. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41–49. doi: <https://doi.org/10.1038/nature00870>
42. Jain-foundation.org [Internet]. Jain Foundation funded studies: Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs). Available from: <https://www.jain-foundation.org/past-projects/multipotent-adult-progenitor-cells-mapcs/>
43. Rosales XQ, Gastier-Foster JM, Lewis S, et al. Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve*. 2010;42(1):14–21. doi: <https://doi.org/10.1002/mus.21650>
44. Деев Р.В., Мавликеев М.О., Бозо И.Я., Пулин А.А., Еремин И.И. Генно-клеточная терапия наследственных заболеваний мышечной системы: современное состояние вопроса // *Гены и клетки*. — 2014. — № 4. [Deev RV, Mavlikeev MO, Yakovlev I, et al. Genno-kletochnaya terapiya nasledstvennykh zabolevaniy myshechnoy sistemy: sovremennoe sostoyanie voprosa // *Гены и клетки*. 2014;9(4):6–33].
45. Keeling KM, Xue X, Gunn G, Bedwell DM. Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:371–394. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153527>
46. Aartsma-Rus A, Singh KH, Fokkema IF, et al. Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies? [published correction appears in *Eur J Hum Genet*. 2010 Sep;18(9):1072-3]. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(8):889–894. doi: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.4>
47. Barthélémy F, Blouin C, Wein N, et al. Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(3):281–290. doi: <https://doi.org/10.3233/JND-150109>
48. Rodrigues M, Yokota T. An Overview of Recent Advances and Clinical Applications of Exon Skipping and Splice Modulation for Muscular Dystrophy and Various Genetic Diseases. *Methods Mol Biol*. 2018;1828:31–55. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8651-4_2
49. Azibani F, Brull A, Arandel L, et al. Gene Therapy via Trans-splicing for LMNA-Related Congenital Muscular Dystrophy. *Mol Ther — Nucleic Acids*. 2018;10:376–386. doi: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.012>
50. Яковлев И.А., Деев Р.В., Соловьева В.В., и др. Пред- и пост-транскрипционная модификация генетической информации в программе лечения мышечных дистрофий // *Гены и клетки*. — 2016. — № 11 (2). — С. 42–52. [Yakovlev IA, Deev RV, Solovyeva VV, et al. Pred-i posttranskriptsionnaya modifikatsiya geneticheskoy informatsii v programme lecheniya myshechnykh distrofiy. *Geny & Kletki*. 2016;11(2):42–52. (In Russ.)]
51. Kierlin-Duncan MN, Sullenger BA. Using 5'-PTMs to repair mutant beta-globin transcripts. *RNA*. 2007;13(8):1317–1327. doi: <https://doi.org/10.1261/rna.525607>
52. Philippi S, Lorain S, Beley C, et al. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Hum Mol Genet*. 2015;24(14):4049–4060. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv141>
53. Muruve DA, Zaiss AK. Immune Responses to Adeno-Associated Virus Vectors. *Curr Gene Ther*. 2005;5(3):323–331. doi: <https://doi.org/10.2174/1566523054065039>
54. Hernandez YJ, Wang J, Kearns WG, Loiler S, Poirier A, Flotte TR. Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. *J Virol*. 1999;73(10):8549–8558.
55. Cottard V, Valvason C, Falgarone G, Lutowski D, Boissier MC, Bessis N. Immune response against gene therapy vectors: influence of synovial fluid on adeno-associated virus mediated gene transfer to chondrocytes. *J Clin Immunol*. 2004;24(2):162–169. doi: <https://doi.org/10.1023/B:JOCI.0000019781.64421.5c>
56. Старостина И.Г., Соловьева В.В., Юрьева К.С., и др. Дисферлинопатии: возможности диагностики, моделирования и генно-клеточной терапии // *Гены и клетки*. — 2013. — № 3. — С. 61–70. [Starostina IG, Solovyeva VV, Yuryeva KS, et al. Modeling and gene therapy of dysferlinopathy. *Cell Transplant Tissue Eng*. 2013;8:61–70.]
57. Escobar H, Schöwel V, Spuler S, Marg A, Izsvák Z. Full-length Dysferlin Transfer by the Hyperactive Sleeping Beauty Transposase Restores Dysferlin-deficient Muscle. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5(1):e277. Published 2016 Jan 19. doi: <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.52>
58. Inoue M, Wakayama Y, Kojima H, et al. Expression of myoferlin in skeletal muscles of patients with dysferlinopathy. *Tohoku J Exp Med*. 2006;209(2):109–116. doi: <https://doi.org/10.1620/tjem.209.109>
59. Davis DB, Delmonte AJ, Ly CT, McNally EM. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2000;9(2):217–226. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.217>
60. Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, et al. Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies. *Mol Neurosci*. 2001;17(1):71–80. doi: <https://doi.org/10.1385/JMN:17:1:71>
61. Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, et al. Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS One*. 2012;7(5):e38036. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038036>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лавров Александр Вячеславович, в.н.с., к.м.н. [*Alexander V. Lavrov*, Leading Research Scientist, MD, PhD]; адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1 [address: 1 Moskvorechie, 115478, Moscow, Russia]; e-mail: alexandervlavrov@gmail.com, SPIN-код: 4926-8347, ORCID: 0000-0003-4962-6947

Иванова Алиса Владимировна, м.н.с. [*Alisa V. Ivanova*, Junior Researcher]; e-mail: bioyoghurtneo@yandex.ru, SPIN-код: 9922-7412, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8954-7330>

Смирнихина Светлана Анатольевна, к.м.н. [*Svetlana A. Smirnikhina*, MD, PhD]; e-mail: smirnikhinas@gmail.com, SPIN-код: 6884-6170, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>