

ИЗМЕНЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В МОТОНЕЙРОНАХ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИЕЙ

Шишмаков М.А., Воловиков Е.А.

Научный руководитель: канд. биол. наук
З.В. Бакаева

Национальный медицинский исследовательский центр
здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

Ключевые слова: дети; спинальная мышечная атрофия

Актуальность. Создание экспериментальных клеточных моделей спинальной мышечной атрофии (СМА) на основе пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) является актуальной задачей для изучения селективной гибели СМА-мотонейронов. Считается, что СМА-мотонейроны высокочувствительны к основному возбуждающему нейромедиатору в центральной нервной системе — глутамату, который в высоких концентрациях вызывает гиперактивацию NMDA-рецепторов, нарушение гомеостаза кальция и гибель нейронов. С другой стороны, внутриклеточный кальциевый сигналинг играет ключевую роль в экспрессии гена *SMN2*.

Цель работы: провести анализ кальциевого гомеостаза мотонейронов, полученных путём нейрональной дифференцировки из ИПСК больных СМА.

Материалы и методы. Для многоступенчатой дифференцировки использовали пациент-специфичную линию ИПСК с мутацией в гене *SMN1* от больных СМА типа II (m3SMA20) и линию ИПСК здорового донора FF1S (группа контроля) с добавлением малых молекул в ростовые среды: CHIR99021, Dorsomorphin, SB431542, ретиноевая кислота, purmorphamine, вальпроевая кислота и DAPT. Полученная гомогенная культура мотонейронов была фенотипирована иммуноцитохимическим методом на нейрональные маркеры OLIG2, ISL1 и ChAT. Анализ внутриклеточной концентрации кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и измерение митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) проводили при помощи флуоресцентной микроскопии с использованием Fura2 (Ex 340/380 нм/Em 525 нм) и Rh123 (Ex 485 нм/Em 525 нм).

Результаты. В ответ на глутамат (300 мкМ) СМА-мотонейроны отвечали слабым повышением $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с контролем. Кроме того, СМА-мотонейроны медленнее восстанавливали исходную $[Ca^{2+}]_i$ в постглутаматный период, что свидетельствует о митохондриальной дисфункции. Воздействие L-глутамата (300 мкМ) не приводило к синхронному падению $\Delta\Psi_m$ и отсроченной кальциевой дизрегуляции в контрольных мотонейронах, следовательно, данная концентрация не является токсической для дифференцированных мотонейронов. Таким образом, различия в ответе на глутамат могут быть связаны с дефектной работой глутаматных рецепторов. Это согласуется с тем, что при дефиците белка SMN наблюдается нарушение метаболизма L-глутамата, ослабление глутаматергической нейротрансмиссии и снижение количества возбуждающих глутаматных синапсов в спинном мозге.

Заключение. Мотонейроны, дифференцированные из пациент-специфичной линии ИПСК с мутацией в гене *SMN1* от больных СМА типа II (m3SMA20) подвержены раннему нарушению кальциевого гомеостаза, что может свидетельство-

вать о низкой экспрессии главной активирующей субъединицы NMDA-рецепторов — NR2A.

* * *