

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ КЛЕТОК НА РЕЗУЛЬТАТЫ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.01
УДК 575:616.858.001.6–089.844
Поступила 2.08.2017 г.

© **А.В. Ставровская**, к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной патологии нервной системы¹;
Е.В. Новосадова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики соматических клеток²;
А.С. Ольшанский, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии нервной системы¹;
Н.Г. Ямщикова, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии нервной системы¹;
А.С. Гущина, научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии нервной системы¹;
Е.Л. Арсеньева, к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики соматических клеток²;
И.А. Гривенников, д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики соматических клеток²;
С.Н. Иллариошкин, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе, руководитель отдела исследований мозга¹

¹Научный центр неврологии, Москва, 125367, Волоколамское шоссе, 80;

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 123182, пл. академика И.В. Курчатова, 2

Цель исследования — на экспериментальной модели паркинсонизма у крыс оценить влияние процедуры геномного редактирования на эффективность трансплантации в стриатум нейрональных предшественников, полученных от пациента с генетической формой болезни Паркинсона.

Материалы и методы. Паркинсонический синдром моделировали у крыс линии Wistar (n=24) путем одностороннего введения в черную субстанцию мозга селективного нейротоксина 6-гидроксидофамина, избирательно повреждающего дофаминергические нейроны. Нейрональные предшественники дифференцировали из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациента с PARK8-формой болезни Паркинсона — носителя мутации G2019S в гене *LRRK2*. В двух сериях эксперимента для нейротрансплантации использовали как клетки с исходной мутацией, так и изогенные «нормализованные» клетки, подвергнутые геномному редактированию с применением искусственной эндонуклеазной системы CRISPR/Cas9. Трансплантация нейрональных предшественников проводилась в стриатум крыс унилатерально на стороне повреждения. Изучение изменений поведения экспериментальных животных выполняли с помощью теста «открытое поле» и теста условных реакций пассивного избегания (УРПИ). Полученные данные обрабатывали в программе Statistica 7.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты. Введение нейрональных предшественников в стриатум крыс приводило к постепенному восстановлению двигательной активности экспериментальных животных в обеих группах — с трансплантированными мутантными и «нормализованными» клетками. В тесте УРПИ животные с трансплантированными мутантными клетками продемонстрировали нарушенное воспроизведение условных реакций, тогда как у крыс, получивших трансплантацию «нормализованных» клеток, воспроизведение УРПИ оказалось сходным с таковым в норме. Различия между группами в величине латентного периода перехода животных в темный отсек были статистически высокодостоверными.

Заключение. Проведенное исследование подтверждает возможность коррекции нарушений моторики и когнитивных функций при экспериментальном паркинсонизме за счет репопуляции дофаминергических нейронов, источником которых могут быть индуцированные плюрипотентные стволовые клетки из соматических клеток (фибробластов). Геномное редактирование трансплантируемых клеток с исправлением каузальной мутации существенно улучшает результаты операции, что позволяет считать такой подход перспективным у пациентов с генетически обусловленными формами болезни Паркинсона.

Для контактов: Иллариошкин Сергей Николаевич, e-mail: snillario@gmail.com

Ключевые слова: паркинсонизм; 6-гидроксидофамин; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; геномное редактирование; нейротрансплантация.

Как цитировать: Stavrovskaya A.V., Novosadova E.V., Olshansky A.S., Yamshchikova N.G., Gushchina A.S., Arsenyeva E.L., Grivennikov I.A., Illarionov S.N. Effect of cell genome editing on the outcome of neurotransplantation in experimental parkinsonism. *Modern Technologies in Medicine* 2017; 9(4): 7–13, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.01>

English

Effect of Cell Genome Editing on the Outcome of Neurotransplantation in Experimental Parkinsonism

A.V. Stavrovskaya, PhD, Head of the Laboratory of Experimental Pathology of the Nervous System¹;
E.V. Novosadova, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Somatic Cells²;
A.S. Olshansky, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Experimental Pathology of the Nervous System¹;
N.G. Yamshchikova, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Experimental Pathology of the Nervous System¹;
A.S. Gushchina, Researcher, Laboratory of Experimental Pathology of the Nervous System¹;
E.L. Arsenyeva, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Genetics of Somatic Cells²;
I.A. Grivennikov, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Somatic Cells²;
S.N. Illarionov, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Science, Head of the Department for Brain Research¹

¹Research Center of Neurology, 80 Volokolamskoye Shosse, Moscow, 125367, Russian Federation;

²Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences, 2 Academician Kurchatov Square, Moscow, 123182, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the effect of genome editing on the outcome of experimental transplantation of neuronal precursors obtained from a patient with the hereditary form of Parkinson's disease.

Materials and Methods. Parkinsonian syndrome was modeled in Wistar rats (n=24) by unilateral administration (into the substantia nigra) of the neurotoxin 6-hydroxydopamine, that selectively destroy dopaminergic neurons. The neural progenitors were differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from a patient with the PARK8 form of Parkinson's disease carrying the G2019S mutation in the *LRRK2* gene. In two series of experiments, the cells containing the mutated gene and the isogenic "normalized" cells (that underwent genome editing using the artificial endonuclease system CRISPR/Cas9) were used for neurotransplantation. The neuronal precursors were transplanted via a unilateral injection into the brain striatum of rats. We then monitored changes in the behavior of experimental animals using the open field test and the passive avoidance response (PAR) test. The data was processed using the Statistica 7.0 software with the single-factor analysis of variance (ANOVA).

Results. The administration of neuronal precursors into the rat brain striatum led to a gradual restoration of motor activity in the experimental animals of both groups, i.e., those transplanted with either mutant or "normalized" cells. In the PAR test, the rats transplanted with mutant cells failed to reproduce the conditioned responses, whereas the rats transplanted with "normalized" cells were able to reproduce the avoidance responses in the way similar to that in intact rats. The latent period before entering the dark box differed between the two groups of animals with a high degree of statistical significance.

Conclusion. The study confirms the possibility of correcting motor and cognitive impairments in experimental parkinsonian rats by replenishing the pool of dopaminergic neurons with neuronal precursors produced from iPSCs derived from somatic cells (fibroblasts). Using genome editing to correct the causal mutation in iPSCs before transplantation significantly improves the treatment results. This study, therefore, provides the rationale for further development of this promising technique and its eventual use in patients with genetically determined forms of Parkinson's disease.

Key words: parkinsonism; 6-hydroxydopamine; induced pluripotent stem cells; genome editing; neurotransplantation.

Одним из распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона (БП), в развитии которой большая роль принадлежит генетическим факторам [1]. Основными клиническими проявлениями данного заболевания служат двигательные расстройства (брадикинезия, мышечная ригидность, тремор покоя), которые обусловлены гибелью пигментированных нейронов черной суб-

станции среднего мозга, продуцирующих дофамин, с последующей дегенерацией нигростриарного дофаминергического пути [2]. БП четко ассоциирована с пожилым возрастом, встречаясь у 1–2% лиц старше 70 лет [3]. Это обстоятельство в связи с неуклонным увеличением доли пожилых лиц в структуре современного общества придает БП высокую социальную значимость.

Существующие методы лечения БП носят главным образом симптоматический характер и не предотвращают прогрессирования текущего нейродегенеративного процесса. Актуальной проблемой является разработка новых подходов к терапии данного заболевания, в числе которых на одном из первых мест рассматривается возможность восполнения уровня дофамина в ЦНС с помощью трансплантации экзогенных дофаминпродуцирующих клеток [4–6]. Попытки нейротрансплантации при паркинсонизме у человека 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 функции, однако этот эффект оказался плохо воспроизводимым [7, 8]. К настоящему моменту реальной и наиболее перспективной альтернативой при БП представляется трансплантация в стриатум полноценных по своим морфофункциональным характеристикам дофаминергических нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [9–12]. ИПСК можно получать из соматических тканей (фибробластов) самих пациентов с помощью клеточного репрограммирования [13], что исключает этические проблемы и обеспечивает генетическую идентичность трансплантата и организма реципиента.

Ранее мы показали [14, 15], что ИПСК могут быть использованы для лечения экспериментального паркинсонизма, вызванного введением в черную субстанцию мозга крыс селективного токсина дофаминергических нейронов 6-гидроксидофамина (6-OHDA): стереотаксическая трансплантация дифференцированных из ИПСК человека дофаминергических нейронов в полосатое тело модельных крыс приводила к отчетливому улучшению двигательных функций и редукции симптоматики паркинсонизма. При этом остается неясным, какое влияние на регенеративный потенциал трансплантируемых клеток оказывают мутации в генах паркинсонизма, встречающиеся у 5–10% пациентов с БП [1, 3]. Ответ на этот вопрос во многом определяет перспективы нейротрансплантации при наследственных формах БП.

Цель исследования — оценить результаты пилотного эксперимента по трансплантации мутантных и «нормализованных» изогенных нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с аутосомно-доминантной формой болезни Паркинсона (точковая мутация в гене *LRRK2*) и подвергнутых геномному редактированию с использованием искусственной эндонуклеазной системы CRISPR/Cas9.

Материалы и методы

Моделирование БП проводили на 24 крысах линии Wistar в возрасте 3–4 мес. Животные содержались в виварии института при свободном доступе к пище

и воде и чередовании суточной освещенности 12 ч света/12 ч темноты. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, the National Academies Press)», а также с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Работа одобрена Этическим комитетом Научного центра неврологии.

Для получения паркинсонического синдрома крысам повреждали дофаминергические нейроны черной субстанции мозга путем введения в ее компактную часть нейротоксина 6-OHDA (Sigma, США). Для проведения стереотаксических операций анестезированных животных помещали на раму двойного лабораторного стереотаксического манипулятора (Stoelting Co., США). Во время операции в указанную область мозга унилатерально справа вводили 6-OHDA в дозе 10,0 мкг в 2 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты со скоростью 0,4 мкл /мин в соответствии с координатами атласа мозга крыс [16] ($AP=-4,8$; $V=1,9$; $L=8,0$). В качестве анестезии при проведении хирургических манипуляций применяли Золетил 100 в дозе 3 мг/100 г и Ксиланит в дозе 3 мг/кг внутримышечно, для премедикации использовали атропин в дозе 0,04 мг/кг подкожно за 10–15 мин до введения Ксиланита. В черную субстанцию слева вводили физиологический раствор в том же объеме.

После развития паркинсонического синдрома животные были разделены на две группы по 12 особей для последующей нейротрансплантации одной из двух изучаемых линий нейрональных предшественников, дифференцированных из ИПСК (см. далее). Трансплантация проводилась в хвостатые ядра мозга в соответствии с координатами атласа мозга крыс [16] ($AP=1,5$; $V=2,5$; $L=4,8$). Животные были анестезированы по схеме, описанной выше.

Трансплантацию клеток осуществляли унилатерально, на стороне повреждения. В хвостатые ядра вводили суспензию дифференцированных клеток в 10 мкл физиологического раствора. Суспензию набирали в 25-мкл микрошприц Гамильтона и вводили с постоянной скоростью в течение 10 мин (1,0 мкл/мин). После инъекции микрошприц оставляли на месте в течение еще 2 мин, затем медленно извлекали в течение одной минуты. В хвостатые ядра слева вводили физиологический раствор в том же объеме. За один день до операции и далее ежедневно в течение всего эксперимента животные получали циклоспорин в дозе 15 мг/кг.

В работе были использованы следующие полученные ранее линии ИПСК [17]:

клетки от пациента с аутосомно-доминантной формой БП (форма PARK8, мутация G2019S в гене *LRRK2*), обозначение линии — IPSPDL2.15L (далее — «больные» клетки);

клетки этого же пациента после геномного редактирования, в ходе которого была проведена коррекция мутации с восстановлением нормальной нуклеотидной последовательности гена *LRRK2* — линия IPSPDL2.15 wt (далее — «редактированные» клетки).

Культивирование ИПСК. Клетки культивировали в чашках Петри 35 и 60 мм (Greiner Bio-One, Австрия) на подложке из матригеля (BD Biosciences, США) в среде mTeSR (STEMCELL Technologies, Канада). Смену среды производили один раз в сутки. Для пересева клетки снимали с подложки с помощью фермента диспазы в концентрации 1 мг/мл (Gibco, США), инкубируя клетки с ферментом 7–10 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C. После этого клетки 5 раз отмывали от диспазы средой DMEM («ПанЭко», Россия), колонии клеток механически снимали широким концом пластикового наконечника на 200 мкл и переносили в 1 мл среды mTeSR, а потом высевали в новую чашку Петри, покрытую матригелем и содержащую 1 мл среды mTeSR. Пассирование клеток 1:2 или 1:3 осуществляли каждые 5–7 дней.

Дифференцировка ИПСК в нейрональные предшественники. ИПСК культивировали в среде mTeSR до достижения 80% конфлюэнтности, далее среду заменяли на нейрональную следующего состава: среда DMEM/F12 (Gibco, США); 2% заменитель сыворотки (Gibco, США); 1 мМ заменимые аминокислоты («ПанЭко», Россия); 2 мМ L-глутамин (ICN Biomedical, США); пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл, 50 мкг/мл; «ПанЭко», Россия); добавка 1% N2 (Life Technologies, США); 10 мкМ ингибитор SB431542 (Stemgent, США); 80 нг белок Noggin (Peprotech, США). Смену среды осуществляли ежедневно в течение 7–10 дней. Сформированные нейрональные розетки и гребни механически отделяли и переносили в 24-луночный планшет с предельно низкой адгезией (Costar, США), где впоследствии формировались нейросферы, которые еще 5–7 дней культивировали в планшете.

Нейросферы собирали в центрифужные пробирки, диссоциировали до моноклеточной суспензии с помощью трипсина (0,05%) и высевали в чашки Петри, покрытые матригелем, в нейрональную среду следующего состава: среда DMEM/F12; 2% заменитель сыворотки; 1 мМ заменимые аминокислоты; 2 мМ L-глутамин; пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл, 50 мкг/мл); добавка 1% N2; добавка 1% B27 (Gibco, США); 10 мкМ ингибитор SB431542; 80 нг белок Noggin с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора (Stemcell Y27632; Stemgent, США). Нейрональные предшественники при достижении плотного монослоя пассировали 1:4.

Подготовка нейрональных предшественников для трансплантации крысам. Нейрональные предшественники 2–4-го пассажа рассеивали по 200 тыс. клеток на 1 см² в чашки Петри, покрытые матригелем, в нейрональную среду.

На следующий день среду заменяли на дифференцировочную: среда DMEM/F12; 2% заменитель сы-

воротки; добавка 1% B27; 2 мМ глутамин; 1% смесь аминокислот («ПанЭко», Россия); пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл, 50 мкг/мл); 100 нг/мл белок Shh (PeproTech, США); 100 нг/мл FGF8 — фактор роста фибробластов (PeproTech, США) и 10 мкМ пурморфамин (Stemgent, США).

Клетки культивировали в течение 6–8 дней, среду меняли через день. В день подсадки клетки снимали с помощью трипсина (0,05%), аккуратно пипетировали, проводили подсчет в камере Горяева и необходимое количество суспензии центрифугировали при 350 g в течение 5 мин. Супернатант сливали и клетки пипетировали в дифференцировочной среде с добавлением 5 мкМ ROCK-ингибитора. Для подсадки одной крысе использовали 500 тыс. клеток (для IPSPDL2.15L) и 250 тыс. клеток (для IPSPDL2.15 wt). Суспензию клеток аликвотировали (по 500 (200) тыс. клеток) в 1 мл среды) в эппендорфы и помещали в водяную баню при 37°C. Непосредственно перед использованием эппендорф с клетками брали из водяной бани, центрифугировали на микроцентрифуге при 2 тыс. оборотов в течение 5 мин, супернатант тщательно удаляли и вносили 10 мкл стерильного 0,9% NaCl, аккуратно пипетировали суспензию клеток и набирали в микрошприц для последующего введения.

Физиологические тесты. Двигательные функции крыс оценивали с помощью теста «открытое поле»: учитывалось число пересеченных квадратов за 3 мин. Изучение нарушений когнитивных функций и оценку динамики эмоционального состояния экспериментальных крыс проводили с помощью теста условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Данный тест позволяет оценить как когнитивные нарушения, так и изменения эмоционального состояния крыс с моделями различных патологий, в частности с паркинсоническим синдромом [18–20]. Воспроизведение пассивных оборонительных реакций оценивали по длительности латентного периода перехода крыс из ярко освещенного отсека камеры в темный отсек, в котором животные накануне получали неизбежное болевое воздействие (нанесение удара постоянным электрическим током 0,2 мА, 3 с). Тестирование таких реакций проводили через 1, 3, 7 и 14 сут после предъявления электрического раздражения. Тесты УРПИ выполняли с помощью программы ShutAvoid 1.8.03 на установке ф. PanLab/Harvard Apparatus (Испания).

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 декапировали и извлекали мозг с целью проведения планируемых иммуногистохимических исследований.

Результаты. В течение 4 нед после нейротоксического повреждения дофаминергических нейронов черной субстанции наблюдали развитие пар-

кинсонического синдрома у экспериментальных животных. Подробнее оценка получаемых нарушений изложена в наших более ранних работах [15]. Нейротрансплантацию дифференцированных ИПСК различных линий проводили в период, когда двигательные нарушения у модельных крыс были отчетливо выражены, но не наблюдалось акинезии.

Особый интерес в данной работе представляло сравнение эффекта нейротрансплантации изогенных ИПСК двух видов — мутантного и «дикого» (восстановленного после геномного редактирования) — на двигательные и когнитивные функции модельных животных, поскольку такие данные в доступной нам литературе практически отсутствуют.

Через 2 нед после хирургических процедур было начато тестирование двигательной активности животных в «открытом поле». Ранее нами было показано [14], что введение дифференцированных ИПСК приводило к постепенному восстановлению двигательной активности экспериментальных крыс. Этот результат был воспроизведен и в данной работе в обеих группах животных, причем статистически значимых различий тестируемых показателей между группами не выявлено (рис. 1).

После достижения устойчивого улучшения локомоции (т.е. через 4 нед после нейротрансплантации) было проведено изучение воспроизведения по тесту УРПИ (рис. 2). Животные 1-й группы, с трансплантированными мутантными («большими») клетками, продемонстрировали нарушенное воспроизведение условных реакций. Все животные этой группы переходили в темный отсек камеры с небольшим латентным периодом, длительность которого практически не менялась при последующих тестированиях; более того, во все дни тестирования не наблюдалось статистически значимых различий латентного периода с днем нанесения болевого шока. У 2-й группы крыс — с трансплантированными «нормализованными» клетками (т.е. с нейрональными предшественниками, в которых был восстановлен нормальный генотип), воспроизведение реакций УРПИ оказалось весьма сходным с хорошо известным паттерном, характерным для животных без каких-либо токсических воздействий. Через сутки после нанесения болевого воздействия экспериментальные животные либо вовсе не переходили в темный отсек, либо переходили с большим латентным периодом. Значительная длительность латентного периода наблюдалась также через 3 сут после болевого шока и предсказуемо снизилась через 7 сут. Интересно, что через 14 сут латентный период перехода резко уве-

личился и сравнился с зафиксированным через 24 ч. Причины такого скачка значений латентного периода пока не вполне ясны.

Различия в величине латентного периода у крыс, получивших в качестве трансплантата мутантные и

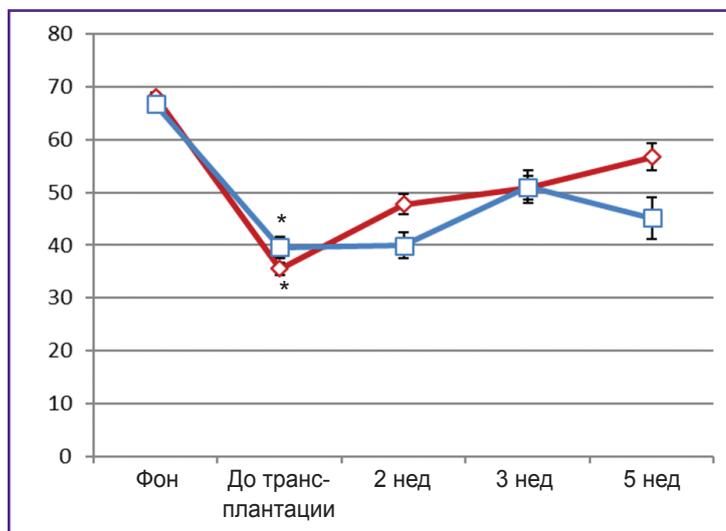


Рис. 1. Динамика восстановления двигательной активности экспериментальных крыс в тесте «открытое поле»:

по оси ординат — число пересеченных квадратов, по оси абсцисс — время тестирования; красная линия — группа крыс с трансплантацией клеток от большого донора («больные» клетки); синяя линия — группа крыс с трансплантацией «редактированных» клеток от большого донора; * — различия статистически значимы со значениями двигательной активности перед нейротрансплантацией; $p \leq 0,05$

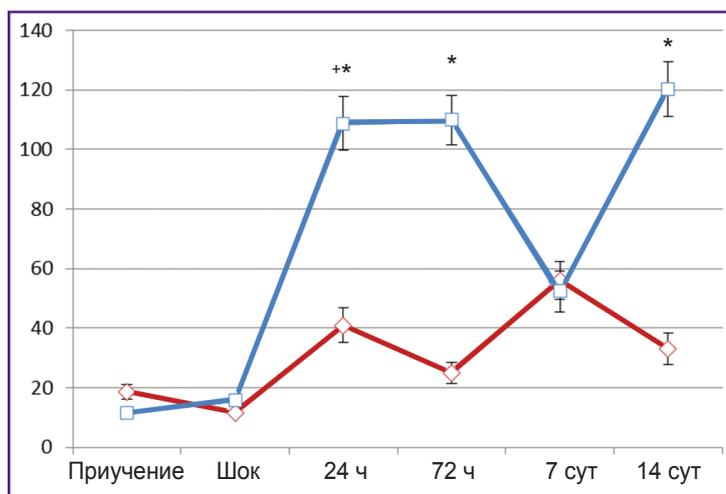


Рис. 2. Изменение длительности латентного периода перехода экспериментальных крыс в темный отсек камеры:

по оси ординат — время в секундах; по оси абсцисс — время тестирования; красная линия — группа крыс с трансплантацией клеток от большого донора («больные» клетки); синяя линия — группа крыс с трансплантацией «редактированных» клеток от большого донора; * — при сравнении с «большими» клетками; * — различия статистически значимы со значениями в день нанесения болевого раздражения; $p \leq 0,05$

«нормализованные» клетки, были статистически высокодостоверны во всех проведенных тестированиях (кроме тестирования через 7 сут): «больные» клетки vs «редактированные» клетки через 24 ч — $p < 0,46$; через 72 ч — $p < 0,004$; через 14 сут — $p < 0,021$.

Обсуждение. Развитие паркинсонизма, помимо изменений в двигательной сфере, сопровождается закономерными нарушениями эмоционального состояния и когнитивной сферы [21, 22]. Возникновение этих нарушений объясняется в значительной степени тем, что наряду с дегенеративными изменениями nigrostriatной системы мозга при БП происходит также вовлечение мезолимбической и мезокортикальной дофаминергических систем. Недвигательные (в том числе когнитивные) нарушения сопровождают все стадии БП и в ряде случаев опережают манифестацию двигательных нарушений на 5–10 лет и более [23, 24].

Среди часто встречаемых когнитивных нарушений, наблюдаемых на ранних стадиях БП, отмечаются замедление психических процессов (брадифрения), ухудшение внимания, нарушение запоминания [25]. С прогрессированием заболевания нарушения когнитивных функций усиливаются, происходит более грубое снижение внимания, памяти, ориентации и мышления, усиливаются зрительно-пространственные нарушения. Развитие деменции в поздней стадии БП значительно затрудняет повседневную деятельность пациента. В связи с этим роли недвигательных проявлений в ранней диагностике и прогнозе развития БП в последние годы придается существенное значение.

Болезнь Паркинсона — это не только патология дофаминергической системы, она также характеризуется вовлечением в патологический процесс ацетилхолинергической, норадренергической и глутаматных медиаторных систем. Показано, что снижение содержания катехоламинов в мозге после выработки УРПИ приводит к дефициту их выполнения, что рассматривается как проявление ретроградной амнезии [26]. Такое действие оказывает и введение 6-ОНДА в черную субстанцию мозга. Вместе с тем известно, что пассивное оборонительное поведение животных обусловлено механизмами страха и отражает состояние тревожности [27, 28]. Хорошо известна роль дофаминергической системы в механизмах памяти [29]. О важном значении дофаминергической системы для воспроизведения УРПИ свидетельствуют результаты нейрофармакологического воздействия на дофаминовые D2-рецепторы [27]. Как известно, избегаемый/контролируемый стресс вызывает увеличение высвобождения дофамина в прилежащем ядре, тогда как предъявление неконтролируемых раздражений уменьшает высвобождение дофамина [30]. Предполагается, что вовлечение дофамина больше связано с нейронными механизмами информационного процесса, определяющего стратегию поведения.

Детальные механизмы влияния трансплантатов, содержащих «редактированные» клетки, на манифестировавшую у животных психоневрологическую

симптоматику пока не вполне ясны. Очевидно, что трансплантация нейрональных предшественников, несущих исходную мутацию, способствовала уменьшению выраженности только двигательных симптомов паркинсонизма, тогда как трансплантация «редактированных» клеток редуцировала одновременно и двигательные, и когнитивные расстройства (сохранение памятного следа). Такой дифференцированный эффект может быть связан с более широким влиянием «редактированных» клеток на дофаминергические структуры разных уровней ЦНС, а также с их более выраженным (по сравнению с «больными» клетками) модулирующим воздействием на высвобождение глутамата, гамма-аминомасляной кислоты и других нейротрансмиттеров в базальных ганглиях и их кортикальных проекциях. Решение этого вопроса требует дальнейших комплексных исследований.

Заключение. Проведенное исследование показывает принципиальную возможность коррекции нарушений моторики и когнитивных функций у экспериментальных животных с 6-ОНДА-моделью паркинсонизма за счет репопуляции дофаминергических нейронов, источником которых могут быть индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые из соматических клеток (фибробластов). Благодаря технологии геномного редактирования такой подход может быть применим и у пациентов с наследственными (генетически обусловленными) формами болезни Паркинсона.

Финансирование исследования. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда №14-15-01047-П.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Литература/References

1. Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. Неврологический журнал 2015; 20(4): 4–13. Illarioshkin S.N. Modern view on etiology of Parkinson's disease. *Nevrologicheskiy zhurnal* 2015; 20(4): 4–13.
2. Экстрапирамидные расстройства. Под ред. Штока В.Н., Ивановой-Смоленской И.А., Левина О.С. М: МЕДпресс-информ; 2002. *Ekstrapiramidnye rasstroystva* [Extrapyramidal disorders]. Pod red. Shtoka V.N., Ivanovoy-Smolenskoy I.A., Levina O.S. [Shtok V.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Levin O.S. (editors)]. Moscow: MEDpress-inform; 2002.
3. Wirdefeldt K., Adami H.-O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 2011; 26(S1): 1–58, <https://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>.
4. Airavaara M., Voutilainen M.H., Wang Y., Hoffer B. Neurorestoration. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18: S143–S146, [https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(11\)70045-1](https://doi.org/10.1016/s1353-8020(11)70045-1).
5. Korecka J.A., Verhaagen J., Hol E.M. Cell-replacement and gene-therapy strategies for Parkinson's and Alzheimer's disease. *Regen Med* 2007; 2(4): 425–446, <https://doi.org/10.2217/17460751.2.4.425>.

6. Langston J.W. The promise of stem cells in Parkinson disease. *J Clin Invest* 2005; 115(1): 23–25, <https://doi.org/10.1172/jci24012>.
7. Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease — give up or move forward? *Mov Disord* 2013; 28(3): 268–273, <https://doi.org/10.1002/mds.25378>.
8. Lindvall O., Kokaia Z., Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders — how to make it work. *Nat Med* 2004; 10(7): S42–S50, <https://doi.org/10.1038/nm1064>.
9. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2011; 5(4): 37–45. Lebedeva O.S., Lagarkova M.A., Illaroshkin S.N., Khaspekov L.G., Grivennikov I.A. Induced pluripotent stem cells: new possibilities in neurobiology and neurotransplantation. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy neurologii* 2011; 5(4): 37–45.
10. 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, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.076>.
11. 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(2): 292–301, <https://doi.org/10.1002/jcb.22411>.
12. Nishimura K., Takahashi J. Therapeutic application of stem cell technology toward the treatment of Parkinson's disease. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(2): 171–175, <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00929>.
13. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–872, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
14. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. *Нейрохимия* 2013; 30(3): 233–241, <https://doi.org/10.7868/s1027813313030084>. Lebedeva O.S., Lagarkova M.A., Kiselev S.L., Mukhina I.V., Vedunova M.V., Usova O.V., Stavrovskaya A.V., Yamshchikova N.G., Fedotova E.Y., Grivennikov I.A., Khaspekov L.G., Illaroshkin S.N. The morphofunctional properties of induced pluripotent stem cells derived from human skin fibroblasts and differentiated to dopaminergic neurons. *Neurochemical Journal* 2013; 7(3): 207–214, <https://doi.org/10.1134/s1819712413030082>.
15. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Худоерков Р.М., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Морфохимическая оценка результатов нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2015; 9(2): 28–32. Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Yamshchikova N.G., Olshanskiy A.S., Khudoerkov R.M., Khaspekov L.G., Illaroshkin S.N. Morphochemical evaluation of neurotransplantation outcomes in experimental Parkinsonism. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy neurologii* 2015; 9(2): 28–32.
16. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press; 1998.
17. Vetchinova A.S., Novosadova E.V., Abramychева N.Yu., Grivennikov I.A., Illaroshkin S.N. PARK8 form of Parkinson's disease: induced pluripotent stem cells-based model and genome editing of LRRK2 mutation. *Асимметрия* 2016; 10(4): 90–96. Vetchinova A.S., Novosadova E.V., Abramychева N.Yu., Grivennikov I.A., Illaroshkin S.N. PARK8 form of Parkinson's disease: induced pluripotent stem cells-based model and genome editing of LRRK2 mutation. *Asimetriya* 2016; 10(4): 90–96.
18. Мирошниченко Е.В., Ставровская А.В., Шугалев Н.П., Ленард Л., Хартманн Г. Изменения эмоционального состояния крыс при воспроизведении реакций пассивного избегания после введения нейротензина в прилежащее ядро мозга. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова* 2010; 60(6): 704–711. Miroshnichenko E.V., Stavrovskaya A.V., Shugalev N.P., Lenard L., Hartmann G. Emotional state variations in rats during recall of passive avoidance reactions after neurotensin administration into nucleus accumbens of brain. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova* 2010; 60(6): 704–711.
19. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Каширина Э.А. Влияние нейротензина на последствие болевого стресса у крыс с нейротоксическим повреждением серотонинергических структур черной субстанции мозга. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова* 2013; 63(3): 384–394. Shugalev N.P., Stavrovskaya A.V., Yamshikova N.G., Olshansky A.S., Kashirina E.A. Neurotensin influence on painful stress afteractions in rats with neurotoxic damages of serotonergic structures of brain substantia nigra. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova* 2013; 63(3): 384–394, <https://doi.org/10.7868/s004446771303012x>.
20. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Мирошниченко Е.В. Воспроизведение реакций пассивного избегания после введения нейротензина в прилежащее ядро мозга у крыс на фоне действия резерпина. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова* 2012; 62(3): 357–363. Shugalev N.P., Stavrovskaya A.V., Yamshikova N.G., Olshansky A.S., Miroshnichenko E.V. Reproduction of passive avoidance reactions after neurotensin microinjection into nucleus accumbens of rat brain against the background of reserpine action. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova* 2012; 62(3): 357–363.
21. Stein M.B., Heuser I.J., Juncos J.L., Uhde T.W. Anxiety disorders in patients with Parkinson's disease. *Am J Psychiatry* 1990; 147(2): 217–220, <https://doi.org/10.1176/ajp.147.2.217>.
22. Uc E.Y., Tippin J., Chou K.L., Erickson B.A., Doerschug K.C., Jimmeh Fletcher D.M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *European Neurological Review* 2012; 7(1): 35–40, <https://doi.org/10.17925/enr.2012.07.01.35>.
23. Вендрова М.И., Голубев В.Л., Садеков Р.А., Вейн А.М. Двигательные, когнитивные и аффективные расстройства при болезни Паркинсона. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2002; 102(3): 13–17. Vendrova M.I., Golubev V.L., Sadekov R.A., Vein A.M. Motor, cognitive and affective disorders in Parkinson's disease. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* 2002; 102(3): 13–17.

24. Chaudhuri K.R., Healy D.G., Schapira A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 2006; 5(3): 235–245, [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(06)70373-8).
25. Яхно Н.Н. Когнитивные расстройства в неврологической клинике. *Неврологический журнал* 2006; 11(S1): 4–12. Yakhno N.N. Cognitive impairment in neurological clinical practice. *Nevrologicheskiy zhurnal* 2006; 11(S1): 4–12.
26. Alves C.S., Andreatini R., da Cunha C., Tufik S., Vital M.A.B. Phosphatidylserine reverses reserpine-induced amnesia. *Eur J Pharmacol* 2000; 404(1–2): 161–167, [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00607-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00607-5).
27. Дубровина Н.И., Попова Е.В., Ильюченко Р.Ю. Компенсаторно-восстановительные эффекты квинпиrolа при угашении условного навыка и амнезии у мышей с альтернативными стереотипами поведения. *Экспериментальная и клиническая фармакология* 2001; 64(3): 13–16. Dubrovina N.I., Popova E.V., Ilyuchenok R.Yu. A compensating-reactivating effect of quinpirole on the extinction of conditional habit and amnesia in mice with alternative behavioral stereotypes. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2001; 64(3): 13–16.
28. Molodtsova G.F. Metabolism and receptor binding of serotonin in brain structures during performance of a conditioned passive avoidance response. *Neurosci Behav Physiol* 2005; 35(7): 685–692, <https://doi.org/10.1007/s11055-005-0111-4>.
29. Goldman-Rakic P.S. The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Adv Pharmacol* 1997; 42: 707–711, [https://doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)60846-7](https://doi.org/10.1016/s1054-3589(08)60846-7).
30. Cabib S., Puglisi-Allegra S. Opposite responses of mesolimbic dopamine system to controllable and uncontrollable aversive experiences. *J Neurosci* 1994; 14(5 Pt 2): 3333–3340.