

В. П. Сокольник

**К ВОПРОСУ О ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ  
ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ***Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»*

*Спинальная мышечная атрофия (СМА) – это нервно-мышечное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Причиной СМА являются мутационные повреждения SMN1-гена, приводящие к недостаточной экспрессии функционального SMN-белка полной длины. Несмотря на значительный прогресс в понимании функций SMN-белка, точные механизмы, время и место реализации его дефицита при различных формах СМА предстоит ещё выяснить. В данной работе мы представляем обзор данных о возможной роли стволовых/прогениторных клеток в патогенезе СМА.*

**Ключевые слова:** спинальная мышечная атрофия, SMN, невральные стволовые клетки.

V. P. Sokolnik

**TO THE QUESTION OF PATHOGENETIC MECHANISMS OF THE CMA HEAVY FORM**

*Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder, caused by disruption of the survival motor neuron gene 1 (SMN1), leading to insufficient expression of the functional full-length SMN protein. Despite significant progress in understanding of SMN protein functions, the precise mechanisms, time and place of realization of its deficit remains unexplained. In this work we review the literature describing possible role neural stem/progenitor cells in SMA pathogenesis.*

**Key words:** spinal muscular atrophy, SMN, neural stem cells.

**С**пинальная мышечная атрофия (СМА) – это генетически обусловленное заболевание, характеризующееся дефицитом  $\alpha$ -моторных нейронов. По тяжести и времени появления клинических симптомов выделяют несколько форм проксимальных детских СМА [1]. В настоящее время общепринятой является точка зрения о том, что вне зависимости от типа СМА, заболевание вызвано снижением количества SMN-белка, которое имеет место в результате делеций или мутаций теломерной копии (SMN1) гена SMN (survival motor neuron gene) [2]. В геноме человека SMN-ген локализован в локусе q13 пятой хромосомы и, в отличие от других организмов, представлен двумя почти идентичными копиями: теломерной (SMN1) и центромерной (SMN2), которая при СМА не изменена. Функциональный белок полной длины считывается в основном с SMN1, а укороченный белок, кодируемый SMN2-геном, по-видимому, является несостоятельным в функциональном смысле, так как быстро деградирует. Полагают, что незначительное количество белка полной длины из SMN2 всё же образуется, но для предотвращения клинических симптомов СМА, при отсутствии SMN1, его недостаточно.

SMN – это многофункциональный белок, который локализуется как в цитоплазме клеток, так и в ядрах. В ядрах он обнаружен в следующих структурах: в так называемых геммах (gemini of the coiled bodies), в телах Кахала и в ядрышках. Наиболее изученной функцией SMN является биогенез сплайсосомных малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНП), которую он выполняет в составе мультикомпонентного комплекса, содержащего, по крайней мере, еще 7 белков, имеющих обобщающее название “gemins” [3-14]. Помимо этого, SMN, по-видимому, имеет отношение к сборке, метаболизму и транспорту других классов РНП, включая теломеразный комплекс, микроРНП и комплексы, выполняющие транскрипцию и РНК сплайсинг [14]. SMN имеет также отношение к апоптозу [11-12]. Перечисленные выше функции универсальны для различных клеточных типов. Вместе с тем показано, что

белок обладает и уникальными для нейронов свойствами – участвует в формировании нервно-мышечных соединений и аксональном транспорте мРНК [15].

Несмотря на значительный прогресс в понимании функций SMN-белка, точные механизмы реализации его дефицита при различных формах СМА предстоит ещё выяснить. При тяжелой форме (СМА 1) ранний, иногда антенатальный, дебют заболевания предполагает, что в данном случае имеют место дефекты нейрогенеза. [16]. Подробное изучение этих вопросов необходимо для разработки адекватного терапевтического дизайна для заболевания.

Целью данной работы явилось изучение данных литературы о патофизиологических изменениях стволовых клеток при СМА 1 и возможных механизмах вовлечения SMN в нейрогенез.

**Ниши невральных стволовых клеток в норме**

В процессе эмбрионального развития нейроэктодерма формирует нервную трубку, нейроэпителиальные клетки которой являются делящимися стволовыми клетками. В дальнейшем они дифференцируются в клетки-предшественницы нейронов и глии [17].

В течение долгого времени считалось, что нейрогенез имеет место в эмбриональном периоде, и что новые нейроны не образуются после рождения. Однако в шестидесятых годах прошлого столетия были получены убедительные данные о том, что новые нейроны образуются в течение всей жизни, и что этот процесс не носит диффузный характер, а имеет место в определенных ограниченных зонах ЦНС, в так называемых нишах стволовых клеток. Обладая способностью к самообновлению, эти клетки, покидая нишу, могут дифференцироваться во множественные клеточные линии. Классическим примером таких ниш являются ростральная субвентрикулярная область (SVZ) и субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа (SGZ). Так, в SVZ идентифицированы астроглиальные стволовые клетки (NSCs) с потенциалом мультипотентных клеток, которые, возможно являются потомками клеток радиальной глии, выстилающей поло-

сти боковых желудочков у новорожденных. Кроме этого в SVZ имеются транзитные клетки-предшественницы, обладающие высокой пролиферативной активностью, и нейробласты. В непосредственной близости находятся кровеносные сосуды [18].

В SGZ идентифицированы два типа предшественников, отличающиеся по морфологии и экспрессии специфических маркеров. В настоящее время существуют убедительные доказательства того, что нейрогенез у взрослых может иметь место и вне классических ниш. Так, у млекопитающих прогениторные клетки с нейрогенным потенциалом найдены в гипоталамусе (на уровне области, выстилающей третий желудочек), в мозжечке, в обонятельных луковице и эпителии, в миндалинном теле, в спинном мозге, в сетчатке (на уровне ресничных тел), в паутинной и в мягкой мозговых оболочках [17–18]. Несмотря на значительный прогресс в описании морфологии NSCs и их экспрессионного профиля, специфическая идентификационная карта NSCs все еще не найдена [17]. Другой критический вопрос касается механизмов доставки вновь возникающих клеток в окончательные места их расположения. Недавно предложено, что ниши стволовых клеток в ЦНС могут быть объединены в функциональную сеть, где SVZ является своеобразным резервуаром NSCs, а мозговые оболочки представляют собой как одну из ниш, так и анатомические ветви сети, которые обеспечивают связь между нишами и миграцию NSCs к местам интеграции в нервной ткани. Мозговые оболочки не только покрывают ЦНС, но и глубоко простираются внутрь паренхимы, сопровождая сосуды и образуя периваскулярное пространство. Таким способом может формироваться сеть потенциальных троп, позволяющих обеспечить миграцию клеток-предшественников к любым местам в ЦНС [17].

#### Факторы, влияющие на нейрогенез и регулирующие активность стволовых клеток

Процессы развития нервной системы регулируются сложным взаимодействием белковых сигнальных молекул и нейромедиаторов. Следующие факторы влияют на нейрогенез и регулируют активность стволовых клеток: сигнальные пути – Notch, Ephrin-B/EphB, Smad4, Wnt; нейротрофины и ростовые факторы – BDNF, NGF и их рецепторы (TrkA, TrkB, TrkC, p75), FGF1, FGF2, EGF, IGF1, CNTF, VEGF, BMPs, SDF1 и рецептор CXCR4; воспалительные цитокины – IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4; Toll-подобные рецепторы – TLR4, TLR2. Подробно с данным вопросом можно ознакомиться в обзоре Decimo с соавт. [17].

Предполагается, что дисфункции стволовых клеток может способствовать укорочение теломер хромосом [19], длина которых регулируется активностью теломеразы [20]. Теломераза состоит из белковой каталитической субъединицы, теломеразной ревертранскриптазы (TERT) и теломеразной РНК (TR), которая относится к семейству малых ядрышковых РНК, содержащих H/ACA бокс [13]. Энзиматическая активность теломеразы у человека имеет место в раннем пренатальном периоде, в то время как в тканях взрослых людей она низкая, либо не определяется вовсе. Активация теломеразы происходит в большинстве раковых и трансформированных клеточных линий, а её ингибция в этих клетках ведет к их старению и гибели [13].

В раковых клетках человека hTR и hTERT доставляются к теломерам в S-фазе клеточного цикла, в то время как в других его фазах hTR локализуется в ядерных кольцевых телах – телах Кахала (Cajal bodies), а hTERT – в так на-

зываемых “TERT foci”. Тела Кахала являются, по-видимому, местом сборки и созревания теломеразы. Непосредственно, перед локализацией hTR и hTERT в теломерах, оба эти компонента обнаруживаются в структурах, тесно связанных с телами Кахала [21]. Предполагается, что кроме контроля длины теломер, теломераза имеет и другие механизмы воздействия на стволовые клетки, например, свободный теломеразный белок может стимулировать их активность [22].

Вероятно, SMN может также иметь отношение к регуляции активности стволовых/прогениторных клеток. Так, показано, что кроме своей ключевой функции, биогенеза малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП), он имеет отношение к созреванию ядрышковых РНП, и в частности теломеразного комплекса [13, 23–24]. Мутантный SMN-белок, который утратил первые 27 аминокислот (SMN $\Delta$ N27), перераспределяет нормальную субклеточную локализацию hTERT (TERT человека) и уменьшает эффективность реконструкции теломеразы *in vitro* в лизате ретикулоцитов кролика [13].

Недавно было предположено, что SMN может способствовать регуляции выхода из клеточного цикла клеток линии моторных нейронов MN1 посредством взаимодействия с РНК-связывающимся белком HuD. Такое взаимодействие полностью отсутствовало у пациентов со СМА1, имеющих мутации в гене SMN [25].

Паттерн экспрессии SMN на ранних стадиях развития позволяет рассматривать этот белок, как вовлеченный в нейрогенез. SMN РНК выявляется диффузно в эпителии нервной трубки и в мигрирующих невральных клетках [26]. Во втором триместре развития плода человека экспрессия имеет место в нейробластах передних рогов спинного мозга, клетках эпандимы и, в меньшей степени, в клетках задних рогов и дорзальных ганглиев. У взрослых людей, когда центральный канал в спинном мозге облитерируется и клетки эпандимы завершают роль герминативного эпителия [26], SMN экспрессируется, главным образом, в моторных нейронах, хотя экспрессия этого гена отмечена и в других отделах ЦНС [26].

#### Ниши невральных стволовых клеток при СМА 1

Данные по целенаправленным исследованиям ниш стволовых клеток при СМА 1 в настоящее время отсутствуют.

Мы наблюдали двух пациентов со СМА 1, которые имели субэпандимальные кисты (псевдокисты), выявленные с помощью ультразвукового исследования. Делеционный анализ SMN гена показал, что у одного ребенка имелась делеция SMNt (экзоны 7, 8) и делеция экзона 5 NAIP-гена. У этого пациента обнаружена мелкая субэпандимальная псевдокиста на уровне центральной части бокового желудочка. В другом случае обнаружена делеция только SMNt-гена (экзоны 7, 8) и выявлены мелкие псевдокисты в субэпандиме бокового желудочка справа в проекции таламо-каудальной области [27]. Известно, что 0.5-5% новорожденных имеют подобные образования в субэпандиме. Эти изменения могут исчезать спонтанно в первые месяцы постнатальной жизни либо ассоциироваться с инфекционными, сосудистыми, метаболическими и хромосомными заболеваниями. Тем не менее, выяснение механизмов возникновения этих образований в области локализации клеток-предшественниц нейронов у пациентов с генетически детерминированной СМА может, по-видимому, представлять определенный интерес в изучении патогенеза заболевания.

Интересно отметить, что с помощью УЗИ и магнитно-резонансного исследования мозга у пациентов со СМА первого типа участки лизиса были выявлены также в коре, в шейном и грудном отделах спинного мозга [28], в переднебоковой части таламуса, вокруг задних рогов боковых желудочков [29].

#### Экспериментальные данные

Исследователи из Канады изучили морфологию и дифференцировку невральных стволовых клеток (NSCs), генерированных с помощью нейросфер, которые были получены из полосатых тел гипоморфной серии СМА-модельных мышей. Показано, что нейросферы от эмбрионов мышей *Smn<sup>-/-</sup>*; *SMN2* (СМА1-модельные мыши, стадия E14,5) продуцируют NSCs с увеличенным пролиферативным потенциалом и укороченными отростками, после помещения в условия, индуцирующие дифференцировку. Полученные результаты позволили авторам работы предположить, что эти клетки не способны выйти из клеточного цикла, остаются в прогениторном состоянии и не дифференцируются должным образом в нейроны [16]. Позже, на морфологическом уровне *in vivo* у мышей *Smn<sup>-/-</sup>*; *Smn<sup>2</sup>* (стадия E10,5) была обнаружена гибель клеток и патологические образования в конечном мозге, количество которых увеличивалось к стадии E14,5 [30].

Другая группа исследователей из Канады изучала влияние дефицита *Smn*-белка у модельных мышей с генотипом *Smn<sup>2B/-</sup>*. *Smn<sup>2B</sup>* – это мутантный аллель с нарушенным сплайсингом эндогенного *Smn*-гена, в результате чего имеет место увеличение  $\Delta 7Smn$  мРНК и редукция транскрипта полной длины. Уровень белка полной длины у таких мышей снижен на 15%. В качестве объекта исследования выбран глаз. Показано, что у мышей дикого типа *Smn*-белок присутствует в ганглиозных и амакриновых клетках сетчатки, а также в глиальных клетках оптического нерва. Гистопатологический анализ мутантных мышей выявил редукцию аксонов ганглиозных клеток, уменьшенное количество глиальных клеток оптического нерва, измененную организацию нейрофиламентов в сетчатке, отсутствие амакриновых клеток, а также дефект электроретинограмм. Результаты проведенного исследования, по мнению авторов работы, указывают на роль *Smn* в регуляции как нейрогенеза, так и образования отростков нейронов [31]. Эти результаты, также как и другие экспериментальные данные, позволяют предположить, что патологические изменения при СМА могут не ограничиваться моторными нейронами [16]. И действительно, позже было показано, что у мыши *Smn<sup>2B/-</sup>* имеет место драматическое изменение судьбы клеток в поджелудочной железе – преобладание продуцирующих глюкагон клеток и уменьшение количества  $\beta$  клеток. Отмечена также гипергликемия, гиперглюкагонемия и резистентность к глюкозе. Сходные изменения в поджелудочной железе были обнаружены у детей, умерших от тяжелой формы СМА. Авторы статьи считают, что изменения метаболизма глюкозы, связанные с дефектами развития поджелудочной железы, вносят существенный вклад в патогенез заболевания [32]. Паттерн экспрессии *Smn* мРНК и белка модулируется в эмбриогенезе в зависимости от стадии развития и ткани, что предполагает вовлечение этого протеина в формирование не только ЦНС, но некоторых других органов [30].

На основании приведенных выше данных следует указать на необходимость исследований, направленных на

изучение роли *SMN* в компартаментах стволовых/прогениторных клеток в норме и изменений его функционирования, связанных с дефицитом этого белка у пациентов с генетически подтвержденной СМА.

#### Литература

1. Munsat, T. L., Davies K. E. // *Neuromusc. Disord.* 1992. Vol. 2, N 5–6. P. 423–428.
2. Lefebvre, S., Burglen L., Reboullet S. et al. // *Cell.* 1995. Vol. 80, N 1. P. 155–165.
3. Gubit, A. K., Feng W., Dreyfuss G. // *Exp. Cell. Res.* 2004. Vol. 296. P. 51–56.
4. Liu, Q., Dreyfuss G. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15, N 14. P. 3555–3565.
5. Renvoise, B., Khoobarry K., Gendron M. C. et al. // *J. Cell Sci.* 2006. Vol. 119. P. 680–692.
6. Wang, J., Dreyfuss G. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, N 30. P. 45387–45393.
7. Fischer, U., Liu Q., Dreyfuss G. // *Cell.* 1997. Vol. 90, N 6. P. 1023–1029.
8. Liu, Q., Fischer U., Wang F., Dreyfuss G. // *Cell.* 1997. Vol. 90. P. 1013–1021.
9. MacKenzie, A. E., Gendron N. H. // *Nature Struct. Biol.* 2001. Vol. 8, N 1. P. 13–15.
10. Selenko, P., Sprangers R., Stier G. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 2001. Vol. 8, N 1. P. 27–31.
11. Kerr, D. A., Nery J. P., Traystman R. J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 13312–13317.
12. Sato, K., Eguchi Y., Kodama T. S., Tsujimoto Y. // *Cell. Death. Differ.* 2000. Vol. 7, N 4. P. 374–483.
13. Bachand, F., Boisvert F. M., Cote J. et al. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. Vol. 13. P. 3192–3202.
14. Kolb, S. J., Battle D. J., Dreyfuss G. // *J. Child Neurol.* 2007. Vol. 12, N 8. P. 990–994.
15. Fan, L., Simard L. R. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. Vol. 11, N 14. P. 1605–1614.
16. Shafey, D., MacKenzie A. E., Kothary R. // *J. Neuroscience Res.* 2008. Vol. 86. P. 2839–2847.
17. Decimo, I., Bifari F., Krampera M., Fumagalli G. // *Current Pharmaceutical Design.* 2012. Vol. 18. P. 1755–1783.
18. Eichmann, A., Thomas J. L. // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. Doi: 10.1101/cshperspect.a006551. P. 1–15.
19. Flores, I., Canela A., Vera E. et al. // *Gen. Dev.* 2008. Vol. 22. P. 654–667.
20. Hoffmeyer, K., Raggioli A., Rudloff S. et al. // *Science.* 2012. Vol. 336, N 6088. P.1549–1554. Abstract.
21. Tomlinson, R. L., Abreu E. B., Ziegler T. et al. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. Vol. 19. P. 3793–3800.
22. Beckman, M. // *SAGE Crossroads – News & Views-News Archive.* October 03. 2005.
23. Buhler, D., Raker V., Luhrmann R., Fischer U. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. Vol. 8. P. 2351–2357.
24. Charroux, B., Pellizzoni L., Perkinson R. A. et al. // *J. Cell. Biol.* 2000. Vol. 148, N 6. P. 1177–1186.
25. Hubers, L., Valderrama-Carvajal H., Laframboise J. et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20, N 3. P. 553–579.
26. Tizzano, E. F., Cabot C., Baiget M. // *Am. J. Path.* 1998. Vol. 153, N 2. P. 355–361.
27. Сокольник, В. П., Хмель Р. Д., Улезко Е. А. // *Весті НАН Беларусі.* 2006. N.1. Ст. 88-92.
28. Hsu, C. F., Chen C. Y., Yuh Y. S. et al. // *Am. J. Neuroradiol.* 1998. Vol. 19. P. 550–552.
29. Ito, Y., Kumada S., Uchiyama A. et al // *Brain Dev.* 2003. Vol. 26. P.53–56.
30. Liu, H., Shafey D., Moores J., Kothary R. // *J. Neuroscience Res.* 2010. Vol. 88. P. 111–122.
31. Liu, H., Beauvais A., Baker A. N. et al. // *Developmental Neurobiol.* 2010. Doi 10.1002/dneu.20840. P. 153–169.
32. Bowerman, M., Swoboda K., Michalski J. P. et al. // *Annals Neurol.* 2012. Vol. 72. P. 256-268.

Поступила 2.08.2013 г.