

Клеточные модели заболеваний нервной системы

Л.Г. Хаспеков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Клеточные модели являются важнейшим исследовательским инструментом в современной нейробиологии. Представленный обзор отечественной и зарубежной литературы обобщает основные данные экспериментальных исследований последних 15 лет, направленных на моделирование in vitro острых и хронических форм церебральной патологии с целью выяснения механизмов их патогенеза и поиска способов их фармакологической коррекции. Представлены результаты моделирования ишемических нейродеструктивных процессов, эпилепсии, болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, полученные с использованием современных клеточных методов исследования, таких как культивирование клеток в мультиэлектродной системе и технология индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Ряд ключевых положений по данной проблеме проиллюстрирован собственными приоритетными результатами автора и его лаборатории. Сформулированы ближайшие цели и перспективы исследований in vitro патогенетических механизмов заболеваний нервной системы и поиска новых нейропротекторов.

Ключевые слова: культура клеток нервной системы; моделирование неврологических заболеваний; нейропротекция; современные клеточные технологии.

Адрес для корреспонденции: 105064, Россия, Москва, пер. Обуха, д. 5, Отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН. E-mail: khaspekleon@mail.ru. Хаспеков Л.Г.

Для цитирования: Хаспеков Л.Г. Клеточные модели заболеваний нервной системы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2018; 12 (Специальный выпуск): 70–78.

DOI: 10.25692/ACEN.2018.5.9

Cellular models of the nervous system diseases

Leonid G. Khaspekov

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Cellular models are a very important research tool in modern neurobiology. The presented review of Russian and international literature summarizes the main data of experimental studies, conducted over the past 15 years, aimed at modeling in vitro acute and chronic forms of cerebral pathology in order to reveal the mechanisms of their pathogenesis and to develop approaches to their pharmacological correction. The results of modeling of ischemic neurodestructive processes, epilepsy, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Huntington's disease, obtained using modern cellular research methods, such as cell cultivation in a multielectrode system and technology of induced pluripotent stem cells, are presented. A number of key concepts related to this problem are illustrated with the data obtained by the author and his laboratory. In conclusion, the short-term goals and prospects of in vitro studies of pathogenic mechanisms of neurological diseases and of the search for new neuroprotectors are formulated.

Keywords: nerve cell culture; modeling of neurological diseases; neuroprotectors; modern cellular technologies.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, per. Obukha, 5, Department for Brain Research, Research Center of Neurology. E-mail: khaspekleon@mail.ru. Khaspekov L.G.

For citation: Khaspekov L.G. [Cellular models of the nervous system diseases]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2018; 12 (Special issue): 70–78 (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2018.5.9

Введение

Со времени первых экспериментальных нейробиологических исследований (R.G. Harrison, 1907, 1910), основным объектом которых стала культура клеток и ткани нервной системы, в мировой и отечественной литературе по данной проблеме опубликованы тысячи статей, сотни монографий и сборников трудов многочисленных научных мероприятий. Постоянное совершенствование методов культивирования привело к тому, что нервные клетки *in vitro* оказались способными к специфической дифференцировке, формированию миелиновых оболочек, синаптогенезу, генерации спонтанной и вызванной биоэлектрической активности.

Если для культивирования используются фрагменты ткани (эксплантаты) различных структур нервной системы, то получают *органотипические культуры*. При культивировании изолированных клеток, получаемых путем механической и/или ферментативной диссоциации ткани, речь идет о *диссоциированных культурах*.

Эксперименты на органотипических культурах спинальных ганглиев, спинного мозга, мозжечка, гиппокампа, гипоталамуса, новой коры, гипофиза, ствола мозга и других структур показали, что при культивировании эмбриональных и ранних постнатальных тканей ЦНС происходят взаимосвязанные и последовательные процессы организации эксплантата. Конечным результатом этих процес-

сов является формирование органотипической структуры, которой свойственны основные цитоархитектонические черты ткани, взятой для культивирования, т.е., реализация тех цитотипических признаков, которые обусловлены генотипом клеток данной популяции. Именно это позволяет рассматривать органотипическую культуру тканей ЦНС в качестве полноценного с морфофункциональной и нейрорхимической точек зрения аналога нервной ткани *in situ*. Исследование процессов дифференцировки нейронов в диссоциированных культурах клеток различных структур головного мозга также выявило формирование ряда специфических фенотипических признаков, присущих этим нейронам *in vivo*. Например, в культивируемых нейронах неостриатума показана высокая активность ацетилхолинэстеразы и моноаминоксидазы [1], а в нейронах культур клеток черной субстанции обнаружен высокий уровень синтеза дофамина [2].

В решение ряда проблем гистогенеза нервной ткани значительный вклад внесли исследования *реагрегированных культур клеток* мозга, позволившие проанализировать роль клеточной мембраны в межклеточном узнавании, подборе клеточной популяции, рассортировке отдельных клеток по признаку родства (аффинитета) и, в конечном итоге, в формировании гистотипических клеточных ассоциаций при агрегации клеток. Внутри агрегатов, сформировавшихся в клеточной суспензии, приготовленной из различных структур мозга (гиппокампа, новой коры и других), происходят процессы миграции и рассортировки клеток, которые завершаются формированием гистотипической структуры, сходной со структурой мозговой формации, взятой для диссоциации.

В нашей стране наиболее значимые результаты исследований на культурах нервных клеток и ткани различных структур нервной системы были получены в работах выдающегося отечественного нейроморфолога, доктора биологических наук, профессора И.В. Викторова (1932–2013) с сотрудниками организованной им лаборатории экспериментальной нейроцитологии в Институте мозга (ныне – Отдел исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии»). Оригинальные результаты, полученные И.В. Викторовым [3] с использованием светомикроскопических, ультраструктурных и биохимических методов исследования *in vitro* клеток и ткани различных структур нервной системы, установили зависимость динамики дифференцировки нейронов и формирования органотипической организации и системных синаптических связей от стадии онтогенетического развития структур мозга, взятых для культивирования. Были выявлены ведущие факторы развития и регенерации нервных клеток, а именно – специфичность, как проявление детерминированности нейроонтогенеза, и морфогенетическая пластичность, как способность развивающихся и зрелых нейронов к адаптивным перестройкам пространственной организации дендритов и аксонов в ответ на изменение межклеточных взаимодействий. Установлено, что при нарушении межклеточных взаимодействий морфогенетическая пластичность нейронов проявляется в изменении размеров, формы и ориентации дендритов, коллатеральном и терминальном росте аксонов, что ведет к образованию атипических систем межнейронных синаптических связей. Сформулирована гипотеза, раскрывающая один из возможных механизмов гетерохронного формирования синаптически взаимосвязанных нервных центров. На разработанной И.В. Викторовым модели глиомезодермального рубца показано, что одной из причин abortивной

регенерации нервной системы является искажение направленного роста аксонов глиальными клетками и фибробластами, а также нарушение специфичности афферентных межнейронных взаимодействий и формирование атипических систем синаптических связей, обусловленных пластичностью нервных клеток.

Таким образом, данные по цито- и гистогенезу в тканевых и клеточных культурах, полученные в работах второй половины прошлого столетия, позволили заключить, что клетки различных структур развивающейся нервной системы способны к дифференцировке в условиях длительного культивирования. При этом *in vitro* происходит рост отростков (дендритов и аксонов), характерных для нейронов определенных морфологических типов, формируются миелиновые оболочки нервных волокон и функционирующие синаптические связи, которые по своей структуре и медиаторной специфичности не отличаются от дефинитивных, существующих *in vivo*. В результате этих процессов нейроны, развивающиеся *in vitro*, достигают морфофункциональной зрелости, характерной для нейронов интактного мозга.

Помимо важной роли в решении фундаментальных задач экспериментальной нейроцитологии, культура нервной ткани и клеток играет важную роль в моделировании патологических процессов в нервной системе и поиске способов их фармакологической коррекции. Большим преимуществом таких исследований является доступность культивируемых нервных клеток непосредственному контролируемому экспериментальному воздействию, что позволяет, с одной стороны, наблюдать динамику и последствия прямого влияния патогенетических факторов на живую нервную клетку, а с другой – управлять ходом патологического процесса на клеточном и молекулярном уровнях. Моделирование этого процесса *in vitro* важно для экспериментального обоснования путей направленного влияния на процессы развития нервной системы при их нарушениях в онтогенезе и при повреждениях нейронных структур зрелого мозга.

Использование культуры клеток и ткани ЦНС в исследованиях механизмов патогенеза неврологических заболеваний и поиске нейропротекторных соединений

Одно из ведущих мест в нейроцитологических исследованиях в условиях патологии *in vitro*, начатых в 80-е годы прошлого столетия, занимает моделирование **ишемического повреждения** нейронов головного мозга. Очевидно, что сложный патогенетический процесс при ишемическом инсульте невозможно полностью смоделировать в системе *in vitro*, т.е. на отдельных клетках или фрагментах ткани мозга, в отсутствие кровотока и лейкоцитарной инфильтрации [4]. Тем не менее, модель *in vitro* позволяет исследовать специфические базисные биохимические и молекулярные механизмы, реализующиеся в условиях энергетического дефицита, характерного для ишемии. Для ее моделирования культивируемые клетки и ткани подвергаются цитотоксическому воздействию возбуждающих аминокислот, кислородно-глюкозной депривации и химической или ферментативной блокаде клеточного метаболизма. Еще одно преимущество этой модели заключается в возможности быстрого тестирования большого числа новых нейропротекторных фармацевтических препаратов [5].

В настоящее время общепринято считать, что важным патогенетическим фактором ишемического инсульта является цитотоксическое действие возбуждающих амино-

кислот (ВАК) и, прежде всего, основного нейромедиатора головного мозга глутамата [6]. Способность глутамата вовлекаться в процессы, приводящие к гибели нейронов, в сопоставлении с данными экспериментальных исследований механизмов их повреждения при гипоксии/ишемии *in vivo* и *in vitro*, послужила основанием для широко распространенной в настоящее время гипотезы о его активном участии в патогенезе ишемического инсульта [7]. В основу этой гипотезы были положены результаты экспериментов, проведенных на культурах нервных клеток и ткани, которые позволили сформулировать важные положения, касающиеся рецепторных и ионных механизмов нейротоксичности (или «эксайтотоксичности») ВАК при ишемии головного мозга [8, 9]. В частности, было показано, что эндогенные ВАК могут вызывать деструкцию нервных клеток, часто сопутствующую судорожному эффекту этих соединений.

В условиях гиперактивации рецепторов глутамата происходит ускоренное накопление в нейронах ионов кальция (Ca^{2+}), опосредуемое, в первую очередь, NMDA-подтипом глутаматного рецептора, управляющим кальциевым каналом. Перегрузка нейронов Ca^{2+} приводит к усилению протекающих при его участии внутриклеточных протео- и липолитических реакций, а также вызывает гиперпродукцию свободных радикалов и инициируемое ими перекисное окисление в мембранах и внутриклеточных органеллах. Степень развития эксайтотоксичности глутамата, приводящей к отсроченной гибели нейронов, которая наступает в постглутаматный период через несколько часов после окончания его воздействия, находится в прямой зависимости от концентрации внеклеточного кальция: ее снижение заметно ослабляет отсроченную гибель нейронов, а повышение усиливает нейродеструктивный эффект субтоксических концентраций глутамата [10].

На основе моделирования повреждающих факторов ишемии *in vitro* (ацидоз, окислительный стресс, глюкозная депривация и др.) исследована роль митохондрий, глутамина, ионов кальция в ишемических нейродеструктивных процессах [11–14] и получены фундаментальные данные, свидетельствующие о тесной взаимосвязи этих процессов с дисфункцией митохондрий и нарушением ионного баланса нейронов. Изучен механизм нейротоксического действия цинка (Zn^{2+}) на культивируемые нейроны, подвергнутые глюкозной депривации, в условиях которой ионы цинка вызывают дополнительную перегрузку нейронов ионами кальция, транспортируемыми через активированные NMDA-каналы, и накапливаются вместе с ними в митохондриях, что инициирует повреждение митохондрий и оказывает нейродеструктивный эффект [15, 16]. В исследовании молекулярных механизмов ишемических нейродеструктивных процессов, вызываемых дисбалансом внутри- и внеклеточного pH и нарушением гомеостаза Zn^{2+} культивированных нейронов, обнаружено, что внеклеточный ацидоз или блокада Na^+/H^+ -обмена при цитотоксическом действии Zn^{2+} и каината оказывают нейротекторный эффект [17]. При этом повышение уровня внеклеточного Zn^{2+} приводит к возрастанию его концентрации в цитоплазме клеток, что сопровождается накоплением свободного внутриклеточного кальция и инициирует повреждение митохондрий, оказывая нейродеструктивный эффект. Показано нейротекторное действие низких концентраций ионов кадмия (Cd^{2+}) в культуре зернистых нейронов, подвергнутой воздействию ионов марганца (Mn^{2+}) и параквата, цитотоксичность которых приводит

к развитию у человека симптомокомплекса болезни Паркинсона [18].

Защитное действие церебролизина при нейротоксическом воздействии глутамата потенцировалось в присутствии ионов лития (Li^{2+}), что указывает на синергизм между Li^{2+} и нейропептидами в составе церебролизина в реализации его нейротекторного эффекта [19]. Выявлен нейротекторный эффект фракции водорастворимых пептидов, выделенной из широко используемого в клинике инсульта препарата кортексина; эта фракция обладает всеми свойствами исходного препарата и ингибирующей протеазы (в частности, каспазы-8), но значительно более проста по составу [20]. Указанная фракция, так же, как и кортексин, предотвращала индуцированную глутаматом гибель нейронов. Таким образом, нейротекторное действие кортексина при цитотоксическом действии глутамата может быть опосредовано прямым ингибированием активности протеаз.

Обнаружено, что в защитные механизмы, опосредуемые эндоканнабиноидной системой (ЭКС), вовлечен нейротрофический фактор головного мозга BDNF [21]. При моделировании апоптотического повреждения и цитотоксическом действии глутамата в культуре клеток различных структур головного мозга показаны нейротекторные свойства каннабимиметиков из семейства N-ацилдофаминов: они оказывают дозозависимый защитный эффект, опосредуемый каннабиноидными рецепторами 1-го и 2-го типов, при этом повышение их защитного потенциала достигается благодаря использованию агонистов каннабиноидных рецепторов в комплексе с ингибиторами их гидролиза [22]. Разработан оригинальный метод органного культивирования свободноплавающих фрагментов головного мозга и сетчатки, использованный для изучения гистогенеза и экспериментального воздействия патогенетических факторов гипоксии/ишемии [23].

При моделировании ишемии в мультиэлектродной системе (МЭС) [24] исследовалась нейротоксичность агонистов глутаматных рецепторов и защитный эффект их антагонистов в органотипической культуре ткани гиппокампа [25]. Хроническое воздействие низких концентраций агонистов глутаматных рецепторов типов NMDA и AMPA вызывало быстрое снижение амплитуды синаптических ответов нейронов, которое не сопровождалось их необратимым повреждением и поэтому могло быть следствием длительной деполаризации. Устранение агонистов почти полностью восстанавливало исходный уровень синаптической активности после их 40-минутного воздействия, а после 24-часового степень уменьшения амплитуды ответов нейронов прямо коррелировала со снижением их выживаемости. Таким образом установлено, что низкие концентрации агонистов глутаматных рецепторов, не оказывающие быстрого нейротоксического эффекта, вызывают длительную деполаризацию, которая может быть важным фактором последующей гибели нейронов. Неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов, МК801 и мемантин, препятствовали как изменениям синаптических ответов под влиянием NMDA и AMPA, так и их нейротоксичности.

Использование нейронной сети, образованной в МЭС диссоциированными клетками гиппокампа, позволило исследовать влияние длительной кислородно-глюкозной депривации (КГД) на синаптическую активность. КГД в течение 3 мин вызывала значительное возрастание часто-

ты спайков, которая через 30 с возвращалась к исходному уровню. Тетродотоксин полностью блокировал генерацию спайков. Эти данные указывают на то, что самым ранним проявлением КГД является быстрое и преходящее усиление импульсной активности, которое может быть обусловлено ускоренной спонтанной реализацией глутамата [26].

Исследовано влияние альдолазы С (АльдС) – специфического фермента, накапливающегося в спцереброспинальной жидкости больных после инсульта, на нейронную сеть, сформированную в МЭС клетками новой коры крысиных эмбрионов [27]. При кратковременном воздействии низких концентраций АльдС (1 мкМ) происходило быстрое и обратимое снижение частоты спонтанных ритмических разрядов, а при воздействии 10 мкМ в течение 20 мин их генерация почти полностью и также обратимо прекращалась. Ингибирующее влияние АльдС на формирование потенциалов действия нейронной сети *in vitro* указывает на вероятность участия этого белка в патофизиологических механизмах инсульта; он может высвободиться из ишемического очага ткани мозга, достигая высоких концентраций во внеклеточном пространстве и отрицательно влияя на функциональное состояние нейронов, сохранившихся в зоне вокруг ишемического очага (пенумбры).

В последние годы накапливаются данные экспериментов, открывающие перспективу использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) для клеточной терапии инсульта. Так, ИПСК, репрограммированные из фибробластов кожи человека и дифференцированные в нейрональном направлении, при трансплантации в мозг крыс и мышей с ишемическим повреждением новой коры длительно переживали в мозге реципиента, развивались в функционирующие нейроны коркового фенотипа и улучшали неврологический статус [28].

Моделирование эпилепсии *in vitro* осуществляли с помощью субтоксического воздействия глутамата на культивируемые нейроны, часть которых при этом погибала, что позволило имитировать эпилептогенез в сохранившихся нейронах как следствие ишемического инсульта [29]. Нейроны в сохранившейся популяции клеток по своим морфологическим и функциональным признакам идентичны нейронам пенумбры и для них характерны спонтанные повторяющиеся эпилептиформные разряды в синхронизованных нейрональных сетях. Данная модель эпилепсии *in vitro*, индуцированной цитотоксичностью глутамата, представляет собой один из способов изучения молекулярных механизмов, опосредующих ишемический эпилептогенез. Ее использование показало роль кальциевого гомеостаза нейронов в развитии эпилептиформной активности после их ишемического повреждения и прямую зависимость продолжительности эпилептиформных разрядов от уровня внутриклеточной концентрации кальция.

В экспериментах с использованием МЭС органотипическая культура ткани мозга позволяет воспроизвести синхронизованные эпилептиформные разряды нейронов путем разбалансировки активности нейронной сети блокадой тормозных GABA_A рецепторов [30]. При моделировании эпилепсии в различных участках эксплантата гиппокампа регистрируется пространственно-временная синхронизация активности нейронов. Этот переход между сбалансированной десинхронизованной спайковой и синхронизованной распространяющейся популяционной активностью представляет особенный интерес в связи с тем, что отража-

ет начальную фазу развития эпилептических судорог, на которые можно оказывать терапевтическое воздействие до их генерализации.

Эпилептиформная пачечная активность в нейронной сети *in vitro*, аналогичная status epilepticus головного мозга *in situ*, индуцируется 4-аминопиридином или удалением из инкубационной среды ионов магния. С увеличением срока культивирования частота следования пачек возрастает. Антиконвульсанты фелбамат и фенобарбитал уменьшают длительность пачек в поле CA1 гиппокампа и не изменяют ее в поле CA3, что позволяет обнаруживать регионально-специфический эффект этих соединений. Таким образом, мультиэлектродная регистрация одновременно с различных участков эксплантата дает возможность достоверно выявить области гиппокампа, преимущественно вовлеченные в эпилептиформную активность, и идентифицировать пачки импульсов для их последующего количественного анализа, а также тестировать новые антиконвульсанты. К числу последних можно отнести и некоторые фитоканнабиноиды. Один из них, каннабидиол, в той же модели эпилепсии регионально-специфически снижал амплитуду пачек синхронной локальной активности сети (local field potential, LFP), а также длительность пачек и их частоту, а *in vivo* облегчал тяжесть судорог, вызванных пентилентетразолом [31].

Хотя некоторые формы эпилепсии являются врожденными, значительное число случаев этого заболевания имеют известную причину и обозначаются как «приобретенная эпилепсия», одной из причин которой может быть инсульт. Локальное повреждение вследствие инсульта вызывает повышение концентрации внеклеточного глутамата, приводящее к гибели нейронов. Культивируемые в МЭС нейроны гиппокампа, подвергнутые кратковременному воздействию глутамата, претерпевают повреждения, сходные с их повреждением при инсульте, при этом в сети переживающих нейронов генерируются спонтанные повторяющиеся разряды эпилептиформного типа. По мере изменения ионной проницаемости мембран нейронов изменения в функциональной организации свойств нейронной сети в этой модели *in vitro*, так же, как и в других экспериментальных моделях эпилепсии, приобретают характер, подобный генерации гиперсинхронизованной активности [32].

Для заместительной терапии эпилепсии особый интерес представляет возможность получения из ИПСК клеточной популяции тормозных интернейронов. Из ИПСК удалось дифференцировать нейрональные клетки, сходные по своим морфофункциональным признакам предшественникам корковых интернейронов, которые мигрировали к коре в срезах переднего мозга мышиных эмбрионов. Интернейроны, дифференцированные из ИПСК и трансплантированные в мозг «эпилептических» мышей, препятствовали развитию судорог и нарушению поведения [33].

Нейродегенеративные процессы при болезни Паркинсона (БП), вызываемые 6-гидроксидоамином (6-OHDA) и 1-метил-4-фенилпиридином (MPP+), моделировались в культурах дофаминергических нейронов стриатума. Эти нейротоксины оказывают *in vitro* нейродеструктивный эффект, опосредуемый внутри- и внутриклеточным переоксислением, формированием перекисных соединений, прямым ингибированием дыхательной цепи митохондрий. С другой стороны, данная модель позволяет исследовать механизмы защитного действия нейропротекторов. Так, ингибирован-

ние Rho-киназы фасудилом препятствует вызываемому MPP^+ повреждению дофаминергических нейронов *in vitro* с вовлечением Akt-сигнального пути, а непосредственное воздействие MPP^+ на нейриты культивируемых дофаминергических нейронов вызывает их ретракцию [34]. Внеклеточный α -синуклеин, продуцируемый нейронами, модулирует активность микроглиальных клеток и астроцитов, которые усиливают секрецию медиаторов воспаления, что способствует прогрессированию БП [35].

ИПСК, полученные от пациентов со спорадической формой БП, способны дифференцироваться в дофаминергические нейроны. При пересадке таких клеток крысам с экспериментальным паркинсонизмом амфетамин-индуцированное ротационное поведение приближалось к нормальному. Трансплантированные в стриатум нейроны давали аксональные проекции в другие отделы мозга [36]. Можно предположить, что производные ИПСК от пациентов со спорадической формой болезни не способны проявлять патологический фенотип в культуре, т.к. не имеют для этого генетических предпосылок.

У пациентов с наследственными формами БП одним из генов, ассоциированных с этой патологией, является ген митохондриальной киназы *PINK1*, которая локализуется на внешней мембране митохондрий и участвует в защите клетки от окислительного стресса в результате его взаимодействия с паркином. Мутация *PINK1* не влияет на репрограммирование клеток пациента и на дифференцировку полученных ИПСК в дофаминергические нейроны. В зрелых нейронах, несущих мутацию, в условиях стресса нарушается мобилизация паркина к поврежденным митохондриям, тогда как в нейронах, полученных из генетически нормальных ИПСК, подобных нарушений не происходит. В мутантных нейронах патологические процессы подавляются при повышенной экспрессии нормального белка *PINK1* [37].

Нами получены ИПСК, репрограммированные из фибробластов биоптатов кожи трех пациентов с генетическими формами БП (мутации в генах *LRRK2* и *PARK2*). ИПСК пациентов дифференцированы в дофаминергические нейроны, экспрессирующие тирозин-гидроксилазу [38]. Для исследования функциональных свойств ИПСК, дифференцированных в нейроны, был использован метод культивирования в МЭС. Усложнение регистрируемой в процессе культивирования спонтанной биоэлектрической активности нейронов, дифференцированных из ИПСК, свидетельствует об их способности к формированию функциональных межнейронных связей. У крыс с токсической 6-ОНДА-моделью паркинсонизма трансплантация полученных нейронов в полосатое тело приводила к отчетливому улучшению двигательных функций и редукции симптоматики паркинсонизма, а также улучшению морфохимических показателей этой структуры [39].

Из биоптатов кожи двух пациентов с генетическими формами БП, являющихся носителями мутаций в генах *LRRK2* и *PARK2*, а также от здоровых доноров, получены фибробласты, которые были репрограммированы при помощи лентивирусных векторов в ИПСК, с их последующей дифференцировкой по нейрональному пути с использованием коктейля из факторов дифференцировки (N2, B27, Noggin) [40]. Показано, что линии ИПСК от пациентов с различными мутациями и от здоровых лиц при одинаковых условиях культивирования имеют разное соотношение нейрональ-

ных предшественников и дифференцированных нейронов. Контрольная линия содержала 56% клеток-предшественников, тогда как линия В16 с мутацией *LRRK2* (G2019S) содержала 35% предшественников. Сходные закономерности были характерны и для культуры Tr5, несущей компаунд-гетерозиготные мутации в гене *PARK2* (del202-203AG и IVS1+1G/A) и содержащей 4% нейрональных предшественников.

Нами дана оценка различий в уровне про- и антиапоптотических факторов семейства Bcl-2 в дофаминергических нейронах, дифференцированных из ИПСК здорового донора и больного БП с мутациями в гене *PARK2* [41]. Методом Вестерн-блоттинга проанализированы соотношения белков Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-W. Показано, что уровень проапоптотического белка Bax в клетках с мутацией *PARK2* практически в два раза ниже по сравнению со здоровыми клетками. Напротив, экспрессия антиапоптотических факторов Bcl-XL, Bcl-W и Bcl-2 достоверно повышена в мутантных клетках по сравнению со здоровыми дофаминергическими нейронами. Полученные результаты позволяют предположить, что мутации *PARK2* сопровождаются сложной разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели, в рамках которой ведущая роль принадлежит неапоптозным молекулярным механизмам.

В исследованиях механизмов, опосредующих повреждение нейронов при **болезни Альгеймера (БА)**, широко используются нейрональные клеточные линии, такие как PC12, HEK293, SH-SY5Y. Эти клетки можно трансфицировать нормальным геном белка-предшественника β -амилоида или его мутантными формами. В первичных культурах клеток новой коры и гиппокампа β -амилоид при его добавлении в питательную среду вызывает апоптоз. Первичные культуры глиальных клеток использовались в исследованиях воспалительных процессов и в поиске противовоспалительных препаратов при БА. Показано, что формированию β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков при БА способствуют культивируемые астроциты, в которых под влиянием β -амилоида активируется протеинкиназа C, индуцирующая усиление формирования циклооксигеназы-2 и высвобождение простагландина E2 [42].

Длительное культивирование сети нейронов новой коры и гиппокампа в МЭС позволило в хроническом эксперименте провести мультипараметрическое исследование влияния амилоидного β -пептида $A\beta_{1-42}$ на спонтанную синхронизованную синаптическую активность функциональной нейронной сети. Действие сублетальных концентраций $A\beta_{1-42}$ вызывало быстрое преходящее ингибирование спонтанных осциллирующей нейронной активности. Подавление спайков происходило на фоне снижения пачечной активности и увеличения межспайковых интервалов, причем эффект имел прямую концентрационную зависимость. Преинкубация культур с антителами к $A\beta_{1-42}$ полностью устраняло эффект пептида [43].

Другим типом культур, позволившим в МЭС длительно моделировать воздействие патогенетических факторов БА на центральные нейроны, явились органотипические эксплантаты гиппокампа [44]. Возможность вводить исследуемые соединения в течение длительного времени и вести одновременную регистрацию ответов с различных участков одного и того же эксплантата гиппокампа позволила осуществлять всесторонний анализ изменений синаптической активности с высоким пространственным разрешением.

На этой модели была получена устойчивая и воспроизводимая длительная посттетаническая потенциация (ДПТП), индуцированная в поле CA1 высокочастотной стимуляцией коллатералей Шаффера и продолжавшаяся до 48 ч, а также исследована синаптическая функция в течение кратковременного (30 мин) и длительного (24 ч) воздействия АВП₁₋₄₂. Использование МЭС позволило провести пространственный анализ изменения пластичности нейронов по всему эксплантату, получая информацию от множества его участков и одновременно оценивая степень индукции в них ДПТП при стимуляции на всем протяжении коллатералей Шаффера. Таким образом, эта система предоставляет уникальную возможность длительно исследовать интенсивность и область индукции ДПТП в эксплантате гиппокампа и ее изменения под влиянием АВП₁₋₄₂. Отсутствие ДПТП после воздействия АВП₁₋₄₂ в каждом из нескольких участков поля CA1, контактирующих с электродами, позволяет судить о степени и распространенности вызванных этим пептидом изменений. Приведенные выше данные, полученные с использованием МЭС, свидетельствуют о важной роли нарушения пластических свойств центральных нейронов в патогенезе БА и расширяют перспективу поиска и практического использования нейропротекторных соединений, препятствующих этим нарушениям.

Одним из наиболее перспективных подходов к разработке новых методов лечения БА является поиск веществ, модулирующих активность β - и γ -секретаз. Недавно получена модель для скрининга подобных соединений на основе ИПСК человека, дифференцированных в нейроны переднего мозга, в которых экспрессировались белки с активностью β - и γ -секретазы и две формы β -амилоида (Ab40 и Ab42), что позволило считать данные клетки адекватной моделью для изучения действия ингибиторов секретаз [45]. Исследовали ингибитор β -секретазы IV, ингибитор γ -секретазы XXI и нестероидный противовоспалительный препарат сулиндак сульфид, для которого показана способность напрямую ингибировать γ -секретазу. Ингибитор β -секретазы IV и сулиндак сульфид снижали уровень экспрессии Ab40 и Ab42, причем сулиндак сульфид преимущественно ингибировал продукцию Ab42. Ингибитор γ -секретазы XXI в низких концентрациях повышал продукцию Ab40 и Ab42, а в более высоких ингибировал ее.

Культуры клеток на основе ИПСК-технологии успешно применяются в моделировании нейродеструктивных процессов, исследовании их механизмов и поиске способов фармакологической коррекции при **болезни Гентингтона (БГ)** [46]. Так, к настоящему времени создано несколько клеточных моделей БГ на основе ИПСК-технологии. В одной из них ИПСК были получены из фибробластов кожи трансгенной обезьяны, экспрессирующей гентингтин с 72 копиями CAG-повторов. При этом было показано, что мутация не влияет на репрограммирование и нейрональную дифференцировку клеток. Агрегаты мутантного гентингина в плюрипотентных клетках не наблюдались и появились лишь в ходе дифференцировки на уровне нейрональных предшественников (нестин-позитивных клеток). По данным Вестерн-блоттинга, количество агрегатов увеличивалось при дальнейшей дифференцировке. При иммуноцитохимическом окрашивании нейронов были выявлены агрегаты мутантного гентингина в ядрах клеток и отростках, что является одним из характерных цитологических признаков БГ. В другой модели ИПСК с мутантным гентингином (72 копии CAG-повторов) успешно дифференцировались в ГАМК-ергические нейроны. Дифферен-

цированные мутантные клетки отличались от нормальных нейронов каспазной активностью, а также паттернами фосфорилирования киназ ERK1 и ERK2 в ответ на добавление фактора роста.

Проводятся также исследования закономерностей патологического процесса и тестирование биологически активных соединений на ИПСК-моделях некоторых других наследственных нейродегенеративных заболеваний – спинальной амиотрофии, семейной дизавтономии Райли–Дея, SOD1-ассоциированной форме бокового амиотрофического склероза. Такие работы ведутся в настоящее время во многих ведущих лабораториях мира – речь идет о создании банков ИПСК и нейрональных культур от больных с охарактеризованными моногенными заболеваниями ЦНС.

Перспективы фундаментальных и прикладных исследований в области экспериментальной нейробиологии

Задачи будущих исследований в области экспериментальной нейробиологии *in vitro* во многом определяются нерешенными вопросами, стоящими перед нейробиологической наукой. В частности, до сих пор окончательно не выяснено, как процессы самоорганизации в период раннего нейронального морфогенеза скоординированы с внешними сигналами, какие механизмы и внеклеточные факторы управляют асимметричной модуляцией избирательной трансляции белков и их деградацией в процессе нейрональной поляризации, как возникновение нейрональной поляриности регулирует развитие дендритов, какие молекулярные механизмы регулируют внутриклеточные сигналы и взаимодействие между дендритами и ядром, модулируя экспрессию генов и избирательно влияя на функции дендритов, как внутриклеточные процессы регулируют рост и ветвление дендритов и участие формирующихся дендритных филоподий в формировании синапсов, как координируется синаптогенез между различными типами нейронов.

Выяснение этих вопросов, возможное в экспериментальных исследованиях *in vitro* и необходимое для решения не только фундаментальных, но и прикладных неврологических проблем, требует постоянного совершенствования методических подходов к культивированию нервных клеток и тканей.

Одним из таких подходов является использование микрофлюидных чипов (МФЧ), которые в сочетании с методами микроскопии высокого разрешения и имиджинговыми методиками позволяют создавать новые аналитические системы для исследований биологических объектов в нормальном и патологическом состоянии, при обеспечении контролируемого микроокружения [47]. Техника МФЧ позволяет создать микроокружение нейрональных структур и субдоменов с беспрецедентными возможностями доступа к ним и их контроля. Таким образом, культивирование клеток нервной системы в МФЧ обладает значительными методическими преимуществами в решении на молекулярном уровне указанных выше фундаментальных задач экспериментальной нейробиологии и открывает новые подходы к исследованию механизмов сохранения нейрональных функций, нарушенных при моделировании *in vitro* острых и хронических форм церебральной патологии.

В числе новых перспективных подходов к ИПСК-технологиям следует отметить создание новых моделей *in vitro*, представляющих собой сложную гетерогенную систему.

К таким моделям следует отнести органотипические культуры нервной ткани из специализированных областей головного мозга, способные переживать недели после введения в них стволовых клеток, что позволяет проследить и оценивать поведение последних и их взаимодействие с окружающей тканью. Кроме того, поскольку культивируемые эксплантаты адекватны для моделирования патологических состояний ЦНС, их можно использовать для предклинических исследований взаимодействия введенных в культуру ИПСК с клетками эксплантатов, подвергнутых воздействию различных патогенетических факторов, а также для тестирования терапевтического потенциала ИПСК, в том числе в комбинации с фармацевтическими препаратами [48].

В ближайшие годы объем клинического применения стволовых клеток для лечения инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, амиотрофического бокового склероза, рассеянного склероза и многих других форм острой и хронической церебральной патологии будет увеличиваться. Несмотря на необходимость соблюдения осторожности при продвижении потенциальных терапевтических подходов, перед применением стволовых клеток открываются широкие перспективы [49]. Безусловно, основанные

на технологии клеточного репрограммирования ИПСК-модели обладают огромным потенциалом в исследовании и раскрытии биологических основ неврологических заболеваний, но до того, как эти технологии станут надежными, безотказными и воспроизводимыми, необходимо решить ряд ключевых вопросов. Ближайшие усилия должны быть нацелены на получение высококачественных ИПСК с минимальными геномно-эпигеномными aberrациями и стойкой потенцией к развитию, разработку методов генерации высокоспецифических нейрональных подтипов с достаточной заместительной эффективностью, устранение риска онкотрансформации трансплантата, адресную доставку и повышение жизнеспособности имплантированных клеток, установление ими правильных контактов и повышение их функциональной активности, трехмерное восстановление поврежденных областей мозга, использование генного редактирования для коррекции патологических мутаций в исследованиях механизмов моно- и полигенных заболеваний. Несмотря на сложность проблем, заметный прогресс в этой области позволяет надеяться, что методы, основанные на технологии клеточного репрограммирования, будут играть возрастающую роль в развитии новых подходов к лечению как редких, так и широко распространенных форм церебральной патологии.

Список литературы

1. Panula P., Rechart L. The development of histochemically demonstrable cholinesterases in the rat neostriatum in vivo and in vitro. *Histochemistry* 1979; 64: 35–50. PMID: 521314.
2. Berger B., Di Porzio U., Dagnet M.C. Long-term development of mesencephalic dopaminergic neurons of mouse embryos in dissociated primary cultures: morphological and histochemical characteristics. *Neuroscience* 1982; 7: 193–205. PMID: 6123092.
3. Викторов И.В. Развитие и пластичность нейронов в тканевых и клеточных культурах. Дис. ... докт. биол. наук. Москва. 1987.
4. Sommer S.J. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 245–261. DOI: 10.1007/s00401-017-1667-0. PMID: 28064357.
5. Holloway P.M., Gavins F.N. Modeling ischemic stroke in vitro: status quo and future perspectives. *Stroke* 2016; 47: 561–569. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.011932
6. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7: 357–368. PMID: 2880937
7. Huang R., Sochoka E., Hertz L. Cell culture studies of the role of elevated extracellular glutamate and K⁺ in neuronal cell death during and after anoxia/ischemia. *Neurosci Behav Rev* 1997; 21: 129–134. PMID: 9062935
8. Khodorov B. Glutamate induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 2004; 2: 279–351. PMID: 15288761
9. Сурин А.М. Механизмы дисфункции митохондрий и нарушений ионного гомеостаза при глутаматной нейротоксичности: Дис. ... докт. биол. наук. Москва. 2014.
10. Woodruff T.M., Thundyil J., Tang S.-C. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 2011; 6: 11. DOI: 10.1186/1750-1326-6-11. PMID: 21266064.
11. 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. DOI: 10.3109/00207454.2011.570464. PMID: 21574892.
12. Stelmashook E.V., Isaev N.K., Plotnikov E.Y. et al. Effect of transitory glucose deprivation on mitochondrial structure and functions in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2009; 461: 140–144. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.05.073. PMID: 19500653.
13. Stelmashook E.V., Isaev N.K., Zorov D.B. Paraquat potentiates glutamate toxicity in immature cultures of cerebellar granule neurons. *Toxicol Lett* 2007; 174: 82–88. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.08.012. PMID: 17919854.
14. Капай Н.А., Popova O.V., Isaev N.K. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J Alzheim Dis* 2013; 36: 377–383. DOI: 10.3233/JAD-122428. PMID: 23735258.
15. Isaev N.K., Lozier E.R., Novikova S.V. et al. Glucose starvation stimulates Zn²⁺ toxicity in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res Bull* 2012; 87: 80–84. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.10.017. PMID: 22079503

References

1. Panula P., Rechart L. The development of histochemically demonstrable cholinesterases in the rat neostriatum in vivo and in vitro. *Histochemistry* 1979; 64: 35–50. PMID: 521314.
2. Berger B., Di Porzio U., Dagnet M.C. Long-term development of mesencephalic dopaminergic neurons of mouse embryos in dissociated primary cultures: morphological and histochemical characteristics. *Neuroscience* 1982; 7: 193–205. PMID: 6123092.
3. Victorov I.V. Razvitiye i plastichnost' neuronov v tkanevykh i kletochnykh kul'turakh. Dis. ... dokt. biol. nauk. [The development and plasticity of neurons in tissue and cell cultures. D.Sci.(Biol.) diss.]. Moscow. 1987. (In Russ.)
4. Sommer S.J. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 245–261. DOI: 10.1007/s00401-017-1667-0. PMID: 28064357.
5. Holloway P.M., Gavins F.N. Modeling ischemic stroke in vitro: status quo and future perspectives. *Stroke* 2016; 47: 561–569. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.011932.
6. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7: 357–368. PMID: 2880937.
7. Huang R., Sochoka E., Hertz L. Cell culture studies of the role of elevated extracellular glutamate and K⁺ in neuronal cell death during and after anoxia/ischemia. *Neurosci Behav Rev* 1997; 21: 129–134. PMID: 9062935.
8. Khodorov B. Glutamate induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 2004; 2: 279–351. PMID: 15288761.
9. Surin A.M. Mekhanizmy disfunktsii mitokhondriy i narusheniy ionnogo gomeostaza pri glutamatnoy neyrotoksichnosti: Dis. ... dokt. biol. nauk. [Mechanisms of mitochondrial dysfunction and ion homeostasis disturbances as consequences of glutamate neurotoxicity. D.Sci.(Biol.) diss.]. Moscow. 2014. (In Russ.)
10. Woodruff T.M., Thundyil J., Tang S.-C. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 2011; 6: 11. DOI: 10.1186/1750-1326-6-11. PMID: 21266064.
11. 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. DOI: 10.3109/00207454.2011.570464. PMID: 21574892.
12. Stelmashook E.V., Isaev N.K., Plotnikov E.Y. et al. Effect of transitory glucose deprivation on mitochondrial structure and functions in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2009; 461: 140–144. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.05.073. PMID: 19500653.
13. Stelmashook E.V., Isaev N.K., Zorov D.B. Paraquat potentiates glutamate toxicity in immature cultures of cerebellar granule neurons. *Toxicol Lett* 2007; 174: 82–88. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.08.012. PMID: 17919854.
14. Kapay N.A., Popova O.V., Isaev N.K. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J Alzheim Dis* 2013; 36: 377–383. DOI: 10.3233/JAD-122428. PMID: 23735258.
15. Isaev N.K., Lozier E.R., Novikova S.V. et al. Glucose starvation stimulates Zn²⁺ toxicity in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res Bull* 2012; 87: 80–84. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.10.017. PMID: 22079503

16. Losier E.R., Stelmashook E.V., Uzbekov R.E. et al. Stimulation of kainate toxicity by zinc in cultured cerebellar granule neurons and the role of mitochondria in this process. *Toxicol Lett* 2012; 208: 36-40. DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.10.003. PMID: 22008730.
17. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Амелкина Г.А. и др. Ацидоз и 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид (EIPA) снижают цинк/каинатную токсичность в культурах зернистых нейронов мозжечка крыс. *Биохимия* 2015; 80: 1282-1288.
18. Isaev N.K., Golyshev S.A., Avilkina S. et al. N-acetyl-L-cysteine and Mn²⁺ attenuate Cd²⁺-induced disturbance of the intracellular free calcium homeostasis in cultured cerebellar granule neurons. *Toxicology* 2018; 393: 1-8. DOI: 10.1016/j.tox.2017.10.017. PMID: 29100878.
19. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В. и др. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2015; 15: 65-72.
20. Яковлев А.А., Лыжин А.А., Хаспекhov Л.Г. и др. Пептидный препарат кортексин ингибирует каспазу-8 мозга. *Биомедицинская химия* 2017; 63(1): 27-31.
21. Khaspekov L.G., Brenz Verca M.S., Frumkina L.E. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1691-1698. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03285.x. PMID: 15078543.
22. Генрихс Е.Е., Бобров М.Ю., Андрианова Е.Л. и др. Модуляторы эндогенной каннабиноидной системы как нейропротекторы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2010; 4: 37-42.
23. Rzezczinski S., Victorov I.V., Lyjin A.A. et al. Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina. *Ophthalmic Res* 2006; 38: 263-269. DOI: 10.1159/000095768. PMID: 16974126.
24. Мухина И.В., Хаспекhov Л.Г. Новые технологии в экспериментальной нейробиологии: нейронные сети на мультэлектродной матрице. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2010; 2: 44-51.
25. Shimono K., Baudry M., Panchenko V., Taketani M. Chronic multichannel recordings from organotypic hippocampal slice cultures: protection from excitotoxic effects of NMDA by noncompetitive NMDA antagonists. *J Neurosci Meth* 2002; 120: 193-202. PMID: 12385769.
26. Wahl A.-S., Buchthal B., Rode F. Hypoxic/ischemic conditions induce expression of the putative pro-death gene *Clcal* via activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 2009; 158: 344-352. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.018. PMID: 18616968.
27. Linke S., Goertz P., Baader S.L. et al. Aldolase C/Zebbrin II is released to the extracellular space after stroke and inhibits the network activity of cortical neurons. *Neurochem Res* 2006; 31: 1297-1303. DOI: 10.1007/s11064-006-9169-9. PMID: 17053973.
28. Vishwakarma S.K., Bardia A., Tiwari S.K. et al. Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke: a review. *J Adv Res* 2014; 5: 277-294. DOI: 10.1016/j.jare.2013.04.005. PMID: 25685495.
29. DeLorenzo R.J., Sun D.A., Blair R.E., Sombati S. An in vitro model of stroke-induced epilepsy: elucidation of the roles of glutamate and calcium in the induction and maintenance of stroke-induced epileptogenesis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 81: 59-84. DOI: 10.1016/S0074-7742(06)81005-6. PMID: 17433918.
30. Norberg J., Poulsen F.R., Blaabjerg M. et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 435-452. PMID: 16101559.
31. Jones N.A., Hill A.J., Smith I. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J Pharm Exp Ther* 2010; 332: 569-577. DOI: 10.1124/jpet.109.159145. PMID: 19906779.
32. Sun D.A., Sombati S., Blair R.E., DeLorenzo R.J. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke induced epilepsy. *Cell Calcium* 2004; 35: 155-163. PMID: 14706289.
33. Corti S., Faravelli I., Cardano M., Conti L. Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10: 615-629. DOI: 10.1517/17460441.2015.1037737. PMID: 25891144.
34. Tonges L., Frank T., Tatenhorst L. et al. Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 2012; 135: 3355-3370. DOI: 10.1093/brain/aw254. PMID: 23087045.
35. Desplats P., Lee H.J., Bae E.J. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13010-13015. DOI: 10.1073/pnas.0903691106. PMID: 19651612.
36. Hargus G., Cooper O., Deleidi M. et al. Differentiated parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 15921-15926. DOI: 10.1073/pnas.1010209107. PMID: 20798034.
37. Hargus G., Ehrlich M., Hallmann A.-L., Kuhlmann T. Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 151-173. DOI: 10.1007/s00401-013-1222-6. PMID: 24306942.
38. Лебедева О.С., Лагар'кова 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; 30: 233-241.
16. Losier E.R., Stelmashook E.V., Uzbekov R.E. et al. Stimulation of kainate toxicity by zinc in cultured cerebellar granule neurons and the role of mitochondria in this process. *Toxicol Lett* 2012; 208: 36-40. DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.10.003. PMID: 22008730.
17. Stelmashook E.V., Novikova S.V., Amelkina G.A. et al. [Acidosis and 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA) attenuate zinc/kainate toxicity in cultured cerebellar granule neurons]. *Biokhimiya* 2015; 80: 1282-1288. (In Russ.)
18. Isaev N.K., Golyshev S.A., Avilkina S. et al. N-acetyl-L-cysteine and Mn²⁺ attenuate Cd²⁺-induced disturbance of the intracellular free calcium homeostasis in cultured cerebellar granule neurons. *Toxicology* 2018; 393: 1-8. DOI: 10.1016/j.tox.2017.10.017. PMID: 29100878.
19. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Gogoleva I.V. et al. [Pharmacokinetic and pharmacodynamic synergy between neuropeptides and lithium in realization of neurotrophic and neuroprotective effects of cerebrolysinum]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* 2015; 15: 65-72. (In Russ.)
20. Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G. et al. [Peptide drug cortexin inhibits brain caspase-8]. *Biomeditsinskaya Khimiya* 2017; 63(1): 27-31. (In Russ.)
21. Khaspekov L.G., Brenz Verca M.S., Frumkina L.E. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1691-1698. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03285.x. PMID: 15078543.
22. Genrikhs E.E., Bobrov M.Yu., Andrianova E.L. et al. [Modulators of endogenous cannabinoid system as neuroprotectants]. *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 2010; 4: 37-42. (In Russ.)
23. Rzezczinski S., Victorov I.V., Lyjin A.A. et al. Roller culture of free-floating retinal slices: a new system of organotypic cultures of adult rat retina. *Ophthalmic Res* 2006; 38: 263-269. DOI: 10.1159/000095768. PMID: 16974126
24. Mukhina I.V., Khaspekov L.G. [New technologies in experimental neurology: neuronal networks on multielectrode array]. *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 2010; 2: 44-51. (In Russ.)
25. Shimono K., Baudry M., Panchenko V., Taketani M. Chronic multichannel recordings from organotypic hippocampal slice cultures: protection from excitotoxic effects of NMDA by noncompetitive NMDA antagonists. *J Neurosci Meth* 2002; 120: 193-202. PMID: 12385769.
26. Wahl A.-S., Buchthal B., Rode F. Hypoxic/ischemic conditions induce expression of the putative pro-death gene *Clcal* via activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 2009; 158: 344-352. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.018. PMID: 18616968.
27. Linke S., Goertz P., Baader S.L. et al. Aldolase C/Zebbrin II is released to the extracellular space after stroke and inhibits the network activity of cortical neurons. *Neurochem Res* 2006; 31: 1297-1303. DOI: 10.1007/s11064-006-9169-9. PMID: 17053973.
28. Vishwakarma S.K., Bardia A., Tiwari S.K. et al. Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke: a review. *J Adv Res* 2014; 5: 277-294. DOI: 10.1016/j.jare.2013.04.005. PMID: 25685495.
29. DeLorenzo R.J., Sun D.A., Blair R.E., Sombati S. An in vitro model of stroke-induced epilepsy: elucidation of the roles of glutamate and calcium in the induction and maintenance of stroke-induced epileptogenesis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 81: 59-84. DOI: 10.1016/S0074-7742(06)81005-6. PMID: 17433918.
30. Norberg J., Poulsen F.R., Blaabjerg M. et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 435-452. PMID: 16101559.
31. Jones N.A., Hill A.J., Smith I. et al. Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J Pharm Exp Ther* 2010; 332: 569-577. DOI: 10.1124/jpet.109.159145. PMID: 19906779.
32. Sun D.A., Sombati S., Blair R.E., DeLorenzo R.J. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke induced epilepsy. *Cell Calcium* 2004; 35: 155-163. PMID: 14706289.
33. Corti S., Faravelli I., Cardano M., Conti L. Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10: 615-629. DOI: 10.1517/17460441.2015.1037737. PMID: 25891144.
34. Tonges L., Frank T., Tatenhorst L. et al. Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 2012; 135: 3355-3370. DOI: 10.1093/brain/aw254. PMID: 23087045.
35. Desplats P., Lee H.J., Bae E.J. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13010-13015. DOI: 10.1073/pnas.0903691106. PMID: 19651612.
36. Hargus G., Cooper O., Deleidi M. et al. Differentiated parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 15921-15926. DOI: 10.1073/pnas.1010209107. PMID: 20798034.
37. Hargus G., Ehrlich M., Hallmann A.-L., Kuhlmann T. Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 151-173. DOI: 10.1007/s00401-013-1222-6. PMID: 24306942.
38. Lebedeva O.S., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. et al. [The morphofunctional properties of induced pluripotent stem cells derived from human skin fibroblasts and differentiated to dopaminergic neurons]. *Neurokhimiya* 2013; 30: 233-241. (In Russ.)

39. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ямщикова Н.Г. и др. Морфохимическая оценка результатов нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме. *Анналы клинической экспериментальной неврологии* 2015; 2: 28–32.
40. Konovalova E.V., Lopacheva O.M., Grivennikov I.A. et al. Mutations in the Parkinson's disease-associated PARK2 gene are accompanied by imbalance in programmed cell death systems. *Acta Naturae* 2015; 7: 146–149. PMID: 26798503.
41. Коновалова Е.В., Новосадова Е.В., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н. Фенотипические различия культур нейронов, получаемых путем репрограммирования фибробластов пациентов с мутациями в генах паркинсонизма *LRRK2* и *PARK2*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015; 159: 749–753.
42. Stansley B., Post J., Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 115. DOI: 10.1186/1742-2094-9-115. PMID: 22651808.
43. Varghese K., Molnar P., Das M. et al. A new target for amyloid beta toxicity validated by standard and high-throughput electrophysiology. *PLoS One* 2010; 5: e8643. DOI: 10.1371/journal.pone.0008643. PMID: 20062810.
44. Ahuja T.K., Mielke J.G., Comas T. et al. Hippocampal slice cultures integrated with multielectrode arrays: a model for study of long-term drug effects on synaptic activity. *Drug Devel Res* 2007; 68: 84–93. DOI: org/10.1002/ddr.20170.
45. Choi S.H., Kim Y.H., Hebisch M. et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* 2014; 515: 274–278. DOI: 10.1038/nature13800. PMID: 25307057.
46. Xie Y. Z., Zhang R. X. Neurodegenerative diseases in a dish: the promise of iPSC technology in disease modeling and therapeutic discovery. *Neurol Sci* 2015; 36: 21–27. doi: 10.1007/s10072-014-1989-9. PMID: 25354658.
47. Millet L.J., Gillette M.U. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends Neurosci* 2012; 32: 752–761. DOI: 10.1016/j.tins.2012.09.001. PMID: 23031246.
48. Daviaud N., Garbayo E., Schiller P.C. et al. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Exp Neurol* 2013; 248: 429–440. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.07.012. PMID: 23899655.
49. Corti S., Faravelli I., Cardano M., Conti L. Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10: 615–629. DOI: 10.1517/17460441.2015.1037737. PMID: 25891144.
39. Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Yamschikova N.G. et al. [Morphochemical evaluation of the results of neurotransplantation in experimental parkinsonism]. *Annals of Clinical and Experim Neurol* 2015; 2: 28–32. (In Russ.)
40. Konovalova E.V., Lopacheva O.M., Grivennikov I.A. et al. Mutations in the Parkinson's disease-associated PARK2 gene are accompanied by imbalance in programmed cell death Systems. *Acta Naturae* 2015; 7: 146–149. PMID: 26798503.
41. Konovalova E.V., Illarioshkin S.N., Novosadova E.V., Grivennikov I.A. [Phenotypical differences in neuronal cultures derived via reprogramming the fibroblasts from patients carrying mutations in parkinsonian genes *LRRK2* and *PARK2*]. *Bull Exp Biol Med* 2015; 159: 749–753. (In Russ.)
42. Stansley B., Post J., Hensley K. A comparative review of cell c ulture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 115. DOI: 10.1186/1742-2094-9-115. PMID: 22651808.
43. Varghese K., Molnar P., Das M. et al. A new target for amyloid beta toxicity validated by standard and high-throughput electrophysiology. *PLoS One* 2010; 5: e8643. DOI: 10.1371/journal.pone.0008643. PMID: 20062810.
44. Ahuja T.K., Mielke J.G., Comas T. et al. Hippocampal slice cultures integrated with multielectrode arrays: a model for study of long-term drug effects on synaptic activity. *Drug Devel Res* 2007; 68: 84–93. DOI: org/10.1002/ddr.20170.
45. Choi S.H., Kim Y.H., Hebisch M. et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* 2014; 515: 274–278. DOI: 10.1038/nature13800. PMID: 25307057.
46. Xie Y. Z., Zhang R. X. Neurodegenerative diseases in a dish: the promise of iPSC technology in disease modeling and therapeutic discovery. *Neurol Sci* 2015; 36: 21–27. DOI: 10.1007/s10072-014-1989-9. PMID: 25354658.
47. Millet L.J., Gillette M.U. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends Neurosci* 2012; 32: 752–761. DOI: 10.1016/j.tins.2012.09.001. PMID: 23031246.
48. Daviaud N., Garbayo E., Schiller P.C. et al. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Exp Neurol* 2013; 248: 429–440. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.07.012. PMID: 23899655.
49. Corti S., Faravelli I., Cardano M., Conti L. Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10: 615–629. DOI: 10.1517/17460441.2015.1037737. PMID: 25891144.

Информация об авторах: Хаспеков Леонид Георгиевич – д.б.н., зав. лабораторией экспериментальной нейрцитологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия

Information about the authors: Leonid G. Khaspekov, D. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Experimental Neurocytology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia