

УДК 576.3/7; 577.17.02

ПРИМЕНЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ОЦЕНКИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2019 Е.В. Новосадова^{1*}, Е.Л. Арсеньева¹, С.А. Антонов¹, Ю.Н. Ванюшина¹,
Т.В. Малова¹, А.А. Комиссаров¹, С.Н. Иллариошкин², Л.Г. Хаспеков²,
Л.А. Андреева¹, Н.Ф. Мясоедов¹, В.З. Тарантул^{1**}, И.А. Гривенников^{1**}

¹ Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия;
электронная почта: novek-img@mail.ru

² Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия;
электронная почта: grivigan@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2019

После доработки 23.07.2019

Принята к публикации 06.08.2019

Создание лекарственных препаратов включает целый ряд стадий, начиная от синтеза химических соединений, их тестирования на различных моделях с отбором наиболее активных и безопасных, до клинических испытаний и внедрения лекарственного препарата в медицинскую практику. Среди используемых моделей важное место занимают культуры клеток животных, как первичные, так и трансформированные. Однако эти клетки имеют целый ряд недостатков, среди которых в первую очередь следует отметить недостаточную стандартизацию в случае первичных культур и нарушения в генотипе клеток в случае трансформированных культур. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека открыло новые возможности для создания тест-систем для масштабного скрининга потенциальных лекарственных средств с разным спектром действия. Благодаря своей способности дифференцироваться во все клетки взрослого организма ИПСК являются уникальной моделью, позволяющей изучать действие тестируемых соединений и их потенциальную токсичность на всем протяжении процесса дифференцировки *in vitro*. В настоящей работе на примере двух классов соединений – представителей меланокортинов и эндоканнабиноидов – продемонстрирована эффективность использования ИПСК и их дифференцированных в нейрональном направлении производных для отбора соединений с нейропротекторной активностью. Показано, что все испытанные соединения не обладали цито- и эмбриотоксичностью. В условиях токсического действия перекиси водорода представители меланокортинов и эндоканнабиноидов способны оказывать нейропротекторное действие на нейрональные предшественники и дифференцированные нейроны, полученные из ИПСК. Наибольшим нейропротекторным эффектом (~70%) в дифференцированных культурах, обогащенных дофаминергическими нейронами, обладал представитель эндоканнабиноидов N-докозагексаноилдофамин. Эффект семакса – представителя семейства меланокортинов – в этих условиях составил ~40%. Обсуждается возможность использования других производных ИПСК для поиска соединений с нейропротекторной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тест-система, цитотоксичность, нейропротекция, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, окислительный стресс, эндоканнабиноиды, меланокортины.

DOI: 10.1134/S0320972519110071

Одной из актуальных проблем современной фармакологии и медицины является создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов, для чего необходимы высокопроизво-

дительные и воспроизводимые, а главное, относительно дешевые технологии их скрининга. В настоящее время средняя стоимость разработки нового лекарственного препарата оценивается в

Принятые сокращения: альфа-МСГ – альфа-меланоцитстимулирующий гормон; ДМСО – диметилсульфоксид; ДА-нейроны – дофаминергические нейроны; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МК – меланокортины; ЭК – эндоканнабиноиды; BDNF – нейротрофический фактор из мозга; GDNF – нейротрофический фактор из глии; G418 – антибиотик генетицин; N-АДА – N-арахидоноилдофамин; N-ДДА – N-докозагексаноилдофамин; PGP – пептид семейства меланокортинов (Pro-Gly-Pro).

* Адресат для корреспонденции.

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

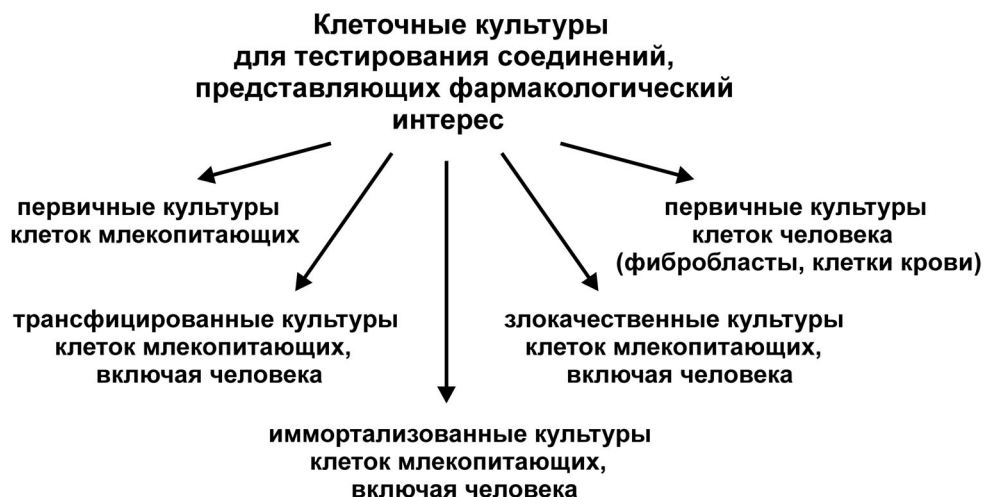


Рис. 1. Клеточные культуры животных, используемые для тестирования соединений, представляющих фармакологический интерес

несколько миллиардов долларов, а время, которое необходимо потратить от начала синтеза и испытаний до выхода нового препарата в производство, составляет обычно 10–15 лет. Создание лекарственного препарата включает целый ряд стадий, начиная от синтеза соединений, их тестирования на различных моделях с отбором наиболее активных и безопасных, до клинических испытаний и внедрения в медицинскую практику. Среди моделей, используемых для скрининга новых соединений, важное место занимают культуры клеток животных, как первичные, так и трансформированные и трансфицированные. Следует отметить, что тестирование на клеточных культурах является обязательным этапом при разработке лекарственных препаратов, предшествующим тестированию соответствующих соединений на экспериментальных животных. На рис. 1 представлены различные типы клеточных культур, используемые для скрининга соединений, представляющих фармакологический интерес.

Культуры клеток млекопитающих можно условно разделить на два основных типа: первичные и трансформированные. Отдельно следует отметить искусственно трансфицированные клеточные культуры млекопитающих, содержащие ген, ответственный за развитие того или иного заболевания у человека. Такие культуры были использованы нами ранее для тестирования различных соединений пептидной природы на наличие у них нейропротекторной активности [1, 2].

Однако животные и полученные от них клеточные культуры зачастую не являются адекватной моделью при разработке лекарственных соединений из-за их видоспецифичности. Извест-

но, что некоторые препараты, успешно прошедшие тестирование на этих моделях, впоследствии оказывались непригодными и даже порой токсичными для человека [3, 4].

Репрограммирование соматических клеток и получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) млекопитающих, включая человека, открывают новые перспективы в трансплантологии и изучении молекулярных и клеточных основ заболеваний человека *in vitro* [5, 6]. Развитие данной технологии также создает новые возможности для разработки моделей ряда тяжелых патологий человека, в т.ч. нейродегенеративных, а также тест-систем, позволяющих проводить масштабный скрининг *in vitro* соединений, являющихся основой лекарственных препаратов, с учетом индивидуальных особенностей пациента [7–9].

Важнейшей особенностью ИПСК является их способность дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма. В настоящее время получены различные производные из ИПСК человека: пигментный эпителий сетчатки, мотонейроны, кортикальные нейроны, ГАМКергические, дофаминергические и сенсорные нейроны, клетки Пуркинье, олигодендроциты, клетки эндотелия, кардиомиоциты, гематopoэтические клетки, остеогенные клетки, нейтрофилы и др. [5, 6]. Большая часть этих клеток была получена от пациентов с различными генетическими патологиями и имела измененный генотип, характерный для конкретных заболеваний. Такие клетки послужили моделью как для молекулярно-генетического изучения патогенеза заболеваний, так и для скрининга потенциальных лекарственных веществ [6].

Особое преимущество ИПСК человека для изучения функций и различных патологий нервной системы, а также для поиска эффективных форм лечения неврологических заболеваний связано с несколькими принципиальными моментами:

1) невозможностью получения нейронов из мозга взрослого человека (за исключением некоторых операций по удалению злокачественных опухолей);

2) отсутствием роста дифференцированных нейронов человека в культуре;

3) возможностью получения неограниченного количества ИПСК и их производных;

4) возможностью получения ИПСК от конкретных доноров, а также пациентов с известными нейродегенеративными заболеваниями;

5) возможностью осуществления направленной дифференцировки ИПСК в нейрональном и глиальном направлениях *in vitro* с получением нейронов определенной эргичности.

Благодаря использованию ИПСК человека в нашем коллективе была разработана тест-система, позволяющая проводить масштабный скрининг различных соединений, представляющих интерес для фармакологии, и оценивать их цито- и эмбриотоксичность, а также нейропротекторный потенциал [10, 11].

Целью настоящей работы являлась демонстрация эффективности разработанной и запатентованной тест-системы для поиска соединений с нейропротекторной активностью на примере двух групп химических соединений: пептидов семейства меланокортинов (альфа-меланоцитстимулирующего гормона (альфа-МСТ), семакса (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и PGP (Pro-Gly-Pro)) и эндоканнабиноидов (N-докозагексаноилдофамина (N-ДДА) и N-арахидоноилдофамина (N-АДА)).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование клеток и синтез соединений.

Работу проводили на культурах ИПСК человека и их дифференцированных производных, полученных нами ранее [12]. Культивирование и оценку пролиферативной активности ИПСК проводили, как описано ранее [13]. Синтез меланокортинов (МК) был осуществлен в Отделе химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН, а синтез эндоканнабиноидов (ЭК) – в лаборатории оксипиринов Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Оценка цитотоксичности исследуемых соединений на ИПСК. ИПСК рассеивали по 40 тыс.

клеток на лунку в 24-луночный планшет и культивировали в 1 мл среды mTeSR1 («STEMCELL Technologies», Канада) в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37 °C и 5,0%-ном содержании CO₂. Нейрональные предшественники, полученные из ИПСК по описанной ранее методике [14], рассеивали по 20 тыс. клеток на лунку в 96-луночный планшет и культивировали в нейрональной среде: DMEM/F12 («Gibco», США), заменитель сыворотки («Gibco», США) – 2%, добавка B27 (50×; «Gibco», США) – 1%, 2 мМ глутамин («ICN Biomedicals», США), 1 мМ заменимые аминокислоты («Пан-Эко», Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия), 10 мкМ SB431542 («Stemgent», США), 80 нг/мл Noggin («Stemgent», США), в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37 °C и 5,0%-ном содержании CO₂. Планшеты предварительно покрывали матригелем («Corning», США). На следующий день вносили исследуемые вещества: пептиды в конечных концентрациях 0,001, 0,1 и 10 мкМ и антибиотик генетицин (G418; Gibco, США) в концентрации 50, 100 и 200 мкг/мл. Смену среды с одновременным внесением исследуемых веществ осуществляли через 48 ч. На третьи сутки после внесения исследуемых соединений проводили оценку пролиферативной активности клеток с использованием МТТ-теста. Для этого в лунку вносили свежеприготовленный раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромид) в концентрации 0,3 мг/мл по 400 мкл на лунку и инкубировали в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе. Затем раствор МТТ удаляли, вносили ДМСО (400 мкл на лунку) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на шейкере («Erpendorf», Германия). Оптическое поглощение в лунках измеряли при 600 нм с помощью планшетного ридера Infinite M200 Pro («Tecan», Швейцария).

Влияние исследуемых веществ на формирование эмбрионных тел из ИПСК. Для получения эмбрионных тел колонии ИПСК снимали с подложки с использованием диспазы («Gibco», США). Далее колонии ИПСК переносили в 24-луночный планшет с ультранизкой адгезией («Costar», США) по 160 тыс. клеток на лунку в 1 мл ростовой среды mTeSR1 для недифференцированных клеток с одновременным добавлением исследуемых пептидов в конечных концентрациях 0,001, 0,1 и 10 мкМ, а также генетицина в конечной концентрации 50 мкг/мл и культивировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37 °C и 5,0%-ном содержании CO₂. После этого проводили половинную смену среды на среду для роста эмбрионных тел следующего состава: DMEM/F12 («Gibco», США), фетальная

бычья сыворотка («Nyclone», Дания) — 20%, 2 мМ L-глутамин, 0,1 мМ β -меркаптоэтанол, 1 мМ заменимые аминокислоты («ПанЭко», Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия). Через 24 ч среду полностью заменяли средой для роста эмбрионных тел с добавлением исследуемых пептидов и генетицина. Подсчет эмбрионных тел осуществляли под микроскопом через 24–48 ч после посева, для чего всю суспензию переносили в 96-луночный круглодонный планшет по 100 мкл на лунку. Это позволило максимально точно определить количество эмбрионных тел в каждом варианте.

Получение дифференцированных культур, обогащенных дофаминергическими нейронами. Нейрональные предшественники рассеивали на чашки Петри, обработанные матригелем, по 200 тыс. клеток/см². На следующий день среду заменяли на дифференцировочную среду I типа: DMEM/F12 («Gibco», США), заменитель сыворотки («Gibco», США) — 2%, добавка B27 (50 $\times$; «Gibco», США) — 1%, 2 мМ глутамин («ICN Biomedicals», США), 1 мМ заменимые аминокислоты («ПанЭко», Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия), 100 нг/мл Shh («PeproTech», США), 20 нг/мл FGF8 («PeproTech», США) и 10 мкМ пурморфамин («Stemgent», США). Клетки культивировали в течение 10 дней, меняя среду через день. Затем клетки переводили на дифференцировочную среду II типа: DMEM/F12 («Gibco», США), заменитель сыворотки («Gibco», США) — 2%, добавка B27 (50 $\times$; «Gibco», США) — 1%, 2 мМ L-глутамин («ICN Biomedicals», США), смесь аминокислот («ПанЭко», Россия) — 1%, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия), 20 нг/мл BDNF («PeproTech», США), 20 нг/мл GDNF («PeproTech», США), 200 мкМ аскорбиновая кислота («ПанЭко», Россия) и 4 мкМ форсколин («Stemgent», США), на которой культивировали клетки в течение 14–21 дней в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37 °C и 5,0%-ном содержании CO₂, смену среды проводили каждые 48 ч.

Определение нейротрофических свойств исследуемых веществ в условиях окислительного стресса на нейрональных предшественниках и дофаминергических нейронах. Нейрональные предшественники по 20–30 тыс. клеток рассеивали на 96-луночный планшет (покрытый матригелем) в 100 мкл нейрональной среды на лунку и культивировали в течение 24 ч. Для получения дофаминергических нейронов осуществляли культивирование, как описано в предыдущем разделе. После получения зрелых нейронов проводили полную смену среды на среду для тестирования (DMEM/F12, 2 мМ L-глутамин («ICN Biomedicals Inc», США), пенициллин-стрептомицин (50 ед/мл) с добавлением МК (семакс, альфа-МСТ, PGP) в конечной концентрации 1,0 нМ или ЭК (N-ДДА, N-АДА) в конечной концентрации 2,5 или 5,0 мкМ по 50 мкл на лунку. В качестве контролей использовали равный объем растворителя PBS для МК и ДМСО для ЭК. Инкубацию проводили в течение 40 мин, вносили еще по 50 мкл среды, содержащей 200 мкМ H₂O₂, далее инкубировали в течение 3 ч и затем проводили полную смену среды на среду для тестирования. Количество жизнеспособных нейрональных предшественников определяли на следующий день с помощью МТТ-теста.

Иммунофлуоресцентный анализ. Планшеты с дофаминергическими нейронами (ДА-нейронами) фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали антителами к тирозингидроксилазе и β III-тубулину. Иммунофлуоресцентный анализ проводили, как было описано ранее [12], с использованием поликлональных антител кролика к тирозингидроксилазе («Abcam», США) в разведении 1 : 1000 и моноклональных антител мыши к β III-тубулину («Abcam», США) в разведении 1 : 2000. Детекцию осуществляли с помощью поликлональных антител козы к иммуноглобулинам мыши и кролика, конъюгированных с красителями Alexa 488 и Alexa 546 соответственно в разведении 1 : 2000 («Thermo Fischer», США). Подсчет окрашенных клеток осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа AXIO Imager Z1 («Zeiss», Германия). Дополнительно в лунках оценивали интенсивность флуоресцентного сигнала соответствующих красителей с помощью планшетного ридера Infinite M200 Pro («Tecan», Швейцария). Анализ микрофотографий и подсчет количества ядер и клеток проводили с помощью программы ImageJ-win64 (США), плагин ITCN.

Статистический анализ. Результаты представлены как средние значения 3–4 независимых экспериментов. В каждом эксперименте было 3–4 повторности на точку. Для анализа данных применяли методы описательной статистики (средние значения и стандартное отклонение). Значимость различий между экспериментальными группами оценивали с помощью дисперсионного анализа (односторонний ANOVA). Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как было отмечено выше, в нашем коллективе на основе ИПСК человека была разработа-

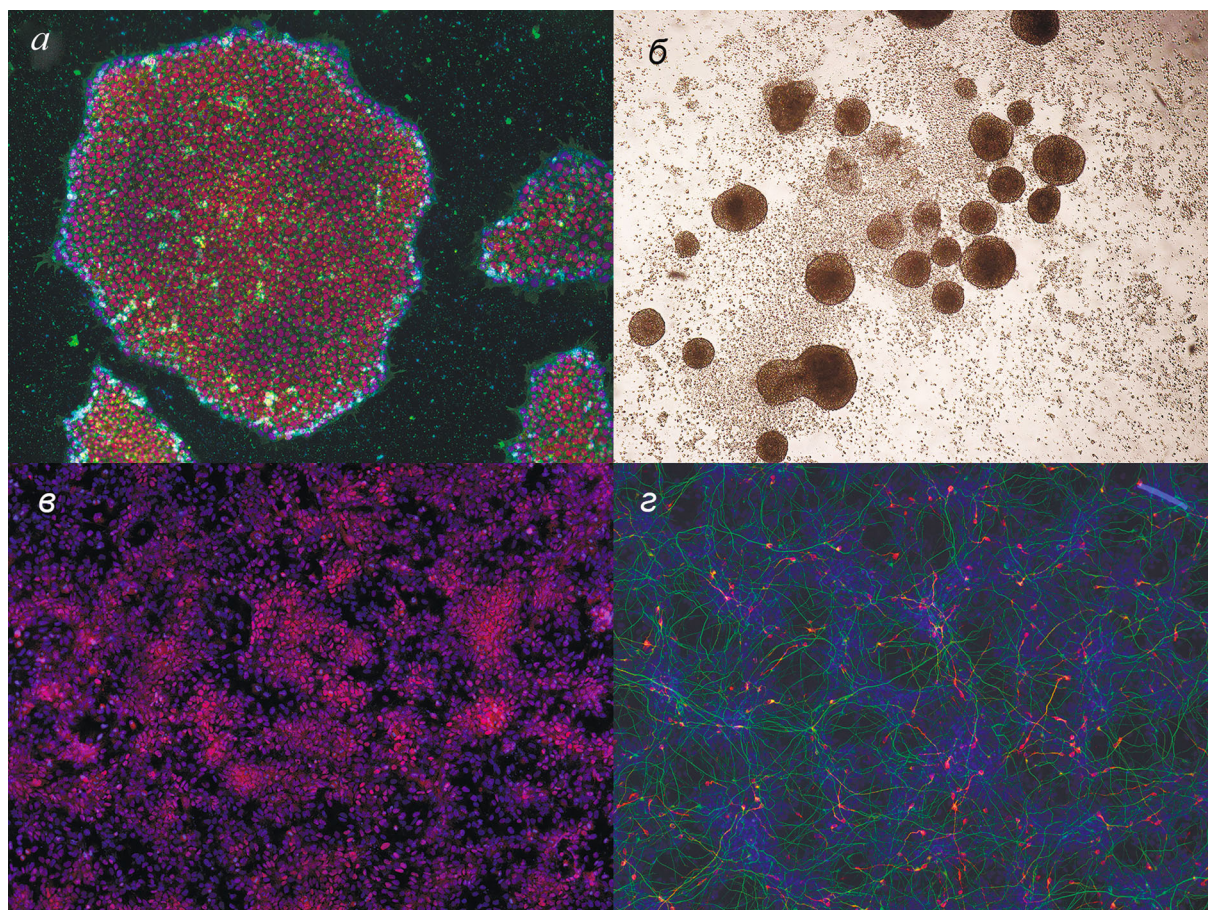


Рис. 2. Культуры ИПСК, находящиеся на разных стадиях дифференцировки, которые были использованы в настоящей работе: *а* – недифференцированные ИПСК. Иммунофлуоресцентная детекция: SSEA-4 (зеленый), Oct3/4 (красный), DAPI (синий); *б* – эмбриоидные тела (без окрашивания); *в* – нейрональные предшественники. Иммунофлуоресцентная детекция: Sox 1 (красный), DAPI (синий); *г* – дифференцированные нейроны. Иммунофлуоресцентная детекция: βIII-тубулин (зеленый), тирозингидроксилаза (красный), DAPI (синий); $\times 100$

на тест-система, позволяющая проводить масштабный скрининг различных соединений, представляющих интерес для фармакологии, и оценивать их цито- и эмбриотоксичность, а также нейропротекторный потенциал [10, 11]. В разработанной тест-системе были использованы недифференцированные ИПСК, эмбриоидные тела, нейрональные предшественники и дифференцированные в нейрональном направлении культуры клеток, обогащенные ДА-нейронами. Микрофотографии использованных культур клеток представлены на рис. 2.

Цито- и эмбриотоксичность, а также пролиферативную активность оценивали с помощью МТТ-теста как наиболее простого метода для проведения масштабного скрининга различных соединений. Нейропротекторный потенциал исследуемых соединений в дифференцированных культурах определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа по экспрессии спе-

цифических маркеров (маркера нейронов βIII-тубулина и маркера ДА-нейронов тирозингидроксилазы). В качестве положительного стандарта использовали пептид семакс, являющийся основой лекарственного препарата с установленными нейропротекторными свойствами [15, 16], а в качестве отрицательного стандарта – антибиотик генетицин (G418), оказывающий цитотоксическое действие на эукариотические клетки.

Влияние пептидов семейства МК на пролиферативную активность ИПСК и способность формировать эмбриоидные тела. Было изучено действие МК в концентрациях от 0,001 до 10 мкМ на выживаемость и пролиферацию недифференцированных ИПСК; в качестве контроля использовали генетицин (G418) в концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл. Полученные результаты представлены на рис. 3. Было показано, что G418 во всех исследованных concentra-

циях вызывал выраженную гибель клеток. Пептиды семакс, альфа-МСГ и PGP в широком диапазоне концентраций не оказывали влияния на пролиферативную активность ИПСК и не обладали цитотоксическим действием (рис. 3).

Далее было исследовано влияние тестируемых соединений на формирование эмбрионидных тел, которые моделируют начальные этапы эмбрионального развития *in vitro*. Для этого ИПСК снимали с подложки и помещали в планшеты с предельно низкой адгезией для исключения их прикрепления к подложке. В таком состоянии ИПСК вступают на начальный путь дифференцировки и формируют эмбрионидные тела. Одновременно с помещением ИПСК в адгерентные условия культивирования в среду вносили исследуемые вещества. Количество сформированных эмбрионидных тел оценивали через 72 ч прямым подсчетом под микроскопом. Полученные результаты представлены на рис. 4. Было показано, что пептиды семейства МК не оказывают значимого влияния на количество сформированных эмбрионидных тел, тогда как антибиотик генетицин в концентрации 50 мкг/мл существенно снижал количество образующихся эмбрионидных тел (рис. 4), а в концентрациях 100 и 200 мкг/мл — полностью блокировал их образование (данные не приведены).

Оценка нейропротекторных свойств исследуемых соединений на разных стадиях нейрональной дифференцировки ИПСК человека. Мы исследовали способность пептидов семейства МК (семакса, альфа-МСГ и PGP), а также ЭК (N-ДДА и N-АДА) оказывать нейропротекторное действие в условиях окислительного стресса, индуцированного добавлением перекиси водо-

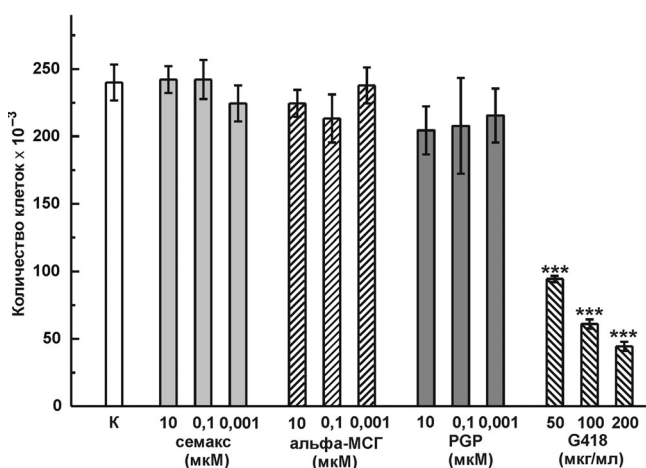


Рис. 3. Влияние пептидов семейства меланокортинов (семакса, альфа-МСГ, PGP) и генетицина (G418) на пролиферативную активность ИПСК; $n = 3$; *** $p \leq 0,005$

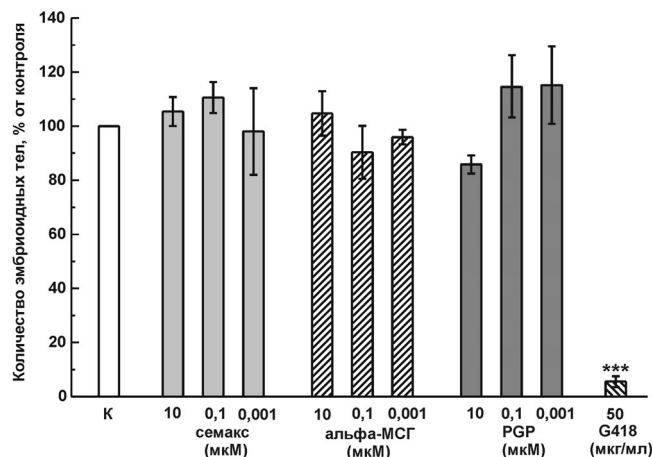


Рис. 4. Влияние пептидов семейства меланокортинов (семакса, альфа-МСГ, PGP) и генетицина (G418) на способность ИПСК формировать эмбрионидные тела; $n = 4$; *** $p \leq 0,005$

рода. Для этого нейрональные предшественники высевали на 96-луночные планшеты, покрытые матригелем. Через 24 ч проводили смену среды с одновременным внесением исследуемых веществ, инкубировали в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе и вносили перекись водорода в указанной концентрации. Количество живых клеток оценивали через 24 ч с помощью МТТ-теста. Полученные результаты представлены на рис. 5. Видно, что и МК, и ЭК способны оказывать нейропротекторное действие на нейрональные предшественники, полученные из ИПСК. Так, в присутствии пептидов семакса, альфа-МСГ и PGP число выживших клеток было, соответственно, примерно на 15, 20, и 10,0% больше, чем в контроле. При использовании N-АДА и N-ДДА количество выживших клеток было больше на 36 и 47% соответственно.

Для получения культур, обогащенных ДА-нейронами, нейрональные предшественники высевали на 96-луночные планшеты, покрытые матригелем, и культивировали, как описано в разделе «Методы исследования». На 15-е сутки культивирования осуществляли смену среды с одновременным внесением исследуемых веществ (МК в концентрации 1,0 нМ и ЭК в концентрациях 2,5 и 5,0 мкМ), инкубировали в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе и вносили H_2O_2 до конечной концентрации 200 мкМ. Через 24 ч клетки фиксировали и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к β III-тубулину (выявление общей нейрональной популяции) и тирозингидроксилазе (выявление ДА-нейронов). Было показано, что пептиды семейства МК осуществляют разную степень нейропротекции (таблица). При использовании се-

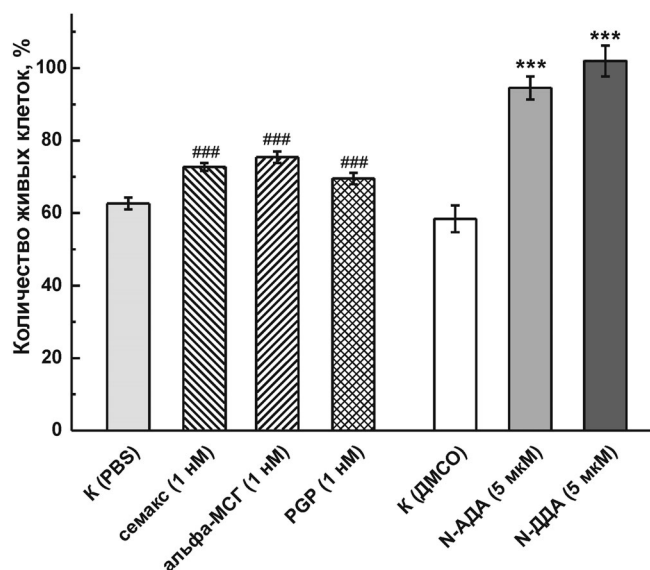


Рис. 5. Влияние пептидов семейства меланокортинов (семакса, альфа-МСГ, PGP), а также эндоканнабиноидов (N-АДА и N-ДДА) на выживаемость нейрональных предшественников при окислительном стрессе, индуцированном H_2O_2 в концентрации 200 мкМ. За 100% принято количество живых клеток в присутствии исследуемых веществ без добавления H_2O_2 ; $n = 4$; *** $p \leq 0,001$ по сравнению с контролем (PBS); ### $p \leq 0,001$ по сравнению с контролем (ДМСО)

макса количество выживших клеток в обеих популяциях (Tub^+ и TH^+) было на ~40% больше, чем в контроле, тогда как альфа-МСГ показал такую же степень защиты только на ДА-нейронах (TH^+) (таблица).

Влияние ЭК N-ДДА и N-АДА на выживаемость дифференцированных нейронов при окислительном стрессе, индуцированном H_2O_2 , исследовали при двух концентрациях: 2,5 и 5,0 мкМ. При использовании ЭК в концентрации 2,5 мкМ не было отмечено достоверного защитного действия на эти клетки (рис. 6). Однако при использовании ЭК в концентрации 5,0 мкМ оба вещества проявили достоверные

нейропротекторные свойства (таблица). При добавлении N-АДА количество выживших клеток в обеих популяциях было на ~30% больше, чем в контроле, а при использовании N-ДДА нейропротекция в дифференцированных культурах, обогащенных ДА-нейронами, была максимальной из всех проанализированных соединений и составила ~70% (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ИПСК, обладающие нормальным кариотипом и способные дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма, являются уникальной моделью для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований [7, 9, 17]. Последовательно проходя стадии дифференцировки от незрелых предшественников до терминально дифференцированных клеток, ИПСК позволяют с разных сторон оценивать влияние различных химических соединений, представляющих интерес для практической медицины. Тестирование соединений на ИПСК человека дает возможность заменить аналогичные эксперименты на других клетках животных. В последние годы использование ИПСК и их дифференцированных производных в качестве тест-системы для поиска соединений, представляющих фармакологический интерес, получило широкое распространение [6, 9, 17]. Так, гепатоциты и кардиомиоциты были использованы для поиска соединений, эффективных при лечении гиперхолестеринемии и ряда кардиологических заболеваний [18, 19]. Большое внимание уделяется применению дифференцированных в нейрональном направлении ИПСК для поиска соединений с нейропротекторной активностью [20–23].

С использованием ИПСК человека в нашем коллективе была разработана и запатентована тест-система, позволяющая проводить скри-

Влияние пептидов семейства меланокортинов (альфа-МСГ и семакса) и эндоканнабиноидов (N-АДА и N-ДДА) на выживаемость дифференцированных нейронов при окислительном стрессе

Дифференцированные нейроны	Количество выживших нейронов					
	МК			ЭК		
	контроль, PBS	семакс, 1 нМ	альфа-МСГ, 1 нМ	контроль, ДМСО	N-АДА, 5 мкМ	N-ДДА, 5 мкМ
Tub^+ -клетки	1108 ± 84	1620 ± 276	1109 ± 59	2608 ± 280	3300 ± 105**	2434 ± 595
TH^+ -клетки	132 ± 10	189 ± 28**	185 ± 19***	181 ± 21	236 ± 43**	323 ± 14***

Примечание. Tub^+ -клетки — клетки, окрашенные антителами к β III-тубулину (общая нейрональная популяция); TH^+ -клетки — клетки, окрашенные антителами к тирозингидроксилазе (ДА-нейроны); $n = 4$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$.

нинг различных соединений с оценкой их цито- и эмбриотоксичности, а также нейропротекторного потенциала [10, 11]. Предложенная тест-система дает возможность оценивать соединения с точки зрения не только цитотоксичности, но и их эмбриотоксических и тератогенных свойств, поскольку формирование эмбрионидных тел имитирует предимплантационную стадию развития в условиях *in vitro*. Дальнейшая дифференцировка эмбрионидных тел *in vitro* в течение 3–5 дней аналогична развитию эмбриона *in vivo* от бластоцисты (3,5 дня) до стадии гаструляции (7,5 дней) [24]. В связи с этим часто сопоставляют эмбриогенез в организме *in vivo* и создание условий эмбрионального развития *in vitro*. В настоящей работе мы показали, что некоторые пептиды семейства МК не оказывают влияния на пролиферативную активность ИПСК и формирование эмбрионидных тел, т.е. не обладают цито- и эмбриотоксическими свойствами. При этом антибиотик генетицин вызывает гибель недифференцированных ИПСК и блокирует способность формировать эмбрионидные тела, проявляя выраженные цитотоксические свойства. Способность ИПСК дифференцироваться в нейроны позволяет выявлять вещества, обладающие нейротоксичностью, а также соединения с нейропротекторными свойствами. Мы проанализировали две группы соединений (МК и ЭК) на разных этапах нейрональной дифференцировки. Эти соединения рассматриваются как потенциальные лекарственные средства, обладающие нейропротекторными свойствами [15, 16, 25, 26]. Однако большинство исследований положительного эффекта этих соединений было проведено либо на опухолевых клетках человека, либо на клетках животного происхождения [25–27]. Действительно, N-АДА и N-ДДА обладали нейропротекторными свойствами в первичных нейрональных культурах, полученных из мозга крысы [25, 26]. Аналогичные эффекты были получены и для одного из представителей МК — семакса [15, 16].

Данные, полученные в этих исследованиях, могут быть лишь отчасти экстраполированы на «нормальные» клетки человека. В нашей работе мы впервые исследовали влияние пептидов семейства МК и ЭК на нейрональную популяцию клеток человека, находящуюся на разных стадиях дифференцировки. Было показано, что на стадии нейрональных предшественников в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода, все тестируемые соединения оказывают нейропротекторное действие. При этом у разных групп соединений эффективность различается. Количество вы-

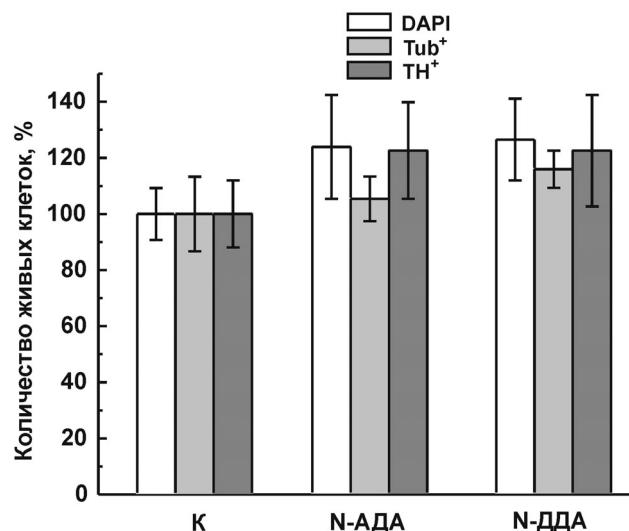


Рис. 6. Влияние эндоканнабиноидов (N-АДА и N-ДДА) в концентрации 2,5 мкМ на выживаемость нейронов при окислительном стрессе. За 100% принято количество живых клеток в присутствии исследуемых веществ без добавления H_2O_2 ; $n = 3$

живших клеток при окислительном стрессе в присутствии ЭК было на ~40%, а с пептидами семейства МК — только на 10–20% больше, чем в контроле. На дифференцированных культурах, обогащенных ДА-нейронами, исследуемые соединения показали нейропротекторные свойства разной интенсивности. Было установлено, что в концентрации 2,5 мкМ ЭК не обладали достоверным нейропротекторным действием. Однако в более высокой концентрации (5,0 мкМ) максимальную нейропротекцию по отношению к ДА-нейронам (~70%) осуществлял N-ДДА, тогда как нейропротекторный эффект N-АДА составил только ~30%. Исследованные пептиды (семакс и альфа-МСГ) также обладали существенным нейропротекторным эффектом (~40%) в этих культурах (таблица).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов подтверждена эффективность созданной ранее тест-системы, которая позволяет оценивать как цито- и эмбриотоксическое действие исследуемых соединений, так и их нейропротекторные свойства. Вопрос о молекулярных механизмах нейропротекторных эффектов исследованных соединений в настоящее время остается открытым. Можно предположить, что эти эффекты осуществляются через специфические рецепторы, локализованные на поверхности ИПСК, наличие которых для МК и ЭК было установлено нами ранее [13, 28]. В случае ЭК было показано, что их нейропротекторное действие связано с наличием на клетках со-



Рис. 7. ИПСК и их нейроглиальные производные, используемые для отбора соединений с нейропротекторной активностью

ответствующих рецепторов 1-го и 2-го типов [29].

Очевидно, что крайне важно тестировать потенциальные лекарственные соединения на специализированных клетках, находящихся в определенной стадии дифференцировки. Однако при этом необходимо учитывать потенциальные риски негативного воздействия на окружающую популяцию клеток. Для нейронов такими клетками являются глиальные клетки, количество которых в мозге человека в ~10 раз больше, чем нейронов. До сих пор исследования вовлеченности глиальных клеток в развитие нейродегенеративных процессов имели ограниченный характер. Хотя следует отметить, что, например, астроциты играют важную роль в развитии ряда нейродегенеративных заболеваний [30, 31]. Поэтому в дальнейшем в нашем коллективе планируется получение из ИПСК глиальных культур для создания аналогичной тест-системы для скрининга потенциальных лекарственных веществ с нейропротекторной активностью. Ранее мы применяли подобную тест-систему, основанную на использовании первичных культур нервных и глиальных клеток, полученных из мозга крысы [27]. Это представляется особенно актуальным при использовании ИПСК, полученных от пациентов с генетическими формами нейродегенеративных заболеваний. Ведь в данном случае существует возможность наблюдать эффекты не только на специализированных нервных клетках, подвергающихся нейродегенерации в головном мозге, но и оценить вклад глиальных клеток в этот процесс [31, 32].

На рис. 7 суммированы разнообразные возможности использования ИПСК и их производных для отбора соединений с нейропротекторной активностью.

Перспективным направлением в плане создания более сложных моделей для изучения патологий нервной системы человека и скрининга потенциальных лекарственных препаратов с нейропротекторным действием является использование трехмерных нейроглиальных культур — 3D-культур или органойдов, получение которых впервые было описано в 2013 г. [33]. В настоящее время наблюдается интенсивное использование таких культур в качестве моделей для изучения ряда патологий мозга [34, 35]. Однако при всей их привлекательности (в мозге клетки формируют сложные трехмерные структуры) при работе *in vitro* существует ряд ограничений, которые не позволяют рассматривать их в качестве адекватной модели для структур, формирующихся в мозге *in vivo*. И в первую очередь это связано с разным набором трофических и дифференцировочных факторов, используемых организмом *in vivo* и экспериментаторами *in vitro*. Тем не менее работы, направленные на получение более стандартизованных органойдов, в настоящее время интенсивно проводятся [36].

Отдельно следует сказать о возможности применения предложенной тест-системы для более масштабного скрининга химических соединений на наличие нейропротекторной активности. Использование 96- и 384-луночных планшетов, высокочувствительной флуоресцентной и цитохимической детекции, а также современных анализаторов позволяет рассчитывать на возможность одновременного скрининга тысячи и более соединений в день. Такие возможности в настоящее время известны и применяются в ряде зарубежных лабораторий [37–42]. Проблема, которая остается, если речь идет о культурах дифференцированных нейронов, связана с длительным временем их терминальной дифференцировки *in vitro* (более 3–4 недель).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов доказана перспективность использования ИПСК и их нейрональных производных, находящихся на разных стадиях дифференцировки, для отбора соединений с нейропротекторной активностью и выявлен ряд соединений, обладающих такой активностью.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-01661a) и про-

граммы Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИМГ РАН «Центр клеточных и генных технологий».

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность В.В. Безуглову (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и

Ю.А. Овчинникова РАН) за предоставление эндоканнабиноидов для проведения работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гривенников И.А., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Антонов С.А., Кобылянский А.Г., Мясоедов Н.Ф. (2011) Применение первичных культур нервных и глиальных клеток млекопитающих для отбора соединений с нейропротекторной активностью, *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*, **7**, 24–31.
2. Новосадова Е.В., Гривенников И.А., Бобрышева И.В., Григоренко А.П., Андреева Л.А., Рогаев Е.И., Тарантул В.З. (2012) Семакс положительно влияет на жизнеспособность клеток трансгенной линии феохромоцитомы РС12, несущей мутантный ген пресенилина 1 человека, *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*, **8**, 15–21.
3. Шефер К., Шпильманн Х., Феттер К. (2010) В кн. *Лекарственная терапия в период беременности и лактации* (под ред. Романова Б.К.), Логосфера, Москва, 768 с.
4. Kalter, H. (2003) Teratology in the 20th century: environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established, *Neurotoxicol. Teratol.*, **25**, 131–282.
5. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861–872, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
6. Elitt, M.S., Barbar, L., and Tesar, P.J. (2018) Drug screening for human genetic diseases using iPSC models, *Hum. Mol. Genet.*, **27**, R89–R98, doi: 10.1093/hmg/ddy186.
7. Piccinno, M.S., Petrachi, T., Resca, E., Strusi, V., Bergamini, V., Mulas, G.A., Mari, G., Dominici, M., and Veronesi, E. (2018) Label-free toxicology screening of primary human mesenchymal cells and iPS-derived neurons, *PLoS One*, **13**, e0201671, doi: 10.1371/journal.pone.0201671.
8. Vu, M., Li, R., Baskfield, A., Lu, B., Farkhondeh, A., Gorshkov, K., Motabar, O., Beers, J., Chen, G., Zou, J., Espejo-Mojica, A.J., Rodriguez-Lopez, A., Almeciga-Diaz, C.J., Barrera, L.A., Jiang, X., Ory, D.S., Marugan, J.J., and Zheng, W. (2018) Neural stem cells for disease modeling and evaluation of therapeutics for Tay–Sachs disease, *Orphanet. J. Rare Dis.*, **13**, 152, doi: 10.1186/s13023-018-0886-3.
9. Cota-Coronado, A., Ramirez-Rodriguez, P.B., Padilla-Camberos, E., Diaz, N.F., Flores-Fernandez, J.M., Avila-Gonzalez, D., and Diaz-Martinez, N.E. (2018) Implications of human induced pluripotent stem cells in metabolic disorders: from drug discovery toward precision medicine, *Drug Discov. Today*, **24**, 334–341, doi: 10.1016/j.drudis.2018.10.001.
10. Новосадова Е.В., Андреева Л.А., Арсеньева Е.Л., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н., Лебедева О.С., Макарова И.В., Мануилова Е.С., Мясоедов Н.Ф., Тарантул В.З. (2016) Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для оценки цито- и эмбриотоксических свойств фармакологических соединений, Патент РФ № 2599847 С1.
11. Новосадова Е.В., Андреева Л.А., Арсеньева Е.Л., Грефенштейн М.А., Гривенников И.А., Иллариошкин С.Н., Иноземцева Л.С., Лебедева О.С., Мануилова Е.С., Мясоедов Н.Ф. (2018) Способ оценки нейропротекторных свойств веществ *in vitro* и тест-система для его осуществления, Патент РФ № 2646446 С1.
12. Novosadova, E.V., Nekrasov, E.D., Chestkov, I.V., Surdina, A.V., Vasina, E.M., Bogomazova, A.N., Manuilova, E.S., Arsenyeva, E.L., Simonova, V.V., Konovalova, E.V., Fedotova, E.Yu., Abramychcheva, N. Yu., Khaspekov, L.G., Grivennikov, I.A., Tarantul, V.Z., Kiselev, S.L., and Illarioshkin, S.N. (2016) A platform for studying molecular and cellular mechanisms of Parkinson's disease based on human induced pluripotent stem cells, *Sovremennye tehnologii v medicine*, **8**, 155–164.
13. Новосадова Е.В., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Андреева Л.А., Лебедева О.С., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. (2016) Изучение влияния альфа-меланокортикостимулирующего гормона на пролиферацию и начальные стадии дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, *Доклады Академии наук*, **467**, 607–611.
14. Novosadova, E.V., Arsenyeva, E.L., Manuilova, E.S., Khaspekov, L.G., Bobrov, M.Y., Bezuglov, V.V., Illarioshkin, S.N., and Grivennikov, I.A. (2017) Neuroprotective properties of endocannabinoids N-arachidonoyl dopamine and N-docosahexaenoyl dopamine examined in neuronal precursors derived from human pluripotent stem cells, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1367–1372, doi: 10.1134/S0006297917110141.
15. Asmarin, I.P., Nezavibat'ko, V.N., Miasoedov, N.F., Kamenskii, A.A., Grivennikov, I.A., Ponomareva-Stepnaia, M.A., Andreeva, L.A., Kaplan, A.Ia., Koshelev, V.B., and Riasina, T.V. (1997) A nootropic adrenocorticotropin analog 4-10-semax (15 years experience in its design and study), *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova*, **47**, 420–430.
16. Miasoedov, N.F., Skvortsova, V.I., Nasonov, E.L., Zhuravleva, E.Iu., Grivennikov, I.A., Arsenyeva, E.L., and Sukhanov, I.I. (1999) Investigation of mechanisms of neuro-protective effect of semax in acute period of ischemic stroke, *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **99**, 15–19.

17. Новосадова Е.В., Гривенников И.А. (2014) Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: от получения до применения в биохимических и биомедицинских исследованиях, *Успехи биологической химии*, **54**, 3–38.
18. Cayo, M.A., Mallanna, S.K., and Di Furio, F. (2017) A drug screen using human iPSC-derived hepatocyte-like cells reveals cardiac glycosides as a potential treatment for hypercholesterolemia, *Stem Cell*, **20**, 478–489, doi: 10.1016/j.stem.2017.01.011.
19. Del'Alamo, J.C., Lemons, D., and Serrano, R. (2016) High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 1717–1727.
20. Malik, N., Efthymiou, A.G., Mather, K., Chester, N., Wang, X., Nath, A., Rao, M.S., and Steiner, J.P. (2014) Compounds with species and cell type specific toxicity identified in a 2000 compound drug screen of neural stem cells and rat mixed cortical neurons, *Neurotoxicology*, **45**, 192–200, doi: 10.1016/j.neuro.2014.10.007.
21. Peng, J., Liu, Q., Rao, M.S., and Zeng, X. (2013) Using human pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons to evaluate candidate Parkinson's disease therapeutic agents in MPP⁺ and rotenone models, *J. Biomol. Screen*, **18**, 522–533, doi: 10.1177/1087057112474468.
22. Little, D., Ketteler, R., Gissen, P., and Devine, M.J. (2019) Using stem cell-derived neurons in drug screening for neurological diseases, *Neurobiol. Aging*, **78**, 130–141, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.008.
23. Garcia-Leon, J.A., Vitorica, J., and Gutierrez, A. (2019) Use of human pluripotent stem cell-derived cells for neurodegenerative disease modeling and drug screening platform, *Future Med. Chem.*, **11**, 1305–1322, doi: 10.4155/fmc-2018-0520.
24. Desbaillets, I., Ziegler, U., Groscurth, P., and Gassmann, M. (2000) Embryoid bodies: an *in vitro* model of mouse embryogenesis, *Exp. Physiol.*, **85**, 645–651.
25. Bobrov, M.Y., Lizhin, A.A., Andrianova, E.L., Gretskeya, N.M., Frumkina, L.E., Khaspekov, L.G., and Bezuglov, V.V. (2008) Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine, *Neurosci. Lett.*, **431**, 6–11.
26. Bobrov, M.Y., Lyzhin, A.A., Andrianova, E.L., Gretskeya, N.M., Zinchenko, G.N., Frumkina, L.E., Khaspekov, L.G., and Bezuglov, V.V. (2006) Antioxidant and neuroprotective properties of N-docosahexaenoyl dopamine, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **142**, 425–427.
27. Niu, N., and Wang, L. (2015) *In vitro* human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs, *Pharmacogenomics*, **16**, 273–285, doi: 10.2217/pgs.14.170.
28. Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н., Новосадова Е.В., Гривенников И.А. (2017) Экспрессия каннабиноидных рецепторов 1-го типа на разных этапах нейрональной дифференцировки фибробластов человека, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **163**, 272–275.
29. Vendel, E., and de Lange, E.C. (2014) Functions of the CB1 and CB2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier, *Neuromolecular Med.*, **16**, 620–642, doi: 10.1007/s12017-014-8314-x.
30. Hauser, D.N., and Cookson, M.R. (2011) Astrocytes in Parkinson's disease and DJ-1, *J. Neurochem.*, **117**, 357–358.
31. Krencik, R., and Ullian, E.M. (2013) A cellular star atlas: using astrocytes from human pluripotent stem cells for disease studies, *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 25, doi: 10.3389/fncel.2013.00025.
32. Di Domenico, A., Carola, G., Calatayud, C., Pons-Espinal, M., Munoz, J.P., Richaud-Patin, Y., Fernandez-Carasa, I., Gut, M., Faella, A., Parameswaran, J., Soriano, J., Ferrer, I., Tolosa, E., Zorzano, A., Cuervo, A.M., Raya, A., and Consiglio, A. (2019) Patient-specific iPSC-derived astrocytes contribute to non-cell-autonomous neurodegeneration in Parkinson's disease, *Stem Cell Reports*, **12**, 213–229, doi: 10.1016/j.stemcr.2018.12.011.
33. Lancaster, M.A., Renner, M., and Martin, C.-A. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly, *Nature*, **501**, 373–379, doi: 10.1038/nature12517.
34. Amin, N.D., and Pas, S.P. (2018) Building models of brain disorders with three-dimensional organoids, *Neuron*, **100**, 389–405, doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.007.
35. Bordini, M., Rey, F., Fantini, V., Pansarasa, O., Di Giulio, A.M., Carelli, S., and Cereda, C. (2018) From neuronal differentiation of iPSCs to 3D neuro-organoids: modelling and therapy of neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3972, doi: 10.3390/ijms19123972.
36. Ereemeev, A.V., Volovikov, E.A., Shuvalova, L.D., Davidenko, A.V., Khomyakova, E.A., Bogomiakova, M.E., Lebedeva, O.S., Zubkova, O.A., and Lagarkova, M.A. (2019) Necessity is the mother of invention or inexpensive, reliable, and reproducible protocol for generating organoids, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 321–328, doi: 10.1134/S0006297919030143.
37. McArdle, P., Engberg, S., Bennett, N., Blackett, C., and Wigglesworth, M. (2017) Enabling 1536-well high-throughput cell-based screening through the application of novel centrifugal plate washing, *SLAS Discov.*, **22**, 732–742, doi: 10.1177/2472555216683650.
38. Sherman, S.P., and Bang, A.G. (2018) High-throughput screen for compounds that modulate neurite growth of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Dis. Model Mech.*, **11**, dmm031906, doi: 10.1242/dmm.031906.
39. Han, Y., Miller, A., Mangada, J., Liu, Y., and Swistowski, A. (2009) Identification by automated screening of a small molecule that selectively eliminates neural stem cells derived from hESCs but not dopamine neurons, *PLoS One*, **4**, e7155, doi: 10.1371/journal.pone.0007155.
40. Wang, C., Ward, M.E., Chen, R., Liu, K., Tracy, T.E., Chen, X., Xie, M., Sohn, P.D., Ludwig, C., Meyer-Franke, A., Karch, C.M., Ding, S., and Li, G. (2017) Scalable production of iPSC-derived human neurons to identify tau-lowering compounds by high-content screening, *Stem Cell Reports*, **9**, 1221–1233, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.019.
41. Traub, S., and Heilker, R. (2019) hiPS cell-derived neurons for high-throughput screening, *Methods Mol. Biol.*, **1994**, 243–263, doi: 10.1007/978-1-4939-9477-9_23.
42. Little, D., Luft, C., Pezzini-Picart, O., Mosaku, O., Ketteler, R., Devine, M.J., and Gissen, P. (2019) Seeding induced pluripotent stem cell-derived neurons onto 384-well plates, *Methods Mol. Biol.*, **1994**, 159–164, doi: 10.1007/978-1-4939-9477-9_14.

APPLICATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FOR THE ESTIMATION OF NEUROPROTECTIVE ACTIVITY OF PHARMACOLOGICAL COMPOUNDS

E. V. Novosadova^{1*}, E. L. Arsenyeva¹, S. A. Antonov¹, Y. N. Vanyushina¹, T. V. Malova¹,
A. A. Komissarov¹, S. N. Illarioshkin², L. G. Khaspekov², L. A. Andreeva¹,
N. F. Myasoedov¹, V. Z. Tarantul^{1**}, and I. A. Grivennikov^{1*,**}

¹ *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia; E-mail: novak-img@mail.ru*

² *Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia; E-mail: grivigan@mail.ru*

Received June 20, 2019

Revised July 23, 2019

Accepted August 6, 2019

The creation of effective drugs includes some stages — from the synthesis of chemical compounds and their testing on different models with selection of the most active and safe compounds until clinical trials and introduction in medical practice. Among models being used, both primary and transformed animal cell cultures take an important place. But these cell cultures have drawbacks, first of all, insufficient standardization in the case of primary cells and disturbances in genotype of transformed cell cultures. Obtaining human induced pluripotent stem cells (IPSCs) has opened new possibilities for the development of test-systems for large-scale screening of potential drugs with various spectrum of action. Due to their ability to differentiate into all type cells of the adult organism, IPSCs are a unique model enabling studies of the effects of tested compounds and their potential toxicity throughout the differentiation process *in vitro*. In this paper, compounds from two groups — melanocortins (MC) and endocannabinoids (EC) — were used to exemplify the efficiency of IPSCs and their neuronal derivatives in the selection of compounds with neuroprotective activity. All tested compounds lacked cyto- and embryotoxicity. On the background of hydrogen peroxide toxic effect, some representatives of the MC and EC families imposed neuroprotective action on neuronal precursors and differentiated neuronal cell cultures obtained from IPSCs. The highest neuroprotective effect (~70%) on differentiated cultures enriched with dopaminergic neurons was demonstrated by a member of EC family — N-docosahexanoyl-dopamine. The effect of a representative of MC family, Semax, was ~40% under the same conditions. The possible use of other IPSC derivatives for searching compounds with neuroprotective activity is discussed.

Keywords: test-system, embryotoxicity, neuroprotection, induced pluripotent stem cells, oxidative stress