

# Опыт экспериментального моделирования болезни Гентингтона

А.В. Ставровская, Д.Н. Воронков, Н.Г. Ямщикова, А.С. Ольшанский,  
Р.М. Худоерков, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

*Болезнь Гентингтона (БГ) является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием и характеризуется хореическим гиперкинезом, снижением когнитивных функций, поведенческими расстройствами и прогрессирующей гибелью нейронов, поражающей, прежде всего, стриатум. В силу фатального характера БГ актуальным является поиск эффективных методов ее лечения, для чего требуется разработка экспериментальных моделей данного заболевания. Такая модель может быть создана с помощью 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК) – нейротоксина, вызывающего характерные изменения моторики и ухудшение памяти у животных в результате индукции окислительного стресса, нарушения глутатионовой защиты и поражения клеток полосатого тела. БГ у крыс моделировалась хроническим введением 3-НПК внутривентрикулярно, ежедневно в течение 17 дней. Системное введение низкой дозы 3-НПК (10 мг/кг) вызывало гиперактивность животных в «открытом поле» (включая избыточность движений как аналог гиперкинезов) и не оказывало влияния на поведение животных в Х-лабиринте. Напротив, при введении токсической дозы 3-НПК (20 мг/кг) крысы демонстрировали значительное снижение двигательной активности и ослабление когнитивных функций во время поведенческих исследований. Гистопатологический анализ выявил повреждение и гибель нейронов и снижение экспрессии дофаминергических маркеров (тирозингидроксилазы и мембранного переносчика дофамина) в стриатуме. Также обнаружили глиотоксическое действие 3-НПК в стриатуме, подтвержденное иммуногистохимическим окрашиванием на астроцитарные белки: GFAP, глутаминсинтетазу и аквапорин-4. Данная модель БГ может быть полезной для тестирования новых экспериментальных видов терапии на различных стадиях нейродегенерации «гентингтоновского» типа, в т.ч. основанных на клеточной нейротрансплантации.*

**Ключевые слова:** болезнь Гентингтона, 3-нитропропионовая кислота, экспериментальное моделирование, нарушения поведения и памяти, стриатум, гибель нейронов, глиотоксичность.

**Б**олезнь Гентингтона – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное полиглутамин-кодирующей мутацией в гене *HTT* [2, 17]. Мутантная форма белка гентингтина характеризуется патологически увеличенным числом копий глутаминовых остатков, что придает белку токсические свойства и приводит к нарушению митохондриальных функций, эксайтоксичности, окислительному повреждению мембран нейронов и их гибели [14]. При БГ специфической «мишенью» патологического процесса являются среднешипиковые ГАМК-ергические нейроны стриатума, а в развернутых стадиях болезни дегенерации подвергаются и глутаматергические пирамидальные нейроны коры мозга, преимущественно IV, V и VI слоев коры [35]. Прогрессирующая гибель нейронов сопровождается двигательными нарушениями (хорея, дистония, миоклонии, расстройства походки и др.), деменцией подкоркового типа (что нередко в дебюте болезни принимают за возрастные изменения в когнитивной сфере) и аффективно-поведенческими расстройствами [1, 2].

Для изучения патогенеза и способов терапии БГ используются модели на животных, которые можно разделить на генетические (трансгенные) и негенетические. Негенетические модели основаны, главным образом, на использовании избирательных токсинов, одним из которых является 3-нитропропионовая кислота (3-НПК). Механизм действия 3-НПК основан на необратимом ингибировании сукцинатдегидрогеназы в митохондриальной цепи переноса электронов (комплекс II) в клетках мозга с особой тропностью к нейронам стриатума [6, 7, 16]. Это приводит к на-

рушению метаболизма глюкозы, снижению синтеза АТФ, а также образованию активных форм кислорода [5, 18, 29]. Указанные метаболические нарушения в нейронах сопровождаются эксайтоксичностью, которая подразумевает гиперактивацию NMDA-рецепторов, избыточное поступление ионов  $Ca^{2+}$  внутрь клетки и усиление окислительного стресса [4, 16].

3-НПК проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и может вводиться лабораторным животным системно – в отличие от хинолиновой кислоты, также используемой в моделировании БГ, но не проникающей через ГЭБ [12, 30, 37]. Системное введение 3-НПК позволяет более точно обеспечивать суточную дозировку с учетом массы экспериментального животного, что позволяет варьировать степень поражения нейронов стриатума и характер неврологических нарушений [7, 13, 23, 27]. Данная модель способна имитировать как гипокинетические, так и гиперкинетические симптомы БГ в зависимости от режима введения 3-НПК [10].

## Материалы и методы

Работа была проведена на крысах-самцах линии Wistar, возрастом 3–4 месяца (n=21). Животные содержались в виварии института при свободном доступе к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Для получения экспериментальной модели БГ использовали 3-НПК (Sigma), которую растворяли в физиологическом растворе и конечное значение pH доводили до 7,4 с помощью 5N NaOH. Инъекции 3-НПК осуществляли внутривенно, ежедневно, в течение 17 дней. Экспериментальные животные были разделены на 3 группы: 1) крысы, получавшие физиологический раствор (контроль); 2) крысы, получавшие 3-НПК в дозе 10 мг/кг; 3) крысы, получавшие 3-НПК в дозе 20 мг/кг. Изучение фенотипических изменений проводили с использованием комплекса поведенческих методик, включающего: 1) тестирование двигательной активности и ориентировочного поведения в «открытом поле» (при проведении теста в течение 3 мин учитывали общее количество пересеченных квадратов и количество стоек); 2) тест в приподнятом крестообразном лабиринте. В последнем тесте крысу помещали индивидуально на конце одного из открытых рукавов лабиринта, головой от центральной площадки. Время, затраченное животным для перехода с конца открытого рукава в один из закрытых рукавов, было обозначено как исходное время задержки латентного периода (ЛП). Крысам разрешили исследовать лабиринт в течение 30 с после записи ЛП, затем возвращали в домашнюю клетку. Тестирование ЛП проводили на 12-й и 13-й дни эксперимента [19].

Фиксирование и анализ поведенческих экспериментов проводили с помощью системы видеонаблюдения за поведением животных Any-maze. Данные обрабатывали в программе Statistica 7.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный тест Фишера (Fisher LSD) для выявления различий между показателями контрольной группы и группы сравнения по дням эксперимента. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

По окончании экспериментов животных усыпляли хлороформом, затем их декапитировали и извлекали мозг.

Для иммуноморфологического исследования были взяты животные, получавшие 3-НПК в дозе 10 мг/кг ( $n=6$ ), и животные, получавшие 20 мг/кг ( $n=4$ ) через 3 недели после введения токсина, а также интактные крысы ( $n=4$ ). Образцы мозга фиксировали в нейтральном формалине (24 ч) и проводили через растворы этанола и хлороформа для заливки в парафин. Фронтальные парафиновые срезы в области стриатума толщиной 7 мкм готовили на микротоме Leica SR2000. Исследовали локализацию маркерных белков дофаминергических структур – тирозингидроксилазы (TH, ключевого фермента синтеза дофамина) и мембранного переносчика дофамина (DAT). В астроцитах исследовали локализацию кислого глиофибрилярного белка (GFAP) – специфического белка цитоскелета астроглии, глутаминсинтетазы (GS) – фермента глутамин-глутаматного цикла, участвующего в регуляции внеклеточного содержания глутамата, и аквапорина-4 (AQP4) – белка водных каналов, локализованного в области контакта концевых ножек астроглии с сосудами. Кроме того, для выявления изменений нейронов стриатума срезы окрашивали крезиловым фиолетовым.

Для иммуногистохимического окрашивания использовали авидинпероксидазную и флуоресцентную методики в соответствии с протоколами производителя (Sigma). Для демаскировки антигенов срезы нагревали в микроволновой печи (600 W, 5 мин) в цитратном буфере (pH=6,0).

Локализацию TH, DAT и GFAP выявляли при помощи моноклональных кроличьих антител (Sigma), используя для визуализации связывания вторичные козы антитела, конъюгированные с биотином, и авидинпероксидазу. В качестве хромогена применяли 3,3-диаминобензидин, с интенсификацией окраски хлоридом кобальта (набор SigmaFast). Иммунофлуоресцентным методом исследовали совместную локализацию GFAP и AQP4, а также GFAP и GS, используя меченые флуорохромом Cy3 мышинные антитела к GFAP и кроличьи антитела к GS или AQP4, связывание которых выявляли при помощи конъюгированных с FITC козьих антител, выработанных против иммуноглобулинов кролика. Препараты изучали и фотографировали под флуоресцентным микроскопом Nikon Eclipse Ni-u с соответствующим набором фильтров (Cy3, FITC), используя камеру Nikon DS-Qi1. Для исследования в светлом поле применяли микроскоп Leica DMLB с цветной камерой Leica DC-300.

## Результаты

Системное введение 3-НПК приводило к разнонаправленному изменению двигательной активности и исследовательского поведения экспериментальных животных в открытом поле по сравнению с контрольной группой (рис. 1).

У животных с хроническим введением 3-НПК в дозе 10 мг/кг к 4-му дню эксперимента наблюдалось значительное увеличение скорости передвижения и количества пересеченных квадратов, а также увеличение числа стоек в «открытом поле». При этом в движениях крыс появилась некоторая избыточность и «вычурность» (аналог гиперкинезов), особенно ярко проявляющаяся в движениях задних конечностей и головы. Начиная с 4-го дня, двигательная активность оставалась на высоком уровне, достигнув своего плато.

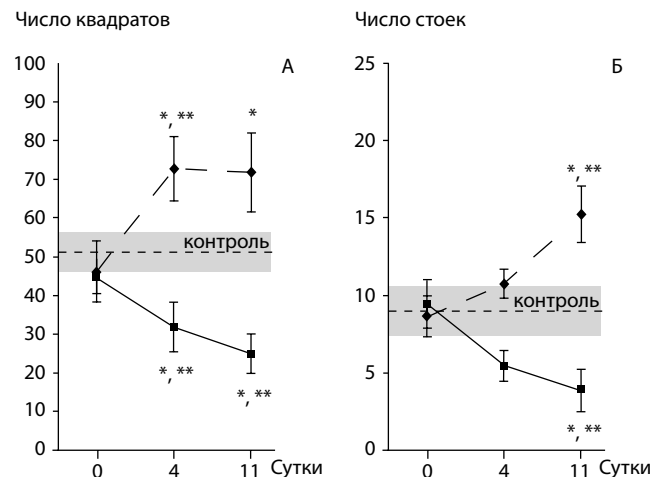


рис. 1: Изменение горизонтальной (А) и вертикальной (Б) двигательной активности крыс в «открытом поле».

По оси ординат: число пересеченных квадратов (А), число стоек (Б); по оси абсцисс: дни эксперимента. Точки данных – средние значения, разброс – стандартная ошибка среднего. Пунктирная линия – доза 10 мг/кг, сплошная линия – доза 20 мг/кг. Среднее значение для контрольной группы показано частым пунктиром. Разброс (стандартная ошибка среднего) приведен в виде серого прямоугольника.

\*  $p < 0,05$ , ANOVA, Post-hoc Fisher LSD test, отличия от дня начала эксперимента;  
\*\*  $p < 0,05$ , ANOVA, Post-hoc Fisher LSD test, отличия от контрольной группы.

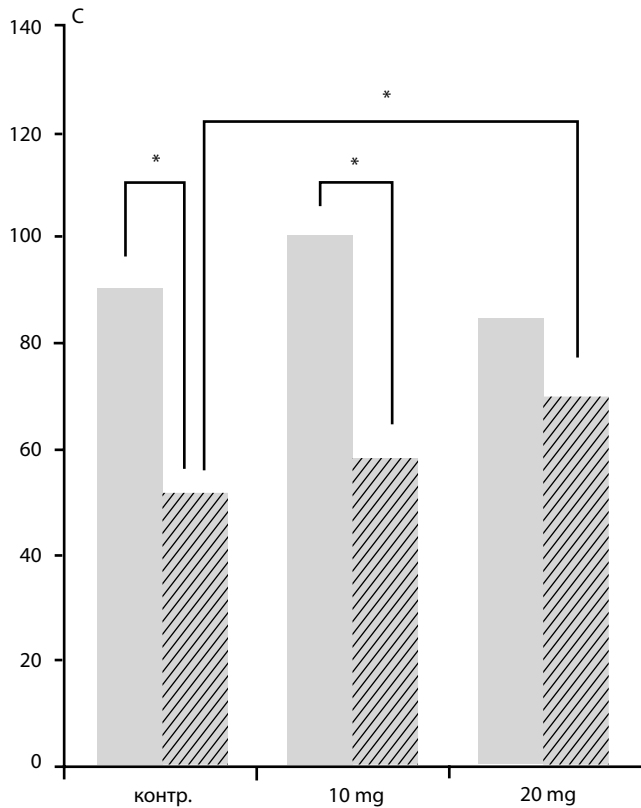


рис. 2: Изменение латентного периода обнаружения закрытого рукава лабиринта. По оси ординат: время (с); по оси абсцисс: столбики со сплошным окрашиванием – 12-й день эксперимента, с градиентным – 13-й день эксперимента. Различия достоверны при  $p \leq 0,05$ ; + – различия с первым предъявлением, \* – различия между группами.

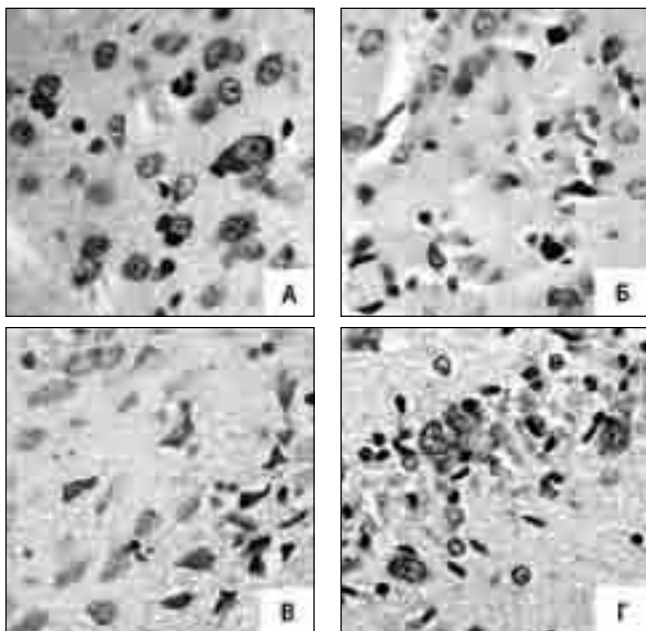


рис. 3: Изменения нейронов в дорсолатеральной области стриатума и гиппокампе крыс, получавших внутривбрюшинные инъекции 3-НПК. А – интактные животные; Б – 3-НПК в дозе 10 мг/кг; В (стриатум) и Г (поле СА1 гиппокампа) – 3-НПК в дозе 20 мг/кг. Окраска крезильовым фиолетовым, увеличение объектива  $\times 40$ .

Напротив, крысы с хроническим ведением 3-НПК в дозе 20 мг/кг поступательно снижали двигательную активность в «открытом поле», как горизонтальную, так и вертикальную. У животных наблюдалось ухудшение моторной координации, их походка приобрела «стелющийся» характер, снизилась скорость передвижения. Эти моторные особенности особенно отчетливо наблюдались при тестировании в приподнятом крестообразном лабиринте.

Тест на пространственную память в приподнятом крестообразном лабиринте показал, что по сравнению с контрольными животными хроническое введение 10 мг/кг 3-НПК не изменило разность ЛП перехода в закрытый рукав между первым и повторным помещением крыс в лабиринт, тогда как хроническое введение 3-НПК в дозе 20 мг/кг эту разницу значительно уменьшило (рис. 2). Такие данные свидетельствуют об ухудшении сохранения памятного следа у крыс, получавших более высокую дозу токсина.

Гистологическое исследование показало, что под действием 3-НПК происходит повреждение стриатных нейронов. На срезах, окрашенных крезильовым фиолетовым, в дорсолатеральной области стриатума наблюдали многочисленные сморщенные гиперхромные нейроны с неразличимыми ядрами, а также гипохромные нейроны. Дегенеративные изменения были отмечены как в средних нейронах хвостатого ядра, составляющих основную популяцию клеток стриатума и являющихся преимущественно ГАМК-ергическими, так и в крупных, редко расположенных холинергических нейронах. Кроме того выявляли выраженный отек сосудов и клеток (рис. 3). Эти изменения были отмечены у всех животных, получавших нейротоксин, но их степень значительно варьировала. Визуально отмечалось снижение плотности нейронов и количества ядер

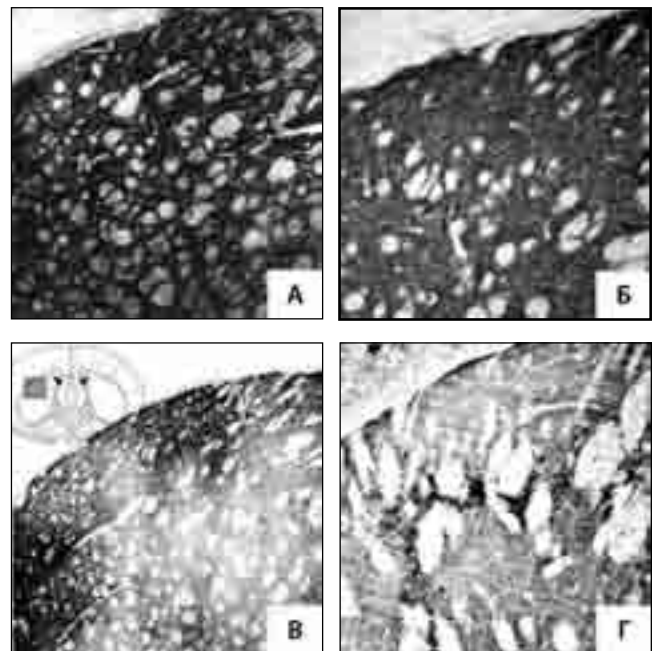


рис. 4: Изменения дофаминергической иннервации стриатума под действием 3-нитропропионовой кислоты.

Слева на В показана схема, демонстрирующая область исследования на фронтальном срезе. А, В – локализация TH (А – контроль, В – 3-НПК в дозе 10 мг/кг); Б, Г – локализация DAT (Б – контроль, Г – 3-НПК в дозе 10 мг/кг). Увеличение объектива  $\times 10$ .

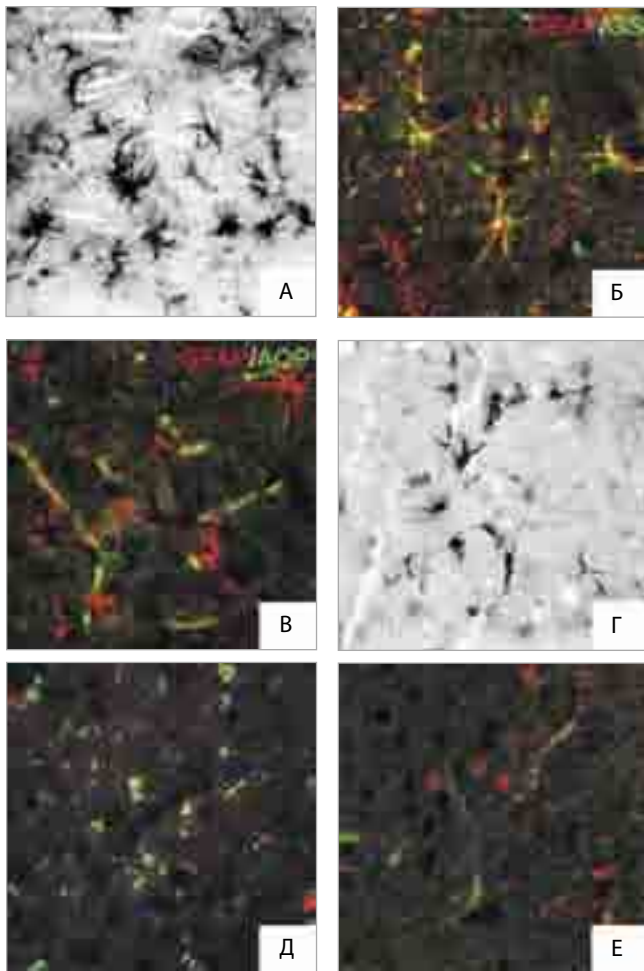


рис. 5: Изменения астроцитов стриатума под действием 3-НПК. А, Г – выявление GFAP, иммунопероксидазный метод (А – контроль, Г – 3-НПК в дозе 10 мг/кг); Б (контроль) и Д (3-НПК в дозе 20 мг/кг) – совместное выявление GFAP (Cy3, красный цвет) и глутаминсинтетазы (FITC, зеленый цвет); В (контроль) и Е (3-НПК в дозе 20 мг/кг) – совместное выявление GFAP (Cy3, красный цвет) и аквапорина IV (FITC, зеленый цвет).

нейроглии. При этом наиболее тяжелые нарушения отмечали в группе, получавшей большую дозу 3-НПК.

Исследование экспрессии дофаминергических маркеров TH и DAT показало, что помимо повреждения стриатных нейронов нарушалась также дофаминергическая иннервация на TH и DAT было не полным, при этом проявлялась «пятнистость», вероятно, связанная с различной степенью повреждения дофаминовых окончаний в стриатомальном и матриксном компонентах стриатума. Выявленное уменьшение экспрессии TH является характерным признаком повреждения дофаминергических окончаний, тогда как уменьшение экспрессии транспортера дофамина, кроме того, может быть связано и с компенсаторным подавлением обратного захвата медиатора. Обнаруженные изменения были характерны для обеих групп, получавших 3-НПК.

Исследование локализации GFAP показало значительное уменьшение экспрессии этого белка в стриатуме и выраженные морфологические изменения, свидетельствующие о дегенерации астроцитарной популяции. В об-

ласти повреждения в стриатуме у животных, получавших 3-НПК, выявлялись единичные астроциты, имеющие меньшее количество отростков и сниженную экспрессию GFAP по сравнению с контролем (рис. 5А, Г). Выраженное повреждение астроцитов отмечали для обеих экспериментальных групп (рис. 5Г–Е). Помимо снижения окрашивания на GFAP были выявлены изменения других глиальных белков – глутаминсинтетазы и аквапорина-4. В контроле глутаминсинтаза (рис. 5Б) была локализована преимущественно в телах и отростках астроцитов, имеющих GFAP-позитивное окрашивание (цвет от желтого до оранжевого на смешанных изображениях). Аквапорин-4 у контрольных животных обнаруживали вдоль стенок сосудов, при этом он был частично колокализован с GFAP, что говорит о его расположении в концевых ножках астроглии. У животных, получавших 3-НПК, при выявлении глутаминсинтетазы обнаруживали снижение интенсивности окрашивания и эктопическую локализацию фермента (рис. 5Д), что связано с гибелью астроглии и, как следствие, нарушением утилизации внеклеточного глутамата. Выявление аквапорина в группах, получавших 3-НПК, продемонстрировало резкое снижение интенсивности окрашивания сосудов по сравнению с контролем (рис. 5В, Е), что демонстрирует нарушение контактов астроглии с сосудами, повреждение гематоэнцефалического барьера и нарушение водного обмена и согласуется с выявленным отеком сосудов при гистологическом исследовании.

## Обсуждение

Системное введение 3-НПК приводит к селективным гистопатологическим изменениям в веществе мозга, в т.ч. повреждения, которые достаточно точно воспроизводят гистологические, биохимические и клинические особенности БГ [37]. Гибель нейронов при БГ развивается постепенно, без интенсивной реакции тканей и клеточного ответа, с длительным латентным прогрессированием патологического процесса [7], что необходимо учитывать при моделировании данного заболевания на животных. Попытки использования разных доз и режимов введения 3-НПК привели к пониманию того, что острое введение 3-НПК (дозы от 10–20 мг/кг до 100 мг/кг в течение 1–5 дней) не способно в полной мере смоделировать БГ: в этих экспериментах неврологический дефицит развивался быстро, варьируя (на разных дозах токсина) от нарушений координации, дремоты и общей слабости до постоянного пребывания в лежачем положении и смерти [11, 37]. В некоторых случаях гибель животных наступала в течение нескольких часов без каких-либо грубых неврологических нарушений. Более адекватным является хроническое системное введение 3-НПК, в т.ч. в виде прямых внутривентрикулярных либо подкожных инъекций, что обеспечивает точность суточного дозирования нейротоксина с учетом массы животного. Это имеет большое значение, т.к. вес крысы может снижаться до 20 г в день при длительном введении 3-НПК [30]. Именно хроническое системное введение 3-НПК вызывает двигательную дисфункцию и стриатное повреждение, наиболее близкие таковым при БГ [12].

Следует подчеркнуть, что неврологические и морфологические симптомы для различных доз и режимов введения 3-НПК могут меняться от исследования к исследованию, поскольку токсичность 3-НПК зависит от различных параметров, таких как возраст животных [11] или линия крыс [27]. Крысы линии Fischer наиболее восприимчивы, но показывают значительную вариабельность в ответе на

токсин, что делает исследования с использованием этой линии трудновыполнимыми. Крысы линии Lewis менее восприимчивы к 3-НПК, но при соответствующей дозировке демонстрируют устойчивые повреждения и поведенческие нарушения.

В настоящей работе было показано, что системное введение 3-НПК вызывает достоверные нарушения двигательной активности, ориентировочно-исследовательского поведения и пространственной памяти у крыс, сходные с симптомами БГ [20]. При тестировании в «открытом поле» эти нарушения выражались либо в моторной гиперактивности с элементами хорейформных гиперкинезов у крыс, получавших внутривнутрибрюшинные инъекции 3-НПК в дозе 10 мг/кг, либо в ослаблении двигательной активности на фоне введения 3-НПК в дозе 20 мг/кг. Эти результаты в основном согласуются с данными других исследований, в которых описывались различные моторные нарушения у крыс с хроническим введением 3-НПК [10, 24, 28].

Основная функция базальных ганглиев в мозге состоит в синхронизации двигательных паттернов [21], и значительное ухудшение моторики животных в экспериментах с 3-НПК объясняется специфической дегенерацией ключевого подкоркового образования – хвостатого ядра. С известными оговорками можно предположить, что симптомы, развивающиеся при длительном введении животными 3-НПК, особенно в большой дозе, аналогичны проявлениям ювенильной и поздней гипокинетической форм БГ [13].

Когнитивные нарушения являются одним из основных симптомов, наблюдаемых при БГ. Их в значительной степени связывают с нарушением стрио-фронтальных связей, причем в ряде работ сообщается, что воспроизведение памяти страдает больше, чем хранение [8]. В настоящем исследовании было обнаружено, что когнитивный дефицит более заметен у животных, получавших 3-НПК в дозе 20 мг/кг, что выражалось в увеличении ЛП перехода с конца открытого рукава в один из закрытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта. Это согласуется с данными других исследований, в которых было показано значительное нарушение когнитивных функций при введении животным 3-НПК [31, 32]. Известно, в частности, что хроническое введение 3-НПК вызывает повреждение гиппокампальных СА-1 и СА-3 пирамидальных нейронов – областей мозга, ассоциированных с когнитивными функциями [26].

Наблюдаемое в нашем эксперименте снижение экспрессии дофаминергических маркеров под влиянием 3-НПК согласуется с данными о чувствительности дофаминовых нейронов к нарушениям митохондриального дыхания [9] в силу токсичности продуктов, образующихся при утилизации дофамина. Кроме того, показано, что экспрессия и активность тирозингидроксилазы в аксонах нигральных нейронов снижается при нейротоксическом воздействии раньше, чем в их телах [20]. Предполагают, что 3-НПК вызывает нарушения катаболизма медиатора и его неферментативное окисление с формированием токсичных хинонов и свободных радикалов [16]. Вероятно, первичной причиной наблюдаемых в хвостатом ядре под действием 3-НПК

патоморфологических изменений является повреждение нигростриатного дофаминергического пути и астроцитов хвостатого ядра, что сопровождается нарушением модуляции дофамином активности глутаматергических кортико-стриатных окончаний.

Наблюдаемые в нашей работе повреждение и гибель астроцитов могут быть связаны не только с прямым действием 3-НПК, но и с нарушением катаболизма дофамина в стриатуме, в котором принимает участие также астротарная МАО-Б [16]. Ранее было показано, что снижение содержания дофамина в стриатуме уменьшает вызываемое повреждение и, в частности, уменьшает содержание ионов внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в астроцитах [25], избыточная концентрация которого является одной из причин гибели нейронов при нарушении внутриклеточного дыхания [23]. Роль астроглии в регуляции глутаматергической передачи, в т.ч. при нейродегенерации, широко обсуждается в литературе [36]. Можно предположить, что повреждение астроцитов является одним из ключевых факторов, приводящих к нарушению функций стриатума.

В проведенном эксперименте было выявлено снижение экспрессии глутаминсинтетазы и аквапорина-4 и повреждение отростков астроцитов, что говорит о нарушении ключевых функций астроглии — контроля внеклеточного содержания возбуждающих аминокислот, водно-электролитного баланса в стриатуме и проницаемости гематоэнцефалического барьера. Нарушение глутамин-глутаматного цикла и снижение синтеза глутамина может приводить к увеличению содержания внеклеточного глутамата, нарушению энергетических процессов и повреждению нейронов [33]. Выявленное нарушение экспрессии аквапорина-4, локализованного в концевых ножках астроглии, подтверждает данные литературы о повреждении гематоэнцефалического барьера [25], развитии тканевого отека и нейровоспалительных процессах [15].

Таким образом, механизм действия 3-НПК на клеточные популяции стриатума носит сложный характер. По данным литературы, гибель нейронов под воздействием 3-НПК наблюдается и в других структурах мозга, однако при малых дозах токсина первичными, по-видимому, являются нарушения именно в стриатуме [34]. По характеру оказываемых эффектов 3-НПК совмещает как неспецифическое токсическое действие на нейроны, что связано с блокадой сукцинатдегидрогеназы и позволяет описывать наблюдаемые изменения как химически-индуцированную гипоксию [3], так и относительно избирательное влияние на стриатум, связанное с повышенной уязвимостью дофаминергических структур. Используя хроническую интоксикацию 3-НПК в разных дозах и варьируя режимы ее введения, можно получить модели, имитирующие различные стадии БГ (как гипер-, так и гипокинетические). Это позволяет тестировать на данной модели новые экспериментальные подходы к терапии БГ, в т.ч. основанные на клеточной нейротрансплантации с использованием технологий индуцированных плюрипотентных стволовых клетках.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01730а.*

## Список литературы

1. Иллариошкин С.Н. Возрастные расстройства памяти и внимания: механизмы развития и возможности нейротрансмиттерной терапии. Неврол. журн. 2007; 2: 34–40.
2. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Новый механизм мутации у человека: экспансия тринуклеотидных повторов (обзор). Генетика 1995; 31: 1478–1489.
3. Aketa S., Nakase H., Kamada Y. et al. Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in gerbil hippocampal slices: therapeutic window and the participation of adenosine receptor. Exp. Neurol. 2000; 166: 385–391.
4. Alexi T., Hughes P.E., Faull R.L., Williams C.E. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. Neuroreport 1998; 9: 57–64.
5. Alston T.A., Mela L., Bright H.J. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74: 3767–3771.
6. Beal M.F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? Ann. Neurol. 1992; 31: 119–130.
7. Beal M.F., Brouillet E., Jenkins B.G. et al. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. J. Neurosci. 1993; 13: 4181–4192.
8. Becker S., Lim J. A computational model of prefrontal control in free recall: strategic memory use in the California Verbal Learning Task. J. Cogn. Neurosci. 2003; 15: 821–832.
9. Blesa J., Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. Front. Neuroanat. 2014; 8: 155.
10. Borlongan C.V., Koutouzis T.K., Freeman T.B. et al. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: The systemic 3-nitropropionic acid model. Brain Res. Protoc. 1997; 1: 253–257.
11. Brouillet E., Conde F., Beal M., Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. Prog. Neurobiol. 1999; 59: 427–468.
12. Brouillet E., Jacquard C., Bizat N., Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. J. Neurochem. 2005; 95: 1521–1540.
13. Brouillet E., Jenkins B., Hyman B. et al. Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. J. Neurochem. 1993; 60: 356–359.
14. Choo Y.S., Johnson G.V., MacDonald M. et al. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. Hum. Mol. Genet. 2004; 13: 1407–1420.
15. Fukuda A.M., Badaut J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. J. Neuroinflammation 2012; 9: 279.
16. Herrera-Mundo N., Sintes M. Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid. J. Neurochem. 2010; 114: 597–605.
17. Kendall A., Hantraye P., Palfi S. Striatal tissue transplantation in non-human primates. Prog. Brain Res. 2000; 127: 381–404.
18. Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G. et al. Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism. J. Neurol. Sci. 2014; 340: 198–207.
19. Kumar P., Kumar A. Effect of lycopene and epigallocatechin-3-gallate against 3-nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione depletion in rat: A novel nitric oxide mechanism. Food Chem. Toxicol. 2009; 47: 2522–2530.
20. Kumar P., Kumar A. Protective effect of hesperidin and naringin against 3-nitropropionic acid induced Huntington's-like symptoms in rats: Possible role of nitric oxide. Behav. Brain Res. 2010; 206: 38–46.
21. Kumar P., Padi S.S., Naidu P.S., Kumar A. Cyclooxygenase inhibition attenuates 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats: possible antioxidant mechanisms. Fundam. Clin. Pharmacol. 2007; 21: 297–306.
22. Lee W.T., Yin H.S., Shen Y.Z. The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. Neuroscience 2002; 112: 707–716.
23. Mehrotra A., Sandhir R. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: Behavioral, biochemical and histological evaluation. Behav. Brain Res. 2014; 261: 345–355.
24. Nishino H., Hida H., Kumazaki M. et al. The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise: a hypothesis to explain its specific vulnerability. J. Neurotrauma 2000; 17: 251–260.
25. Nishino H., Kumazaki M., Fukuda A. et al. Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. Neurosci. Res. 1997; 27: 343–355.
26. Ouary S., Bizat N., Altairac S., Menetrat H. Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: Implications for neuroprotection studies. Neuroscience 2000; 97: 521–530.
27. Pandey M., Borah A., Varghese M. et al. Striatal dopamine level contributes to hydroxyl radical generation and subsequent neurodegeneration in the striatum in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease in rats. Neurochem. Intern. 2009; 55: 431–437.
28. Patočka J., Bielavsky J., Cabal J., Fusek J. 3-Nitropropionic acid and similar nitro- toxins. Acta Medica (Hradec Kralove) 2000; 43: 9–13.
29. Ramaswamy S., McBride J., Kordower J. Animal models of Huntington's disease. ILAR J. 2007; 48: 356–373.
30. Sandhir R., Mehrotra A. Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: implications in Huntington's disease. Biochim. Biophys. Acta 2013; 1832: 421–430.
31. Sandhir R., Sood A., Mehrotra A., Kamboj S. N-Acetylcysteine reverses mitochondrial dysfunctions and behavioral abnormalities in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease. Neurodegener. Dis. 2012; 9: 145–157.
32. Stelmashook E.V., Isaev N.K., Lozier E.R. et al. Role of glutamine in neuronal survival and death during brain ischemia and hypoglycemia. Int. J. Neurosci. 2011; 121: 415–422.
33. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 1993; 72: 971–983.
34. Tunes I., Tasset I., Perez-De La Cruz V., Santamaria A. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. Molecules 2010; 15: 878–916.
35. Van Raamsdonk J.M. et al. Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. Hum. Mol. Genet. 2005; 14: 3823–3835.
36. Villalba R.M., Smith Y. Differential structural plasticity of corticostriatal and thalamostriatal axo-spinous synapses in MPTP-treated Parkinsonian monkeys. J. Comp. Neurol. 2011; 519: 989–1005.
37. Wüllner U., Young A.B., Penney J.B., Beal M.F. 3-Nitropropionic acid toxicity in the striatum. J. Neurochem. 1994; 63: 1772–1781.

## Experience of experimental simulation of Huntington's disease

A.V. Stavrovskaya, D.N. Voronkov, N.G. Yamshchikova, A.S. Ol'shanskiy, R.M. Khudoerkov, S.N. Illarioshkin

*Research Center of Neurology (Moscow)*

**Keywords:** Huntington disease, 3-nitropropionic acid, experimental simulation, behavioral and memory disorders, striatum, neuronal death, gliotoxicity.

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease characterized by choreic hyperkinesia, cognitive decline, behavioral disorders, and progressive neuronal death affecting primarily the striatum. The fatal nature of HD makes searching for new effective methods of treatment topical, which requires the development of experimental models of the disease. This model can be created on the basis of 3-nitropropionic acid (3-NPA) that is a neurotoxin causing characteristic changes in motor skills and memory impairment in animals due to induction of oxidative stress, impaired glutathione defense, and destruction of striatal cells. HD in rats was simulated by chronic intraperitoneal administration of 3-NPA daily for 17 days. Systemic administration of a low dose of 3-NPA (10 mg/kg) induced hyperactivity of the animals in the open field test (in-

cluding movement redundancy as a hyperkinesia analogue) and had no effect on the behavior of the animals in the X-maze test. On the contrary, rats administered with a toxic dose of 3-NPA (20 mg/kg) demonstrated a significant decrease in the motor activity and cognitive decline in behavioral tests. Histopathological analysis revealed damage and loss of neurons and decreased expression of dopaminergic markers (tyrosine hydroxylases and plasma membrane dopamine transporter) in the striatum. Also, a gliotoxic effect of 3-NPA in the striatum was found, which was confirmed by immunohistochemical staining for astrocytic proteins: GFAP, glutamine synthetase, and aquaporin-4. This HD model may be helpful for testing new experimental therapies at various stages of neurodegeneration of the Huntington type, including those based on cell neurotransplantation.

**Контактный адрес:** Ставровская Алла Вадимовна – канд. биол. наук, зав. лаб. экспериментальной патологии нервной системы Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН. 105064 Москва, пер. Обуха, д.5. E-mail: [alla\\_stav@mail.ru](mailto:alla_stav@mail.ru);

Воронков Д.Н. – ст. науч. сотр. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга;

Ямщикова Н.Г. – вед. науч. сотр. лаб. экспериментальной патологии нервной системы Отдела исследований мозга;

Ольшанский А.С. – науч. сотр. лаб. экспериментальной патологии нервной системы Отдела исследований мозга;

Худоерков Р.М. – зав. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга;

Иллариошкин С.Н. – зам. директора по научной работе, рук. Отдела исследований мозга.