

Мышечная дистрофия Дюшена

Дуншэн Дуань¹, Натали Гоэманс², Синъити Такеда³, Эухенио Меркури^{4, 5} и Аннемиеке Аартсма-Рус⁶

Аннотация | Мышечная дистрофия Дюшена — тяжелое, прогрессирующее заболевание, вызывающее потерю мышц, которое приводит к затруднениям с движением и, в конечном итоге, к необходимости применения вспомогательной вентиляции легких и преждевременной смерти. Заболевание вызывается мутациями в гене *DMD* (кодирует дистрофин), которые нарушают синтез дистрофина в мышцах. В отсутствии дистрофина они более чувствительны к повреждению, что приводит к прогрессирующей потере мышечной ткани и функции, а также к кардиомиопатии. Недавние исследования значительно углубили наше понимание первичных и вторичных патогенетических механизмов заболевания. Разработаны рекомендации по мультидисциплинарной помощи при мышечной дистрофии Дюшена, направленные на генетическую диагностику и ведение различных аспектов заболевания. Кроме того, ряд методов лечения, направленных на восстановление недостающего белка дистрофина или устранение вторичной патологии, получил одобрение регулирующих органов, а многие находятся в стадии клинической разработки.

Мышечная дистрофия Дюшена (МДД) — тяжелое, прогрессирующее заболевание, вызывающее потерю мышц. Самые ранние симптомы — трудности с подъемом по лестнице, «утиная» походка и частые падения; эти симптомы начинаются в возрасте около 2–3 лет¹.

Большинство пациентов становятся зависимыми от инвалидных колясок в возрасте 10–12 лет и нуждаются в вспомогательной вентиляции легких примерно в 20 лет¹. При оптимальном уходе большинство пациентов с МДД умирают между 20 и 40 годами от сердечной и/или дыхательной недостаточности¹.

МДД вызывается мутациями в гене *DMD* (кодирует синтез дистрофина), которые нарушают выработку мышечной изоформы дистрофина (Dp427m)². Мутации в гене *DMD* также могут вызывать мышечную дистрофию Беккера (МДБ)², это более легкое заболевание с более поздним началом и более медленным прогрессированием, чем МДД¹. Различия в спектре заболеваний можно объяснить «правилом рамки считывания»³.

В мышцах дистрофин связывает цитоскелетный F-актин с внеклеточным матриксом через свои N-концевые и C-концевые домены. При МДД мутации со сдвигом рамки считывания (дедеции или дупликации, которые включают количество нуклеотидов, не делящихся на три) или бессмысленные мутации (точечная мутация, при которой код кодона аминокислоты заменяется стоп-кодоном) вызывают преждевременное прекращение трансляции белка, и синтезу нефункционального и нестабильного дистрофина. Нонсенс-опосредованное нарушение, по-видимому, не влияет на транскрипты дистрофина, но эпигенетические изменения вызывают снижение продукции транскриптов⁴. Напротив, при МДБ и мутациях в середине гена сохраняется рамка считывания (дедеции или дупликации, содержащие количество нуклеотидов, кратных трем), что позволяет продуцировать дистрофины с меньшим количеством спектриноподобных повторов, но они имеют как F-актин так и связывающие домены внеклеточ-

ного матрикса и поэтому частично функциональны (Рис. 1).

«Основы» представляют собой всестороннее введение в МДД, начиная с эпидемиологии, характера наследования и патофизиологии. Обсуждаются также стандарты оказания помощи при диагностике и мультидисциплинарном ведении пациентов с МДД для максимального повышения качества их жизни (КЖ). Кроме того, рассматриваются одобренные терапевтические подходы и новые идеи, находящиеся в стадии клинической разработки.

Эпидемиология

Дистрофинопатии — это X-сцепленные рецессивные заболевания, поражающие от 1 из 5 000 до 1 из 6 000 живорожденных мальчиков^{5–7}. Распространенность МДД составляет менее 10 случаев на 100 000 мужчин и, по-видимому, не имеет географических различий^{6–8}. Для сравнения, распространенность МДБ составляет менее 8 случаев на 100 000 живорожденных мужского пола⁷. Из-за отсутствия данных неизвестно, изменилась ли распространенность МДД с течением времени.

При оптимальном уходе пациенты с МДД могут дожить до сорока лет, в основном благодаря разработке рекомендаций по уходу и лечению, а также достижениям в лечении сердечно-легочной дисфункции⁶. Выживаемость пациентов с МДД со временем улучшилась; исследование, проведенное во Франции, показало, что средняя продолжительность жизни составляла 25,77 года для тех, кто родился до 1970 года, и 40,95 года для тех, кто родился после 1970 года (REF⁹).

МДД у женщин встречается очень редко (<1 на миллион) и ограничивается описаниями случаев у больных с синдромом Тернера¹⁰ — 12, транслокацией с участием МДД или лиц с биаллельными *DMD* мутациями¹³. Женщины-носительницы (то есть с *DMD* мутацией на одной X-хромосоме) обычно протекают бессимптомно, но в редких случаях напоминают МДБ. Приблизительно 2,5–19% носителей имеют скелетно-мышечную симптоматику,

¹ Кафедра молекулярной Микробиологии и Иммунологии и кафедра неврологии медицинского факультета; отделение биомедицинских наук, Колледж ветеринарии Лекарство; Департамент Биомедицинские, биологические и Химическая инженерия, Колледж наук, Университет Миссури, Колумбия, Миссури, США.

² Детское отделение Неврология, Университет Больницы Левен, Левен, Бельгия.

³ Национальный центр Неврология и психиатрия, Токио, Япония.

⁴ Centro Clinico Nemo, Policlinico Gemelli, Рим, Италия.

⁵ Детская неврология, Католический университет, Рим, Италия.

⁶ Отдел Человеческой Генетики, Лейденский университет Генетика, Лейденский университет, Медицинский центр, Лейден, Нидерланды.

e-mail:
a.m.aartsma-rus@lumc.nl
<https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3>

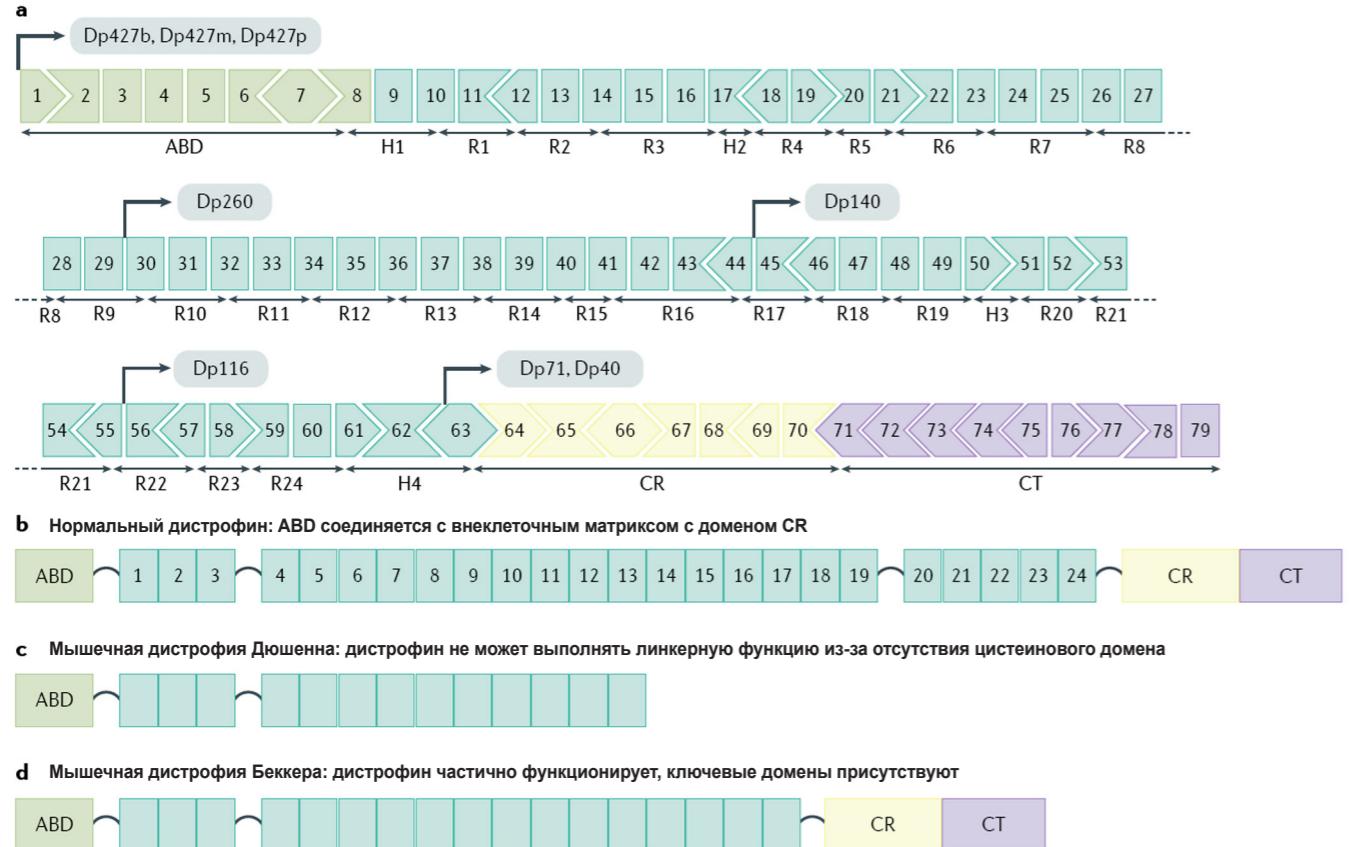


Рис. 1 | Схематическое изображение *DMD* и белок дистрофии. **a** | ~2,4 Мб *DMD* ген содержит восемь промоторов и 79 экзонов. С трех начальных промотора (Dp427b, Dp427m и Dp427p) продуцируются полноразмерная кДНК размером ~11,4 т.п.н. и полноразмерный дистрофии белок 427 кДа. Четыре внутренних промотора (Dp260, Dp140, Dp116 и Dp71) дают начало синтезу усеченных с N- конца немышечной изоформе дистрофина. Альтернативный сплайсинг на 3'-конце и альтернативное полиденилирование (добавление поли (A) хвоста к РНК) генерируют дополнительные изоформы дистрофина, таких как DP40. Полноразмерный белок, образующийся из Dp427m, является первичной мышечной изоформой. **b** | Полноразмерный дистрофии разделен на четыре основных домена, включая N-концевой F-актин-связывающий домен (ABD; кодируется экзонами 1-8), стержневой (R; кодируется экзонами 8-64), богатый цистеином (CR; кодируется экзонами 64-70) и C-концевой (CT; кодируется экзонами 71-79) доменов. Стержневой домен можно разделить на 24 спектриноподобных повтора и четыре перемежающихся петли. **c** | У пациентов с мышечной дистрофией Дюшена (МДД) выработка белка преждевременно прекращается, и образующийся белок не функционирует. Это приводит к потере связей между цитоскелетом и внеклеточным матриксом. **d** | Напротив, у пациентов с мышечной дистрофией Беккера вырабатывается частично функциональный дистрофии, который содержит важные домены, необходимые для соединения с F-актином и внеклеточным матриксом.

а у 7,3–16,7% развивается дилатационная кардиомиопатия¹⁴; носители могут также иметь дополнительные кардиологические симптомы, включая аномальную эхокардиограмму без поражения мышц. До 13,3% женщин-носителей с мутациями МДБ имеют скелетно-мышечную симптоматику и дилатационную кардиомиопатию, но дыхательных проблем обычно нет¹⁴. Систематический анализ того, как эти проявления влияют на продолжительность жизни носителей МДД и МДБ, не проводился, но одно обзорное исследование в Шотландии показало, что продолжительность жизни у носителей с кардиомиопатией была нормальной¹⁵.

Генетика

У пациентов с МДД или МДБ обнаружены тысячи различных мутаций в гене *DMD*^{2,16}. Примерно 60–70% мутаций МДД пациентов — делеции, 5–15% — дупликации, а 20% — точечные мутации, небольшие делеции или дупликации^{3,17}. Напротив, у пациентов с МДБ 60–70% мутаций — делеции, 20% — мутации дупликации, а 5–10% — точечные мутации, небольшие делеции или вставки^{2,18,19}. Кластеры делеций и дупликаций в горячих точках

гена *DMD*, расположены в экзонах 45–55 и 3–9. Примерно 47% и 7% пациентов с МДД имеют мутации в этих горячих точках, соответственно^{20,21}.

Хотя >99% пациентов с МДД или МДБ имеют делецию, дупликацию или небольшую мутацию, также сообщалось о более крупных геномных перестройках между Х-хромосомой и аутосомой (неполовой хромосомой). Было сообщено о нескольких случаях транслокаций с участием гена *DMD*²²; эти транслокации вызывают МДД как у мужчин, так и у женщин, в последнем случае из-за неслучайной Х-инактивации незатронутой Х-хромосомы. В этих случаях клетки с инактивацией мутантной Х-хромосомы (клетки, которые теоретически могут продуцировать дистрофии) становятся нежизнеспособными из-за инактивационного эффекта хромосомной транслокации на аутосому. Только клетки, в которых незатронутая Х-хромосома инактивирована, будут жизнеспособными. Однако они не будут производить дистрофии из-за хромосомной транслокации, влияющей на ген *DMD*. Следовательно, женщины с этими транслокациями не могут продуцировать никакой дистрофии.

De novo мутации часто встречаются при МДД и МДБ; действительно, обе формы вызваны de novo мутациями половых клеток у трети пациентов^{18,23–26}. Примечательно, что матери, не являющиеся соматическими носителями мутации *DMD* гена, но у которых есть дети с МДД или МДБ, подвержены риску иметь еще одного ребенка с МДД или МДБ в результате гонадного мозаичизма (какой-то процент ооцитов несет мутацию). Частота гонадного мозаичизма в ооцитах или сперматозоидах имеет индивидуальные различия, но может достигать 14%²⁷.

Механизмы / патофизиология МДД и дистрофин

МДД — в первую очередь болезнь разрушения и некроза мышц²⁸ (Рис. 2), хотя механизмы, лежащие в основе гибели мышц, долго оставались непонятными. До открытия дистрофина обсуждались несколько гипотез о причинах гибели мышц, включая ишемию мышц, аномалии двигательных неронов, недостаточность питания, метаболические дефекты, аберрантную регуляцию кальция и повреждение сарколеммы²⁹. Из них гипотеза вовлечения сарколеммы получила наибольшую популярность, поскольку она, кажется, объясняет многие клинические данные о МДД. Согласно гипотезе вовлечения сарколеммы, МДД вызывается структурными и/или функциональными дефектами сар-

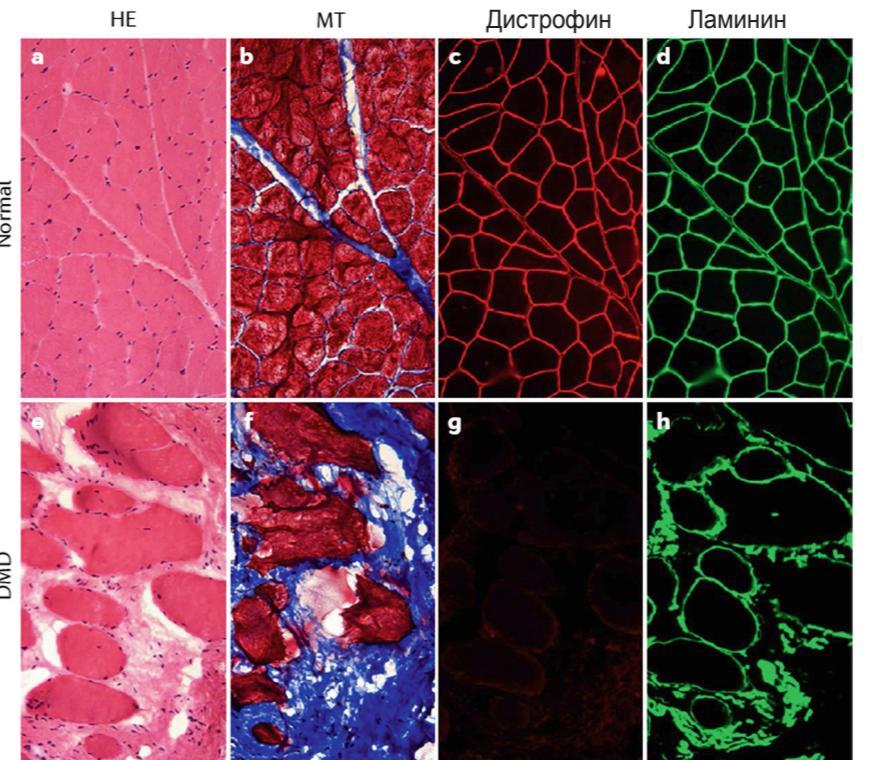


Рис. 2 | Гистология здоровых и дистрофичных (МДД) мышц. Окрашивание поперечного сечения здоровой мышцы (панели а–д) и скелетных мышц пациента с миодистрофией Дюшена (МДД; панели е–h). Окрашивание Гематоксилином эозином (HE) показывает центральноядерные миофибриллы, инфильтрацию воспалительными клетками, различный размер миофибрилл, накопление соединительной ткани эндомизия и перимизия (панели а и е). Окрашивание трихромом по Массону (MT) показывает усиление фиброза (окрашивание в синий цвет) у пациентов с МДД по сравнению со здоровыми мышцами (панели б и ф). Иммунофлуоресцентное маркирование дистрофина и ламинина показывает отсутствие дистрофина у пациентов с МДД по сравнению со здоровыми мышцами (панели с и г) и изменение размера мышечных волокон в мышцах больных МДД (панели д и х).

колемного белка из-за мутаций в кодирующем гене²⁹; последующие расследования вывили дистрофин и ген *DMD* как подлежащие причины^{30,31} (Рис. 1), хотя, в отличие от первоначальной гипотезы, дистрофин является скорее субсарколемным, чем сарколемным белком.

DMD кодирует специфический для мышц белок дистрофин (Dp427m) в дополнение к двум другим полноразмерным изоформам с промоторами DP427c и DP427p^{32,33} (Рис. 1); эти изоформы экспрессируются в нейронах коры и клетках Пуркинье мозжечка, соответственно^{32,33}. Изоформа Dp427p была идентифицирована у мышей, и исследования показывают, что экспрессия Dp427p в мозжечке человека очень низка во время эмбрионального развития и постнатально³⁴. Помимо полноразмерных изоформ дистрофина, четыре внутренних промотора инициируют синтез более коротких изоформ дистрофина. Эти изоформы в основном экспрессируются в разных тканях; Dp260 экспрессируется главным образом в сетчатке³⁵, Dp140 экспрессируется в центральной нервной системе, почках³⁶ и на высоких уровнях в эмбриональном мозге³⁴, Dp116 в первую очередь экспрессируется в периферических нервах и шванновских клетках³⁷, и Dp71 экспрессируется повсеместно, но на более высоких уровнях в нейронах, чем в других типах клеток³⁸. Другая изоформа, Dp40, считается с того же промотора, что и Dp71, но полиденилируется в интроне 70³⁹.

Дистрофин-ассоциированный белковый комплекс

Выявление партнеров по связыванию дистрофина включало комбинацию исследований на моделях клеток человека и животных, а также изучение биопсии и аутопсии тканей пациентов с мышечной дистрофией. В поперечно-полосатых мышцах дистрофин прямо или косвенно взаимодействует с сарколеммой, цитоскелетом (актиновыми микротрубочками, промежуточными филаментами, микротрубочками и другими структурными белками), белками, формирующими поры, сигнальными белками или каркасными белками (Рис. 3). В совокупности дистрофин и его связывающие его соединения образуют дистрофин-ассоциированный белковый комплекс (DAPC)⁴⁰. Он был открыт в начале 1990-х и получил тогда название дистрофин-гликопротеинового комплекса (DGC), поскольку несколько компонентов являются гликопротеинами. DGC содержит 11 белков: дистрофин, дистрогликановый подкомплекс (α -дистрогликан и β -дистрогликан), подкомплекс саркогликан (α -саркогликан, β -саркогликан, γ -саркогликан и δ -саркогликан), саркоспан, синтрафин, дистробревин и нейрональная синтаза оксида азота (nNOS)⁴¹. С момента открытия DGC наше понимание о взаимодействующих с дистрофином компонентах существенно продвинулось. Идентифицировано больше связывающих соединений и картированы домены взаимодействия многих из этих белков. Кроме того, цепится динамическая природа DAPC; разные формы DAPC существуют в различных тканях

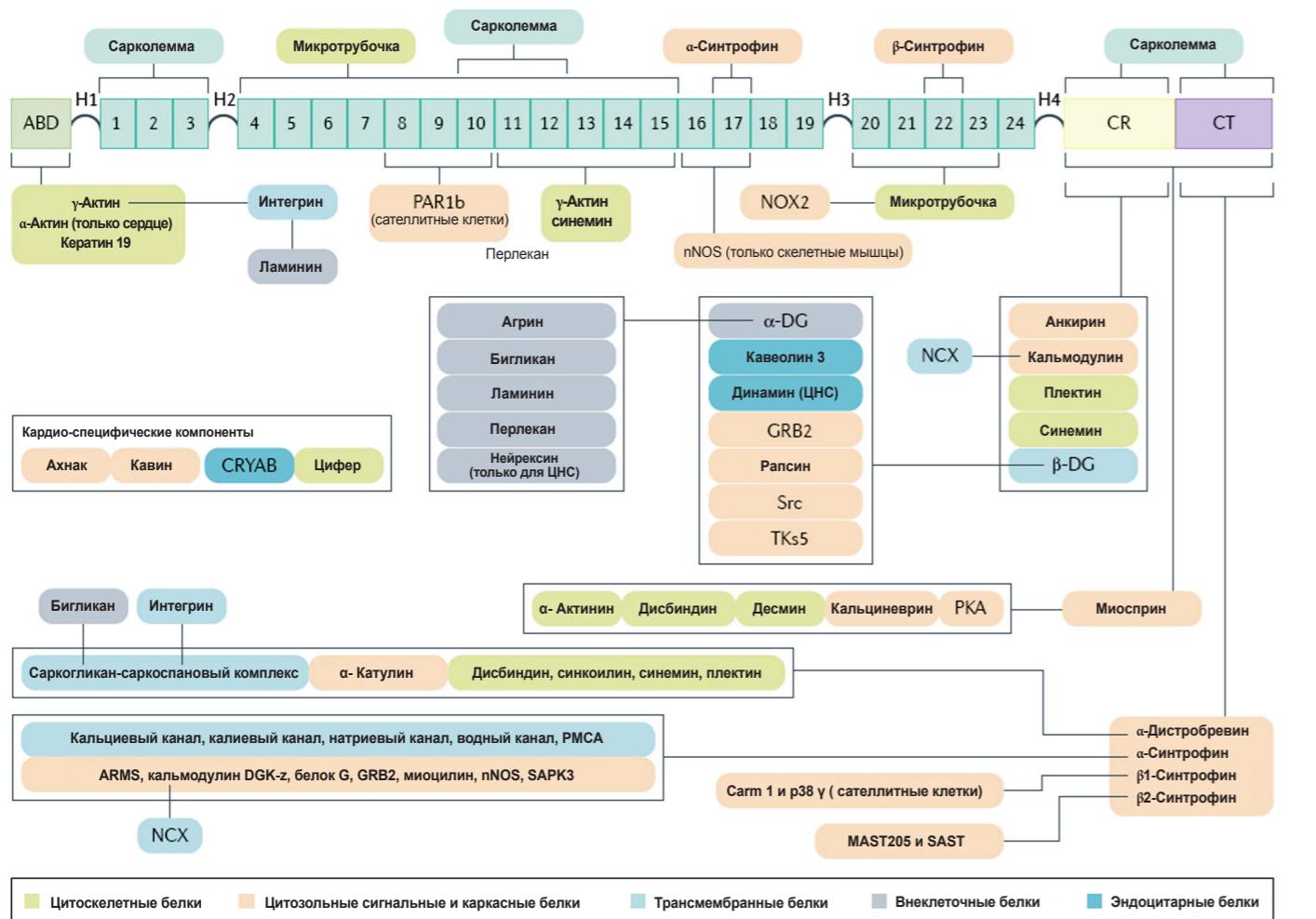


Рис. 3 | **Дистрофин и связывающие его компоненты.** Компоненты, связывающие дистрофин, можно разделить на цитоскелетные белки, трансмембранные белки, внеклеточные белки, цитозольные сигнальные и каркасные белки, эндоцитарные белки. ABD, актин-связывающий домен; ЦНС, центральная нервная система; CR, богатый цистеином домен; СТ, С-концевой домен; ДГ, дистролиган; NCX, кальций-натриевый обменник; nNOS, нейрональная синтаза оксида азота; NOX2, НАДФ-оксидаза 2; PMCA, кальцийевая АТФаза плазматической мембранны.

или клетках и даже в разных частях одного и того же миоцита. В совокупности эти данные улучшили наше понимание патогенеза МДД.

Дистрофин взаимодействует с сарколеммой через четыре связывающих домена, расположенных в спектриноподобных повторах R1-3 и R10-12, а также в богатых цистеином (CR) и С-концевых (СТ) доменах⁴² (Рис. 3). Связывание дистрофина с актином (в основном с филаментозным γ-актином цитоплазмы) происходит через актин-связывающий домен (ABD) (двумя мотивами гомологов кальпонина) и R11-15 (электростатическое взаимодействие)⁴³.

Взаимодействие микротрубочек с дистрофином происходит через R4-15 и R20-23^{44,45}. Кроме того, дистрофин напрямую связывается с двумя промежуточными белками-филаментами, кератином 19 (через N-концевой фрагмент ABD) и синемином (через R11-15 и домен CR)^{46, 47}. Помимо синемина, домен CR также взаимодействует с трансмембранным белком β-дистролиганом⁴⁸, мембранным стыковочным белком анкирина⁴⁹ и промежуточным связанным с филаментами белком плектином⁵⁰. Связь между дистрофином и сигнальными и каркасными белками более сложна, поскольку

включает прямые и косвенные связи. Дистрофин напрямую связывается с PAR1b (также известным как MARK2, через R8-10)⁵¹, nNOS (через R16 и R17)⁵², α-синтрофин (через два сайта связывания синтрофина в домене СТ и R17), β1-синтрофин и β2-синтрофин (через домен СТ и R22), α1-дистроревин, α2-дистроревин и α3-дистроревин (через два скрученных-спиральных мотива в домене СТ), кальмодулин (через домен CR)⁵³, и миосприн (также известный как CMY5, через домены CR и СТ)⁵⁴.

α-Синтрофин переносит в DAPC несколько других белков: кальциевую АТФазу плазматической мембранны (PMCA), белки каналов (натриевые каналы Nav1.4 и Nav1.5, кальциевые каналы Ki,2 и Ki,4.1, кальциевые каналы TRPC1 и TRPC4 и водный канал аквапорин 4) и другие сигнальные белки (кальмодулин, G-белки, Grb2, миосилин, диацилглицерин-киназа-γ, SAPK3 (также известный как MAPK12 или p38γ MAPK) и ARMS (также известный как KIDINS220))^{40,55,56}. α-Синтрофин также работает с R16/17, чтобы совместно закрепить nNOS на сарколемме в скелетных мышцах⁵⁵⁻⁵⁷. β1-Синтрофин рекрутирует сигнальные и каркасные белки p38γ MAPK и CARM1 (также известные

как PRMT4) для создания полярности саркотилитных клеток⁵⁸. β2-Синтрофин взаимодействует с сигнальными белками и каркасными белками MAST205 и SAST⁵⁹. α-Дистроревин связывает филамент-ассоциированный белок плектин, промежуточные белки филаменты синкоилин и синемин, Спирально закрученный белок дисбиндин, сигнальный белок α-катулин и комплекс саркогликан-саркоспан с DAPC^{55,56}. Миосприн взаимодействует с дисбиндином, белком микроволокон α-актинином, белком промежуточных филаментов десмином, а также сигнальным белком кальциневрином и протеинкиназой A^{5,56,60}.

Помимо этих белков, дистролигановый субкомплекс и комплекс саркогликан-саркоспан вносят дополнительные белки в DAPC, взаимодействующие на уровне третичных структур. Сюда входят белки внеклеточного матрикса (такие как ламинин, агрин, перекан и нейрексин⁶¹), внеклеточный сигнальный или структурный белок бигликан, трансмембранный сигнальный или структурный белок интегрин, сигнальные белки (такие как Src, Grb2, Tks5 и rapsyn) и эндоцитарные белки (кавеолин 3 и динамин 1)^{40,55,56,61}.

Последствия дефицита дистрофина

Дефицит дистрофина приводит к распаду DAPC и потере взаимодействия между F-актином и внеклеточным матриксом. Поскольку DAPC выполняет важные механическую и сигнальную роль в поддержании структурной целостности мышечных клеток и сократительной активности, распад DAPC приводит к обширным последствиям для функции мышечных клеток.

Ослабление сарколеммы. Сила создается за счет повторяющихся циклов скатия и расслабления саркомера, что требует эффективной обработки механической нагрузки сарколеммой. В здоровой мышце целостность сарколеммы поддерживается за счет связей между цитоскелетом, сарколеммой и внеклеточным матриксом через DAPC и комплекс интегрина.

Вставка 1 | Мышечная активность и патогенез МДД

Мышечная дистрофия Дюшена (МДД) не может быть объяснена одним механизмом²¹⁸; действительно, отдельные перекрывающиеся патогенетические процессы, вероятно, задействованы на разных стадиях заболевания и определяют спектр клинических проявлений в различных системах и органах.

Мышечная ткань предназначена для сокращения и составляет основу движений тела, дыхания и кровообращения. Сократительная активность также вызывает значительный механический стресс, который, если не контролировать его должным образом, может повредить мышцы. Неспособность управлять механическим стрессом, вызванным мышечной активностью, составляет центральную тему патогенеза МДД.

Несколько линий доказательств предполагают участие мышечной активности в начале и прогрессировании болезни мышц при МДД. Например, дистрофин экспрессируется на ранних сроках беременности человека²¹⁹, однако пациентов только к 2-3 годам появляются минимальные симптомы, когда они начинают ходить. Точно так же начало некроза мышц совпадает с повышенной активностью в клетках у *mdx* мышей с дефицитом дистрофина. Иммобилизация конечностей предотвращает мышечную дегенерацию *mdx* мышей²²⁰. Кроме того, диафрагма — это основная дыхательная мышца в состоянии покоя и наиболее сильно поражаемая мышца. Паттерны экспрессии дистрофина и состав дистрофин-ассоциированного белкового комплекса (DAPC) дополнительно указывают на важность мышечной активности. В частности, дистрофина гораздо больше в тех участках мышц, которые подвергаются максимальной механической нагрузке, например, в мышечно-сухожильном соединении, костамере (который соединяет саркомер с сарколеммой) и сети Z-дисков. Соединение DAPC в костамере дополнительна усиливается за счет дополнительных взаимодействий через α-актинин, анкирин, десмин, синкоилин и синемин.

При МДД разрушение DAPC ослабляет сарколемму, которая становится очень восприимчивой к повреждениям вследствие мышечных сокращений (Вставка 1). Этот механизм подтверждается несколькими наблюдениями. Например, разрывы сарколеммы (так называемые «дельта-поражения») были обнаружены с помощью электронной микроскопии в мышцах пациентов с МДД⁶².

Кроме того, разрывы сарколеммы можно обнаружить по пассивному проникновению циркулирующих белков или красителей, таких как альбумин, IgG и синий Эванса, и утечке мышечных ферментов, таких как креатинкиназа (КК), из мышц в кровь, особенно после тренировки как у людей, так и у мышей⁶³. Более того, повреждение мышц коррелирует с мышечным стрессом⁶⁴; самые напряженные мышцы, такие как диафрагма, поражаются раньше и сильнее, чем менее работающие. Наконец, мышечные заболевания значительно ослабляются на животных моделях даже за счет частичного восстановления цитоскелета, сарколеммы и связи внеклеточного матрикса с использованием сильно укороченного белка миодистрофина⁶⁵.

Функциональная ишемия. Небольшие очаги мышечной дегенерации и регенерации являются первыми наблюдаемыми мышечными поражениями у пациентов с МДД и легко обнаруживаются на меченных гематоксилином и эозином поперечных срезах при биопсии скелетных мышц уже в первый год жизни до появления симптомов^{66, 67}. Это явление объясняется тем, что дистрофин (в частности, дистрофин-спектриноподобные повторы R16 и R17) прикрепляет nNOS к сарколемме, чтобы производить и высвобождать оксид азота в окружающие сосуды на нагрузку на мышцы, что приводит к расширению сосудов^{52, 68} и обеспечивает перфузию крови в сокращающихся мышцах. В отсутствие дистрофина nNOS неправильно локализуется в саркоплазме, и общий клеточный уровень nNOS снижается, тем самым ставя под угрозу защитную вазодилатацию и приводя к ишемическому повреждению мышц⁶⁹. Важно отметить, что R16-содержащие и R17-содержащие дистрофины эффективно восстанавливают сарколеммальные nNOS и устраняют патологию мышцы в моделях МДД у мышей и собак^{52, 70, 71}.

Свободные радикалы. Мыши модельных животных и пациентов с ДМД продуцируют значительно больше свободных радикалов, чем здоровые мышцы. Основным источником свободных радикалов в мышцах является производство активных форм кислорода (АФК) НАДФН-оксидазой 2 (NOX2). NOX2 активируется связанным с микротрубочками белком Rac1 при механическом растяжении мышцы, что приводит к продукции ROS NOX2^{72, 73}. Процесс производства NOX2-определяемых АФК значительно усиливается при МДД, поскольку структура микротрубочек становится плотной и дезорганизованной из-за потери взаимодействия между ними и дистрофином^{44, 72, 73}. Активные виды азота,

генерируемые цитозольной активацией делокализованных нNOS, являются еще одним важным источником свободных радикалов в МДД мышцах⁷⁴. Кроме того, инфильтрирующие воспалительные клетки и дисфункциональные митохондрии продуцируют дополнительные свободные радикалы в мышцах с МДД. В совокупности это образование свободных радикалов приводит к увеличению маркеров окисления белков, липидов и ДНК в мышцах МДД, что указывает на продолжающееся и повторяющееся окислительное повреждение^{75, 76}. Дистрофическая мышца также более уязвима, чем здоровая мышца, к окислительному стрессу⁷⁷. Восстановленный глутатион — один из самых распространенных и важных антиоксидантов, который защищает мышцы от вредного окислительного повреждения; однако уровень глутатиона значительно снижен в дистрофических мышцах^{78, 79}. Следовательно, способность справляться с окислительным стрессом в мышцах МДД значительно снижена. Несмотря на накопление доказательств, свидетельствующих о роли окислительного стресса в патогенезе МДД, общая антиоксидантная терапия не принесла убедительных клинических преимуществ у пациентов⁷⁵.

Цитозольная перегрузка кальцием. В покое цитозольная (особенно субсарколемная) концентрации кальция в мышцах на моделях МДД и на клеточных моделях пациентов с МДД выше, чем в здоровых мышцах⁸⁰.

Дисфункция митохондрий, вызванная перегрузкой кальцием, приводит к метаболическим дефектам, а перегрузка кальцием также напрямую способствует гибели мышц, запуская пути деградации посредством кальций-зависимой протеазы кальпиона и фосфолипазы А2, а также митохондриально-зависимый некроз⁸¹.

Перегрузка кальцием частично вызвана аномальным поступлением кальция в сарколемму через кальциевые каналы (активируемые растяжением, накоплением ионов, потенциал зависимые и управляемые рецепторами канала), активностью плазматической мембранный Ca^{2+} -АТФазы (РМСА), натрий-кальциевого обменника (NCX) и микроповреждений сарколеммы⁵⁶. Примечательно, что активируемые растяжением кальциевые каналы, управляемые накоплением ионов кальциевые каналы, и РМСА формируются белками, ассоциированными с DAPC, а NCX связан с DAPC через кальмодулин⁵⁶. Несмотря на все эти данные, блокаторы кальциевых каналов практически не продемонстрировали клинической пользы для пациентов с МДД⁸², позволяя сделать вывод о том, что опосредованные кальциевыми каналами мембранные проходы, могут играть лишь незначительную роль в патогенезе.

Привлекает внимание вовлечение саркоплазматического ретикулума (SR) в МДД. Кальций высвобождается из SR через рианодиновый рецептор (RyR) во время мышечного сокращения и перекачивается обратно в SR кальциевой АТФазой сарко / эндоплазматического ретикулума (SERCA) во время расслабления мышцы. При МДД RyR нитрозилируется и фосфорилируется из-за нитрозативного/окислительного стресса и аномальной передачи сигналов (например, через компонент DAPC протеинкиназы А)^{83, 84}, соответственно, которые уменьшают связывание кальстабина (белка, стабилизирующего канал RyR)⁸⁴. Диссоциация кальстабина увеличивает открытие канала RyR, что приводит к утечке кальция из SR⁸⁵. Напротив, стабилизаторы RyR значительно уменьшают патологию мышц у *mdx* мышей, лабораторной модели МДД^{84, 86}. Активность SERCA значительно снижается в дистрофических мышцах в основном из-за повышенной экспрессии сарколипина, небольшого пептида, который отрицательно регулирует активность SERCA. Избыточная экспрессия SERCA или истощение сарколипина эффективно уменьшала заболевание скелетных мышц и кардиомиопатию на моделях мышей с симптомами МДД^{87, 88}.

Сбой регенерации. Неспособность регенерировать лежит в основе истощения мышц, фиброза и замещения жира при МДД. Некоторые исследования показали, что DAPC играет прямую роль в регенерации мышц^{88, 89}. Действительно, в здоровых мышцах повреждение восстанавливается за счет асимметричного деления сателлитных клеток, и для этого процесса важны взаимодействия белков DAPC (дистрофин — PAR1b и β 1-синтрофин — p38/γ Carm1)^{88, 89}. Дезинтеграция DAPC нарушает миогенную приверженность активированных сателлитных клеток, тем самым влияя на регенерацию. Хотя эта теория раскрывает потенциальное прямое влияние потери дистрофина на регенерацию, необходимы дополнительные исследования, чтобы продемонстрировать, как нарушение асимметричного деления сателлитных клеток приводит к неспособности регенерации как у животных, так и у пациентов. Помимо потенциального дефекта миогенной фиксации, нарушение регенерации происходит из-за косвенных последствий изменений в микросреде от потери дистрофина, таких как реструктуризация матрикса, эпигенетические изменения и хроническое воспаление (подробнее 90-92).

Последствия повреждения мышц. Индуцированное дезинтеграцией DAPC повреждение мышц (включая утечки сарколеммы, ишемическое повреждение, окислительный и нитрозативный стресс и аберрантная активация кальций-зависимой протеазы и фосфолипазы) вызывает повреждение органелл и измененные внутриклеточные составляющие в дистрофических мышцах. В нормальных мышцах дефектные органеллы и белковые агрегаты удаляются с помощью аутофагии⁹³; однако аутофагия сильно подавляется при МДД из-за активации Akt, ее мощного ингибитора⁹⁴. Дезинтеграция DAPC способствует активации Akt через активацию пути киназы Src/PI3, опосредованную ROS⁹⁵. Повышение количества и активности интегрина, его связывание с ламинином также вносят вклад в активацию Akt через киназный путь PI3⁹⁶. Нарушение аутофагии приводит к неконтролируемому накоплению дисфункциональных белков и дефектных органелл и, в конечном итоге, к дегенерации мышечных клеток⁹⁷.

Дегенеративные и поврежденные мышечные клетки обнаруживаются и элиминируются инфильтрирующими мышцу воспалительными клетками. У юных пациентов с МДД (2–8 лет) эти инфильтраты в основном состоят из макрофагов и Т-клеток⁹⁸. На ранней стадии воспаления провоспалительные макрофаги M1 способствуют лизису мышечных клеток за счет продукции индуцибелной NOS. На более поздних этапах макрофаги M1 заменяются противовоспалительными макрофагами M2, которые способствуют регенерации и фиброзу⁹⁹. CD4+ хелперные Т-клетки помогают другим иммунным клеткам, продуцируя воспалительные цитокины, а CD8+ цитотоксические Т-клетки вызывают гибель мышечных клеток посредством механизма, опосредованного перфорином⁹⁹.

Нейтрофилы, тучные клетки и эозинофилы также способствуют воспалению иммунно-опосредованной патологии в дистрофических мышцах^{98, 99}. На ранней стадии заболевания поврежденная мышца восстанавливается путем регенерации; однако на более поздних этапах мертвые мышечные клетки в конечном итоге заменяются жировой и фиброзной тканью из-за нарушенной регенеративной способности и активации TGF β в хронической воспалительной среде мышцы МДД¹⁰⁰.

Корреляция генотип-фенотип

Исследования корреляции генотипа и фенотипа предоставили уникальные данные о патогенезе МДД. Исследования пациентов с МДД подтвердили результаты фундаментальных исследований о взаимосвязи между структурой и функцией дистрофина. Например, пациенты с МДД, у которых отсутствует нNOS-связывающий домен ABD или R16/R17, часто имеют более тяжелое заболевание, чем пациенты с МДД, с другими генетическими вариантами^{2, 101}. Исследования корреляции генотип-фенотип также выявили участки дистрофина, которые важны для заболеваний сердца (например, R16-R19), когнитивного дефицита (например, домен CT)¹⁰²⁻¹⁰⁴. Подлежащие механизмы этих явлений остаются все еще невыясненными.

Наше понимание патогенеза МДД и МДБ также улучшилось в результате изучения пациентов с МДБ (даже в пределах одной семьи), которые имеют одинаковую мутацию, но имеют разную степень тяжести, а также при изучении пациентов с МДД, у которых у всех отсутствует дистрофин, но различается степень выраженности и скорость прогрессирования заболевания. Эти исследования подчеркнули важность генетических модификаторов, посредством которых вариации генов, участвующих, например, в формировании воспаления или фиброза, могут влиять на исход заболевания. Например, генетические вариации в регионе, близком к гену CD40 влияют на его экспрессию, а белок CD40 вовлечен в поляризацию Т-клеток. Вариант мутации, вызывающий повышенную экспрессию CD40, был связан с более медленным прогрессированием заболевания, при этом пациенты, несущие протективный аллель этого варианта, значительно

позже теряли способность передвигаться в пяти группах пациентов с МДД¹⁰⁵.

Выявлено шесть потенциальных генетических модификаторов, замедляющих прогрессирование заболевания. К ним относятся варианты, которые влияют на экспрессию и функцию генов SPP1, LTBP4, CD40, THBS1, ACTN3 и TCTEX1D^{90, 101}. В будущем, вероятно, будет определено больше генетических модификаторов. Поскольку МДД — редкое заболевание, выявление этих генетических модификаторов является сложной задачей, и важно подтверждать результаты в независимых коротких, как в случае с модификатором CD40, чтобы исключить ложноположительные результаты из-за небольшого размера выборки.

Кардиомиопатия и когнитивные проявления

Сердце — самая нагруженная мышца в организме, но кардиомиопатия — это позднее проявление МДД. Это наблюдение, вероятно, связано с различиями в экспрессии дистрофина и составе DAPC. В частности, только в сердце форма дистрофина Dp427m экспрессируется в t-трубочках¹⁰⁷, дистрофин напрямую связывается с сократительным аппаратом (α -актином) на Z-дисках¹⁰⁸, а также дистрофин взаимодействует с четырьмя кардиопротективными белками¹⁰⁹ — супер, АННАК1, cavin 1 и CRYAB.

Как упоминалось ранее, мутации, которые нарушают синтез мышечного дистрофина, также препятствуют образованию двух других полноразмерных и, в зависимости от локализации мутации, одной или нескольких более коротких изоформ дистрофина мозга. Поэтому неудивительно, что много пациентов с МДД имеют когнитивные нарушения. Действительно, одна треть пациентов с МДД имеет когнитивные нарушения, трудности с обучением, поведенческие проблемы также являются обычным явлением¹¹⁰. Когнитивные нарушения проявляются с раннего возраста, но не прогрессируют. МРТ 29 пациентов с МДД не вывела серьезных аномалий в головном мозге, хотя количественный анализ показал уменьшение объема серого вещества, наличие аномалий белого вещества и снижение церебральной перфузии по сравнению с контрольной группой того же возраста¹¹¹. В головном мозге дистрофин экспрессируется на постсинаптических термозящих ГАМК-эргических нейронах миандлевидного тела, гиппокампа и клеток Пуркинье мозжечка^{112, 113}. Некоторые исследования коррелируют когнитивные нарушения с мутациями, которые влияют на более короткие изоформы дистрофина (такие как Dp140)¹¹⁴. Кроме того, различия, наблюдаемые с помощью МРТ, были более очевидны у пациентов с МДД, у которых отсутствовал белок Dp140, чем у пациентов с экспрессией Dp140¹¹¹. Однако мало что известно о точной роли различных изоформ дистрофина, экспрессируемых в головном мозге. Связь между дезинтеграцией DAPC и когнитивными нарушениями еще менее ясна^{115, 116}. Интересно, что DAPC головного мозга отличается по составу и включает в себя несколько уникальных компонентов,

таких как нейрексин и γ -синтрофин¹¹². Необходимы дальнейшие исследования, чтобы прояснить связь между дефицитом дистрофина и когнитивными проявлениями.

Диагностика, скрининг и профилактика Получение точного генетического диагноза

Следует соблюдать рекомендации по генетической диагностике МДД¹¹⁷. МДД следует подозревать у мальчиков (в возрасте 2–4 лет) с задержкой двигательной активности, мышечной слабостью, гипертрофией икр и приемом Говерса (когда пациенты «поднимаются» руками по нижним конечностям, вставая с пола, чтобы компенсировать слабость в верхней части ноги и бедрах). Как упоминалось ранее, 30% пациентов с МДД имеют манифестирующие когнитивные нарушения, задержка речи является обычным явлением; следовательно, эти данные также должны вызывать настороженность в отношении МДД¹¹⁸.

У мальчиков с симптомами МДД следует измерять КФК в плазме крови, поскольку у пациентов с МДД с рождения обычно существенно повышаются уровни КФК, нередко $>20\,000$ ед./л. Примечательно, что уровни аспартаттрансаминазы (АСТ) и аланинтрансаминазы (АЛТ) в плазме также повышаются у пациентов с МДД из-за продолжающегося повреждения мышц и высокой экспрессии этих ферментов в скелетных мышцах; однако уровни АСТ и АЛТ обычно не оцениваются в рамках стандартного диагностического обследования пациентов с подозрением на МДД, поскольку уровни КФК являются более специфическим маркером повреждения мышц. МДД чаще встречается у молодых людей с типичными симптомами МДД и повышенными уровнями КФК в плазме; очень важно определить мутацию гена *DMD* у этих больных для подтверждения диагноза¹¹⁹. Кроме того, определение специфической мутации необходимо для начала оказания мультидисциплинарной помощи, проведения анализа матери на носительство и генетического консультирования, а также для определения того, является ли пациент кандидатом на таргетную терапию, специфичную для определенных мутаций, которая в настоящее время одобрена в нескольких регионах¹²⁰. Следует отметить, что, поскольку повышение уровня КФК в плазме является неспецифическим маркером повреждения скелетных мышц, МДД не может быть диагностирована только на основании повышенных уровней КФК в плазме; генетическое подтверждение, как указано в руководстве, имеет решающее значение.

Хотя в будущем секвенирование экзона или генов, вероятно, станет рутинным для всех пациентов с подозрением на наследственные заболевания, в настоящее время более экономично проводить генетическую диагностику дистрофинопатий, используя поэтапный подход^{117, 119} (Рис. 4).

На первом этапе, наличие и избыток 79 экзонов гена *DMD* оценивают с использованием, как правило, метода мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA) или сравнительной геномной гибридизации (CGH). Большинством генетических диагностических

лабораторий используется MLPA, так как его проще реализовать из-за наличия коммерчески доступных наборов¹²¹. Поскольку ~75% пациентов имеют делеции или дупликации гена DMD², MLPA или CGH обнаруживают мутации гена у большинства пациентов. Следует отметить, что если MLPA идентифицирует делецию одного экзона, важно подтвердить это открытие с помощью дополнительного теста, чтобы исключить, вероятность того, что один из зондов мог не связаться с ДНК из-за небольшой мутации. Если MLPA или массив CGH не смогут обнаружить мутацию, требуется анализ малых мутаций с использованием секвенирования по Сэнгеру, во время которого секвенируется каждый из 79 экзонов и фланкирующих инtronных областей.

MLPA внедряется в диагностических лабораториях по всему миру в странах со средним и высоким доходом; однако анализ небольших мутаций часто доступен только в специализированных лабораториях. В странах с низким уровнем дохода может быть доступен только мультиплексный ПЦР. Доступны наборы ПЦР, оценивающие наличие или отсутствие часто делециируемых экзонов гена *DMD*, основанные на том, что имеется кластеризация делеций в двух горячих точках гена¹²². Однако, поскольку эти наборы не оценивают все экзоны, этот анализ показывает только что некоторые экзоны отсутствуют, а другие экзоны присутствуют и неясно, какие именно экзоны вовлечены в делецию. Например, если известно, что экзон 43 и экзон 46 присутствуют, а экзон 45 отсутствует, делеция может затрагивать только экзон 45 (нарушение рамки считываивания) или экзон 44 и экзон 45 (сохранение рамки)¹¹⁹. Таким образом, этот подход не позволяет оценить, является ли делеция с сохранением или нарушением рамки считываивания, и подходит ли пациенту лечение специфичное для конкретной мутации. Кроме того, этот тест позволяет надежно идентифицировать только делеции, но не другие типы мутаций, и, соответственно, мультиплексная ПЦР не рекомендуется для генетической диагностики МДД и МДБ. Однако, если MLPA, CGH и анализ малых мутаций недоступны, предпочтительнее использовать мультиплексную ПЦР, чем не проводить какой-либо генетический анализ вовсе.

Интерпретируя эффект мутации, нужно иметь в виду, что клинические симптомы определяются, какая форма заболевания у человека — МДД или МДБ. В >90% случаев мутации с сохранением рамки считывания приводят к МДБ, а мутации с нарушением рамки считывания — к МДД²; однако об исключениях не сообщалось. В случае несоответствия между симптомами и генетическими мутациями, такими как мутация без нарушения рамки считывания, но симптомы МДД, можно рассмотреть возможность проведения мышечной биопсии и анализа белка, чтобы оценить, например, может ли альтернативный сплайсинг объяснить дискордантный фенотип.

В случаях, когда у пациента была выявлена мутация гена, мать должна пройти обследование, чтобы определить, является ли она носителем. Если ее носительство подтверждено, ее мать и сестры и, возможно, тети и двоюрод-

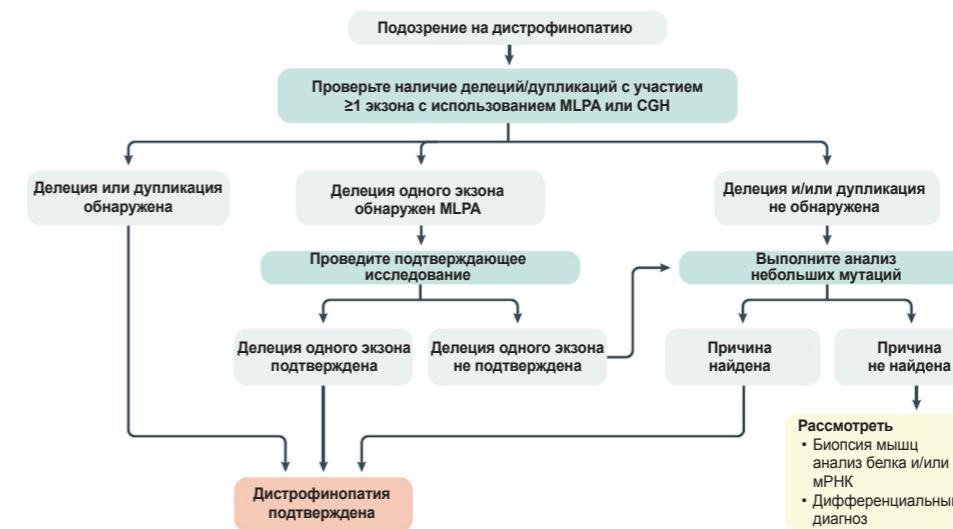


Рис. 4 | Дерево диагностических решений для подтверждения генетического диагноза дистрофинопатии. Мальчики с типичными симптомами дистрофинопатии и повышенным уровнем креатинкиназы (КФК) в плазме должны пройти генетическое тестирование для подтверждения диагноза. Первоначально следует использовать мультиплексную амплификацию лигированных зондов (MLPA) или сравнительную гибридизацию генома (CGH) для выявления патогенного варианта гена *DMD*; однако, если мутантный вариант не идентифицирован (что встречается у ~25% пациентов), следует использовать анализ малых мутаций. Мальчики, у которых после анализа малых мутаций не выявлен патогенный вариант, должны быть направлены для проведения мышечной биопсии и анализа белка или РНК.

ные сестры по материнской линии также могут быть носителями, и им следует предложить консультацию. Матери-носители имеют 50% шанс родить еще одного сына с МДД или дочь, которая также может быть носителем. В частности, матери, не являющиеся носителями, имеют риск до 14% иметь еще одного сына с МДД из-за гонадного мозаичизма²⁷.

Для диагностики МДД большинству пациентов биопсия мышцы не требуется, она показана только тогда, когда мутации не обнаружены с помощью MLPA, CGH или секвенирования по Сэнгеру. В таких целях биопсии мышц является оценка того, правильно ли локализован дистрофин (с использованием иммунофлуоресцентного анализа) или отсутствует/снижен (с помощью вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции, его отсутствие является диагностом МДД) или имеет место измененный размер (с помощью вестерн-блоттинга изменение размера является диагностическим признаком МПК). Часто эти случаи вызваны глубокими инtronными мутациями, и мРНК могут быть выделены из биоптата для дальнейшего анализа¹¹⁹. Лечение может быть начато и тем, у кого не выявлено мутации; однако генетическое консультирование тогда является более сложной задачей, и неясно, подходит ли пациент для мутаций-специфической терапии. Примечательно, что анализ белка дистрофина с помощью вестерн-блоттинга или иммунофлуоресцентного анализа осложняется большим размером молекулы и низким содержанием дистрофина¹²³. Таким образом, он не является широко доступным в диагностических учреждениях стран с низким и средним доходом.

Скрининг новорожденных

Измерение уровней КФК в плазме по сухим пятнам крови возможен и может использоваться для скрининга новорожденных на МДД (*DMD-NS*)^{5, 124, 125}. У пациентов

повышенным уровнем КФК тестирование а мутации гена *DMD* следует использовать для подтверждения диагноза⁵.

Следует отметить, что скрининг на повышенное значение КФК может выявить и другие мышечные заболевания. Действительно, в зоне 10 pilotных исследований *DMD-NS* 20% положительных результатов были связаны с расстройствами, не связанными с МДД, включая МДБ и поясно-конечностная, также контгенитальные мышечные дистрофии¹²⁶. Возможность выявлять расстройства, отличные от МДД, с помощью этого метода подчеркивает необходимость в алгоритмах последующего тестирования для оценки пациентов, без мутации *DMD*. Уровень ложно-положительных результатов при использовании этого метода скрининга был низким (20 на 1 800 000)¹²⁶.

За исключением местных или региональных пилотных исследований, например, в Уэльсе, Германии и США, программы неонатального скрининга на МДД не внедрены. В целом, неонатальный скрининг рассматривается для выявления расстройств с неональным началом, лечение которых на ранних этапах дает убедительные доказательства улучшения результатов. Хотя МДД не полностью соответствует этим критериям, адвокатские группы выступают за раннюю диагностику, чтобы обеспечить раннее лечение вмешательства. Новые методы лечения, которые могут быть более эффективными при использовании на ранней стадии заболевания до того, как произойдет необратимое овреждение мышц, усиливают их просьбу включении МДД в скрининг новорожденных¹²⁷. Кроме того, ранняя диагностика МДД должна привести к скорейшему направлению на генетическое консультирование матери для выявления статуса носителя. Женщины-носителям могут быть предложены варианты репродуктивного выбора, такие как

предимплантационная генетическая диагностика или пренатальное генетическое тестирование с использованием ворсинок хориона или забор образцов околоплодных вод, что ограничивает риск рецидива МДД в этих семьях. Кроме того, женщины-носители должны быть проинформированы о повышенном риске развития кардиомиопатии¹¹⁷.

Пренатальный скрининг на МДД

Внедрение в повседневную дородовую помощь неинвазивного пренатального скрининга, основанного на анализе внеклеточной ДНК в материнской сыворотке, открывает новые возможности. Этот метод выявляет анеуплоидии плода, как правило, тризомию 21, 13 и 18¹²⁸, а также выявляет материнские вариации числа копий (CNV), что еще необходимо оценить. CNV в гене *DMD* являются одними из наиболее часто наблюдаемых материнских CNV, некоторые из которых имеют неизвестное значение¹²⁹. Прогнозирование фенотипа, связанного с CNV, и последующее генетическое консультирование основаны на семейном анамнезе, анализе сегрегации (оценку того, как вариант наследуется в семье, например, если он присутствует у здорового дедушки, то патогенность может быть исключена) и с использованием баз данных с генотип-фенотипическими корреляциями вариантов гена *DMD* (Leiden Open VariationDatabase (LOVD) и UMD-DMD France Database^{2, 130}). Применение правила сдвига рамки к идентифицированным CNV позволяет отличить МДД от МДБ с точностью ~90%¹⁹.

Ведение

Мультидисциплинарное ведение МДД

Несмотря на значительные достижения в терапии за последние 30 лет, лекарства от МДД до сих пор не существует. Тем не менее, мультидисциплинарный медицинский, хирургический и реабилитационный подход, направленный на симптоматику МДД, может изменить естественное течение болезни, улучшив качество жизни и увеличив ее продолжительность¹³¹⁻¹³³. Хотя МДД в первую очередь поражает сердечные и скелетные мышцы, существует также множество внemyщечных проявлений и вторичных последствий мышечной слабости; эти проявления требуют скоординированного, междисциплинарного, ориентированного на пациента подхода на разных стадиях заболевания. Этот подход должен применяться от постановки диагноза до конца жизни и прогнозировать конкретные потребности человека в соответствии со стадией заболевания, включая переход от педиатрической помощи к уходу за взрослыми и расширенное планирование ухода, а также следует учитывать более широкие аспекты здоровья и качества жизни. Помимо основной группы врачей, имеющих опыт лечения пациентов с МДД, медсестры, физиотерапевты, логопеды и диетологи являются ключевыми партнерами в профилактике и лечении симптомов у пациентов с МДД. Кроме того, психологи, эрготерапевты и социальные работники должны оказывать помощь в решении психосоциальных проблем,

расширять участие и поддерживать достижение жизненных целей.

Опубликованы лучшие рекомендации по лечению МДД. Они чаще всего не основаны на доказательствах, поскольку отсутствуют крупномасштабные рандомизированные контролируемые исследования этого заболевания. Тем не менее, эти рекомендации основаны на опыте и мнении ключевых экспертов, на наилучших доступных доказательствах, которые были собраны и проанализированы с использованием признанных методологий для достижения консенсуса^{117, 134, 135}. Эти рекомендации следуют рассматривать как руководство по уходу и ведению МДД, но они должны быть нацелены на потребности и предпочтения отдельных пациентов и должны адаптироваться к появляющимся новым данным по ведению больных МДД.

Респираторная помощь. Улучшение респираторной помощи пациентам с МДД значительно увеличило продолжительность жизни^{9, 136}.

Рекомендации по уходу за органами дыхания включают оценку респираторной функции ежегодно с момента постановки диагноза и каждые 6 месяцев после потери возможности передвигаться самостоятельно. Кроме того, рекомендации также включают использование механического откашливателя и обеспечение респираторной поддержки с помощью механической вентиляции у пациентов с гиповентиляцией¹³⁷.

Симптомы ночной гиповентиляции, такие как утренние головные боли, усталость, аноrexия и частые ночные пробуждения, должны вызывать исследования сна для выявления и лечения этой проблемы¹³⁴.

Кардиологическая помощь. Поражение сердца при МДД характеризуется развитием прогрессирующей дилатационной кардиомиопатии, приводящей к хронической сердечной недостаточности, нарушениям проводимости, желудочковой или наджелудочковой аритмии и риску внезапной ранней смерти^{9, 136}. Улучшение респираторной помощи пациентам с МДД и обеспечение респираторной поддержки привело к смещению причин смерти с первичной дыхательной недостаточности на острые сердечные приступы из-за дилатационной кардиомиопатии, сердечного фиброза и нарушений проводимости, а также сердечной недостаточности. Лечение сердечных проявлений МДД включает раннее выявление симптомов недостаточности и аритмий путем оценки при постановке диагноза и каждый последующий год. Это обследование должно включать физическое обследование, электрокардиографию, эхокардиографию или, если возможно, МРТ сердца^{134, 138}. После появления сердечных симптомов частота обследований должна увеличиваться на усмотрение кардиолога. Симптомы сердечной недостаточности и аритмий лечат ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) и бета-адреноблокаторами. Раннее начало приема ингибиторов АПФ в качестве кардиопротективного лечения рекомендуется пациентам в возрасте до 10 лет, поскольку

профилактическое лечение ингибиторами АПФ может отсрочить появление сердечных симптомов¹³⁹⁻¹⁴¹.

Ортопедическое ведение. МДД характеризуется развитием контрактур мышц конечностей (укорочение мышц, приводящее к деформации) и сколиозом. Кроме того, нарушение метаболизма костей с их пониженной минерализацией является хорошо известным признаком МДД, на него негативно влияет терапия кортикоидами, что может предрасполагать больных к компрессионным переломам. Общая цель ортопедического ведения — оптимизировать или сохранить ослабленную мышечную функцию и предотвратить серьезные деформации, такие как контрактуры или сколиоз. Показания к ортопедическим вмешательствам и хирургическим процедурам должны быть оценены и спланированы с участием членов мультидисциплинарной команды, включающей физиотерапевтов, эрготерапевтов и ортопедов.

Ортопедическое лечение амбулаторных пациентов направлено на предотвращение контрактур ахиллова сухожилия, сгибателей коленного и бедренного суставов и подвздошно-большеберцовых связок с помощью физической терапии и использования ортезов для сохранения устойчивости и способности ходить. У пациентов, которые потеряли способность передвигаться самостоятельно, дополнительное внимание следует уделять правильному положению сидя, чтобы улучшить комфорт и предотвратить (ухудшение) сколиоза и контрактур в нижних конечностях, а также предотвратить контрактуры в кистях и руках, которые могут ухудшить их двигательную активность.

Лечение глюкокортикоидами снижает частоту тяжелых сколиозов, требующих хирургического вмешательства, у подростков с МДД¹⁴²; однако тщательный клинический и радиологический мониторинг позвоночника по-прежнему показан пациентам, получающим глюкокортикоиды, поскольку сколиоз может развиться в более позднем возрасте, особенно после прекращения их приема¹³⁴. Как правило, всем пациентам рекомендуется выполнять исходный рентген позвоночника для выявления переломов позвоночника с ежегодным последующим осмотром, когда пациент перестает ходить. Если обнаружен компрессионный перелом позвонка, может быть рассмотрен вопрос о внутреннем лечении бисфосфонатами¹³⁴. При выявлении сколиоза клиническое и рентгенологическое обследование следует повторять каждые 6-12 месяцев в зависимости от искривления и зрелости скелета¹³⁴. Эти оценки будут определять решение о проведении заднего спондилодеза в зависимости от возраста, скорости развития сколиоза, зрелости скелета и общего состояния пациентов. Периоперационные риски заднего спондилодеза должны быть ограничены путем привлечения мультидисциплинарной команды, имеющей опыт лечения нервно-мышечных расстройств, и анестезиологов, информи-

рованных о конкретных рисках, связанных с этой популяцией, таких как острый рабдомиолиз, криз надпочечников из-за хронического лечения глюкокортикоидами и повышенные риски кардиореспираторных осложнений.

Эндокринология. Хотя кортикоиды связаны с улучшением течения и выживаемости при МДД, они также связаны с побочными эффектами лечения, влияющими на множество систем организма. Эндокринный менеджмент должен касаться вопросов нарушения роста, здоровья костей, метаболизма глюкозы и жиров и задержки полового созревания, все вышеперечисленное нарушено у пациентов с МДД и усугубляется действием глюкокортикоидов. Лечение гипогонадизма и задержки полового созревания должно соответствовать стандартам лечения лиц с патологической задержкой полового созревания среди подростков¹¹⁷. Рекомендации диетолога с акцентом на здоровое питание, сокращение жиров рафинированного сахара и адекватное потребление кальция и витамина D должны предоставляться с момента постановки диагноза, чтобы минимизировать риск избыточного веса. Следует отметить, что диетические рекомендации по потреблению калорий должны корректироваться с учетом снижения физической активности у пациентов с МДД и учитывать чрезмерный аппетит, часто связанный с лечением глюкокортикоидами¹¹⁷.

Гастроэнтерология. Симптомы вовлечения висцеральной гладкой мускулатуры, такие как задержка опорожнения желудка и парез кишечника, становятся более очевидными у взрослых с МДД. Кроме того, запоры и гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) являются очень частыми и, соответственно, частыми осложнениями МДД. Профилактические меры и фармакологические вмешательства должны устранять эти желудочно-кишечные симптомы. Пациентам с МДД может потребоваться ежедневное лечение осмотическими слабительными средствами или лактулозой, также могут быть полезны ректальные клизмы. Лечение ГЭРБ заключается в подавлении выработки желудочного сока с помощью антагонистов гистаминовых рецепторов 2 (таких как ранитидин) или ингибиторов протонной помпы (таких как лансопразол или омепразол). Диетические подходы к профилактике симптомов ГЭРБ включают в себя более частое и меньшее количество приемов пищи и уменьшение потребления жиров¹¹⁷. Слабость роготлотки и нарушение моторики пищевода могут поставить под угрозу безопасный и адекватный прием пищи и привести к недостаточному питанию, что приводит к использованию чрескожной эндоскопической гастростомической трубки для оптимизации статуса питания и ограничения риска аспирации (вдыхание пищи в дыхательные пути). Как и во многих других проявлениях МДД, существует неоднородность во времени появления симптомов дисфагии (затруднение глотания),

необходимость постановки чрескожной эндоскопической гастростомической трубы должна определяться симптомами. Поскольку многие пациенты с МДД доживают до зрелого возраста, соответственно увеличивается число пациентов, которым требуется зондовое питание. При первых признаках желудочных симптомов ингибиторы протонной помпы должны сопровождать лечение глюкокортикоидами, чтобы ограничить риск язвы желудка¹¹⁷.

Урология. У мужчин с МДД могут развиваться признаки и симптомы дисфункции мочевого пузыря и мочевыводящих путей, такие как малая емкость, гиперрефлексивная диссинергия мочевого пузыря и детрузорного сфинктера (нарушение координации мышц), приводящие к ургентным позывам к мочеиспусканию, неполному опорожнению и задержке мочеиспускания. Эти симптомы требуют урологического лечения и могут быть купированы с помощью фармакологического подхода, такого как оксибутинин, который может уменьшить симптомы со стороны мочевыводящих путей и улучшить качество жизни^{143, 144}.

В почках происходит высокий уровень экспрессии изоформы дистрофина Dp71. Хотя точная функция Dp71 до конца неизвестна, ее структура предполагает роль в защите почечных эпителиальных клеток¹⁴³⁻¹⁴⁵. Сообщается, что почечная дисфункция является частым осложнением у пациентов с поздней стадией МДД, которая усугубляется недостаточным потреблением жидкости и применением диуретиков (последние могут быть прописаны кардиологами для лечения сердечной недостаточности, связанной с отеками); таких пациентов следует направить к нефрологу¹⁴⁵.

Развитие нервной системы и нейропсихологии. Особое внимание следует уделять ведению расстройств развития нервной Системы и нейропсихологических расстройств у пациентов с МДД^{34, 146}. Пациенты с МДД имеют более высокую частоту когнитивных нарушений, дефицита внимания/гиперактивности, расстройств аутистического спектра, тревожности и обсессивно-компульсивных расстройств по сравнению с популяцией в целом¹⁴⁶.

Направление на нейропсихологическое обследование следует рассматривать при постановке диагноза МДД, но оно необходимо при возникновении опасений по поводу прогресса в развитии. Может потребоваться поддержка в обучении, которая будет определяться результатами нейропсихологических тестов, они все чаще проводятся в рамках повседневной помощи. Лечение синдрома дефицита внимания/гиперактивности или других поведенческих или психиатрических проблем основано на симптомах и следует руководящим принципам лечения этих расстройств в общей популяции. Дальнейшие исследования для улучшения знаний об этих проявлениях МДД и предоставления руководящих принципов по выявлению, мониторингу и лечению этих проявлений имеют решающее значение, поскольку они оказывают большое влияние на функционирование и качество жизни как пациентов, так и их семей.

Лечение глюкокортикоидами

В последних рекомендациях настоятельно рекомендуется использовать глюкокортикоиды (преднизон или дефлазакорт) у мальчиков с МДД, когда их двигательное развитие останавливается или начинает снижаться, следует продолжать лечение на протяжении всей жизни¹¹⁷. Возраст начала приема стероидов варьирует между пациентами, но не должен быть раньше, чем пациент достигнет 2-летнего возраста, а обычно составляет ~4–5 лет. Нет четкого указания на то, какой глюкокортикоид следует использовать, поскольку оба имеют доказательства улучшения силы и двигательной функции и могут отсрочить потерю способности передвигаться и легочную функцию, уменьшая необходимость хирургического вмешательства при сколиозе и отсрочивая начало кардиомиопатии. Следуя более ранним данным, преднизон чаще ассоциировался с увеличением веса, а дефлазакорт — с катарктой¹⁴⁷.

В недавних исследованиях сообщалось о возможной лучшей роли ежедневного приема дефлазакорта по сравнению с ежедневным преднизолоном в замедлении потери возможности передвигаться и увеличении выживаемости^{148, 149}.

Однако этот аспект до сих пор вызывает споры¹⁵⁰ поскольку аналогичная задержка потери возможности передвигаться также была отмечена в когорте, получавшей ежедневный преднизолон в другом исследовании¹⁵¹. Задержка потери способности передвигаться зависит от схемы лечения; средняя задержка у пациентов, принимающих стероиды ежедневно составляет 2 года, тогда как задержка составляет 1 год для тех, кто использует интервальный режим¹⁵². Нет единого мнения по поводу режима, так как ежедневный прием связан с большим количеством побочных эффектов, и недавние исследования показали возможности режима приема по выходным¹⁵³. Идущее исследование FOR МДД (NCT01603407) оценивает долгосрочную эффективность и безопасность преднизона и дефлазакорта при различных схемах приема и, мы надеемся, поможет прояснить некоторые из этих вопросов.

Точный механизм, с помощью которого глюкокортикоиды задерживают прогрессирование болезни при МДД, полностью не выяснен, поскольку активация рецепторов глюкокортикоидов имеет плейотропные эффекты. Однако было высказано предположение, что глюкокортикоиды уменьшают воспаление и увеличивают общую мышечную массу и силу у пациентов с МДД за счет стимуляции инсулиноподобных факторов роста, снижения продукции цитокинов, снижения реакции лимфоцитов, усиления пролиферации миобластов и усиления синергетических молекул¹⁵⁴. Кроме того, глюкокортикоиды, такие как преднизон и дефлазакорт, также проявляют минералокортикоидную активность (то есть они активируют рецепторы минералокортикоидов в дополнение к рецепторам глюкокортикоидов), что может играть роль в широком спектре побочных эффектов, связанных с этим лечением, включая гипертензию, задержку жидкости, увеличение веса и атрофию кожи. Возможность ограничения этих побочных эффектов с помощью диссоциативных стероидных препаратов

с некоторой антагонистической активностью к минералокортикоидам (ваморолон) оценивается сейчас в клинических испытаниях для лечения МДД¹⁵⁵.

Клинические испытания и одобренные препараты

За последние два десятилетия несколько терапевтических подходов были сосредоточены на различных этапах патофизиологии МДД. Эти подходы можно в целом разделить на те, которые нацелены на восстановление продукции дистрофина, и те, которые пытаются уменьшить вторичные последствия дефицита дистрофина. Некоторые из этих подходов проходят оценку в клинических испытаниях и недоступны в клиниках (см. Перспективы). Однако некоторые уже получили одобрение регулирующих органов США, Европы и Японии¹.

Малые молекулы, направленные на нонсенс мутации. Два рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых испытания атальурена^{156, 157}, перорально биодоступной небольшой молекулы, которая вызывает рибосомное прочтывание бессмысленных мутаций, не смогли достичь после 48-недель улучшений основной конечной точки ходьбы на расстояние в тесте 6-минутной ходьбы (SMWT) по сравнению с пациентами, получавшими лечение плацебо. Однако эти испытания выявили четкую тенденцию терапевтической эффективности, в частности увеличение SMWT на 29 метров и улучшение временных функциональных тестов у тех, кто получал атальурен, по сравнению с плацебо, что вместе с благоприятным профилем безопасности привело к его условному одобрению EMA¹⁵⁸. Соответственно, этот препарат используется в Европе более 4 лет. Результаты Европейского реестра лекарственных средств (STRIDE) подтверждают профиль эффективности и безопасности основных исследований¹⁵⁹. Еще одно подтверждающее плацебо-контролируемое исследование по оценке функциональных эффектов атальурена еще продолжается. Этот препарат не был одобрен FDA¹⁶⁰.

Антисмыловые олигонуклеотиды для дегенерации, нарушающих рамки считывания. Подход с пропуском экзонов основан на открытии того факта, что мутации с нарушением рамки считывания приводят к тяжелой МДД, тогда как мутации с сохранением рамки считывания приводят к более мягкой МДБ. Целью такого подхода является восстановление рамки считывания транскрипты дистрофина, так что могут продуцироваться частично функциональные, МДБ-подобные варианты дистрофина. Восстановление рамки считывания достигается с помощью антисмыловых олигонуклеотидов (ASO), небольших фрагментов модифицированной РНК, которые специфически связываются с экзоном-мишенью во время сплайсинга пре-мРНК. Это связывание предотвращает включение экзона в мРНК. ASO очень малы (20–30 нуклеотидов) и вводятся пациенту системно¹⁶¹.

Подход ASO специфичен для определенных мутаций и необходимо пропускать разные экзоны в зависимости от размера и местоположения мутации. Однако, поскольку большинство пациентов имеют делеции в горячих точках, пропуск определенных экзоны применим к большим группам пациентов. Доказательство концепции опосредованного ASO пропуска экзоны и восстановления дистрофина было достигнуто на клеточных и животных моделях. Однако из-за обмена ASO, транскриптов и белков требуется повторное лечение. Клиническая разработка ведется для ASO, нацеленных на экзоны, где пропуск применяется к самым большим группам, то есть экзон 51 (14%), экзон 45 (8%), экзон 53 (8%) и экзон 44 (6%)⁸.

ASO-опосредованный пропуск экзона предполагает еженедельное системное введение ASO мальчикам с МДД, которые имеют корректируемые делеции с нарушением рамки считывания. Цель — манипулировать пре-мРНК, удаляя один экзон, примыкающий к делеции, для восстановления рамки. Три ASO, которые предназначены для пропуска экзона 51 (этеплирсен)^{162, 163} или экзона 53 (голодирсен¹⁶⁴ и вилтоларсен¹⁶⁵) продемонстрировали некоторые доказательства индуцированного восстановления дистрофина на небольших группах пациентов и получили условное одобрение FDA (этеплирсен, голодирсен и вилтоларсен) и Министерства здравоохранения, благосостояния и труда Японии (вилтоларсен). Подтверждающие исследования для оценки клинической пользы пропуска экзонов 51 и 53 продолжаются (NCT03218995, NCT03532542, NCT03985878, NCT03992430, NCT04060199, NCT04179409 и NCT0437112), а также для пропуска экзона 45 (NCT03532542 и NCT04179409).

Качество жизни

МДД — это прогрессирующее, инвалидизирующее и ограничивающее жизнь заболевание, которое влияет на жизнь пациентов и их семей. В некоторых исследованиях качества жизни (КЖ) пациентов с МДД сообщалось о снижении качества жизни, в то время как другие не обнаружили различий по сравнению со здоровыми людьми; эти различия связаны с инструментами, используемыми для оценки качества жизни, и тем фактом, что КЖ, связанное со здоровьем, и обычное КЖ используются взаимозаменяющими¹⁶⁶.

Обычно предполагается, что снижение физических возможностей и большая тяжесть заболевания являются основными факторами, определяющими ухудшение КЖ у людей с нервно-мышечным расстройством, и эта связь была подтверждена в некоторых исследованиях, которые выявили снижение КЖ, связанного со здоровьем, у пациентов с МДД по сравнению с опубликованными нормативными данными¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Однако КЖ — более широкая, многомерная концепция, относящаяся к удовлетворению индивидуальных потребностей, желаний и ожиданий, охватывающая не только функциональные способности и физическое здоровье. Эмоциональное благополучие, самооценка здоровья,

социальная жизнь, поддержка семьи, предполагаемый контроль, возможности для отдыха и сексуальные отношения имеют самую сильную корреляцию с удовлетворенностью жизнью¹⁷⁰. Кроме того, некоторые исследования показали, что ухудшение состояния здоровья и инвалидность существенно не влияют на удовлетворенность жизнью и КЖ^{170, 171}. Действительно, некоторые исследования показали, что взрослые с МДД, длительное время находившиеся на ИВЛ, сообщают об умеренном влиянии состояния на КЖ^{171, 172}. Несмотря на негативное влияние мышечной слабости, потери функции, боли и усталости, удовлетворенность уходом и лечением, социальным взаимодействием и поддержкой, скорректированными ожиданиями и принятием может помочь смягчить негативные эффекты МДД на КЖ^{173, 174}. Действительно, пациенты с МДД адаптируются к своим физическим недостаткам и вырабатывают новые цели, ценности и ожидания¹⁷⁵.

Хотя дети и молодые люди с МДД оценивают свою жизнь как удовлетворительную, родители и опекуны склонны недооценивать качество жизни пациента с МДД, используя свои собственные меры ценности^{176, 177}. Этот вывод вызывает опасения по поводу эффекта субъективной оценки качества жизни медиками, которая может помешать процессу принятия решений по жизнеобеспечивающим вмешательствам в дополнение к принятию решений по уходу и ведению пациентов в острых ситуациях. Эта озабоченность была подчеркнута недавно в связи с пандемией COVID-19, когда сортировка пациентов в странах, испытывающих серьезную нагрузку на систему здравоохранения, ставит пациентов с нейромышечными нарушениями на поздних стадиях заболевания в невыгодное положение с точки зрения доступа к отделениям интенсивной терапии в медицинских учреждениях¹⁷⁸. Это подчеркивает необходимость регулярной оценки предполагаемого КЖ и заблаговременного планирования ухода.

Диагностика МДД у детей сильно влияет на жизнь их родителей. Родители детей с МДД часто сообщают о чувствах изоляции, депрессии, стресса, тревоги, гнева и истощения^{179–181}. Дополнительно, практические проблемы, финансовые трудности, физическое истощение и недосыпание усугубляют горе и беспокойство о ребенке и могут создать дополнительное напряжение в их супружеских отношениях. Кроме того, матери-носители могут испытывать чувство вины за передачу заболевания своему ребенку¹⁸².

Принятие эффективные навыки того, как можно справляться с ситуацией, являются наиболее важными факторами, определяющими КЖ¹⁷⁵. Улучшение доступа к внешним ресурсам, таким как группы поддержки пациентов или лиц, осуществляющих уход, и к мультидисциплинарной команде по уходу с комплексным подходом ко всем аспектам состояния больного, а также участие в социальных и развлекательных мероприятиях — все это может поддержать человека и его семью в разработке необходимых механизмов того, как справляться с ситуацией.

Перспективы

Многие терапевтические подходы к лечению МДД находятся в стадии разработки и могут быть разделены на подходы, направленные на восстановление дистрофина, и подходы, нацеленные на последствия потери дистрофина, чтобы сохранить мышечную ткань как можно дольше. Терапевтические подходы для МДД не восстанавливают мышечную ткань и утраченную функцию; поэтому важно начать лечить пациентов как можно раньше. Более того, эффективность терапии, восстанавливающей дистрофин, будет зависеть от качества мышц, поскольку только мышца будет экспрессировать дистрофин (нацеливание на транскрипт) или получать пользу от экспрессии дистрофина (редактирование генома и доставка генов). Вероятно, что в будущем будет использоваться комбинация подходов для восстановления дистрофина и поддержания качества мышц, а также для максимального замедления прогрессирования заболевания.

Трансплантиация стволовых клеток

Из всех стратегий восстановления дистрофина трансплантация стволовых клеток имеет самую долгую историю. Обоснование перспективности трансплантиации стволовых клеток при МДД является привлекательным, поскольку трансплантированные клетки будут содействовать функциональной копии гена *DMD* и будет способствовать восстановлению мышц после трансплантации. Однако на практике обилие мышц (>30% массы тела) и количество отдельных скелетных мышц (>700) создают серьезные проблемы для разработки эффективного подхода к терапии стволовыми клетками.

Трансплантиация стволовых клеток может быть либо аллогенной (что требует иммуносупрессии у реципиента), либо ре-трансплантацией откорректированных клеток самого пациента. Кроме того, для трансплантиации можно использовать несколько типов стволовых клеток, включая сателлитные клетки (миообласти), клетки костного мозга, перициты и мезенхимальные стволовые клетки. Клетки-сателлиты (миообласти) — это мышечные стволовые клетки, которые находятся в состоянии покоя и находятся под базальной пластинкой (слоем соединительной ткани, окружающим каждое мышечное волокно). Эти клетки активируются при повреждении мышц для пролиферации, самообновления и восстановления. Клетки костного мозга, перициты и мезенхимальные стволовые клетки обладают способностью проникать в мышцы и вносить свой вклад в миогенез, а также могут использоваться для трансплантации. Следует отметить, что все эти типы клеток имеют лишь ограниченную способность к размножению *in vitro*. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцированные в миогенные линии, предлагают другой вариант, который не сталкивается с этой проблемой; однако при таком подходе есть риск неограниченного роста и образования тератомы.

Для каждого типа используемых клеток нет оптимального способа доставки, поскольку миообласти не выходят из кровеносных

сосудов после доставки, и, хотя другие стволовые клетки могут проникать в мышцу, на самом деле это происходит только у очень небольшого процента трансплантированных стволовых клеток. Систематические исследования не привели к значимому восстановлению дистрофина. Некоторые испытания с использованием местных инъекций миообластов высокой плотности показали некоторое восстановление дистрофина вокруг мест инъекций^{183, 184}; однако этот подход применим только к небольшим поверхностным мышцам.

В качестве альтернативного подхода трансплантация стволовых клеток также используется для улучшения качества мышц. Логика состоит в том, что трансплантированные клетки продуцируют факторы, которые положительно влияют на восстановление скелетных мышц и патологию сердца. Этот эффект временный, так как пересаженные клетки погибнут. В испытании с использованием клеток, полученных из кардиосфер, лечение повторяют каждые 3 месяца. Предварительные результаты клинических испытаний фазы I/II показали, что лечение хорошо переносится и свидетельствует о его положительном влиянии на функцию верхних конечностей и сердца¹⁸⁵.

Генная терапия

Генная терапия МДД направлена на восстановление недостающего дистрофина путем предоставления функциональной копии гена *DMD* или ремонтируя ген *DMD*. Генная аддитивная терапия использует вирусные векторы для доставки кДНК-копии функционального гена *DMD* в пораженные ткани. Хотя большинство вирусов не обладают естественным тропизмом к скелетным мышцам и сердцу, адеоассоциированные вирусы (AAV) являются исключением и могут очень эффективно инфицировать эти ткани. Однако AAV имеет ограниченную вместимость, составляющую ~4,7 килобайт, тогда как мышечная изоформа дистрофина Dp427 кодируется кДНК размером ~11,4 килобайт. Так как дистрофии с внутренними делециями могут быть частично функциональными (как показано у пациентов с МДД), созданы конструкции «мини-дистрофин» и «микродистрофин». Конструкции микродистрофина лишены всех, кроме наиболее важных доменов (N-концевой ABD, 4–5 спектрино-подобных повторов, 2–3 шарнирных участка и CR домен). кДНК этих микродистрофинов подходит для векторов AAV, и экспрессия этих микродистрофиновых конструкций улучшает патологию в моделях МДД у мышей и собак¹⁸⁶.

Клинические испытания по оценке системной доставки различных версий кДНК микродистрофина с использованием различных серотипов векторов AAV в высоких дозах (1–3x10¹⁴ векторов/кг) продолжаются¹⁸⁶. Предварительные результаты этих исследований подтверждают экспрессию микродистрофина в большинстве мышечных волокон (>80%) при биопсии мышц на уровне более 60%^{120, 187}, хотя пока не ясно, улучшит ли лечение прогрессирование заболевания. У части

пациентов наблюдалась тяжелые побочные эффекты, включая преходящую почечную недостаточность (вероятно, из-за врожденного иммунного ответа) и временное повышение ферментов печени (вероятно, из-за клеточного иммунного ответа на вектор)^{185, 187}. Примечательно, что все пролеченные пациенты, включенные в эти исследования, прошли предварительный скрининг, чтобы исключить предшествующий гуморальный иммунный ответ на применяемый вирусный кapsид, и все пациенты предварительно увеличены дозы стероидов для подавления иммунного ответа на вирус. Кроме того, введение AAV индуцирует образование нейтрализующих антител против кapsида AAV, что исключает возможность повторного лечения. Кроме того, у некоторых пациентов имеются предшествующие нейтрализующие антитела к AAV, что исключает получение ими этого лечения. Изучаются стратегии противодействия этому ответу антител, такие как плазмаферез, альтернативный серотип AAV и иммуномодулирующие препараты.

Хотя предварительные результаты обнадеживают, AAV редко интегрируются в геном хозяина, и возможно, что с обновлением мышц трансген микродистрофина со временем исчезнет. Когда это произойдет и сколько времени это займет, остается неизвестным. Кроме того, нет данных о том, насколько функциональны микродистрофии и их соответствующие терапевтические эффекты у людей.

С развитием систем редактирования генома, таких как CRISPR / Cas9, стало возможным вносить целевые модификации в геном. CRISPR/Cas9 использует направляющие РНК, которые гибридизуются с конкретными комплементарными областями ДНК и направляют фермент Cas9, чтобы вызвать двухцепочечный разрыв в целевых местах¹⁸⁸. Эти разрывы затем восстанавливаются системами reparации ДНК. В делящихся клетках безошибочная reparация может происходить путем гомологичной рекомбинации, что дает возможность исправлять мутации. Напротив, в неделящихся клетках используется подверженная ошибкам негомологичная система соединения концов ДНК. Поскольку наиболее пораженные ткани при МДД являются постmitотическими, в терапии редактирования генома при МДД основное внимание уделялось использованию негомологичного соединения концов ДНК. Вдохновленные подходом с пропуском экзонов, направляющие РНК сконструированы таким образом, что они восстанавливают рамку считывания. Это может быть достигнуто несколькими способами, например, путем удаления экзона, отмени сайта сплайсинга, так что экзон не включается в матричную РНК или рефрейминга экзона (Рис. 5).

Доказательство верности этой концепции было получено, подтверждая, что редактирование генома может восстановить производство дистрофина в моделях клеток МДД и животных^{189, 190}. Некоторые исследования дополнительно продемонстрировали эффективное редактирование мышечных стволовых

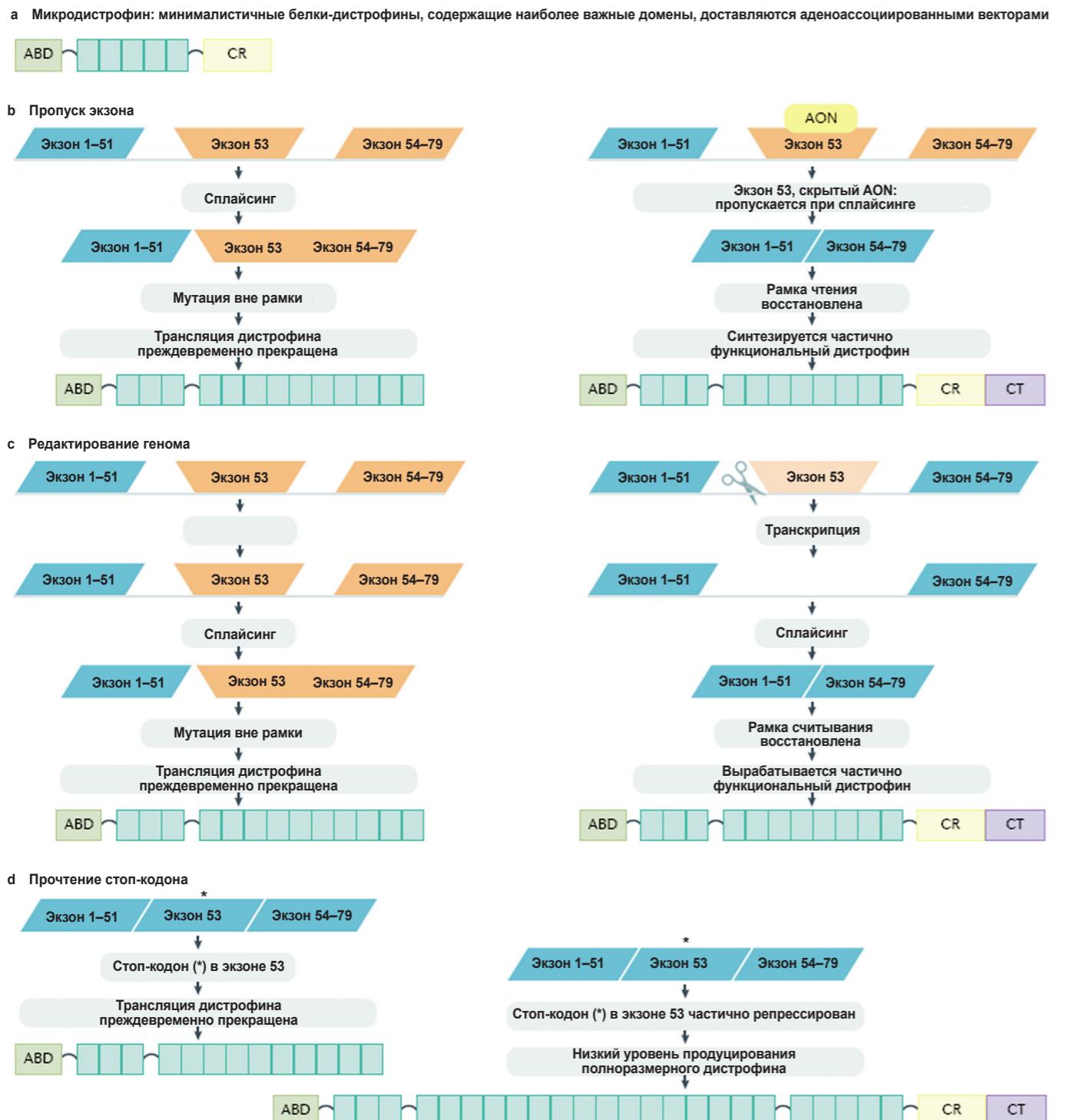
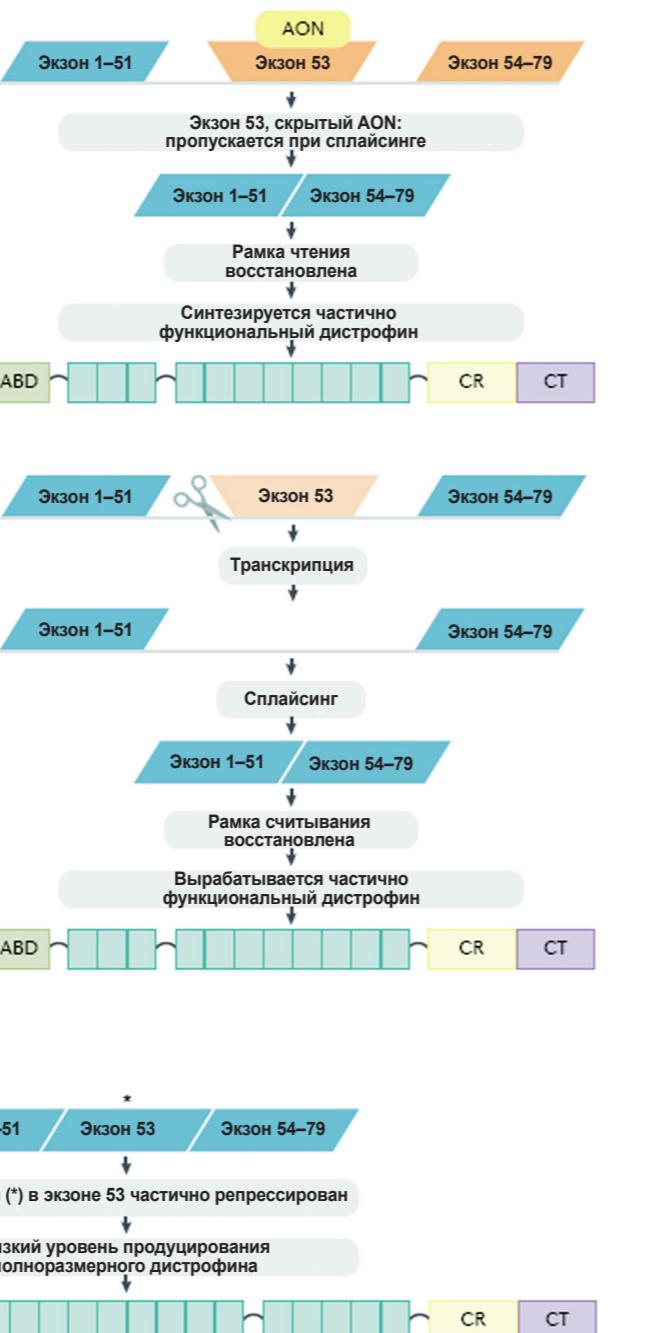


Рис. 5 | Дистрофин-восстанавливающие подходы. **a |** Генная терапия микродистрофином. Чтобы приспособиться к ограниченной емкости аденоассоциированных вирусных векторов, были созданы конструкции кДНК, кодирующие только самые важные части дистрофина, чтобы обеспечить экспрессию микродистрофинов. **б |** Пропуск экзона. Антисмыловые олигонуклеотиды (AON) используются для нацеливания на конкретный экзон во время спlicesинга пре-мРНК. AON скрывает целевой экзон от процесса спlicesинга, вызывая его пропуск, таким образом восстанавливая рамку считывания, позволяя продуцировать вариант дистрофина, по-добрый Беккеру. **в |** Редактирование генома. Направляющие РНК используются для направления Cas9 к целевым областям в ДНК для удаления экзона из гена, тем самым восстанавливая рамку считывания мРНК, продуцируемой этим геном, что позволяет синтезировать вариант дистрофина, подобный Беккеру. **д |** Прочтение стоп-кодона. Для пациентов с нонсенс мутациями (обозначенные звездочкой) соединения могут подавлять использование преждевременного стоп-кодона, обеспечивая вместо этого включение аминокислоты. Таким образом, может быть получен полноразмерный дистрофин. ABD, актин-связывающий домен; CR, богатый цистеином домен; СТ, С-концевой домен.

вых клеток на мышиной модели^{191, 192}. Редактирование генома — это подход, специфичный для определенных мутаций, потому что для разных мутаций необходимо удалять разные

экзоны. Предпринимаются попытки сделать этот подход менее специфичным для мутаций, например, путем удаления экзонов 45–55¹⁹³ или экзонов 47–58¹⁹⁴.



Однако вся работа по редактированию генома все еще находится на доклинической стадии, и для системного применения этого подхода у людей необходимо преодолеть множество проблем, включая оптимальную доставку компонентов, редактирующих геном, риск нецелевого редактирования и риск иммунного ответа на Cas9¹⁹⁵. В качестве альтернативы клетки, полученные от пациента, можно редактировать *ex vivo*, а затем трансплантировать обратно. Однако этот путь не является оптимальным из-за неспособности эффективно доставлять клетки в мышцы.

Вместо того, чтобы доставлять функциональную копию гена (микро)-дистрофина, также предпринимаются усилия по доставке кДНК генов, кодирующих белки, которые могут увеличить мышечную массу (например, фоллистатин¹⁹⁶) или нацелены на механизмы заболевания (такие как SERCA2a)⁸⁸. Преимущество этого подхода в том, что он применим ко всем мышечным расстройствам. Однако это, вероятно, будет иметь ограниченное влияние на прогрессирование заболевания, поскольку основная причина заболевания не будет устранена.

Пропуск экзона

Как упоминалось ранее, три ASO теперь одобрены для лечения МДД, хотя одобрение было основано более на низких уровнях восстановления дистрофина, а не на подтверждении функциональных эффектов. Дрисперсен, другой ASO, для пропуска экзона 51, с модификацией 2'-О-метилфосфоротиатом, оценивался в плацебо-контролируемых исследованиях; однако FDA не одобрила этот препарат из-за отсутствия убедительных доказательств функциональной эффективности, а также из-за возникновения реакций в месте инъекции, протеинурии и, у некоторых пациентов, тромбоцитопении¹⁹⁷.

ASO являются специфичными для определенных мутаций, и разные белки-дистрофиины будут образовываться после пропуска разных экзонов при разных мутациях. Фактически, пропуск одного и того же экзона может привести к образованию разных дистрофинов; например, делеция экзонов 47–50, 48–50, 49–50 и 52 может быть восстановлена путем пропуска экзона 51. Однако дистрофиины, продуцируемые после пропуска экзона 51, будут различаться. Точно так же делеция экзона 52 может быть восстановлена пропуском экзона 51 или экзона 53, что приводит к получению двух разных дистрофинов. Хотя дистрофиины с сохранением рамки частично функциональны, если у них есть ABD и CR-богатый домен, их функциональность зависит от связей между спектриноподобными повторами¹⁹⁸; связь между спектриноподобными повторами может быть близкой к нормальной, нормальной или непрочной, а некоторые непрочные связи препятствуют связыванию таких белков, как nNOS^{199, 200}.

Изучаются методы повышения эффективности ASO и его проникновения в скелетные мышцы и сердце, такие как различ-

ные химические модификации, конъюгаты с пептидом, богатым аргинином, или конъюгаты, обеспечивающие попадание в мышцы. Параллельно изучается возможность пропуска мультиэкзонов для лечения больших групп пациентов. Здесь основное внимание уделяется пропуску экзонов 45–55, поскольку пациенты с МДД и делецией экзонов 45–55 обычно имеют очень мягкий фенотип²⁰. Кроме того, изучается доставка антисмыловых генов с использованием векторов AAV. В этих исследованиях ген U7 (snRNP) малого ядерного рибонуклеопротеина модифицирован таким образом, что последовательность РНК, которая обычно связывается с гистонами РНК, связывается с экзонами-мишениями. Этот подход представляет собой комбинацию генной терапии и пропуска экзонов и показал многообещающие результаты на моделях животных²⁰¹. Клинические испытания по оценке пропуска экзона 2 продолжаются у пациентов с МДД с дупликациями экзона 2 на основе многообещающих доклинических результатах²⁰².

Прочтение бессмысленных мутаций

В дополнение к аталурену, одобренному ЕМА, гентамицин обладает способностью считывать стоп-кодоны, он был исследован как средство лечения МДД²⁰³. Однако из-за его профиля безопасности длительное лечение не является подходящим вариантом. Были проверены различные другие химические соединения, чтобы определить препарат с лучшим профилем безопасности.

Индукция синтеза утрофина

Утрофин — белок, синтезируемый повсеместно в организме, особенно в нервно-мышечных соединениях, имеет высокий уровень гомологии с дистрофином и может действовать большинство белков DAPC комплекса. В эмбриональных мышцах, утрофин экспрессируется в тех же областях мышечных волокон, что и дистрофин, но его выработка в мышцах подавляется, когда начинается экспрессия дистрофина. Утрофин часто активируется у пациентов с МДД и на моделях животных, у которых отсутствует дистрофин, а дальнейшая активация утрофина на моделях мышей улучшает течение МДД^{204, 205}. Методом высокопроизводительного скрининга идентифицирован эзутромид как потенциальное соединение, повышающее экспрессию утрофина в мышцах; однако это соединение показало очень ограниченную биодоступность, и терапевтический эффект не наблюдался в плацебо-контролируемом исследовании у пациентов с МДД²⁰⁶. На основании этих данных клиническая разработка эзутромида прекращена. Однако было обнаружено, что эзутромид повышает регуляцию утрофина, действуя как антагонист рецептора арилуглеводорода, оказалось, что и другие антагонисты рецептора арилуглеводорода также повышают регуляцию утрофина²⁰⁷; соответственно и другие соединения могут быть способны активировать утрофин.

Подходы для сохранения мыши

Терапевтические подходы, направленные на вторичные последствия потери дистрофина, при МДД находятся в стадии разработки. Например, поскольку хроническое использование глюкокортикоидов сопровождается множеством побочных эффектов, изучаются альтернативные стероиды, которые имеют лучший профиль безопасности, такие как варморолон^{208, 209}. Он, по-видимому, хорошо переносится пациентами, и побочные эффекты наблюдаются при дозах, превышающих те, что используются для преднизона и дефлазакорта²¹⁰. Варморолон сейчас проходит плацебо-контролируемые испытания. Эдасалонексент (ингибитор NF-кБ и, следовательно, мощный ингибитор воспаления) также находится в стадии клинической разработки для лечения МДД. Однако, хотя этот препарат переносится хорошо²¹¹, в двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании его эффективность не подтвердилась и разработка этого препарата была остановлена.

Препараторы для улучшения мышечной массы также оценивались для лечения МДД. Одним из таких примеров является миостатин (фактор роста семейства TGF β , который ингибирует рост мышц); поскольку животные и люди, у которых отсутствует миостатин, чрезвычайно мускулистые^{212, 213}, ингибирование миостатина исследовалось как способ компенсации потери мышечной ткани у пациентов с МДД. Растворимые рецепторы миостатина (ActIIB) приводили к увеличению мышечной массы у здоровых добровольцев; однако длительное лечение пациентов с МДД было невозможно из-за побочных эффектов, включая спонтанное кровотечение²¹⁴, что, вероятно,

было связано с перекрестом с сигнальными путями активина. Более специфичный подход включал антитела к миостатину; однако результаты двух крупных плацебо-контролируемых исследований с двумя разными антителами к миостатину²¹⁵ не продемонстрировали терапевтического эффекта. Оглядываясь назад, это открытие не является неожиданным, поскольку уровни миостатина очень низки у пациентов с МДД, поэтому дальнейшее ингибирование может оказаться невозможным.

Также изучались подходы к улучшению функции митохондрий при МДД. Ожидается, что эти соединения смогут снизить уровень окислительного стресса и фиброза. Одно соединение, направленное на митохондриальную функцию, идебенон, продемонстрировало замедление ухудшения респираторной функции у пациентов с МДД, не принимающих кортикоиды, в плацебо-контролируемом исследовании²¹⁶; однако исследования пациентов принимавших кортикоиды, были преждевременно прекращены, поскольку промежуточные результаты не продемонстрировали терапевтических эффектов (NCT02814019 и NCT03603288). Кроме того, исследовали ингибирование гистондеацетилазы как метод улучшения регенерации и уменьшения воспаления у пациентов с МДД. В небольшом открытом исследовании протестирован гивиностат, лечение уменьшало фиброз у всех пациентов (на основании биопсии мышц, взятых до и после клинического исследования)²¹⁷. В настоящее время проводится плацебо-контролируемое исследование фазы III для оценки функциональных эффектов лечения гивиностатом у пациентов с МДД (NCT02851797).

Published online: 18 February 2021

1. Mercuri, E., Bonnemann, C. G. & Muntoni, F. Muscular dystrophies. *Lancet* **394**, 2025–2038 (2019).
2. Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J. C. T., Fokkema, I. F., Van Ommen, G. J. B. & Den Dunnen, J. T. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* **34**, 135–144 (2006).
3. Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H. & Kunkel, L. M. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the *DMD* locus. *Genomics* **2**, 90–95 (1988).
4. García-Rodríguez, R. et al. Premature termination codons in the *DMD* gene cause reduced local mRNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 16456–16464 (2020).
5. Mendell, J. R. et al. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **71**, 304–313 (2012).
6. Ryder, S. et al. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J. Rare Dis.* **12**, 79 (2017).
7. Mah, J. K. et al. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 482–491 (2014).
8. Bladen, C. L. et al. The TREAT-NMD *DMD* global database: analysis of more than 7000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* **36**, 395–402 (2015).
9. Kieny, P. et al. Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **56**, 443–454 (2013).
10. Ferrier, P., Bamatter, F. & Klein, D. Muscular dystrophy (Duchenne) in a girl with Turner's syndrome. *J. Med. Genet.* **2**, 38–46 (1965).
11. Chelly, J. et al. De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* **74**, 193–196 (1986).
12. Satre, V., Monnier, N., Devillard, F., Amblard, F. & Lunardi, J. Prenatal diagnosis of *DMD* in a female foetus affected by Turner syndrome. *Prenat. Diagn.* **24**, 913–917 (2004).
13. Takeshita, E. et al. Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions. *Neuromuscul. Disord.* **27**, 569–573 (2017).
14. Ishizaki, M., Kobayashi, M., Adachi, K., Matsunaga, T. & Kimura, E. Female dystrophinopathy: review of current literature. *Neuromuscul. Disord.* **28**, 572–581 (2018).
15. Holloway, S. M. et al. Life expectancy and death from cardiomyopathy amongst carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Scotland. *Heart* **94**, 633–636 (2008).
16. Bladen, C. L. et al. The TREAT-NMD *DMD* global database: analysis of more than 7000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* **36**, 395–402 (2015).
17. Magri, F. et al. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J. Neurol.* **258**, 1610–1623 (2011).
18. Garcia, S. et al. Identification of de novo mutations of Duchenne/Becker muscular dystrophies in southern Spain. *Int. J. Med. Sci.* **11**, 988–993 (2014).
19. Kesari, A. et al. Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Hum. Mutat.* **29**, 728–737 (2008).
20. Nakamura, A. et al. Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J. Hum. Genet.* **62**, 459–463 (2017).
21. Nakamura, A. et al. Deletion of exons 3–9 encompassing a mutational hot spot in the *DMD* gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multixon skipping therapy. *J. Hum. Genet.* **61**, 663–667 (2016).
22. Nevin, N. C., Hughes, A. E., Calwell, M. & Lim, J. H. Duchenne muscular dystrophy in a female with a translocation involving Xp21. *J. Med. Genet.* **23**, 171–173 (1986).
23. Chen, W. J. et al. Molecular analysis of the dystrophin gene in 407 Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy by the combination of multiplex ligation-dependent probe amplification and Sanger sequencing. *Clin. Chim. Acta* **423**, 35–38 (2013).
24. Yu, H., Chen, Y. C., Liu, G. L. & Wu, Z. Y. A de novo mutation in dystrophin causing muscular dystrophy in a female patient. *Chin. Med. J.* **130**, 2273–2278 (2017).
25. Caskey, C. T., Nussbaum, R. L., Cohan, L. C. & Pollack, L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin. Genet.* **18**, 329–341 (1980).
26. Haldane, J. B. The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935. *J. Genet.* **83**, 235–244 (2004).
27. Helderman-van den Enden, A. T. et al. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin. Genet.* **75**, 465–472 (2009).
28. Dreyfus, J. C., Schapira, G. & Schapira, F. Serum enzymes in the physiopathology of muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 235–249 (1958).
29. Moser, H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.* **66**, 17–40 (1984).
30. Koenig, M. et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (*DMD*) cDNA and preliminary genomic organization of the *DMD* gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509–517 (1987).
31. Hoffman, E. P., Brown, R. H. Jr. & Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919–928 (1987).
32. Chelly, J. et al. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* **344**, 64–65 (1990).
33. Górecki, D. C. et al. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 505–510 (1992).
34. Doorenweerd, N. et al. Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.* **7**, 12575 (2017).
35. D'Souza, V. N. et al. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 837–842 (1995).
36. Lidov, H. G., Selig, S. & Kunkel, L. M. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 329–335 (1995).
37. Byers, T. J., Lidov, H. G. & Kunkel, L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* **4**, 77–81 (1993).
38. Hugnot, J. P. et al. Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7506–7510 (1992).
39. Tinsley, J. M., Blake, D. J. & Davies, K. E. Apo-dystrophin-3: a 2.2 kb transcript from the *DMD* locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 521–524 (1993).
40. Gao, Q. Q. & McNally, E. M. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Compr. Physiol.* **5**, 1223–1239 (2015).
41. Ervasti, J. M. & Sonnemann, K. J. Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. *Int. Rev. Cytol.* **265**, 191–225 (2008).
42. Zhao, J. et al. Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 3647–3653 (2016).
43. Amann, K. J., Renley, B. A. & Ervasti, J. M. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J. Biol. Chem.* **273**, 28419–28423 (1998).
44. Prins, K. W. et al. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J. Cell Biol.* **186**, 363–369 (2009).
45. Nelson, D. M. et al. Rapid, redox-mediated mechanical susceptibility of the cortical microtubule lattice in skeletal muscle. *Redox Biol.* **37**, 101730 (2020).
46. Stone, M. R., O'Neill, A., Catino, D. & Bloch, R. J. Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4280–4293 (2005).
47. Bhoste, R. C., Michele, D. E., Campbell, K. P., Li, Z. & Robson, R. M. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 768–777 (2006).
48. Huang, X. et al. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 634–638 (2000).
49. Ayalon, G., Davis, J. Q., Scotland, P. B. & Bennett, V. An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* **135**, 1189–1200 (2008).
50. Reznicek, G. A. et al. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (*mdx*) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan. *J. Cell Biol.* **176**, 965–977 (2007).
51. Yamashita, K. et al. The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 812–817 (2010).
52. Lai, Y. et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **119**, 624–635 (2009).
53. Anderson, J. T., Rogers, R. P. & Jarrett, H. W. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J. Biol. Chem.* **271**, 6605–6610 (1996).
54. Reynolds, J. G., McCalmon, S. A., Donaghue, J. A. & Nayak, F. J. Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* **283**, 8070–8074 (2008).
55. Constantin, B. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 635–642 (2014).
56. Allen, D. G., Whitehead, N. P. & Froehner, S. C. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca²⁺, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiol. Rev.* **96**, 253–305 (2016).
57. Lai, Y., Zhao, J., Yue, Y. & Duan, D. α2 and α3 helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the α1 helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 525–530 (2013).
58. Chang, N. C. et al. The dystrophin glycoprotein complex regulates the epigenetic activation of muscle stem cell commitment. *Cell Stem Cell* **22**, 755–768. e6 (2018).
59. Lumeng, C. et al. Interactions between β2-synemin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat. Neurosci.* **2**, 611–617 (1999).
60. Sarparanta, J. Biology of myospryn: what's known? *J. Muscle Res. Cell Motil.* **29**, 177–180 (2008).
61. Sugita, S. et al. A stoichiometric complex of neuromodulins and dystroglycan in brain. *J. Cell Biol.* **154**, 435–445 (2001).
62. Mokri, B. & Engel, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* **25**, 1111–1120 (1975).
63. Aartsma-Rus, A. & van Putten, M. Assessing functional performance in the *mdx* mouse model. *J. Vis. Exp.* **85**, 51303 (2014).
64. Stedman, H. H. et al. The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536–539 (1991).
65. Duan, D. Systemic AAV micro-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **26**, 2337–2356 (2018).

Comprehensive overview of microdystrophin gene therapy development, its opportunities and challenges.

66. Bradley, W. G., Hudgson, P., Larson, P. F., Papapetropoulos, T. A. & Jenkinson, M. Structural changes in the early stages of Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **35**, 451–455 (1972).
67. Pearson, C. M. Histopathological features of muscle in the preclinical stages of muscular dystrophy. *Brain* **85**, 109–120 (1962).
68. Brennan, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K. & Bredt, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743–752 (1995).
69. Sander, M. et al. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13818–13823 (2000).
70. Patel, A. et al. Dystrophin R16/17-syntrophin PDZ fusion protein restores sarcolemmal nNOSmu. *Skelet. Muscle* **8**, 36 (2018).
71. Kodipalli, K. et al. Dual AAV gene therapy for Duchenne muscular dystrophy with a 7-kb mini-dystrophin gene in the canine model. *Hum. Gene Ther.* **29**, 299–311 (2018).
72. Prosser, B. L., Ward, C. W. & Lederer, W. J. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* **333**, 1440–1445 (2011).
73. Khairallah, R. J. et al. Microtubules underlie dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Signal.* **5**, ra56 (2012).
74. Li, D., Yue, Y., Lai, Y., Hakim, C. H. & Duan, D. Nitrosative stress elicited by nNOSmu delocalization inhibits muscle force in dystrophin-null mice. *J. Pathol.* **223**, 88–98 (2011).
75. Kim, J. H., Kwak, H. B., Thompson, L. V. & Lawler, J. M. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **34**, 1–13 (2013).
76. Grounds, M. D. et al. Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Dis. Models Mech.* **13**, dmm.043638 (2020).
77. Rando, T. A. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc. Res. Tech.* **55**, 223–235 (2001).
78. Dudley, R. W. et al. Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (*mdx*) muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R704–710 (2006).
79. Petrilillo, S. et al. Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 2781–2790 (2017).
80. Turner, P. R., Westwood, T., Regen, C. M. & Steinhardt, R. A. Increased protein degradation

- results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. *Nature* **335**, 735–738 (1988).
81. Millay, D. P. et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat. Med.* **14**, 442–447 (2008).
82. Phillips, M. F. & Quinlivan, R. Calcium antagonists for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, CD004571 (2008).
83. Kyrychenko, S. et al. Hierarchical accumulation of RyR post-translational modifications drives disease progression in dystrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* **97**, 666–675 (2013).
84. Bellinger, A. M. et al. Hypertonitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* **15**, 325–330 (2009).
85. Kushnir, A., Wajsberg, B. & Marks, A. R. Ryanodine receptor dysfunction in human disorders. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1865**, 1687–1697 (2018).
86. Capogrosso, R. F. et al. Ryanodine channel complex stabilizer compound S48168/ARM210 as a disease modifier in dystrophin-deficient *mdx* mice: proof-of-concept study and independent validation of efficacy. *FASEB J.* **32**, 1025–1043 (2018).
87. Voit, A. et al. Reducing sarcoplasmic reticulum expression mitigates Duchenne muscular dystrophy and associated cardiomyopathy in mice. *Nat. Commun.* **8**, 1068 (2017).
88. Wasala, N. B. et al. Single SERCA2a therapy ameliorated dilated cardiomyopathy for 18 months in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **28**, 845–854 (2020).
89. Dumont, N. A. et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.* **21**, 1455–1463 (2015).
90. Bello, L. & Pegoraro, E. The “usual suspects”: genes for inflammation, fibrosis, regeneration, and muscle strength modify Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Med.* **8**, 649 (2019).
91. Cappellari, O., Mantuano, P. & De Luca, A. “The Social Network” and muscular dystrophies: the lesson learnt about the niche environment as a target for therapeutic strategies. *Cells* **9**, 1659 (2020).
92. Grounds, M. D. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1621–1625 (2008).
93. Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P. & Bonaldo, P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J. Cell Sci.* **126**, 5325–5333 (2013).
94. De Palma, C. et al. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis.* **3**, e418 (2012).
95. Pal, R. et al. Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **5**, 4425 (2014).
96. Xiong, Y., Zhou, Y. & Jarrett, H. W. Dystrophin-glycoprotein complex-associated Gbetagamma subunits activate phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling in skeletal muscle in a laminin-dependent manner. *J. Cell. Physiol.* **219**, 402–414 (2009).
97. De Palma, C., Perrotta, C., Pellegrino, P., Clementi, E. & Cervia, D. Skeletal muscle homeostasis in Duchenne muscular dystrophy: modulating autophagy as a promising therapeutic strategy. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 188 (2014).
98. Evans, N. P., Misyk, S. A., Robertson, J. L., Bassaganya-Riera, J. & Grange, R. W. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of Duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R* **1**, 755–768 (2009).
99. Tidball, J. G., Welc, S. S. & Wehling-Henricks, M. Immunobiology of inherited muscular dystrophies. *Compr. Physiol.* **8**, 1313–1356 (2018).
100. Rosenberg, A. S. et al. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **7**, 299rv294 (2015).
101. Bello, L. et al. Functional changes in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials in dystrophinopathies. *Sci. Rep.* **6**, 32439 (2016).
102. Wasala, L. et al. Cardiac specific expression of ΔH2-R15 mini-dystrophin normalized all ECG abnormalities and the end-diastolic volume in a 23-m-old mouse model of Duchenne dilated cardiomyopathy. *Hum. Gene Ther.* **29**, 737–748 (2018).
103. Vo, A. H. & McNally, E. M. Modifier genes and their effect on Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* **28**, 528–534 (2015).
104. Ricotti, V. et al. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev. Med. Child Neurol.* **58**, 77–84 (2016).
105. Bello, L. et al. Association study of exon variants in the NF-κB and TGFβ pathways identifies CD40 as a modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 1163–1171 (2016).
106. Spitali, P. et al. TCTEX1D1 is a genetic modifier of disease progression in Duchenne muscular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **28**, 815–825 (2020).
107. Klietsch, R., Ervasti, J. M., Arnold, W., Campbell, K. P. & Jorgensen, A. O. Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. *Circ. Res.* **72**, 349–360 (1993).
108. Meng, H., Leddy, J. J., Frank, J., Holland, P. & Tuana, B. S. The association of cardiac dystrophin with myofibrils/Z-disc regions in cardiac muscle suggests a novel role in the contractile apparatus. *J. Biol. Chem.* **271**, 12364–12371 (1996).
109. Johnson, E. K. et al. Proteomic analysis reveals new cardiac-specific dystrophin-associated proteins. *PLoS ONE* **7**, e43515 (2012).
110. Thangaraj, M. et al. Relationships between DMD mutations and neurodevelopment in dystrophinopathy. *Neurology* **93**, e1597–e1604 (2019).
111. Doorenweerd, N. et al. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **76**, 403–411 (2014).
112. Pilgram, G. S., Potikond, S., Baines, R. A., Fradkin, L. G. & Noordermeer, J. N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol. Neurobiol.* **41**, 1–21 (2010).
113. Huard, J., Côté, P. Y., Parent, A., Bouchard, J. P. & Tremblay, J. P. Dystrophin-like immunoreactivity in monkey and human brain areas involved in learning and motor functions. *Neurosci. Lett.* **141**, 181–186 (1992).
114. Chieffo, D. et al. Early neurodevelopmental findings predict school age cognitive abilities in Duchenne muscular dystrophy: a longitudinal study. *PLoS ONE* **10**, e013214 (2015).
115. Cohen, E. J., Quarta, E., Fulgenzi, G. & Minicacci, D. Acetylcholine, GABA and neuronal networks: a working hypothesis for compensations in the dystrophic brain. *Brain Res. Bull.* **110**, 1–13 (2015).
116. Doorenweerd, N. Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy — a narrative review. *Neuromuscul. Disord.* **30**, 437–442 (2020).
117. Bimkrant, D. J. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* **17**, 251–267 (2018).
118. Aartsma-Rus, A. et al. Evidence-based consensus and systematic review on reducing the time to diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.* **204**, 305–313.e314 (2019).
119. Aartsma-Rus, A., Ginjala, I. B. & Bushby, K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* **53**, 145–151 (2016).
120. Verhaart, I. E. C. & Aartsma-Rus, A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 373–386 (2019).
121. Janssen, B., Hartmann, C., Scholz, V., Jauh, A. & Zschocke, J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics* **6**, 29–35 (2005).
122. Chamberlain, J. S. et al. Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multicenter study. *JAMA* **267**, 2609–2615 (1992).
123. Aartsma-Rus, A. et al. Report of a TREAT-NMD/World Duchenne organisation meeting on dystrophin quantification methodology. *J. Neuromuscul. Dis.* **6**, 147–159 (2019).
124. Scheuerbrandt, G. Screening for Duchenne muscular dystrophy in Germany, 1977–2011: a personal story. *Muscle Nerve* **57**, 185–188 (2018).
125. Moat, S. J. et al. Characterization of a blood spot creatine kinase skeletal muscle isoform immunoassay for high-throughput newborn screening of Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chem.* **63**, 908–914 (2017).
126. Gatheridge, M. A. et al. Identifying non-Duchenne muscular dystrophy-positive and false negative results in prior Duchenne muscular dystrophy newborn screening programs: a review. *JAMA Neurol.* **73**, 111–116 (2016).
127. Wood, M. F. et al. Parental attitudes toward newborn screening for Duchenne/Becker muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* **49**, 822–828 (2014).
128. Bianchi, D. W. & Chiu, R. W. K. Sequencing of circulating cell-free DNA during pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **379**, 464–473 (2018).
129. Brison, N. et al. Maternal copy-number variations in the DMD gene as secondary findings in noninvasive prenatal screening. *Genet. Med.* **21**, 2774–2780 (2019).
130. Tuffery-Giraud, S. et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* **30**, 934–945 (2009).
131. Eagle, M. et al. Managing Duchenne muscular dystrophy—the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord.* **17**, 470–475 (2007).
132. Moxley, R. T. 3rd, Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D. J. & Campbell, K. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J. Child Neurol.* **25**, 1116–1129 (2010).
133. Saito, T. et al. Study of Duchenne muscular dystrophy long-term survivors aged 40 years and older living in specialized institutions in Japan. *Ann. Neuromuscul. Disord.* **27**, 107–114 (2017).
134. Bimkrant, D. J. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* **17**, 347–361 (2018).
135. Bimkrant, D. J. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *Lancet Neurol.* **17**, 445–455 (2018).
136. Passamano, L. et al. Improvement of survival in Duchenne muscular dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol.* **31**, 9–15 (2012).
137. Finder, J. D. et al. Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 456–465 (2004).
138. Buddhe, S. et al. Cardiac management of the patient with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics* **142** (Suppl. 2), S72–S81 (2018).
139. McNally, E. M. et al. Contemporary cardiac issues in Duchenne muscular dystrophy. Working Group of the National Heart, Lung, and Blood Institute in collaboration with Parent Project Muscular Dystrophy. *Circulation* **131**, 1590–1598 (2015).
140. Duboc, D. et al. Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 855–857 (2005).
141. Duboc, D. et al. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years’ follow-up. *Am. Heart J.* **154**, 596–602 (2007).
142. Yilmaz, O., Karaduman, A. & Topaloğlu, H. Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur. J. Neurol.* **11**, 541–544 (2004).
143. Bertrand, L. A., Askeland, E. J., Mathews, K. D., Erickson, B. A. & Cooper, C. S. Prevalence and bother of patient-reported lower urinary tract symptoms in the muscular dystrophies. *J. Pediatr. Urol.* **12**, 398. e391–398.e4 (2016).
144. Haenggi, T., Schaub, M. C. & Fritschy, J. M. Molecular heterogeneity of the dystrophin-associated protein complex in the mouse kidney nephron: differential alterations in the absence of utrophin and dystrophin. *Cell Tissue Res.* **319**, 299–313 (2005).
145. Matsumura, T., Saito, T., Fujimura, H. & Sakoda, S. Renal dysfunction is a frequent complication in patients with advanced stage of Duchenne muscular dystrophy [Japanese]. *Rinsho Shinkeigaku* **52**, 211–217 (2012).
146. Banhani, R. et al. Cognitive and neurobehavioral profile in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Child Neurol.* **30**, 1472–1482 (2015).
147. Biggar, W. D. et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 476–482 (2004).
148. McDonald, C. M. et al. Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet* **391**, 451–461 (2018).
149. McDonald, C. M. et al. Deflazacort vs prednisone treatment for Duchenne muscular dystrophy: a meta-analysis of disease progression rates in recent multicenter clinical trials. *Muscle Nerve* **61**, 26–35 (2020).
150. Bylo, M., Farewell, R., Coppenrath, V. A. & Yogaratnam, D. A review of deflazacort for patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Pharmacother.* **54**, 788–794 (2020).
151. Ricotti, V. et al. Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 698–705 (2013).
152. Matthews, E., Brassington, R., Kuntzer, T., Jichi, F. & Manzur, A. Y. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **5**, CD003725 (2016).
153. Connolly, A. M. et al. Twice-weekly glucocorticosteroids in infants and young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **59**, 650–657 (2019).
154. Angelini, C. & Peterle, E. Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* **31**, 9–15 (2012).
155. Jaisser, F. & Farman, N. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **68**, 49–75 (2016).
156. Bushby, K. et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve* **50**, 477–487 (2014).
157. McDonald, C. M. et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **390**, 1489–1498 (2017).
158. Haas, M. et al. European medicines agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscul. Disord.* **25**, 5–13 (2015).
159. Mercuri, E. et al. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE registry and CINRG DMD Natural History Study. *J. Comp. Eff. Res.* **9**, 341–360 (2020).
160. Aartsma-Rus, A. & Goemans, N. A sequel to the eteplirsen saga: eteplirsen is approved in the United States but was not approved in Europe. *Nucleic Acid Ther.* **29**, 13–15 (2019).
161. Niks, E. H. & Aartsma-Rus, A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **17**, 225–236 (2017).
162. Alfano, L. N. et al. Long-term treatment with eteplirsen in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medicine* **98**, e15858 (2019).
163. Mendell, J. R. et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **79**, 257–271 (2016).
164. Frank, D. E. et al. Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **94**, e2270–e2282 (2020).
165. Roshni, R. & Yokota, T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs Today* **55**, 627–639 (2019).
166. Utley, L., Carlton, J., Woods, H. B. & Brazier, J. A review of quality of life themes in Duchenne muscular dystrophy for patients and carers. *Health Qual. Life Outcomes* **16**, 237 (2018).
167. Pangalila, R. F. et al. Prevalence of fatigue, pain, and affective disorders in adults with Duchenne muscular dystrophy and their associations with quality of life. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **96**, 1242–1247 (2015).
168. Schara, U., Geers, B., Schmid, J. & Elsenbruch, S. Health-related quality of life in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 652 (2011).
169. Elsenbruch, S., Schmid, J., Lutz, S., Geers, B. & Schara, U. Self-reported quality of life and depressive symptoms in children, adolescents, and adults with Duchenne muscular dystrophy: a cross-sectional survey study. *Neuropediatrics* **44**, 257–264 (2013).
170. Abresch, R. T., Seydel, N. K. & Wineinger, M. A. Quality of life. Issues for persons with neuromuscular diseases. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* **9**, 233–248 (1998).
171. Bach, J. R., Campagnolo, D. I. & Hoeman, S. Life satisfaction of individuals with Duchenne muscular dystrophy using long-term mechanical ventilatory support. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **70**, 129–135 (1991).
172. Crescimanno, G., Greco, F., D’Alia, R., Messina, L. & Marrone, O. Quality of life in long term ventilated adult patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **29**, 569–575 (2019).
173. Pangalila, R. Quality of life in Duchenne muscular dystrophy: the disability paradox. *Dev. Med. Child Neurol.* **58**, 435–436 (2016).
174. Albrecht, G. L. & Devlieger, P. J. The disability paradox: high quality of life against all odds. *Soc. Sci. Med.* **48**, 977–988 (1999).
175. Rose, M. R. et al. Role of disease severity, illness perceptions, and mood on quality of life in muscle disease. *Muscle Nerve* **46**, 351–359 (2012).
176. Zamani, G. et al. The quality of life in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 423–427 (2016).
177. Lim, Y., Velozo, C. & Bendixen, R. M. The level of agreement between child self-reports and parent proxy-reports of health-related quality of life in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Qual. Life Res.* **23**, 1945–1952 (2014).
178. Leclerc, T. et al. Prioritisation of ICU treatments for critically ill patients in a COVID-19 pandemic with scarce resources. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **39**, 33

188. Wang, D., Zhang, F. & Gao, G. CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and in vivo delivery by AAV vectors. *Cell* **181**, 136–150 (2020).
189. Chemello, F., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J. Clin. Invest.* **130**, 2766–2776 (2020).
190. Nelson, C. E., Robinson-Hamm, J. N. & Gersbach, C. A. Genome engineering: a new approach to gene therapy for neuromuscular disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 647–661 (2017).
191. Nance, M. E. et al. AAV9 edits muscle stem cells in normal and dystrophic adult mice. *Mol. Ther.* **27**, 1568–1585 (2019).
192. Kwon, J. B. et al. In vivo gene editing of muscle stem cells with adeno-associated viral vectors in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **19**, 320–329 (2020).
193. Ousterout, D. G. et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **6**, 6244 (2015).
194. Duchêne, B. L. et al. CRISPR-induced deletion with SaCas9 restores dystrophin expression in dystrophic models in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **26**, 2604–2616 (2018).
195. Wasala, N. B., Hakim, C. H., Yang, N. N. & Duan, D. Questions answered and unanswered by the first CRISPR editing study in the canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **30**, 535–543 (2019).
196. Mendell, J. R. et al. A phase I/IIa follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **23**, 192–201 (2015).
197. Goemans, N. et al. A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **28**, 4–15 (2018).
198. Iyombe-Engembe, J. P. et al. Efficient restoration of the dystrophin gene reading frame and protein structure in *DMD* myoblasts using the CinDel method. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **5**, e283 (2016).
199. Nicolas, A. et al. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the *DMD* gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 45 (2012).
200. Delalande, O. et al. Dystrophin's central domain forms a complex filament that becomes disorganized by in-frame deletions. *J. Biol. Chem.* **293**, 6637–6646 (2018).
201. Goyenvalle, A. et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**, 1796–1799 (2004).
202. Wein, N. et al. Translation from a *DMD* exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat. Med.* **20**, 992–1000 (2014).
203. Malik, V. et al. Gentamicin-induced read-through of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **67**, 771–780 (2010).
204. Hirst, R. C., McCullagh, K. J. & Davies, K. E. Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* **24**, 209–216 (2005).
205. Miura, P. & Jasmin, B. J. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol. Med.* **12**, 122–129 (2006).
206. Muntoni, F. et al. A phase 1b trial to assess the pharmacokinetics of ezutromid in pediatric Duchenne muscular dystrophy patients on a balanced diet. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **8**, 922–933 (2019).
207. Wilkinson, I. V. L. et al. Chemical proteomics and phenotypic profiling identifies the aryl hydrocarbon receptor as a molecular target of the utrophin modulator ezutromid. *Angew. Chem.* **59**, 2420–2428 (2020).
208. Heier, C. R. et al. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1569–1585 (2013).
209. Reeves, E. K. M., Hoffman, E. P., Nagaraju, K., Damsker, J. M. & McCall, J. M. VBP15: preclinical characterization of a novel anti-inflammatory delta 9,11 steroid. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2241–2249 (2013).
210. Hoffman, E. P. et al. Vamorolone trial in Duchenne muscular dystrophy shows dose-related improvement of muscle function. *Neurology* **93**, e1312–e1323 (2019).
211. Finanger, E. et al. Phase 1 study of edasaloxenent (CAT-1004), an oral NF-κB inhibitor, in pediatric patients with Duchenne muscular dystrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* **6**, 43–54 (2019).
212. Shelton, G. D. & Engvall, E. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. *Neuromuscul. Disord.* **17**, 721–722 (2007).
213. Aiello, D., Patel, K. & Lasagna, E. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Anim. Genet.* **49**, 505–519 (2018).
214. Campbell, C. et al. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve* **55**, 458–464 (2017).
215. Wagner, K. R. et al. Randomized phase 2 trial and open-label extension of domagrozumab in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **30**, 492–502 (2020).
216. Buyse, G. M. et al. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **385**, 1748–1757 (2015).
217. Bettica, P. et al. Histological effects of givinstat in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 643–649 (2016).
218. Petrof, B. J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **81** (Suppl. 11), S162–S174 (2002).
219. Clerk, A., Strong, P. N. & Sewry, C. A. Characterisation of dystrophin during development of human skeletal muscle. *Development* **114**, 395–402 (1992).
220. Mokhtarian, A., Lefaucheur, J. P., Even, P. C. & Sebille, A. Hindlimb immobilization applied to 21-day-old *mdx* mice prevents the occurrence of muscle degeneration. *J. Appl. Physiol.* **86**, 924–931 (1999).