© Коллектив авторов, 2026

DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.30-44 УДК: 616.74-007.17:611.018

Гистоморфометрическое исследование мышечной ткани дисферлин-дефицитных мышей линии Bla/J при системной терапии посредством AAB9.ДИСФ.ДВ

И.А. Яковлев[1], И. Сорочану[1,2], А.М. Емелин[2], Н.С. Гладышев[2], И.С. Лимаев[2], Д.В. Вдовина[2], Ю.А. Ветрова[3], А.А. Исаев[4], Р.В. Деев[2,4]

[1] ООО «Генотаргет», Инновационный центр «Сколково», Москва, Россия
[2] ГНЦ РФ ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия
[3] ООО «Медицинский институт имени Березина Сергея», Санкт-Петербург, Россия
[4] ПАО «Артген биотех», Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Дисферлинопатия представляет собой группу тяжелых мышечных дистрофий, для которых в настоящее время не существует одобренной этиопатогенетической терапии. Использование рекомбинантных аденоассоциированных вирусов ограничено малым размером вирусного капсида, не вмещающим полноразмерный ген *DYSF*. Целью работы стало гистоморфометрическое исследование скелетной мышечной ткани после системного введения оригинальной двухвекторной перекрывающейся системы на основе аденоассоциированных вирусов на модели дисферлинопатии.
Материалы и методы. В исследовании *in vivo* взрослым самцам мышей линии Bla/J (возраст 7 месяцев) однократно внутривенно вводили препарат AAB9.ДИСФ.ДВ в дозе 5×10^{12} вг/кг (n=14). В качестве групп сравнения были включены группы отрицательного (самцы линии Bla/J, n=10) и положительного (интактные самцы линии C57BL/6J, n=10) контроля, которым было выполнено введение физиологического раствора. Через 3 месяца и 6 месяцев скелетные мышцы задних конечностей – икроножную, переднюю большеберцовую и латеральную широкую мышцу бедра (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) – оценивали методами иммунофлуоресценции и гистоморфометрии.
Результаты. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил сборку и восстановление синтеза белка дисферлина *in vivo* во всех изученных мышцах. На сроке 3 месяца зафиксирован выраженный гистопротекторный эффект: тенденция к снижению доли некротизированных волокон по сравнению с отрицательным контролем, а также достоверное увеличение площади поперечного сечения волокон в *m. gastrocnemius* (p=0,012) и *m. tibialis anterior* (p=0,015). К 6-му месяцу зарегистрирован возврат показателей к уровню отрицательного дистрофического контроля, обусловленный эписомальной дилюцией вектора на фоне непрерывных циклов дегенерации и регенерации мышечной ткани. Тем не менее системное введение вектора обеспечило устойчивую стабилизацию в *m. gastrocnemius*, предотвратив нарастание доли волокон с интернализированными ядрами (p=0,572 в экспериментальной группе по сравнению со значимым ухудшением отрицательного контроля, p=0,032).
Заключение. Системное применение разработанной двухвекторной конструкции AAB9.ДИСФ.ДВ обеспечивает стабильный во времени синтез дисферлина и оказывает гистопротекторное действие, ослабевающее к 6 месяцам. Полученные данные свидетельствуют о работоспособности конструкции при системной доставке и указывают на необходимость ее оптимизации для удержания достигнутого эффекта.

Ключевые слова: дисферлинопатия, генная терапия, поясно-конечностная мышечная дистрофия типа R2, аденоассоциированный вирус (AAB), двухвекторная система, Bla/J, гистоморфометрия

Для корреспонденции: Ирина Сорочану. E-mail: ipsorochanu@gmail.com

Для цитирования: Яковлев И.А., Сорочану И., Емелин А.М., Гладышев Н.С., Лимаев И.С., Вдовина Д.В., Ветрова Ю.А., Исаев А.А., Деев Р.В. Гистоморфометрическое исследование мышечной ткани дисферлин-дефицитных мышей линии Bla/J при системной терапии AAB9.ДИСФ.ДВ. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):30–44. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.30-44.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания (№ 125021201974-2) «Генно-клеточная регуляция регенерации тканей опорно-двигательного аппарата и разработка лекарственных препаратов на их основе».

Статья поступила 15.06.2026. **Получена после рецензирования** 23.06.2026. **Принята в печать** 05.10.2026.

Histomorphometric analysis of muscle tissue in dysferlin-deficient Bla/J mice following systemic AAV9.DYSF.DV therapy

I.A. Yakovlev[1], I. Sorochanu[1,2], A.M. Emelin[2], N.S. Gladyshev[2], I.S. Limaev[2], D.V. Vdovina[2], Iu.A. Vetrova[3], A.A. Isaev[4], R.V. Deev[2,4]

[1] LLC Genotarget, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia
[2] Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia
[3] LLC Oncologic Clinic MIBS, Saint Petersburg, Russia
[4] PJSC Artgen Biotech, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction.* Dysferlinopathy is a group of severe muscular dystrophies for which there is no approved etiopathogenetic therapy. The use of recombinant adeno-associated viruses (AAV) is limited by the small packaging capacity of the viral capsid, which cannot accommodate the full-length *DYSF* gene. The aim of this study was to conduct a histomorphometric evaluation of skeletal muscle tissue following the systemic administration of an original dual-vector overlapping AAV-based system in a model of dysferlinopathy.
Materials and methods. Adult male Bla/J mice (7 months of age, n=14) received a single intravenous injection of AAV9.DYSF.DV at a dose of 5×10^{12} vg/kg (n=14). A negative control (male Bla/J mice, n=10) and a positive control (male C57BL/6J mice, n=10), which were administered physiological saline, were comparison groups. At 3 and 6 months post-injection, the hindlimb skeletal muscles (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, and *m. vastus lateralis*) were examined using immunofluorescence and histomorphometry.
Results. Immunofluorescence analysis confirmed the reconstitution and restored synthesis of full-length dysferlin *in vivo*. At 3 months, we noted a pronounced histoprotective effect evidenced by a decreasing percentage of necrotic fibers compared to negative controls and a statistically significant increase in muscle fiber cross-sectional area in *m. gastrocnemius* (p=0.012) and *m. tibialis anterior* (p=0.015). By month 6, morphometric parameters returned to the baseline dystrophic level, which was driven by episomal vector dilution during chronic muscle tissue cellular turnover. Nevertheless, systemic administration of the vector provided stable structural preservation in *m. gastrocnemius*, preventing the progression of nuclear internalization in the treated group (p=0.572) compared to a significant progression in untreated mice (p=0.032).
Conclusion. Systemic administration of the developed dual-vector construct AAV9.DYSF.DV ensures a time-stable synthesis of dysferlin and exerts a histoprotective effect that wanes by 6 months. The obtained data demonstrate the viability of the construct upon systemic delivery and indicate the need for its optimization to sustain the achieved effect.

Keywords: dysferlinopathy, gene therapy, limb-girdle muscular dystrophy type R2 (LGMDR2), adeno-associated virus (AAV), dual-vector system, Bla/J, histomorphometry

Corresponding author: Irina Sorochanu. E-mail: ipsorochanu@gmail.com

For citation: Yakovlev I.A., Sorochanu I., Emelin A.M., Gladyshev N.S., Limaev I.S., Vdovina D.V., Vetrova Iu.A., Isaev A.A., Deev R.V. Histomorphometric analysis of muscle tissue in dysferlin-deficient Bla/J mice following systemic AAV9.DYSF.DV therapy. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):30–44 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.30-44.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The study was carried out within the framework of the state assignment (No. 125021201974-2) “Gene-cell regulation of tissue regeneration in the musculoskeletal system and the development of pharmaceuticals based on it.”

Received 15.06.2026. **Received in revised form** 23.06.2026. **Accepted** 05.10.2026.

Введение

Дисферлинопатия представляет собой фенотипически гетерогенную группу прогрессирующих мышечных дистрофий, развитие которых обусловлено патогенными вариантами в гене *DYSF*, кодирующем белок дисферлин [1, 2]. Выделяют два наиболее часто встречающихся фенотипа – поясно-конечностную мышечную дистрофию типа R2 и миопатию Миоши [2–4], распространенность которых составляет от 1:1300 до 1:2 000 000 человек [2, 5]. Основным экспериментальным подходом лечения, как и для ряда других моногенных заболеваний, является заместительная генная терапия с использованием рекомбинантных векторов на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ). Она заключается в доставке в мышечную ткань функциональной копии терапевтического гена, на матрице которого в дальнейшем синтезируется целевой белок [6, 7].

Применение такого подхода для дисферлинопатии сопряжено с технологическими трудностями из-за размера кодирующей последовательности (кДНК) гена *DYSF* (от 6,2 до 6,5 т.п.н.) [8], существенно превышающей упаковочную емкость стандартного капсида ААВ (~4,7 т.п.н.) [9]. Для преодоления этого ограничения коллективом авторов ранее была разработана ориги-

нальная двухвекторная генно-терапевтическая конструкция на основе AAB, предполагающая раздельную доставку фрагментов целевого гена с их последующей внутриклеточной сборкой в единую и полноразмерную функциональную молекулу (заявка на патент РФ № 2025121570). Несмотря на успешное применение разработанной конструкции при локальном (внутримышечном) введении [10], важнейшим условием для потенциальной клинической трансляции препарата является доказательство его долгосрочной эффективности при системном (внутривенном) методе введения, способном обеспечить терапевтический охват всей скелетной мускулатуры организма [11].

В связи с этим целью настоящего исследования стала морфологическая оценка среднесрочного терапевтического действия (3 месяца и 6 месяцев) однократного системного введения оригинальной двухвекторной конструкции на основе AAB в модели дисферлинопатии – мышей линии BlaJ, базовый дистрофический фенотип которых на момент введения был охарактеризован ранее [12].

Материалы и методы

Векторная генно-терапевтическая конструкция

В работе использовалась оригинальная двухвекторная конструкция на основе AAB, кодирующая ген дисферлина человека, – AAB9.ДИСФ.ДВ. Высокая степень эволюционной консервативности дисферлина человека и мыши (идентичность аминокислотной последовательности 89,6%) обусловливает функциональную состоятельность использования человеческого трансгена в модели заболевания на мышах. Детальное описание дизайна плазмиды, схемы наработки вектора и его предварительная *in vitro* и *in vivo* характеристики описаны ранее [10].

Дизайн эксперимента и лабораторные животные

В исследовании использовались самцы мышей линии Bla/J (B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ) в возрасте 7 месяцев, несущих мутацию гена *DYSF* и служивших моделью дисферлинопатии. Мутация представляет собой инсерцию ретротранспозона в интрон 4, приводящую к аберрантному сплайсингу пре-мРНК и последующему полному блокированию синтеза белка. Животные содержались в виварии с контролируемыми условиями среды, 12-часовым циклом освещения, при температуре 22±2°C и доступом к корму и воде *ad libitum*.

Все этапы экспериментального исследования полностью соответствовали законодательству Российской Федерации (включая Федеральный закон от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации»), нормативным документам исследовательских организаций, а также были одобрены биоэтической комиссией Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 15/10 от 29.10.2021).

Мыши были рандомизированы на три экспериментальные группы:

- экспериментальная терапевтическая группа с внутривенным введением в хвостовую вену исследуемого препарата в дозе 5×10^{12} векторных геномов на 1 кг веса животного (вг/кг) в объеме 150 мкл (n=14);
- отрицательная контрольная группа (нелеченые мыши BlaJ) с внутривенным введением эквивалентного объема физиологического раствора (n=10);
- положительная контрольная группа (генетически интактные мыши дикого типа исходной линии C57Bl/6J) с аналогичным введением физиологического раствора (n=10).

Системное внутривенное введение препарата и физиологического раствора проходило без общей анестезии с использованием индивидуальных фиксирующих устройств – рестрейнеров.

В дальнейшем проводилось исследование в двух временны́х точках: через 3 месяца и 6 месяцев после введения. Для этого в указанные сроки из эксперимента выводилась ровно половина животных из каждой когорты. Выведение животных из эксперимента осуществляли методом цервикальной дислокации шейных позвонков, после чего проводили выделение скелетных мышц задних конечностей икроножной, передней большеберцовой и латеральной широкой мышцы бедра (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) для дальнейшего анализа.

Иммунофлуоресценция

Для иммунофлуоресцентного исследования извлеченные скелетные мышцы задних конечностей (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) подвергали быстрой заморозке в изопентане, предварительно охлажденном в жидком азоте. Из полученных криоблоков изготавливали поперечные срезы толщиной 5 мкм с помощью криостата CryoStar NX50 (Epredia, Германия). В дальнейшем на криосрезах проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием первичных кроличьих моноклональных антител к дисферлину (клон JAI-1-49-3, № ab124684, Abcam, Великобритания, 1:200) и соответствующих вторичных козьих антикроличьих антител, конъюгированных с красителем Alexa Fluor 555 (№ ab150078, Abcam, Великобритания, 1:200). Ядра клеток докрашивали красителем DAPI (№ D1306, Invitrogen, США) в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 10 минут. С целью количественной оценки трансдукции была посчитана доля дисферлин-позитивных волокон (%).

Гистологическое исследование и морфометрия

Для проведения рутинного гистологического исследования аналогичные целевые скелетные мышцы (*m. gastrocnemius*, *m. tibialis anterior*, *m. vastus lateralis*) фиксировали в 10% нейтральном забуференном форма-

лине. Затем материал проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм с помощью ротационного микротома MT1 (Dakewe, КНР).

Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином с дальнейшим получением изображений с использованием сканера гистологических препаратов KF-PRO-120 (KFBio, КНР). Гистотопограммы мышечных срезов анализировали с использованием программного обеспечения Aperio ImageScope (Leica Biosystems, США) для проведения морфометрической оценки следующих гистологических параметров:

- доля некротизированных мышечных волокон (МВ) (%);
- доля мышечных волокон с интернализированными ядрами (%);
- площади поперечного сечения мышечных волокон (мкм^2).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка статистического программирования R (версия 4.3.3, R Core Team, Австрия) в интегрированной среде разработки RStudio (версия 2023.12.1, Posit Software, PBC, США). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического значения и 95% доверительного интервала (95% ДИ). Статистическая значимость межгрупповых различий (p-value) оценивалась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с последующей поправкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга.

Результаты

Восстановление синтеза белка дисферлина

По результатам иммунофлуоресценции у мышей с дисферлинопатией, получивших однократную внутривенную инъекцию исследуемого AAB-препарата, было выявлено восстановление синтеза целевого белка во всех проанализированных скелетных мышцах. Локализация синтезируемого *de novo* дисферлина продемонстрировала смешанный паттерн распределения. Наряду с участками мембранного флуоресцентного окрашивания, подтверждающими встраивание белка в сарколемму мышечных волокон, в ткани регистрировался выраженный внутриклеточный (цитоплазматический) сигнал, а также образование субсарколеммальных агрегатов (рис. 1 A, B).

В то же время в группе отрицательного контроля (мыши Bla/J, получавшие инъекцию плацебо в виде физиологического раствора) специфический сигнал дисферлина полностью отсутствовал как через 3 месяца, так и через 6 месяцев эксперимента (рис. 1 C). В свою очередь, описанный паттерн отличался от профиля естественного распределения в группе положительного контроля – у интактных мышей дикого типа C57Bl/6J наблюдалась локализация дисферлина равномерно по контурам мембран всех волокон, без цитоплазматического свечения (рис. 1 D).

При подсчете доли дисферлин-позитивных волокон через 3 месяца после однократной системной инъекции среднее значение составило 3,80% (95% ДИ: 0,00–8,77%). К 6-му месяцу эксперимента показатели трансдукции стабилизировались, а среднее значение доли позитивных волокон достигло 4,97% (95% ДИ: 0,44–9,56%). Статистическое сравнение двух временны́х точек подтвердило отсутствие значимых различий в количестве трансдуцированных волокон между 3-м и 6-м месяцами наблюдения (p=0,749).

Гистоморфометрическая характеристика скелетных мышц

При качественном исследовании скелетных мышц через 3 месяца после системного введения препарата AAB9.ДИСФ.ДВ в группе терапии визуализировалось изменение гистологической структуры ткани, которое выражалось в снижении количества дегенерирующих волокон и выраженности воспалительной инфильтрации. Кроме того, в *m. gastrocnemius* и *m. tibialis anterior* отмечалось увеличение поперечного размера МВ с формированием крупных однородных полей, что визуально приближало ткань к характеристике мышечных волокон мышей C57Bl/6J. К сроку 6 месяцев общая архитектоника ткани оставалась более сохранной, чем у особей из отрицательной контрольной группы, а в обеих временны́х точках визуально определялось присутствие выраженного количества волокон с интернализированными ядрами. Тем не менее в отдельных полях зрения обнаруживались очаги некрозов и воспалительной инфильтрации, нехарактерные для сохранной ткани, но менее выраженные, чем в отрицательной контрольной группе (рис. 2).

При определении доли некротизированных волокон через 3 месяца после терапии в экспериментальной группе животных выраженность дегенеративных процессов варьировала. В *m. gastrocnemius* значимые различия между опытной и отрицательной контрольными группами не выявлены (средние 1,35 и 1,88%, соответственно, p=0,682) (рис. 3 A). В *m. tibialis anterior* среднее значение доли некротизированных волокон составило 1,35% (95% ДИ: 0,44–2,26%), что было ниже показателей группы мышей Bla/J без лечения, где среднее достигало 5,56% (95% ДИ: 0,12–11,24%) (p=0,163) (рис. 3 B).

В *m. vastus lateralis* на этом же сроке у животных после терапии AAB среднее значение доли некротизированных волокон составило 3,28% (95% ДИ: 1,11–5,44%), демонстрировало тенденцию к снижению по сравнению с группой отрицательного контроля – 7,86% (95% ДИ: 2,74–12,97) (p=0,067) (рис. 3 C).

В 6 месяцев статистически значимые различия по доле некротизированных МВ также не были обнаружены (рис. 3 A–C).

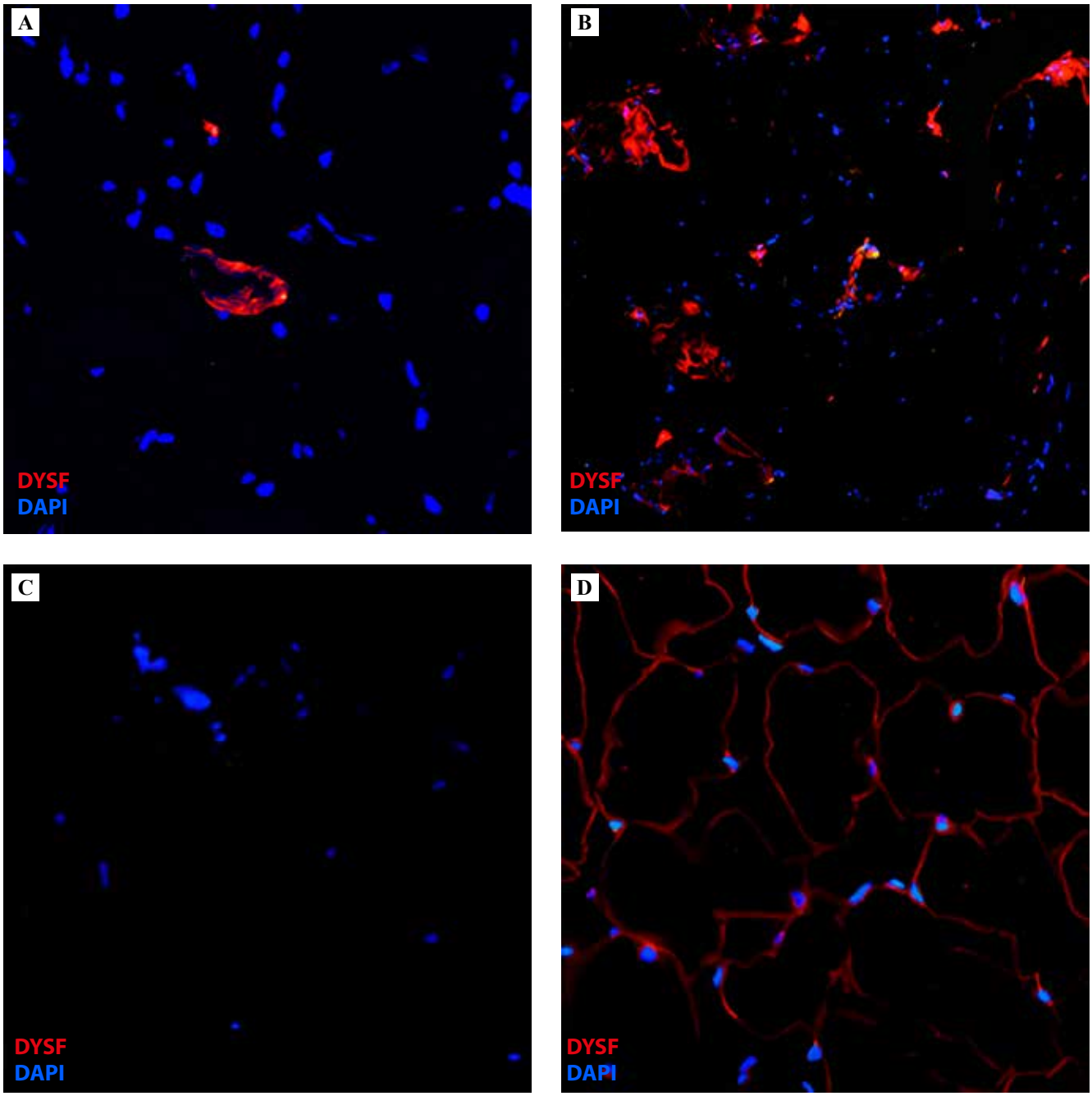


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное исследование поперечных криосрезов икроножных мышц с антителами к дисферлину. Красный сигнал (Alexa Fluor 555) соответствует дисферлину (DYSF), синий сигнал (DAPI) – ядрам клеток. A – единичные трансдуцированные мышечные волокна со смешанным паттерном распределения у мышей Bla/J через 3 месяца после внутривенного введения AAB9.ДИСФ.ДВ. B – группа дисферлин+ волокон со смешанной локализацией у мышей Bla/J через 6 месяцев после системной терапии. C – отсутствие специфического сигнала дисферлина у мышей Bla/J (группа отрицательного контроля). D – сарколеммальная локализация белка у мышей C57Bl/6J (группа положительного контроля). A, C, D – ×400, B – ×200

Fig. 1. Immunofluorescence staining of transverse *m. gastrocnemius* cryosections using anti-dysferlin antibodies. Red signal (Alexa Fluor 555) and blue signal (DAPI) correspond to dysferlin (DYSF and cell nuclei, respectively. A – single transduced muscle fibers with a mixed distribution pattern in Bla/J mice 3 months after IV administration of AAV9.DYSF.DV. B – a cluster of dysferlin-positive fibers with mixed localization in Bla/J mice 6 months after systemic therapy. C – absence of specific dysferlin signal in the negative control (untreated Bla/J mice). D – sarcolemmal protein localization in the positive control (C57Bl/6J mice). A, C, D – ×400, B – ×200

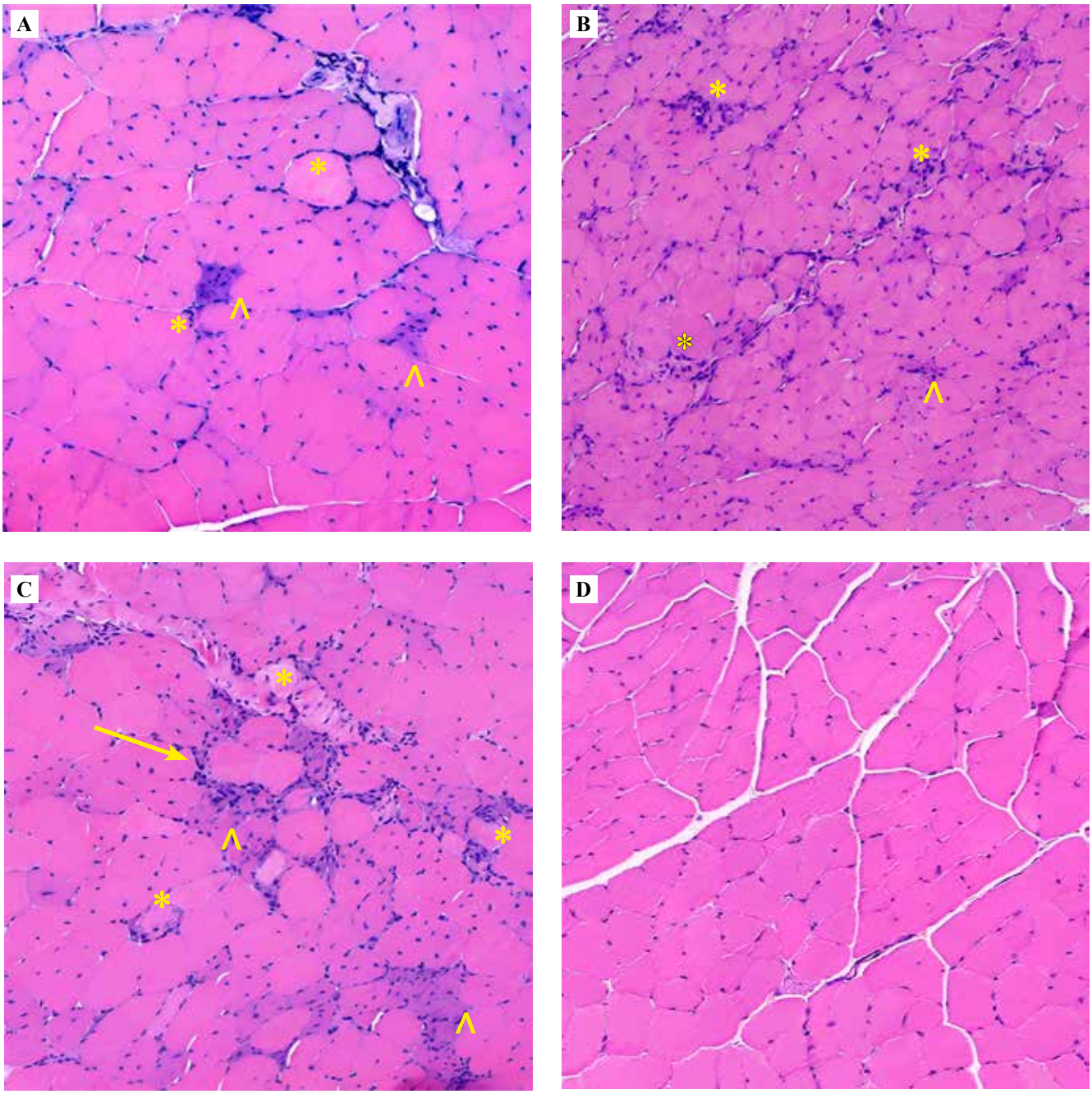


Рис. 2. Патоморфологический анализ поперечных срезов *m. tibialis anterior* мышей экспериментальных групп через 3 месяца и 6 месяцев после начала исследования.
A – мышечная ткань мыши Bla/J через 3 месяца после системного введения препарата AAB9.ДИСФ.ДВ. B – мышечная ткань мыши Bla/J через 6 месяцев после системного введения препарата AAB9.ДИСФ.ДВ. C – скелетная мышечная ткань мыши Bla/J без лечения (группа отрицательного контроля). D – скелетная мышечная ткань мыши C57Bl/6J (группа положительного контроля). *Звездочками* (*) отмечены некротизированные мышечные волокна; символом (∧) указаны группы регенерирующих мышечных волокон с интернализованными ядрами; *стрелкой* (↑) отмечен очаг воспалительной инфильтрации в эндомизии. Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 2. Pathomorphological analysis of transverse *m. tibialis anterior* sections from the experimental groups of mice 3 and 6 months after the start of the study.
A – muscle tissue of a Bla/J mouse 3 months after systemic administration of AAV9.DYSF.DV. B – muscle tissue of a Bla/J mouse 6 months after systemic administration of AAV9.DYSF.DV. C – skeletal muscle tissue of an untreated Bla/J mouse (negative control). D – skeletal muscle tissue of a C57Bl/6J mouse (positive control). *Asterisks* (*) indicate necrotic muscle fibers; symbols (∧) indicate clusters of regenerating muscle fibers with internalized nuclei; the *arrow* (↑) indicates a focus of inflammatory infiltration in the endomysium. H&E stain, ×200

При сравнении доли некротизированных мышечных волокон внутри группы с терапией AAB была выявлена тенденция к нарастанию деструктивных процессов в *m. tibialis anterior* – среднее значение увеличилось с 1,35% (95% ДИ: 0,44–2,26%) на сроке 3 месяца до 3,92% (95% ДИ: 1,43–6,41%) на сроке 6 месяцев (p=0,094) (рис. 3 B).

Подсчет доли МВ с интернализированными ядрами во всех сроках наблюдения не показал статистически значимых различий между группой с терапией AAB и группой отрицательного контроля(p>0,05) (рис. 3 D–F). Однако при сравнении динамики показателей в двух контрольных точках было обнаружено статистически значимое нарастание показателя в *m. gastrocnemius*

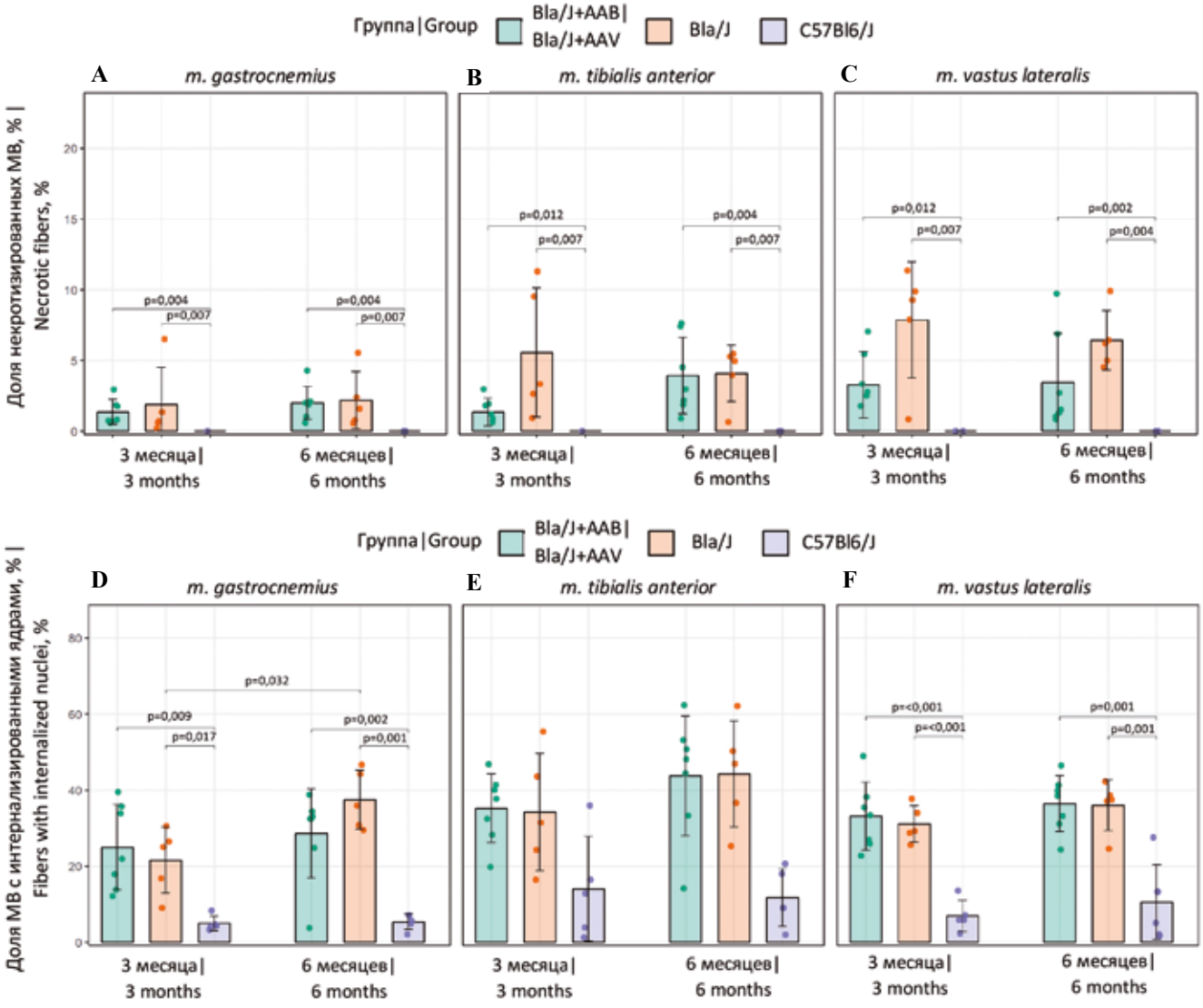


Рис. 3. Доля некротизированных мышечных волокон (%) и МВ с интернализированными ядрами (%) в скелетных мышцах мышей экспериментальных групп на сроках 3 месяца и 6 месяцев после начала терапии.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Показаны группы: Bla/J (отрицательный контроль), Bla/J+AAB (мыши Bla/J, получившие системную терапию препаратом AAB9.ДИСФ.ДВ) и C57Bl6/J (положительный контроль). Высота столбцов отражает среднее арифметическое значение; вертикальные планки представляют собой 95% доверительный интервал; отдельные точки соответствуют показателям индивидуальных животных (n=5–7 в группе). Статистическая значимость различий рассчитана с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и последующей поправкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга

Fig. 3. Percentage of necrotic muscle fibers (%) and muscle fibers with internalized nuclei (%) in skeletal muscles of experimental groups of mice 3 and 6 months after the start of therapy.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Groups: Bla/J (untreated negative control), Bla/J+AAV (Bla/J mice that received systemic therapy with AAV9.DYSF.DV), and C57Bl6/J (intact positive control). The height of the bars reflects the arithmetic mean; the vertical error bars represent the 95% confidence interval; individual dots correspond to the values of individual animals (5–7 per group). Statistical significance of differences was calculated using the non-parametric Mann–Whitney test with subsequent correction for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg method

в группе отрицательного контроля – среднее значение выросло с 21,58% (95% ДИ: 10,89–32,28%) до 37,46% (95% ДИ: 27,82–47,10%) (p=0,032), тогда как в группе с терапией достоверное нарастание показателя за аналогичный период не зарегистрировано (25,01% на сроке 3 месяца и 28,56% для 6 месяцев, p=0,572), что свидетельствует о стабилизации процесса (рис. 3 D).

В результате количественной оценки через 3 месяца после терапии в экспериментальной группе животных наблюдалось выраженное увеличение площади поперечного сечения МВ по сравнению с аналогичным показателем в группе отрицательного контроля в мышцах голени:

- в *m. gastrocnemius* среднее значение в группе терапии составило 1850,60 мкм² (95% ДИ: 1683,21–2018,00 мкм²) против 1437,69 мкм² (95% ДИ: 1209,17–1666,21 мкм²) в группе отрицательного контроля (p=0,012) (рис. 4 A);
- в *m. tibialis anterior* среднее значение составило 2501,24 мкм² (95% ДИ: 1888,49–3113,98 мкм²) против 1444,17 мкм² (95% ДИ: 1283,08–1605,26 мкм²) в группе животных без лечения (p=0,015) (рис. 4 B).

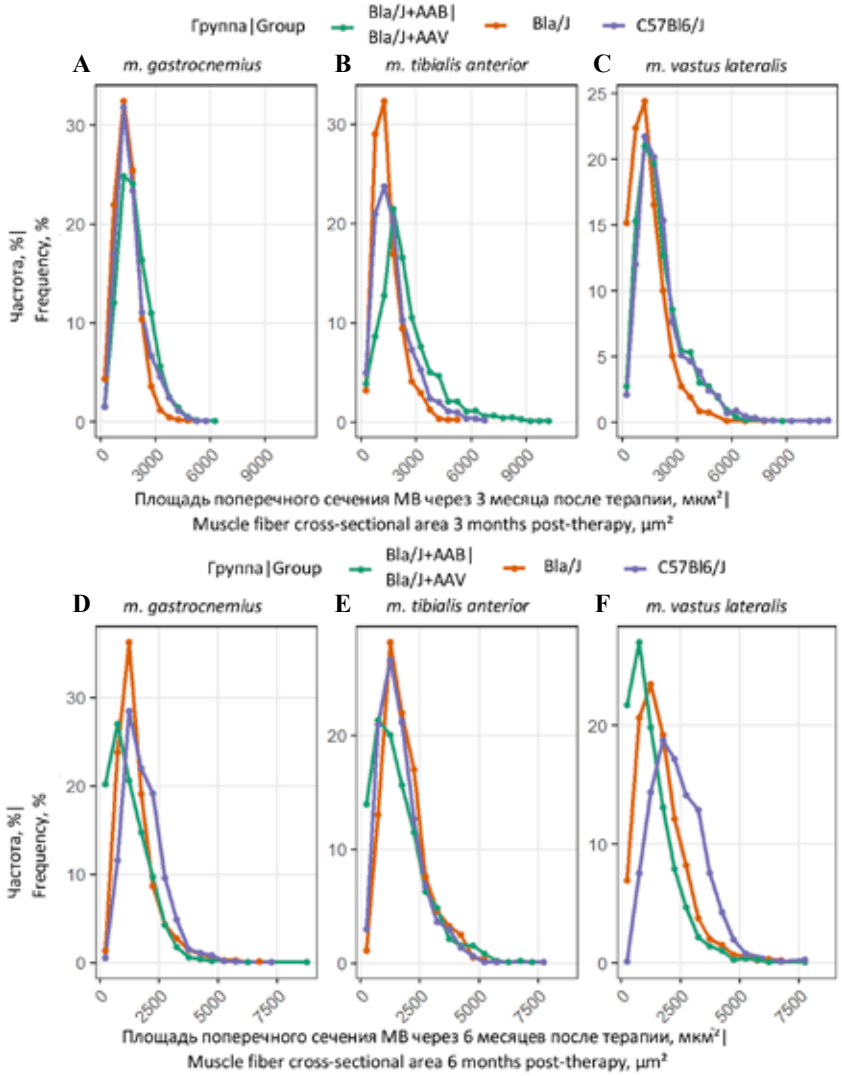


Рис. 4. Частотное распределение площадей поперечного сечения мышечных волокон (%) в скелетных мышцах мышей экспериментальных групп на сроке 3 месяца и 6 месяцев после начала терапии.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Показаны группы: Bla/J (отрицательный контроль), Bla/J + AAB (мыши Bla/J, получившие системную терапию препаратом AAB9.ДИСФ.ДВ) и C57Bl6/J (положительный контроль). Графики отражают процентное соотношение мышечных волокон различного калибра (размерных классов, мкм²) к общему пулу измеренных профилей в каждой группе (n=5–7 в группе)

Fig. 4. Frequency distribution of muscle fiber cross-sectional areas (%) in skeletal muscles of experimental groups of mice 3 and 6 months after the start of therapy.
A, D – *m. gastrocnemius*, B, E – *m. tibialis anterior*, C, F – *m. vastus lateralis*. Groups shown: Bla/J (untreated negative control), Bla/J + AAV (Bla/J mice that received systemic therapy with AAV9.DYSF.DV), and C57Bl6/J (intact positive control). The graphs reflect the percentage ratio of muscle fibers of different calibers (size classes, µm²) to the total pool of measured profiles in each group (5–7 per group)

К сроку 6 месяцев показатели площади в группе терапии достоверно не отличались от показателей группы отрицательного контроля во всех трех проанализированных мышцах ($p>0,05$) (рис. 4 D–F).

При исследовании изменения размеров МВ в динамике внутри группы терапии AAB было обнаружено статистически значимое уменьшение площади поперечного сечения волокон на сроке 6 месяцев по сравнению с 3-месячным сроком во всех исследованных мышцах ($p\leq0,05$).

Полные данные описательной статистики по всем трем морфометрическим параметрам во всех группах представлены в таблице.

Таблица | Table

Сводные показатели гистоморфометрического анализа скелетных мышц мышей экспериментальных групп через 3 месяца и 6 месяцев после начала терапии AAB9.ДИСФ.ДВ | Summary data of histomorphometric analysis of skeletal muscles in experimental groups of mice 3 and 6 months after the initiation of AAV9.DYSF.DV therapy

Месяцев после терапии | Months post-therapy	Мышца | Muscle	Группа | Group	N	Среднее значение | Mean value	95% ДИ | 95% Confidence Interval	
					нижняя граница | Lower limit	верхняя граница | Upper limit
Доля некротизированных мышечных волокон, % | Percentage of necrotic muscle fibers, %						
3	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1,35	0,54	2,16
		Bla/J	5	1,88	1,38	5,15
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1,35	0,44	2,26
		Bla/J	5	5,56	0,12	11,24
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	3,28	1,11	5,44
		Bla/J	5	7,86	2,74	12,97
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
6	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1,99	0,91	3,06
		Bla/J	5	2,17	0,33	4,68
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	3,92	1,43	6,41
		Bla/J	5	4,07	1,60	6,55
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	3,43	0,20	6,65
		Bla/J	5	6,42	3,82	9,03
		C57Bl/6J	5	0,00	0,00	0,00
Доля волокон с интернализированными ядрами, % | Percentage of fibers with internalized nuclei, %						
3	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	25,01	14,63	35,39
		Bla/J	5	21,58	10,89	32,28
		C57Bl/6J	5	4,98	2,58	7,37

Продолжение таблицы | Table continued

Месяцев после терапии | Months post-therapy	Мышца | Muscle	Группа | Group	N	Среднее значение | Mean value	95% ДИ | 95% Confidence Interval	
					нижняя граница | Lower limit	верхняя граница | Upper limit
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	35,21	26,82	43,60
		Bla/J	5	34,25	15,07	53,44
		C57Bl/6J	5	14,07	0,00	31,16
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	33,12	24,85	41,38
		Bla/J	5	31,11	25,16	37,05
		C57Bl/6J	5	6,96	1,85	12,07
6	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	28,56	17,77	39,36
		Bla/J	5	37,46	27,82	47,10
		C57Bl/6J	5	5,36	2,84	7,89
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	43,77	29,21	58,34
		Bla/J	5	44,24	26,91	61,57
		C57Bl/6J	5	11,76	2,42	21,10
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	36,42	29,63	43,21
		Bla/J	5	36,04	27,70	44,38
		C57Bl/6J	5	10,56	0,26	20,86
Площадь поперечного сечения мышечных волокон, мкм^2 | Muscle fiber cross-sectional area, μm^2						
3	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1850,60	1683,21	2018,00
		Bla/J	5	1437,69	1209,17	1666,21
		C57Bl/6J	5	1657,64	1099,66	2215,62
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	2501,24	1888,49	3113,98
		Bla/J	5	1444,17	1283,08	1605,26
		C57Bl/6J	5	1739,47	701,92	2777,03
	m. vastus lateralis	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	2157,22	1473,21	2841,23
		Bla/J	5	1484,17	883,53	2084,80
		C57Bl/6J	5	2052,23	1106,56	2997,90
6	*m. gastrocnemius*	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1258,00	866,31	1649,70
		Bla/J	5	1561,45	1161,83	1961,08
		C57Bl/6J	5	1939,83	1514,78	2364,87

Окончание таблицы | End of table

Месяцев после терапии | Months post-therapy	Мышца | Muscle	Группа | Group	N	Среднее значение | Mean value	95% ДИ | 95% Confidence Interval	
					нижняя граница | Lower limit	верхняя граница | Upper limit
	m. tibialis anterior	Bla/J + AAB | Bla/J + AAV	7	1600,28	1192,61	2007,96
		Bla/J	5	1889,67	1563,71	2215,62
		C57Bl/6J	5	1829,36	1028,80	2629,91
	m. vastus lateralis	Bla/J +AAB | Bla/J + AAV	7	1231,64	996,00	1467,28
		Bla/J	5	1652,49	1094,02	2210,96
		C57Bl/6J	5	2448,90	1653,71	3244,08

Обсуждение

Паттерн распределения трансгенного белка

Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил сборку полноразмерного белка дисферлина *in vivo*, что согласуется с механизмом объединения перекрывающихся векторов [13]. Тем не менее его локализация имела смешанный паттерн распределения: в волокнах регистрировались выраженные цитоплазматические агрегаты и субсарколеммальные депо белка. Такое распределение отличается от равномерного сарколеммального в норме и определяет необходимость анализа его причин.

Накопление усеченных продуктов трансляции как фактор образования агрегатов маловероятно из-за строгой топологии перекрывающейся системы. Наличие промотора только в 5′-векторе и сигнала полиаденилирования только в 3′-векторе ограничивает независимую транскрипцию несобранных половин. Это подтверждается данными литературы, где при аналогичной векторной архитектуре укороченные формы белка *in vivo* не выявлялись [14]. Следовательно, наблюдаемые цитоплазматические скопления с наибольшей вероятностью представляют собой полноразмерный дисферлин на этапе посттрансляционного процессинга, а не его N- или C-концевые фрагменты. Более того, функциональная состоятельность *de novo* синтезированного дисферлина на данной когорте животных подтверждена в смежной работе, где было зафиксировано статистически значимое улучшение мышечной силы и локомоторных показателей у мышей после терапии по сравнению с показателями в отрицательной контрольной группе [15]. Таким образом, несмотря на нетипичное внутриклеточное распределение, собранный белок сохраняет свою функциональность.

Природа смешанного паттерна локализации дисферлина допускает несколько объяснений. Основной гипотезой является локальная сверхэкспрессия белка в волокнах с высокой копийностью вектора. При интенсивном синтезе крупного трансмембранного белка скорость его наработки может превышать пропускную способность аппарата фолдинга и везикулярного транспорта, приводя к депонированию незрелых форм. Принципиальная возможность такого стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) показана на трансгенной модели с экстремальной конститутивной сверхэкспрессией дисферлина, приводившей к дозозависимой миопатии [16]. Однако наличие безопасного терапевтического окна подтверждается данными D.P. Millay et al., где умеренная (3–3,5-кратная) сверхэкспрессия дисферлина у трансгенных мышей не вызывала патологии, обеспечивала правильное сарколеммальное встраивание и полностью устраняла дистрофический фенотип [17]. Это свидетельствует о том, что стресс ЭПР возникает лишь при значительном избытке белка, тогда как в исследовании доля трансдуцированных мышечных волокон не превышала 4%.

Альтернативной причиной скоплений может являться дисбаланс белков-партнеров (аннексины, AHNAK, кавеолин-3), необходимых для правильного встраивания дисферлина в волокнах, длительно находившихся в условиях его дефицита [18]. Окончательное разграничение этих механизмов требует будущей экспериментальной проверки, включающей вестерн-блот анализ на полноразмерность белка и оценку его колокализации с маркерами ЭПР и аппарата Гольджи.

Динамика изменений доли некротизированных волокон

Эксперимент выявил выраженную гетерогенность терапевтического ответа по уровню некроза в зависимости от мышечной группы. На сроке 3 месяца в *m. vastus lateralis* (3,28% против 7,86%, p=0,067) и *m. tibialis anterior* (1,35% против 5,56% в группе Bla/J, p=0,163) доля некротизированных МВ снизи-

лась в 2 раза и более. Однако к 6 месяцам в *m. tibialis anterior* доля некрозов выросла до 3,92% (p=0,094), тогда как в *m. vastus lateralis* терапевтический эффект оставался стабильным (3,28% некрозов на сроке 3 месяца против 3,43% на сроке 6 месяцев, p=0,926).

Постепенное снижение гистопротекторного действия конструкции к 6-му месяцу может носить комплексный характер. С одной стороны, оно связано с фундаментальным свойством векторов AAB персистировать в ядрах в виде неделящихся кольцевых эписом [19]. Хотя инъекция проводилась взрослым животным (7 месяцев), в их мышцах протекает хронический дегенеративно-регенеративный процесс, требующий постоянного восстановления ткани. При неизменном количестве вирусных эписом объем саркоплазмы и количество ядер увеличиваются, вызывая эписомальную дилюцию (episomal dilution – постепенное снижение копийности генома вектора в расчете на мышечное ядро и элиминацию эписом в ходе дегенеративно-регенераторного цикла), на фоне чего снижается концентрация терапевтического белка [20]. С другой стороны, к постепенному снижению наработки терапевтического белка со временем может приводить его эпигенетический сайленсинг (например, метилирование промотора гена) [21]. Кроме того, поскольку мыши Bla/J характеризуются полным блоком синтеза собственного дисферлина, *de novo* синтезируемый человеческий белок (несмотря на высокую степень эволюционной консервативности) может распознаваться иммунной системой нокаутных животных как чужеродный антиген, постепенно запуская Т-клеточный ответ и элиминацию трансдуцированных мышечных волокон.

Скорость этого процесса определяется особенностями состава мышечных волокон и различиями в интенсивности клеточного обновления (дегенерации и регенерации) в различных мышечных группах. Хотя в условиях поддержания веса тела и локомоции обе мышцы (*m. tibialis anterior* и *m. vastus lateralis*) испытывают значительную эксцентрическую нагрузку, *m. tibialis anterior* в моделях мышечных дистрофий характеризуется более высокой частотой повреждения [22]. Это может быть обусловлено преобладанием в *m. tibialis anterior* быстрых гликолитических мышечных волокон IIb типа, которые наиболее чувствительны к разрывам сарколеммы при напряжении в условиях дефицита дисферлина. В то время как *m. vastus lateralis* обладает более гетерогенным профилем (включая окислительно-гликолитические волокна глубоких слоев) [23], *m. tibialis anterior* подвергается более регулярной и выраженной деструкции, что ускоряет элиминацию эписом вектора в ходе интенсивного клеточного обновления. Напротив, более медленная динамика регенераторных процессов в *m. vastus lateralis* позволяет дольше сохранять стабильную копийность эписом в ядрах вплоть до 6 месяцев наблюдения, несмотря на испытываемую мышцей нагрузку.

Стабилизация доли волокон с интернализированными ядрами

Отсутствие абсолютного снижения доли волокон с интернализированными ядрами у мышей после терапии по сравнению с параметрами отрицательной контрольной группы (p>0,05) биологически закономерно для грызунов. В отличие от человека у мышей интернализированные ядра являются пожизненными «гистологическими рубцами» регенерации и практически не мигрируют на периферию, свидетельствуя о пройденных в прошлом циклах некроза [24]. Поскольку конструкция вводилась взрослым животным в возрасте 7 месяцев, значительный стартовый пул МВ с интернализацией в мышцах уже успел сформироваться и был биологически необратим.

Гистопротекторная активность препарата подтверждается динамикой показателя во времени. В *m. gastrocnemius* у особей группы отрицательного контроля зафиксировано нарастание доли МВ с интернализированными ядрами с 21,58 до 37,46% (p=0,032), отражающее непрерывный дегенеративно-регенеративный цикл патологии. В то же время в группе терапии показатель был полностью стабилизирован (рост с 25,01 до 28,56% статистически недостоверен, p=0,572). Это доказывает, что экспрессия дисферлина защитила мембраны от разрывов и предотвратила запуск новых циклов некроза–регенерации.

Двухфазная динамика площади поперечного сечения мышечных волокон

Подсчет средней площади поперечного сечения мышечных волокон выявил разнонаправленные изменения. На сроке 3 месяца зафиксирована реверсия атрофии: площадь волокон значимо увеличилась в *m. gastrocnemius* (p=0,012) и *m. tibialis anterior* (p=0,015) по сравнению с показателем площади в группе отрицательного контроля. Однако к 6 месяцам этот эффект угас и произошло достоверное уменьшение площади во всех исследованных группах мышц по сравнению с 3-месячной точкой: в *m. gastrocnemius* (p=0,018), *m. tibialis anterior* (p=0,015) и *m. vastus lateralis* (p=0,031).

Это уменьшение размеров мышечных волокон является также следствием описанных выше процессов снижения гистопротективного действия. К 6-му месяцу наблюдения в условиях хронического дегенеративно-регенеративного процесса в развернутой стадии заболевания концентрация терапевтического белка на сарколемме снизилась ниже терапевтического порога, что привело к постепенному возобновлению дистрофических изменений. Использованная умеренная доза 5×10^{12} вг/кг оказалась недостаточной для поддержания терапевтического порога дисферлина к 6-му месяцу. Схожие изменения описаны в клинических исследованиях препаратов для лечения миодистрофии Дюшенна (Elevidys) и саркогликанопатий (SRP-9003), где для создания «ядерного резерва» вектора применяются более высокие дозировки (до $1,33\times10^{14}$ вг/кг) [25, 26].

Ограничения исследования

При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать ряд ограничений настоящего исследования. Во-первых, в рамках данной работы не проводилась прямая верификация молекулярной массы собранного белка методом вестерн-блоттинга. Хотя молекулярный дизайн используемой двухвекторной системы исключает экспрессию изолированных усеченных фрагментов, прямая оценка полноразмерности *de novo* синтезированного белка повысит точность выводов в будущих исследованиях. Во-вторых, потенциальный гуморальный и клеточный иммунный ответ на системное введение вектора AAB9 (включая антикапсидные нейтрализующие антитела) или на длительную экспрессию человеческого трансгена у дисферлин-дефицитных животных также остался за рамками настоящей статьи и требует детальной экспериментальной оценки в последующих работах. Наконец, к ограничениям исследования следует отнести относительно небольшой объем выборок животных в группах и умеренный период наблюдения (6 месяцев), что не позволяет в полной мере оценить долгосрочную стабильность действия разработанной конструкции.

Заключение

В настоящем исследовании *in vivo* получены морфологические свидетельства гистопротекторного действия системного введения оригинальной двухвекторной конструкции AAB9.ДИСФ.ДВ на модели дисферлинопатии на раннем и среднем сроках наблюдения. Однократная внутривенная инъекция обеспечила восстановление синтеза дисферлина во всех исследованных скелетных мышцах, причем доля трансдуцированных волокон сохранялась стабильной между 3-м и 6-м месяцами ($p=0,749$), оставаясь при этом невысокой. На сроке 3 месяца зарегистрирован морфологический эффект: значимое увеличение площади поперечного сечения волокон в *m. gastrocnemius* и *m. tibialis anterior* и тенденция к снижению доли некротизированных волокон в мышцах голени. К 6 месяцам этот эффект ослабевал – площадь волокон значимо уменьшалась во всех исследованных мышцах относительно 3-месячного срока, что отражает возврат показателей к дистрофическому уровню в группе отрицательного контроля и может быть связано с постепенным снижением концентрации белка в хронически регенерирующей ткани. Признаком сохраняющегося защитного действия осталась динамика доли волокон с интернализированными ядрами в *m. gastrocnemius*, где в группе терапии в отличие от животных отрицательного контроля значимое нарастание показателя не отмечено. Полученные данные свидетельствуют о работоспособности платформы при системной доставке и указывают на необходимость ее дальнейшей оптимизации (в частности, для минимизации рисков формирования внутриклеточных агрегатов и преодоления снижения концентрации терапевтического белка) с целью удержания достигнутого эффекта.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – И.А. Яковлев, А.А. Исаев, Р.В. Деев.
Сбор и обработка материала – И.А. Яковлев, И. Сорочану, А.М. Емелин, И.С. Лимаев, Д.В. Вдовина, Ю.А. Ветрова.
Подготовка иллюстративного материала – И.С. Лимаев, Д.В. Вдовина, Ю.А. Ветрова.
Статистическая обработка данных и графический материал – И.А. Яковлев, Н.С. Гладышев.
Написание текста – И.А. Яковлев, И. Сорочану.
Редактирование – Р.В. Деев.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – I.A. Yakovlev, A.A. Isaev, R.V. Deev.
Collected the data and performed the analysis – I.A. Yakovlev, I. Sorochanu, A.M. Emelin, I.S. Limaev, D.V. Vdovina, Iu.A. Vetrova.
Preparation of illustrative material – I.S. Limaev, D.V. Vdovina, Iu.A. Vetrova.
Statistical data processing and graphic material – I.A. Yakovlev, N.S. Gladyshev.
Wrote the paper – I.A. Yakovlev, I. Sorochanu.
Edited the manuscript – R.V. Deev.

Конфликт интересов. Авторы заявляют о наличии потенциального конфликта интересов: ООО «Генотаргет» – разработчик исследуемого генно-терапевтического препарата для лечения дисферлинопатии. И.А. Яковлев является генеральным директором и соучредителем ООО «Генотаргет», И. Сорочану – научным сотрудником, А.А. Исаев и Р.В. Деев – соучредителями ООО «Генотаргет». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare the following potential conflict of interest: LLC Genotarget is the developer of the investigated gene therapy drug for dysferlinopathy treatment. I.A. Yakovlev is the CEO; I. Sorochanu is an employee; and I.A. Yakovlev, A.A. Isaev, and R.V. Deev are co-founders of LLC Genotarget. The other authors declare no conflict of interest.

Благодарности. Авторы выражают признательность сотрудникам Белгородского государственного национального исследовательского университета за проведение всех экспериментальных манипуляций на животных *in vivo*, включая их содержание, уход, введение препарата и последующее выведение из эксперимента.

Acknowledgments. The authors would like to acknowledge Belgorod State National Research University for performing all *in vivo* animal procedures and manipulations, including animal housing, husbandry, vector administration, and euthanasia.

Литература/References

1. Orphanet. Dysferlin-related limb-girdle muscular dystrophy R2 [Internet]. Paris: INSERM; 2026. Available from: https://www.orpha.net/en/disease/detail/268 (accessed 11.06.2026).
2. *Anwar S, Yokota T.* The dysferlinopathies conundrum: clinical spectra, disease mechanism and genetic approaches for treatments. Biomolecules. 2024;14(3):256. DOI: 10.3390/biom14030256.
3. *Aoki M, Takahashi T.* Dysferlinopathy. 2004 Feb 5 [Updated 2025 Dec 4]. In: MP Adam, S Bick, GM Mirzaa (eds.). GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2026. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1303/ (accessed 11.06.2026).
4. *Umakhanova ZR, Bardakov SN, Mavlikeev MO, Chernova ON, Magomedova RM, Akhmedova PG et al.* Twenty-year clinical

progression of dysferlinopathy in patients from Dagestan. Front Neurol. 2017;8:77. DOI: 10.3389/fneur.2017.00077.
5. *Bardakov SN, Deev RV, Tsargush VA, Kaimonov VS, Musatova EV, Blagodatskikh KA et al.* Asymptomatic and oligosymptomatic states of dysferlinopathy. J Neuromuscul Dis. 2024;11(6):1283–94. DOI: 10.1177/22143602241289227.
6. *Au HKE, Isalan M, Mielcarek M.* Gene therapy advances: a meta-analysis of AAV usage in clinical settings. Front Med (Lausanne). 2022;8:809118. DOI: 10.3389/fmed.2021.809118.
7. *Sondergaard PC, Griffin DA, Pozsgai ER, Johnson RW, Grose WE, Heller KN et al.* AAV.Dysferlin overlap vectors restore function in dysferlinopathy animal models. Ann Clin Transl Neurol. 2015;2(3):256–70. DOI: 10.1002/acn3.172.
8. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. DYSF dysferlin [Homo sapiens (human)]. Gene ID: 8291. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2026. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8291 (accessed 27.05.2026).
9. *Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR.* Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. Hum Gene Ther. 1999;10(6):1031–9. DOI: 10.1089/104303499500 18427.
10. *Yakovlev IA, Emelin AM, Slesarenko YS, Limaev IS, Vetrova IA, Belikova LD et al.* Dual adeno-associated virus 9 with codon-optimized DYSF gene promotes *in vivo* muscle regeneration and may decrease inflammatory response in limb girdle muscular dystrophy type R2. Int J Mol Sci. 2023;24(17):13551. DOI: 10.3390/ijms241713551.
11. *Potter RA, Griffin DA, Sondergaard PC, Johnson RW, Pozsgai ER, Heller KN et al.* Systemic delivery of dysferlin overlap vectors provides long-term gene expression and functional improvement for dysferlinopathy. Hum Gene Ther. 2018;29(7):749–62. DOI: 10.1089/hum.2017.062.
12. *Корокин М.В., Кузубова Е.В., Радченко А.И., Деев Р.В., Яковлев И.А., Дейкин А.В. и др.* Мыши B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ как генетическая модель дисферлинопатии. Фармация и фармакология. 2022;10(5):483–496. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496.
Korokin MV, Kuzubova EV, Radchenko AI, Deev RV, Yakovlev IA, Deikin AV et al. B6.A-DYSF^{PRMD}/GENEJ mice as a genetic model of dysferlinopathy. Pharmacy & Pharmacology. 2022;10(5):483–496 (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496.
13. *Pryadkina M, Lostal W, Bourg N, Charton K, Roudaut C, Hirsch ML et al.* A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. Mol Ther Methods Clin Dev. 2015;2:15009. DOI: 10.1038/mtm.2015.9.
14. *Trapani I, Colella P, Sommella A, Iodice C, Cesi G, de Simone S et al.* Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. EMBO Mol Med. 2014;6(2):194–211. DOI: 10.1002/emmm.201302948.
15. *Kuzubova EV, Radchenko AI, Manuylov AA, Korokina AM, Koroleva NV, Yakovlev IA et al.* Assessment of physiological parameters in the application of a double adeno-associated virus 9 with a codon-optimized DYSF gene for limb girdle muscular dystrophy type R2. Research Results in Pharmacology. 2025;11(2):36-47. DOI: 10.18413/rrpharmacology.11.642.
16. *Glover LE, Newton K, Krishnan G, Bronson R, Boyle A, Krivickas LS et al.* Dysferlin overexpression in skeletal muscle produces a progressive myopathy. Ann Neurol. 2010;67(3):384–93. DOI: 10.1002/ana.21926.
17. *Millay DP, Maillet M, Roche JA, Sargent MA, McNally EM, Bloch RJ et al.* Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. Am J Pathol. 2009;175(5):1817–23. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090107.
18. *Cárdenas AM, González-Jamett AM, Cea LA, Bevilacqua JA, Caviedes P.* Dysferlin function in skeletal muscle: possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. Exp Neurol. 2016;283(Pt A):246–54. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.06.026.
19. *Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Chérel Y, Chenuaud P et al.* Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. J Virol. 2008;82(16):7875–85. DOI: 10.1128/JVI.00649-08.
20. *Morgan J, Muntoni F.* Changes in myonuclear number during postnatal growth – implications for AAV gene therapy for muscular dystrophy. J Neuromuscul Dis. 2021;8(s2):S317–24. DOI: 10.3233/JND-210683.
21. *Chanda D, Hensel JA, Higgs JT, Grover R, Kaza N, Ponnazhagan S.* Effects of cellular methylation on transgene expression and site-specific integration of adeno-associated virus. Genes (Basel). 2017;8(9):232. DOI: 10.3390/genes8090232.
22. *Dellorusso C, Crawford RW, Chamberlain JS, Brooks SV.* Tibialis anterior muscles in mdx mice are highly susceptible to contraction-induced injury. J Muscle Res Cell Motil. 2001;22(5):467–75. DOI: 10.1023/a:1014587918367.
23. *Bloemberg D, Quadrilatero J.* Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. PLoS One. 2012;7(4):e35273. DOI: 10.1371/journal.pone.0035273.
24. *Meyer GA.* Evidence of induced muscle regeneration persists for years in the mouse. Muscle Nerve. 2018;58(6):858–62. DOI: 10.1002/mus.26329.
25. *Mendell JR, Muntoni F, McDonald CM, Mercuri EM, Ciafaloni E, Komaki H et al.* AAV gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: the EMBARK phase 3 randomized trial. Nat Med. 2025;31(1):332–41. DOI: 10.1038/s41591-024-03304-z.
26. *Mendell JR, Pozsgai ER, Lewis S, Griffin DA, Lowes LP, Alfano LN et al.* Gene therapy with bidridistrogene xeboparvovec for limb-girdle muscular dystrophy type 2E/R4: phase 1/2 trial results. Nat Med. 2024;30(1):199–206. DOI: 10.1038/s41591-023-02730-9.

Информация об авторах

Иван Антонович Яковлев – генеральный директор ООО «Генотаргет».

Ирина Сорочану – научный сотрудник ООО «Генотаргет», младший научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Алексей Михайлович Емелин – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Никита Сергеевич Гладышев – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Игорь Сергеевич Лимаев – научный сотрудник лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Дарья Владимировна Вдовина – ординатор первого года обучения по патологической анатомии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Юлия Андреевна Ветрова – врач-патологоанатом ООО «Медицинский институт имени Березина Сергея».

Артур Александрович Исаев – председатель совета директоров ПАО «Артген биотех».

Роман Вадимович Деев – кандидат медицинских наук, доцент, исполняющий обязанности директора НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, член совета директоров ПАО «Артген биотех».

Author information

Ivan A. Yakovlev – CEO, LLC Genotarget.
https://orcid.org/0000-0001-8127-4078

Irina Sorochanu – Researcher, LLC Genotarget; Junior Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0002-6909-8937

Alexei M. Emelin – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0003-4109-0105

Nikita S. Gladyshev – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0003-2732-5676

Igor S. Limaev – Researcher, Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0000-0002-0994-9787

Daria V. Vdovina – 1st-year Pathology Resident, Petrovsky National Research Surgery Centre.
https://orcid.org/0009-0005-0993-9430

Iuliia A. Vetrova – Pathologist, LLC Oncologic Clinic MIBS.
https://orcid.org/0000-0003-3627-4962

Artur A. Isaev – Chairman of the Board of Directors, PJSC Artgen Biotech.
https://orcid.org/0000-0001-5848-5117

Roman V. Deev – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Acting Director, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI Petrovsky National Research Centre of Surgery; Member of the Board of Directors, PJSC Artgen Biotech.
https://orcid.org/0000-0001-8389-3841