

# Морфохимическая оценка результатов нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме

А.В. Ставровская, Д.Н. Воронков, Н.Г. Ямщикова, А.С. Олышанский, Р.М. Худоерков, Л.Г. Хаспеков, С.Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

*Болезнь Паркинсона характеризуется дегенерацией nigrostriatalного дофаминергического пути, что и обуславливает развитие основных двигательных симптомов заболевания. В связи с симптоматическим характером доступной на сегодня противопаркинсонической терапии в качестве альтернативы рассматриваются подходы, связанные с трансплантацией в мозг функционально сохранных дофаминергических нейронов, получаемых из фибробластов через стадию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). В настоящей работе на модели 6-ОНДА-индуцированного паркинсонизма у крыс нами были исследованы долговременные двигательные эффекты и дана морфохимическая оценка результатов трансплантации в стриатум животных дофаминергических нейронов, полученных из ИПСК человека. Нейротрансплантация в основной группе животных (n=8) приводила к достоверному улучшению двигательных функций и редукции симптоматики паркинсонизма, тогда как аналогичная трансплантация фибробластов в стриатум животных в группе сравнения (n=4) не влияла на симптоматику паркинсонизма. Иммуноморфологический анализ показал, что дифференцированные человеческие нейроны после трансплантации в мозг крыс сохраняют свою локализацию в стриатуме и остаются жизнеспособными до четырех месяцев после операции; при этом наблюдается распространение их отростков вокруг области трансплантации. Проведенное исследование показывает принципиальную возможность коррекции нарушений моторики у экспериментальных животных с 6-ОНДА-моделью паркинсонизма за счет репопуляции дофаминергических нейронов, источником которых могут быть ИПСК, получаемые из соматических клеток (фибробластов).*

**Ключевые слова:** паркинсонизм, 6-ОНДА, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дофаминергические нейроны, нейротрансплантация, иммуноморфохимическое исследование.

**Б**олезнь Паркинсона – распространенное нейродегенеративное заболевание, в развитии которого большая роль принадлежит генетическим факторам [1, 21]. Болезнь Паркинсона характеризуется прогрессирующей потерей дофаминергических нейронов среднего мозга в черной субстанции и, как следствие, значительным (свыше 80%) снижением уровня дофамина в стриатуме. Это приводит к развитию основных двигательных симптомов заболевания – брадикинезии, мышечной ригидности и тремора [22]. В связи с открытием дофаминергического дефицита в качестве ключевого патогенетического звена болезни Паркинсона наиболее эффективными подходами к лечению на протяжении многих лет являются заместительная терапия леводопой (биологическим предшественником дофамина) и назначение агонистов дофаминовых рецепторов; применяются также корректоры других звеньев центрального нейротрансмиттерного дисбаланса [4, 7]. Однако по мере прогрессирования болезни положительный эффект применяемых противопаркинсонических препаратов может становиться менее стойким, а нарастающие осложнения многолетней терапии и появления симптомов, резистентных к дофаминергической стимуляции, ставят перед врачом все новые и нередко трудноразрешимые проблемы [4, 11, 12, 22]. Следует добавить, что современные методы лечения паркинсонизма не предотвращают прогрессирования текущего нейродегенеративного процесса. Именно поэтому требуется создание новых терапевтических опций, в числе которых рассматривается восполнение дофамина в ЦНС с помощью трансплантации экзогенных

дофамин-продуцирующих клеток, потенциально способных обеспечить более длительный и стойкий эффект [5, 13, 14].

Попытки нейротрансплантации при паркинсонизме с использованием фетальных тканей среднего мозга и нейронов, полученных из эмбриональных стволовых клеток, продемонстрировали, что трансплантированные клетки могут реиннервировать стриатум, восстанавливать дофаминергическую нейротрансмиссию и в некоторых случаях улучшать двигательные дисфункции, однако этот эффект оказался плохо воспроизводимым [15, 16]. Более того, трансплантация эмбриональных клеток имеет значительные этические, религиозные, технические и практические ограничения, к тому же она связана с необходимостью стойкой иммуносупрессии в послеоперационном периоде [6, 8]. Реальной и наиболее перспективной альтернативой при паркинсонизме представляется трансплантация в головной мозг полноценных по своим морфофункциональным характеристикам дофаминергических нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [2, 9, 10, 18, 19]. В свою очередь, ИПСК можно получать из соматических тканей (фибробластов) самих пациентов, ориентированных на операцию, с помощью открытой в 2006 г. технологии клеточного репрограммирования [23, 24]. Такой подход исключает этические проблемы и обеспечивает генетическую идентичность трансплантата и организма реципиента.

В 2012–13 гг. нами совместно с Институтом общей генетики РАН и Институтом молекулярной генетики РАН начато первое в России исследование, в котором ИПСК были использованы для лечения экспериментального паркинсонизма, вызванного прямым введением в черную субстанцию нейротоксина 6-ОНДА [3]. Было показано, что стереотаксическая трансплантация полученных из ИПСК человека дофаминергических нейронов в полосатое тело крыс с паркинсонизмом приводит к отчетливому улучшению двигательных функций и редукции симптоматики паркинсонизма [3]. В настоящей работе мы представляем расширенные результаты длительного наблюдения за оперированными экспериментальными животными и данные морфохимического исследования их мозга, показывающие принципиальную возможность выживаемости трансплантированных нейронов на протяжении недель и месяцев.

## Материалы и методы

Методы получения из культивированных фибробластов человека ИПСК и их направленной дифференцировки в дофаминергические нейроны были детально описаны нами ранее [3]. Моделирование паркинсонизма у крыс с помощью нейротоксина 6-ОНДА, избирательно повреждающего дофаминергические нейроны, а также трансплантация в хвостатое ядро экспериментальных животных суспензии дофаминергических нейронов (n=8) или фибробластов (у животных в группе сравнения, n=4) проводились в соответствии с отработанными протоколами [3, 17, 20].

Для оценки величины нейротоксического повреждения дважды (через 4 и 8 нед после стереотаксических операций) крысам вводили агонист дофаминовых рецепторов апоморфин в дозе 0,1 мг/кг подкожно. Тестирование и анализ поведения экспериментальных животных проводился один раз в неделю на протяжении 12 нед. Срок переживания животных после нейротрансплантации составлял 16 нед. При проведении теста в «открытом поле» в течение 3 мин определяли горизонтальную двигательную активность; при этом учитывали общее количество пересеченных квадратов и величину пройденного пути. Фиксирование и анализ поведенческих экспериментов проводили с помощью системы видеонаблюдения за поведением животных Aputaze. Начиная с двух дней до операции нейротрансплантации и в течение всего периода эксперимента (16 нед), крысы ежедневно получали циклоспорин (12 мг/кг перорально) с целью иммуносупрессии и предотвращения иммунологической несовместимости клеток донора с мозгом реципиента.

Полученные результаты были обработаны с помощью программы STATISTICA (release7) методом Вилкоксона (Манна-Уитни).

По окончании экспериментов животные усыплялись хлороформом, затем осуществлялась декапитация и извлечение мозга.

Образцы мозга фиксировали в формалине на фосфатном солевом буфере и проводили через этанол и хлороформ для заливки в парафин. Серии фронтальных срезов (толщиной 7 мкм) готовили на микротоме Leica SR2000. Препараты окрашивали иммуногистохимическим авидинпероксидазным методом, часть препаратов также окрашивали крезиловым фиолетовым. Срезы подвергали тепловой дема-

скировке антигена в микроволновой печи (600 W, 5 мин) в цитратном буфере (0,01 M, pH=6,0). Для выявления тирозингидроксилазы (TH) и транспортера дофамина (DA) использовали моноклональные кроличьи антитела, для выявления ядерного антигена человека применяли антитела мыши. Для визуализации связывания использовали биотинилированные антитела козы против соответствующих иммуноглобулинов и экстравидинпероксидазу, в качестве хромогена применяли 3,3-диаминобензидин с хлоридом никеля (черное окрашивание) или кобальта (голубое окрашивание). Окрашивание проводили по протоколам производителя антител (Sigma). Для каждой серии препаратов ставили негативный контроль. Препараты изучали и фотографировали на микроскопе Leica DMLB (Германия), с камерой DC-300 (3 Мпкс, цветная). Морфометрическое исследование выполняли в программе Leica QWin.

## Результаты и обсуждение

У крыс с экспериментальной моделью паркинсонизма после трансплантации полученных дофаминергических нейронов в полосатое тело отмечалось отчетливое улучшение двигательных функций и редукция симптомов паркинсонического синдрома. (рис. 1, 2). Вращательное поведение, наблюдаемое в первом апоморфиновом тесте, т.е. через 4 нед после введения токсина, достоверно ослаблялось при втором тестировании через 8 нед после нейротоксического повреждения.

В группе сравнения нейротрансплантация фибробластов в хвостатые ядра крыс не оказала выраженного эффекта на поведение животных. Тестирование двигательной активности таких крыс в «открытом поле», проводимое еженедельно, не выявило статистически достоверных различий поведенческих показателей до трансплантации и спустя 5 нед (рис. 3).

На разных сроках после трансплантации (3, 5, 7, 14, 32 дня и 4 мес) проводили иммуногистохимическое исследование

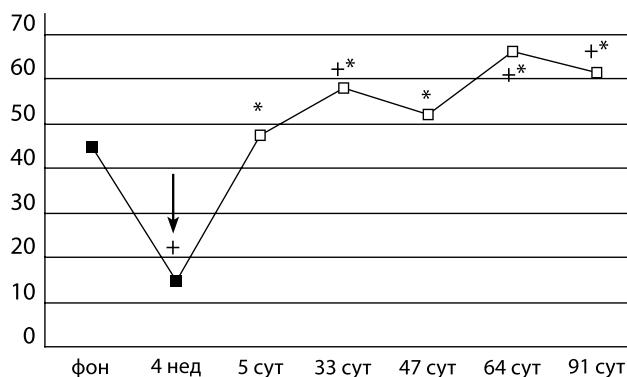


рис. 1: Изменение двигательной активности в «открытом поле» у крыс с паркинсоническим синдромом после введения дифференцированных дофаминергических нейронов в стриатум.

По оси ординат: число пересеченных квадратов; по оси абсцисс: 4 нед – время после введения токсина 6-ОНДА в черную субстанцию, 5, 33, 47, 64 и 91 сут – время после введения клеточной суспензии. Стрелкой обозначен момент введения дофаминергических нейронов;

+ – различия достоверны по сравнению с фоном (исходным уровнем двигательной активности);

\* – различия достоверны по сравнению с уровнем двигательной активности спустя 4 нед после введения токсина при  $p \leq 0,05$ .

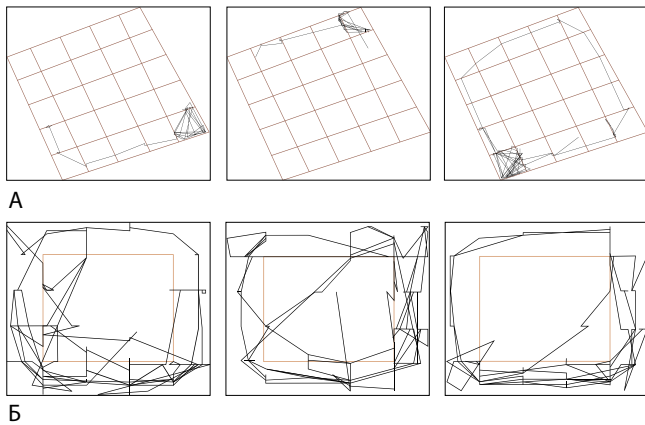


рис. 2: Примеры треков в «открытом поле» у крыс с развившимся паркинсоническим синдромом (А) и через 33 сут после введения дифференцированных дофаминергических нейронов (Б) тем же животным.

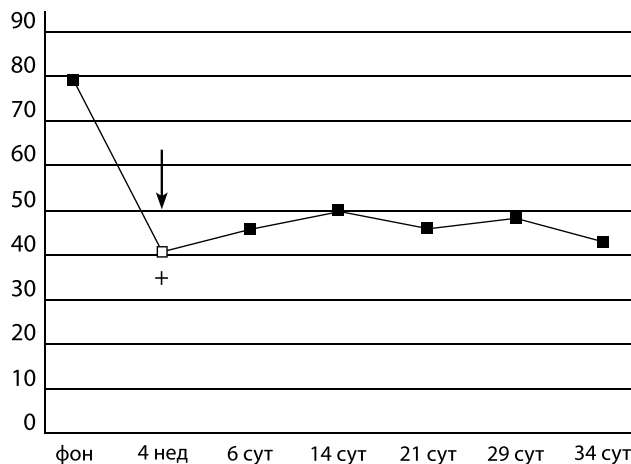


рис. 3: Динамика двигательной активности крыс с паркинсоническим синдромом в «открытом поле» после введения фибробластов в хвостатые ядра (показано стрелкой).

По оси ординат: количество пересеченных квадратов; по оси абсцисс: 4 нед – время после введения токсина 6-ОНДА в черную субстанцию; далее – число дней эксперимента между тестами; + – различия достоверны по сравнению с исходным уровнем двигательной активности при  $p \leq 0,05$ .

экспрессии нейрональных белков TH и DAT, являющихся маркерами дофаминергических нейронов, а также ядерного антигена человека (HNA) для выявления трансплантированных клеток. Одностороннее повреждение черной субстанции после интранигрального введения 6-ОНДА подтверждалось резким снижением экспрессии TH в ипсилатеральном стриатуме.

На серийных последовательных срезах в трансплантате выявляли клетки, содержащие как ядерный антиген человека, так и дофаминергические маркеры (рис. 4), причем локализация TH и DAT-позитивных клеток была одинаковой. Трансплантированные дофаминергические нейроны отличались малыми размерами (средняя площадь нейронов составила  $107 \pm 10 \text{ мкм}^2$ ).

За пределами области трансплантации наблюдали единичные дофаминовые нейроны, не экспрессирующие HNA и являющиеся собственными нейронами стриатума крысы.

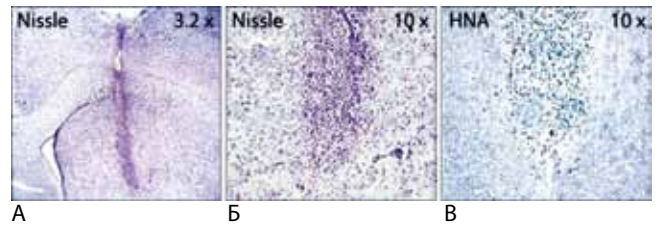


рис. 4: Трансплантация нейронов, дифференцированных из ИПСК человека, в стриатум крысы с экспериментальным паркинсонизмом. А, Б – локализация трансплантата в хвостатом ядре крысы (окраска по Нисслию); В – HNA-позитивные клетки в области трансплантации (32-й день). Обозначения: Nissle – окраска по методу Ниссля, HNA – локализация ядерного антигена человека.

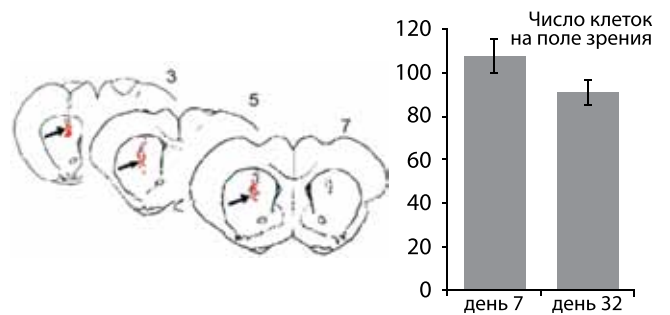


рис. 5: Локализация и число дофаминергических нейронов в разные сроки после трансплантации.

А – стрелками указана локализация дофаминергических нейронов на 3-й, 5-й и 7-й дни после трансплантации (схемы с репрезентативных препаратов); Б – плотность клеток (в поле зрения –  $0,04 \text{ мм}^2$ ), экспрессирующих ядерный антиген человека (HNA), на 7-й и 32-й дни после трансплантации.

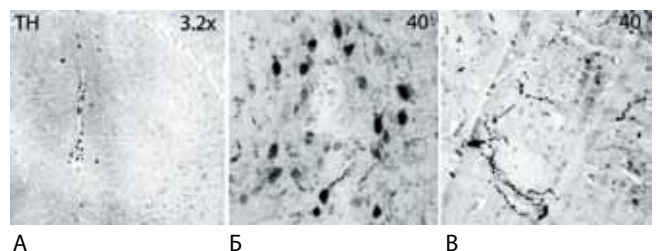


рис. 6: Выявление тирозингидроксилазы (TH) в трансплантате.

А – дофаминовая денервация стриатума на стороне разрушения черной субстанции и TH-позитивные клетки в области введения по ходу трека от иглы (32-й день); Б – TH-позитивные клетки в стриатуме области трансплантата на 2-й нед после введения; В – распространение TH-позитивных отростков в краевой зоне трансплантата на 4-й нед.

Область трансплантации к 5–7 дням была окружена глиальным валом, состоящим из астроцитарных клеток крысы.

Число HNA-позитивных клеток в области трансплантации статистически значительно снижалось в течение первой недели после введения (в среднем на 46%), после чего объем трансплантата оставался стабильным вплоть до месяца и составлял  $0,06\text{--}0,1 \text{ мм}^3$ ; при подсчете с учетом поправки Аберкромби общее число выявляемых клеток человека через 1 мес после введения составляло до 150 тыс. (рис. 5). Через 4 мес после операции HNA-позитивные клетки также

обнаруживались в области трансплантации. Миграции HNA- или TH-позитивных клеток за пределы области введения (по количественной оценке расстояния между выявляемыми нейронами) выявлено не было, что, по видимому, может свидетельствовать в том числе и о высокой степени дифференцировки клеток. Количество сохранных дофаминергических нейронов в трансплантатах на 2–4 нед после введения составило около 1% от выявляемых HNA-позитивных клеток. Начиная с 7 дня после операции, в области трансплантата наблюдали появление TH-позитивных отростков трансплантированных нейронов (рис. 6), а на сроках 32 дня и 4 мес. отростки выявлялись и за пределами области трансплантации (до 1 мм от ее границы), что позволяет предположить формирование контактов между клетками трансплантата и стриатными нейронами экспериментальных животных.

Обобщая полученные в результате иммуноморфологического исследования результаты, можно утверждать, что клетки человека, полученные из репрограммированных фибробластов и дифференцированные *in vitro* в зрелые дофаминергические нейроны, после нейротрансплантации сохраняют свою локализацию в стриатуме и остаются жизнеспособными до 4 мес после операции, при этом наблюдается распространение их отростков вокруг области трансплантации. Проведенное исследование показывает принципиальную возможность коррекции нарушений моторики у экспериментальных животных с 6-ОНДА-моделью паркинсонизма за счет репопуляции дофаминергических нейронов, источником которых могут быть ИПСК, получаемые из соматических клеток (фибробластов).

Исследование поддержано грантом РФФИ № 13-04-01730а.

## Список литературы

1. Иллариошкин С.Н., Загоровская И.А., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Генетические аспекты болезни Паркинсона. Неврол. журнал 2002; 5: 47–51.
2. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. и др. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. Анн. клин. и эксперим. неврол. 2011; 4: 37–45.
3. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. и др. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. Нейрохимия 2013; 3: 233–241.
4. Экстрапирамидные расстройства. Руководство по диагностике и лечению (под ред. В.Н. Штока, И.А. Ивановой-Смоленской, О.С. Левина). М.: МЕДпресс-информ, 2002.
5. Airavaara M., Voutilainen M.H., Wang Y., Hoffer B. Neurorestoration. Parkinsonism Relat. Disord. 2012; 18 (Suppl. 1): S143–S146.
6. Bjorklund A., Kordower J.H. Cell therapy for Parkinson's disease: what next? Mov. Disord. 2013; 28: 110–115.
7. Connolly B., Lang A.E. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: a review. JAMA 2014; 311: 1670–1683.
8. Cooper O., Hallett P., Isacson O. Using stem cells and iPSC cells to discover new treatments for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat. Disord. 2012; 18 (Suppl. 1): S14–S16.
9. Gao A., Peng Y., Deng Y., Qing H. Potential therapeutic applications of differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the treatment of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2013; 228: 47–59.
10. Hwang D.-Y., Kim D.S., Kim D.W. Human ES and iPSC cells as cell sources for the treatment of Parkinson's disease: current state and problems. J. Cell. Biochem. 2010; 109: 292–301.
11. Jenner P., Morris H.R., Robbins T.W. et al. Parkinson's disease – the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. J. Parkinson's Dis. 2013; 3: 1–11.
12. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson's disease. Lancet 2015: published online April 20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
13. Korecka JA, Verhaagen J, Hol EM: Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease. Regenerative Medicine 2007, 2: 425–446.
14. Langston J.W. The promise of stem cells in Parkinson's disease. J. Clin. Invest. 2005; 115: 23–25.
15. Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease – give up or move forward? Mov. Disord. 2013; 28: 268–273.
16. Lindvall O., Kokaia Z., Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders – how to make it work. Nat. Med. 2004; 10 (Suppl.): S42–S50.
17. Meredith G.E., Sonsalla P., Chesselet M.P. Animal models of Parkinson's disease progression. Acta Neuropathol. 2008; 115: 385–398.
18. Nishimura K., Takahashi J. Therapeutic application of stem cell technology toward the treatment of Parkinson's disease. Biol. Pharm. Bull. 2013; 36: 171–175.
19. Park I.H., Zhao R., West J.A. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 2008; 451 (7175): 141–146.
20. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, 1998.
21. Periquet M., Lücking C.B., Vaughan J.R. et al. Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from founder effects. Am. J. Hum. Genet. 2001; 68: 617–626.
22. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. J Clin Invest. 2006; 116 (7): 1744–1754.
23. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131: 861–872.
24. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663–676.

## Morphochemical evaluation of neurotransplantation outcomes in experimental Parkinsonism

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

*Scientific Center of Neurology (Moscow, Russia)*

**Keywords:** Parkinsonism, 6-OHDA, induced pluripotent stem cells, dopaminergic neurons, neurotransplantation, immunomorphochemical analysis.

Parkinson's disease is characterized by degeneration of the nigrostriatal dopaminergic pathway that underlies the basic motor symptoms of the disease. Since the currently available antiparkinsonian therapy is symptomatic by its nature, approaches associated with intracerebral transplantation of functionally intact dopaminergic neurons derived from fibroblasts through the stage of induced pluripotent stem cells (iPSCs) are considered as an alternative. In this work, based on a model of 6-OHDA-induced Parkinsonism in rats, we have studied the long-term motor effects and provided morphochemical evaluation of the outcomes of human iPSC-derived dopaminergic neuron transplantation into the animal striatum. Neurotransplantation in the main group of animals (n=8) resulted in significant improvement in

the motor functions and a reduction of the Parkinsonism symptoms, while similar transplantation of fibroblasts into the animal striatum in the control group (n=4) had no effect on the Parkinsonism symptoms. Immunomorphological analysis demonstrated that differentiated human neurons, which were transplanted into the rat brain, retain their localization in the striatum and remain viable for up to four months after surgery. In this case, the outgrowth of their processes around the transplantation site was observed. The study has demonstrated the fundamental possibility for movement disorders in experimental animals with a 6-OHDA-model of Parkinsonism due to the repopulation of dopaminergic neurons, the source of which may be iPSCs derived from somatic cells (fibroblasts).

**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. Тел.: +7 (495) 917-80-07; e-mail: [alla\\_stav@mail.ru](mailto:alla_stav@mail.ru);

Воронков Д.Н. – ст. науч. сотр. лаб. функцион. морфохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

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

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

Худоерков Р.М. – зав. лаб. функцион. морфохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

Хаспеков Л.Г. – зав. лаб. эксперим. нейрцитологии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН;

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