

Трансплантация нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в стриатум крыс с токсической моделью болезни Гентингтона

А.В. Ставровская, Н.Г. Ямщикова, А.С. Ольшанский, Е.В. Коновалова, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

Введение. Болезнь Гентингтона (БГ) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся хореическим гиперкинезом, снижением когнитивных функций, поведенческими расстройствами и прогрессирующей гибелью нейронов, прежде всего, в стриатуме. В силу фатального характера БГ актуальным является поиск эффективных методов ее лечения, в т.ч. на основе заместительного клеточного подхода, для чего все шире используются экспериментальные модели данного заболевания.

Цель работы – оценка эффективности и безопасности трансплантации в стриатум крыс с 3-НПК-индуцированной моделью БГ нейрональных предшественников, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора.

Материалы и методы. Исследовано влияние нейротрансплантации на поведенческие эффекты крыс с моделью БГ, вызванной интрастриатным введением 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК). В основной группе животных ($n=11$) в качестве трансплантируемого материала в хвостатые ядра вводили человеческие нейрональные предшественники (5×10^5 в 5 мкл физиологического раствора билатерально), полученные из ИПСК здорового донора; в контрольной группе ($n=10$) – физиологический раствор. Тестирование животных проводилось с помощью системы видеонаблюдения Алу-таде; оценивались показатели двигательной активности в «открытом поле» и условные реакции пассивного избегания (УРПИ).

Результаты. Анализ поведенческих эффектов после трансплантации показал, что введение нейрональных ИПСК-производных в хвостатые ядра крыс с моделью БГ сопровождалось восстановлением горизонтальной и вертикальной двигательной активности животных, чего не наблюдалось в контроле. При тестировании воспроизведения реакций пассивного избегания было обнаружено, что у контрольных животных условные реакции избегания были ослаблены, тогда как интрастриатное введение нейронов привело к резкому возрастанию величины латентного периода перехода (ЛП) в темный отсек камеры УРПИ.

Заключение. По данным проведенного пилотного эксперимента на модели БГ, нейротрансплантация с использованием производных ИПСК позволяет восстановить сниженную двигательную активность крыс и улучшить сохранение памятного следа, что способствует коррекции двигательных и когнитивных нарушений, вызванных нейротоксином 3-НПК.

Ключевые слова: болезнь Гентингтона, 3-нитропропионовая кислота, нарушения поведения и памяти, стриатум, нейротрансплантация, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Введение

Болезнь Гентингтона (БГ) – тяжелое аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, связанное с экспансией полиглутамин-кодирующих CAG-повторов в гене *HTT* на коротком плече хромосомы 4 [1]. Диагноз БГ в развернутой, ранней и латентной стадиях возможен с помощью прямой ДНК-диагностики [2, 3]. Заболевание характеризуется прогрессирующей дегенерацией нейронов, в первую очередь в скорлупе и хвостом ядра, с последующим вовлечением новой коры и постепенным развитием глобальной атрофии головного мозга [4]. Клинически это проявляется сочетанием нарастающего генерализованного хореического гиперкинеза и других моторных нарушений (включая гипокинезию, мышечную ригидность, атаксию, миоклонии и т.д.), когнитивных нарушений «подкоркового» типа и поведенческих/психиатрических расстройств (раздражительность, агрессив-

ность, депрессия, психозы). Смерть наступает в среднем через 10–15 лет после появления двигательных симптомов заболевания [5, 4].

На сегодняшний день БГ остается неизлечимой, а все применяемые в клинике методы коррекции многообразных психоневрологических нарушений носят симптоматический характер. В настоящее время в мире разрабатывается ряд инновационных подходов к терапии БГ, основанных на подавлении экспрессии мутантного гена, ограничении агрегации полиглутаминовых включений в нейронах ЦНС, модулировании дофаминергической нейротрансмиссии, электрической стимуляции подкорковых структур с помощью имплантированных электродов и др. [6, 7]. Важнейшей задачей при этом признается создание нейротекторной среды для замедления текущего дегенеративного процесса и/или замещения погибших нейронов. Это можно осуществить либо путем стимулирования эндогенного

нейрогенеза, либо посредством трансплантации клеток, обладающих способностью к нейрональной дифференцировке и интеграции в соответствующие структурно-функциональные церебральные сети [8].

Для БГ существует несколько заместительных терапевтических стратегий, различающихся в т.ч. происхождением трансплантируемых стволовых клеток. Многочисленные исследования последнего десятилетия показали принципиальную возможность получения положительных эффектов такой клеточной терапии [9–13]. Однако лишь открытие феномена *индуцированных плюрипотентных стволовых клеток* (ИПСК) – клеток соматического происхождения, подвергнутых генетическому репрограммированию и способных давать начало любым тканям, предоставляет по настоящему широкие перспективы для регенеративной неврологии, избегая при этом многочисленных иммунологических, этических и других проблем [14, 15]. В силу ряда принципиальных преимуществ использование ИПСК для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и БГ, находится сегодня в центре внимания исследователей всего мира [8, 16–18].

Для изучения патогенеза и разработки методов лечения БГ были получены различные модели *in vivo* и *in vitro*, которые используются в т.ч. при проведении скрининга новых лекарственных средств [7, 19, 20]. Однако оценить эффект клеточной терапии на моделях *in vitro* чрезвычайно сложно, поскольку она на уровне целого организма предполагает взаимодействие трансплантата с клетками и тканями хозяина. Именно поэтому наиболее часто в фундаментальных и доклинических исследованиях используются химические и трансгенные модели БГ на экспериментальных животных. Большинство авторов используют химические модели для индукции БГ, обращаясь к селективным токсинам, в частности – к 3-нитропропионовой кислоте (3-НПК) [21, 22]. 3-НПК проникает через гематоэнцефалический барьер и может быть введена системно, что вызывает гибель центральных нейронов. 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, что приводит к патологии «гентингтоновского» типа [23]. И хотя патогенез 3-НПК-индуцированной нейродегенерации у крыс существенно отличается от механизмов развития БГ у людей, данная модель довольно точно воспроизводит характерную потерю шипиковых ГАМК-ергических нейронов в полосатом теле и ряд симптомов БГ [24].

Целью работы была оценка эффективности и безопасности трансплантации в головной мозг крыс с 3-НПК-индуцированной моделью БГ нейрональных предшественников, дифференцированных из ИПСК здорового донора.

Материалы и методы

Работа была выполнена на крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3–4 мес (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 метаболической модели БГ ежедневно в течение 2 нед внутрибрюшинно вводили 3-НПК в дозе 15 мг/кг. Через 2 нед после начала введения митохондриального токсина экспериментальные животные были разделены на две группы. Крысам первой группы (n=11) во время стереотаксических операций осуществляли введение в хвостатые ядра человеческих клеток, полученных из ИПСК от здорового донора и дифференцированных по нейрональному типу: в соответствии с описанным ранее протоколами, первоначально из ИПСК были получены нейросферы, которые далее разбивались до моноклеточной суспензии и культивировались в среде для нейронального роста [8]. Для стереотаксического введения были использованы следующие координаты по атласу мозга крыс [25]: AP=1,5; V=2,5; L=4,8. С целью анестезии животным вводили золетил-100 в дозе 3 мг/100 г и ксиланит в дозе 3 мг/кг внутримышечно, в качестве премедикации использовали атропин в дозе 0,04 мг/кг подкожно за 10–15 мин до введения ксиланита.

Трансплантацию клеток осуществляли билатерально. В хвостатые ядра вводили суспензию дифференцированных клеток в количестве 5×10^5 в 5 мкл физиологического раствора. Суспензию набирали в 10 мкл микрошприц Гамильтона и вводили с постоянной скоростью в течение 7 мин (0,7 мкл/мин). После инъекции микрошприц оставляли на месте в течение еще 3 мин, а затем медленно извлекали в течение одной минуты и перемещали на противоположное полушарие, где повторяли процесс. За один день до операции и далее ежедневно в течение всего эксперимента животные получали циклоспорин в дозе 15 мг/кг.

Контрольным животным (n=10) в хвостатые ядра вводили физиологический раствор в том же объеме.

Оценку изменений поведения и моторики проводили при помощи тестирования двигательной активности в «открытом поле», а также воспроизведения условных реакций пассивного избегания (УРПИ). При проведении теста в «открытом поле» в течение 3 мин определяли горизонтальную двигательную активность, при этом учитывали общее количество пересеченных квадратов. Воспроизведение пассивных оборонительных реакций оценивали по величине ЛП крыс из ярко освещенного отсека камеры в темный отсек, в котором животные накануне получали не избегаемое болевое воздействие (нанесение удара постоянным электрическим током – 0,2 мА, 3 с). Тестирование реакций УРПИ проводили через 1, 3, 7 и 14 сут после предъявления электрического раздражения.

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). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

По окончании экспериментов животных усыпляли хлороформом, затем декапитировали и извлекали мозг с целью проведения на следующем этапе работы планируемых иммуногистохимических исследований.

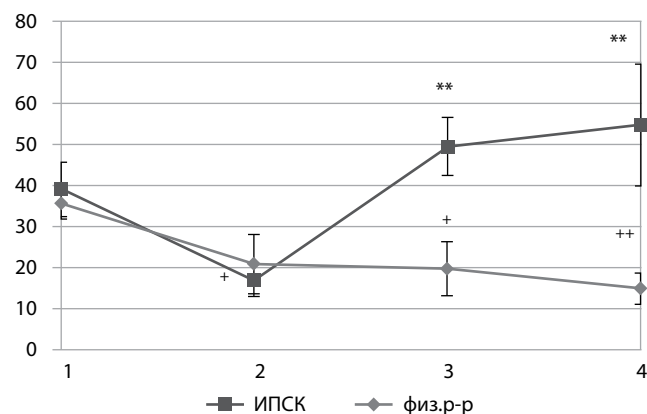
Результаты

Хроническое введение 3-НПК приводило к значительному снижению двигательной активности и исследовательско-

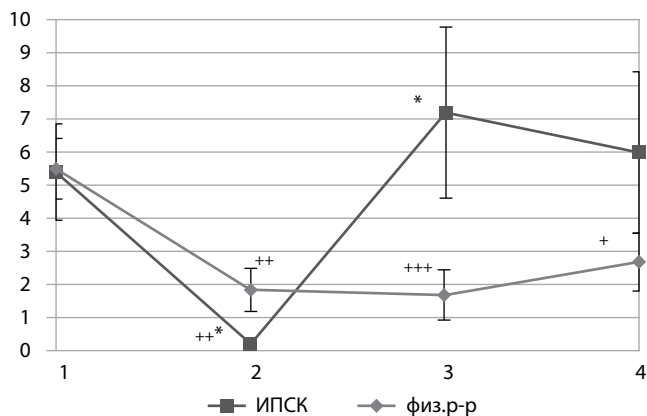
го поведения экспериментальных животных в «открытом поле», как это подробно было описано нами ранее при обработке данной экспериментальной модели БГ [26].

Трансплантация в мозг клеток – нейрональных предшественников, дифференцированных из ИПСК, приводила к выраженному увеличению двигательной активности модельных животных (рис. 1). Достоверное повышение количества перемещений крыс отмечалось уже через 10 дней после нейротрансплантации, и этот показатель оставался на высоком уровне спустя 30 дней.

При тестировании воспроизведения реакций пассивного избегания было обнаружено, что у контрольных животных условные реакции избегания были ослаблены, все крысы заходили в темный отсек камеры УРПИ с небольшим латентным периодом. Введение нейрональных предшественников в стриатум привело к резкому возрастанию величины ЛП в темный отсек камеры (рис. 2). При этом значительная величина ЛП наблюдалась не только через 1 сут после нанесения болевого раздражения, но и до 7 сут тестирования.



А



Б

рис. 1: Изменение величины горизонтальной (А) и вертикальной (Б) двигательной активности крыс с токсической (3-НПК) моделью БГ после трансплантации нейрональных предшественников.

По оси ординат: А – число пересеченных квадратов; Б – число стоек.

По оси абсцисс: 1 – до введения 3-НПК; 2 – после окончания введения 3-НПК; 3 и 4 – соответственно через 10 и 30 дней после нейротрансплантации.

*, ** – различия достоверны между группами; +, ++, +++ – различия достоверны по сравнению с фоном при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,005$ соответственно.

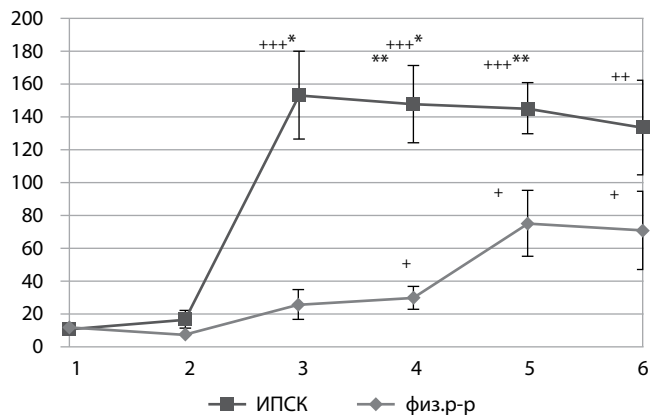


рис. 2: Изменение величины ЛП в темный отсек камеры у крыс с токсической (3-НПК) моделью БГ после трансплантации нейрональных предшественников.

По оси ординат: время в сек.

По оси абсцисс: 1 – приучение к установке; 2 – нанесение болевого раздражения; 3–6 – тестирование реакций воспроизведения условного рефлекса через 1, 3, 7 и 14 сут после нанесения болевого раздражения соответственно.

+, ++, +++ – различия достоверны по сравнению с «2», остальные обозначения – как на рис. 1.

Таким образом, проведенная нейротрансплантация позволила не только восстановить сниженную двигательную активность крыс, но и улучшить у них сохранение памятного следа, т.е. скорректировать нарушения, вызванные введением 3-НПК.

Обсуждение

В большинстве исследований, проведенных на моделях БГ, стволовые клетки трансплантируются непосредственно в стриатум, где они показывают хорошую выживаемость и интеграцию преимущественно в поврежденных участках головного мозга [21, 22, 27–29]. В современной регенеративной медицине ключевыми «игроками» из числа стволовых клеток являются ИПСК [18], исследованные в данной работе.

Успех любых экспериментальных исследований в значительной степени определяется адекватностью выбранной модели изучаемого заболевания [19]. Доказательства, подтверждающие роль нарушений энергетического обмена в клетках при многих нейродегенеративных заболеваниях, в т.ч. и при БГ, привели к более широкому использованию митохондриальных токсинов, таких как 3-НПК, при моделировании на животных соответствующих клинико-морфологических нарушений [30]. Интоксикация 3-НПК в течение нескольких дней приводит к селективному и прогрессирующему поражению полосатого тела, которое имитирует нейропатологический фенотип, наблюдаемый у пациентов с БГ [31].

Одной из основных функций базальных ганглиев является синхронизация двигательных паттернов [32], 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 большей дозе, аналогичны проявлениям наиболее тяжелых форм БГ – ювенильной и поздней акинетико-ригидной [33].

Ранее нами было показано [26], что хроническое введение 3-НПК приводит к значительному снижению двигательной активности экспериментальных животных в «открытом поле» и ухудшению сохранения памятного следа у крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. В настоящем исследовании было обнаружено, что введение в хвостатые ядра нейрональных предшественников, дифференцированных из ИПСК, сопровождается увеличением двигательной активности модельных животных до уровня, наблюдаемого перед началом введения 3-НПК. Кроме того, у таких животных восстанавливается ориентировочно-исследовательское поведение. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в ряде других работ по изучению эффекта клеточной терапии на двигательные нарушения у крыс с моделью БГ [16].

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 [34]. Особый интерес в данной работе представляло исследование эффекта нейротрансплантации на когнитивные функции модельных животных, поскольку таких данных в доступной нам литературе очень мало. Нами было показано, что введение 3-НПК приводит к грубому нарушению воспроизведения реакций пассивного избегания, что говорит об ослаблении когнитивных функций экспериментальных

крыс, нарушении воспроизведения памятного следа и ухудшении процесса обучения. Трансплантация «ранних» нейронов, имеющих потенциал дальнейшей специфической дифференцировки в конкретном микроокружении стриатума, приводит к выраженным положительным изменениям в поведении модельных животных, упрочению рефлекса пассивного избегания, улучшению обучаемости. Процедура оказалась достаточно безопасной как минимум при 30-дневном наблюдении за оперированными животными. На следующем этапе нами будет проведено тщательное иммуногистохимическое исследование мозга оперированных крыс, которое позволит доказательно оценить степень реиннервации стриатума в ответ на введение в пораженную область нейрональных клеток-предшественников.

Проведенное пилотное экспериментальное исследование показало перспективность представленной модели БГ для изучения молекулярных механизмов гибели нейронов при данном заболевании, а также возможность коррекции патологического «гентингтоновского» фенотипа путем трансплантации в стриатум ИПСК-производных нейронального ряда. Полученные данные открывают перспективу разработки новых подходов к терапии БГ и других нейродегенеративных заболеваний на основе технологий клеточного репрограммирования.

Конфликт интересов отсутствует.

References

1. 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. PMID: 8458085.
2. Ivanova-Smolenskaya I.A., Ovchinnikov I.V., Illarionovskiy S.N. et al., [Molecular and genetic testing in diagnostics of sporadic cases of Huntington's chorea]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im.Korsakova* 1998; 3: 19–22. (in Russ.).
3. Illarionovskiy S.N. [DNA diagnostics and medicogenetic consultation]. Moscow; MIA, 2004. (in Russ.).
4. Estrada Sanchez A.M., Mejia-Toiber J., Massieu L. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Arch. Med. Res.* 2008; 39: 265–276. PMID: 18279698 DOI: 10.1016/j.arcmed.2007.11.011.
5. Ivanova-Smolenskaya I.A., Markova E.D., Illarionovskiy S.N., Nikol'skaya N.N. [Monogenic hereditary diseases of the central nervous system] In: Vel'tishcheva J.E., Temina P.A. *Nasledstvennyye bolezni nervnoy sistemy. Rukovodstvo dlya vrachey* (eds). [Hereditary diseases of nervous system. Guidelines for doctors]. Moscow: Meditsina, 1998: 9–104. (in Russ.).
6. Illarionovskiy S.N. Huntington's disease as model for studying of neurodegenerative diseases. [Bulleten natsional'ogo obshchestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstroystvam dvizheniy] 2016; 1: 3–11. (in Russ.).
7. Southwell A.L., Ko J., Patterson P.H. Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 2009; 29: 13589–13602. PMID: 19864571 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4286-09.2009.
8. Nekrasov E.D., Lebedeva O.S., Vasina E.M. et al. [Platform for studying of Huntington's disease on the base of induced pluripotent stem cells]. *Annaly klinicheskoi i eksperimentalnoi nevrologii*. 2012; 4: 30–35. (in Russ.).
9. Bachoud-Levi A.-C. Neural grafts in Huntington's disease: Viability after 10 years. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 979–981. PMID: 19833293 DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70278-9.
10. Cicchetti F., Saporta S., Hauser R.A. et al. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106: 12483–12488. PMID: 19620721 DOI: 10.1073/pnas.0904239106.
11. Kerkis I., Haddad M., Valverde C., Glosman S. Neural and mesenchymal stem cells in animal models of Huntington's disease: past experiences and future challenges. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6: 232. PMID: 26667114 DOI: 10.1186/s13287-015-0248-1.
12. Maucksch C., Vazey E., Gordon R., Connor B. Stem cell-based therapy for Huntington's disease. *J. Cell. Biochem.* 2013; 114: 754–763. PMID: 23097329 DOI: 10.1002/jcb.24432.
13. Reuter I., Tai Y.F., Pavese N. et al. Long-term clinical and positron emission tomography outcome of fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2008; 79: 948–951.
14. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663–676. PMID: 16904174 DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
15. Yamanaka S., Blau H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465: 704–712. PMID: 20535199 DOI: 10.1038/nature09229.
16. Fink K., Crane A. et al., Intrastriatal transplantation of adenovirus-generated induced pluripotent stem cells for treating neuropathological and functional deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Stem Cells Translational Medicine*. 2014; 3: 620–631. PMID: 24657963 DOI: 10.5966/sctm.2013-0151.
17. Fink K., Rossignol J., Lu M. et al. Survival and differentiation of adenovirus-generated induced pluripotent stem cells transplanted into the rat striatum. *Cell Transplant*. 2013 [Epub ahead of print]. PMID: 23879897 DOI: 10.3727/096368913X670958.

18. Peng J., Zeng X. The role of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res. Ther.* 2011; 2: 32. PMID: 21861938 DOI: 10.1186/scrt73.
19. Stavrovskaya A.V., Konorova I.L., Illarionov S.N. et al., [Technologies of nervous system diseases modeling]. M.A. Piradov, S.N. Illarionov, M.M. Tanashyan (eds). *Nevrologiya XXI veka: diagnosticheskie, lechebnye i issledovatel'skie tekhnologii: Rukovodstvo dlya vrachev. V 3-kh t. T. 3: Sovremennye issledovatel'skie tekhnologii v eksperimental'noy nevrologii. [Neurology of the 21st century: diagnostic, medical and research technologies: Guidelines for doctors in 3 Vol. Vol.3: The modern research technologies in the experimental neurology]. Moscow: OOO «ATMO», 2015: 73–133. (in Russ.).*
20. Cisbani G, Cicchetti F. An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. *Cell Death Dis.* 2012; 3: e382. PMID: 22932724 DOI: 10.1038/cddis.2012.121.
21. Roberts T.J., Price J., Williams S.C., Modo M. Preservation of striatal tissue and behavioral function after neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience.* 2006; 139: 1187–1199. PMID: 16517087 DOI:10.1016/j.neuroscience.2006.01.025.
22. Ryu J.K., Kim J., Cho S.J. et al. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 2004; 16: 68–77. PMID: 15207263 DOI: 10.1016/j.nbd.2004.01.016.
23. Tuzé I., Tasset I., Perez De La Cruz V. et al. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: Past, present and future. *Molecules.* 2010; 15: 878–916. PMID: 20335954 DOI: 10.3390/molecules15020878.
24. El Massioui N., Ouary S., Cheruel F. et al. Perseverative behavior underlying attentional set-shifting deficits in rats chronically treated with the neurotoxin 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 2001; 172: 172–181. PMID: 11681849 DOI: 10.1006/exnr.2001.7766.
25. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, 1998.
26. Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Yamshikova N.G. et al. [Experience of the experimental modeling of Huntington's disease]. *Annaly klinicheskoi i neksperimentalnoi nevrologii.* 2015; 3: 49–55.
27. Bantubungi K., Blum D., Cuvelier L. et al. Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Mol. Cell Neurosci.* 2008; 37: 454–470. PMID: 18083596 DOI: 10.1016/j.mcn.2007.11.001.
28. Johann V., Schiefer J., Sass C. et al. Time of transplantation and cell preparation determine neural stem cell survival in a mouse model of Huntington's disease. *Exp Brain Res.* 2007; 177: 458–470. PMID: 17013619 DOI: 10.1007/s00221-006-0689-y.
29. Lee S.T., Chu K., Park J.E. et al. Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. *Neurosci. Res.* 2005; 52: 243–249. PMID: 15896865 DOI: 10.1016/j.neures.2005.03.016.
30. Shear D.A., Haik K.L., Dunbar G.L. Creatine reduces 3-nitropropionic-acid-induced cognitive and motor abnormalities in rats. *Neuroreport.* 2000; 11: 1833–1837. PMID: 10884028.
31. Rossignol J., Boyer C., Lévêque X. et al. Mesenchymal stem cell transplantation and DMEM administration in a 3-NP rat model of Huntington's disease: Morphological and behavioral outcomes. *Behav. Brain Res.* 2011; 217: 369–378. PMID: 21070819 DOI: 10.1016/j.bbr.2010.11.006.
32. Kendall A., Hantraye P., Palfi S. Striatal tissue transplantation in non-human primates. *Prog. Brain Res.* 2000; 127: 381–404. PMID: 11142037.
33. 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. PMID: 16300642 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x.
34. 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. PMID: 14511535 DOI: 10.1162/089892903322370744.

Transplantation of neuronal precursors derived from induced pluripotent stem cells into the striatum of rats with the toxin-induced model of Huntington's disease

A.V. Stavrovskaya, N.G. Yamshchikova, A.S. Ofshanskiy, E.V. Konovalova, S.N. Illarioshkin

Research Center of Neurology (Moscow)

Keywords: Huntington's disease, 3-nitropropionic acid, behavior and memory disorders, striatum, neurotransplantation, induced pluripotent stem cells.

Introduction. Huntington's disease (HD) is a severe neurodegenerative disorder characterized by choreic hyperkinesia, cognitive decline, behavioral disorders, and progressive neuronal death, mostly in the striatum. Since HD is a fatal disorder, searching for efficient treatment methods, including those based on cell replacement therapy, is quite relevant. The experimental models of HD are used increasingly often.

The objective of the study was to assess effectiveness and safety of transplantation of neuronal precursors differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a healthy donor into the striatum of rats with 3-NPA-induced HD model.

Materials and methods. We studied the influence of neurotransplantation on the behavioral effects in rats with HD model induced by intrastriatal injection of 3-nitropropionic acid (3-NPA). In the study group of animals (n=11), human neuronal precursors derived from iPSCs of a healthy volunteer were transplanted into the caudate nuclei (5×10^5 per $5 \mu\text{l}$ of normal saline solution bilaterally); the control group of animals (n=10) received normal

saline solution. The animals were tested using the Any-maze video tracking system; the parameters of the open-field test and the conditioned avoidance response test were evaluated.

Results. An analysis of behavioral effects after transplantation demonstrated that introduction of neuronal iPSC derivatives into the caudate nuclei of rats with induced HD model was accompanied by recovery of motor activity of the animals (horizontal and vertical), as opposed to the control group. It was found during testing the reproducibility of the conditioned avoidance responses that the conditioned avoidance responses in control animals were weakened, whereas intrastriatal transplantation of neurons abruptly increased the latency of moving into the dark compartment of the chamber in the conditioned avoidance response test.

Conclusions. The pilot experiment using the HD model showed that neurotransplantation using iPSC derivatives recovers the reduced motor activity in rats and improves memory trace keeping, which contributes to correction of motor and cognitive disorders induced by 3-NPA neurotoxin.

Контактный адрес: Ставровская Алла Вадимовна – канд. биол. наук, зав. лаб. эксперим. патологии нервной системы Отдела исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии». 105064, Москва, пер. Обуха, д. 5. E-mail: alla_stav@mail.ru;

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

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

Коновалова Е.В. – науч. сотр. лаб. клинич. и эксперим. нейрхимии;

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