

УДК 602

ЛЕЧЕБНЫЙ ЭФФЕКТ НЕЙРОНОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ *N*-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА, ПРИ ПАРКИНСОНИЗМЕ

© 2013 г. Y. H. Noh^{1#}, J. Y. Kim^{1#}, D. H. Kim^{1,2}, O. H. Kim¹, J. Park^{1,2}, B.-S. Kee³, D.-S. Sohn⁴, D. Kim¹, Y. H. Chung¹, K. Y. Kim¹, W. B. Lee^{1*}, S. S. Kim^{1*}

¹Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

²BioGrand Biomedical Research Center, BioGrand Inc., Gyeonggi 427-800, Korea

³Department of Psychiatry, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

⁴Department of Thoracic Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Поступила в редакцию 11.09.2012 г.

Принята к печати 21.09.2012 г.

Активация дифференцировки дофаминергических нейронов необходима в случае терапии болезни Паркинсона с использованием стволовых клеток. В представленной работе показано, что *N*-ацетилцистеин более чем в 2 раза повышает эффективность нейрональной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток P19, индуцированной ретиноевой кислотой, глиальная дифференцировка при этом подавляется. Большая часть стволовых клеток, обработанных *N*-ацетилцистеином, пересаженных в головной мозг мышей, моделирующих болезнь Паркинсона, дифференцируется в дофаминергические нейроны и сохраняется в течение 6 недель. При пересадке клеток, индуцированных *N*-ацетилцистеином и ретиноевой кислотой, состояние животных улучшается более существенно, чем при обработке только ретиноевой кислотой. Наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что обработка *N*-ацетилцистеином может использоваться в качестве эффективной стратегии получения стволовых клеток, дифференцирующихся в дофаминергические нейроны, с целью клеточной терапии болезни Паркинсона.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки P19, *N*-ацетилцистеин, дифференцировка, дофаминергические нейроны, болезнь Паркинсона.

RECOVERY FROM PARKINSONISM WITH *N*-ACETYLCYSTEINE-DIFFERENTIATED NEURONS, by Y. H. Noh^{1#}, J. Y. Kim^{1#}, D. H. Kim^{1,2}, O. H. Kim¹, J. Park^{1,2}, B.-S. Kee³, D.-S. Sohn⁴, D. Kim¹, Y. H. Chung¹, K. Y. Kim¹, W. B. Lee^{1*}, S. S. Kim^{1*} (¹Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea; ²BioGrand Biomedical Research Center, BioGrand Inc., Gyeonggi 427-800, Korea; ³Department of Psychiatry, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea; ⁴Department of Thoracic Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea; *e-mail: whitefox@cau.ac.kr; * sungsu@cau.ac.kr). The upregulation of dopaminergic neuronal differentiation is necessary for stem cell therapy in Parkinson's disease (PD). In this study, neuronal differentiation efficiency increased by more than 2 times in P19 embryonic stem cells (ESCs) induced by *N*-acetylcysteine (NAC) and retinoic acid (RA) as compared to RA alone, with suppressed glial differentiation. The majority of NAC-treated stem cells grafted into brains of PD mice differentiated into dopaminergic neurons and persisted well for 6 weeks. Parkinsonism was also greatly improved after grafting NAC-treated cells in comparison to cells treated with only RA. Our results strongly suggest that NAC treatment may be an effective strategy for generating stem cells fated to become dopaminergic neurons for PD clinical therapy.

Keywords: P19 embryonic stem cell, *N*-acetylcysteine, differentiation, dopaminergic neuron, Parkinson's disease.

DOI: 10.7868/S0026898413040186

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НАЦ – *N*-ацетилцистеин; РК – ретиноевая кислота; ЭТ – эмбриональные тельца; FBS – фетальная сыворотка крупного рогатого скота; 6-ОНДА – 6-гидроксидофамин; ГАМК – γ -аминомасляная кислота; ТН – тирозингидроксилаза; MAP-2 – белок 2, ассоциированный с микротрубочками; GAD – глутаматдекарбоксилаза; GFAP – глиальный кислый фибриллярный белок; PBS – фосфатно-солевой буфер.

Y.H. Noh и J.Y. Kim внесли равный вклад в эту работу.

Текст представлен авторами на английском языке.

* Эл. почта: whitefox@cau.ac.kr; sungsu@cau.ac.kr

В основе болезни Паркинсона (БП) лежит дегенерация дофаминергических нейронов [1, 2]. В качестве альтернативной стратегии терапии БП рассматривается возможность использования стволовых клеток. В многочисленных клинических исследованиях применяют стволовые клетки разного происхождения, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), мезенхимные стволовые клетки и клетки-предшественники нейронов [3– 6]. Получены обнадеживающие результаты, указывающие на эффективность клеточной терапии при БП. Предпринято множество попыток получить дофаминергические нейроны из стволовых клеток, изучены различные потенциальные агенты, индуцирующие нейрональную дифференцировку [7, 8]. Однако до сих пор не удалось найти эффективные соединения, способствующие дифференцировке в дофаминергические нейроны.

В настоящей работе изучено действие *N*-ацетилтистеина (НАЦ) на дифференцировку дофаминергических нейронов. НАЦ участвует во многих клеточных процессах [9, 10], но связь между нейрональной дифференцировкой и НАЦ изучена недостаточно. Используя ЭСК Р19, мы подтвердили способность НАЦ индуцировать дифференцировку ЭСК в дофаминергические нейроны *in vitro*. Обработка НАЦ повышает скорость нейрональной дифференцировки, а трансплантация дифференцированных ЭСК Р19, индуцированных НАЦ и ретиноевой кислотой (РК), ведет к функциональному излечению *in vivo* в мышинной модели нейродегенеративных заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток Р19 и дифференцировка. Для субклонирования ЭСК Р19 100 клеток инокулировали в культуральной чашке в 100 мл среды α -MEM (“Gibco”), содержащей бикарбонат (2.2 мг/л, “Sigma-Aldrich”), 1% антибиотика-антимикотика (АА, “Gibco”), 7.5% сыворотки теленка, 2.5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, “Gibco”), 100 мкМ пирувата (“Sigma-Aldrich”). ЭСК Р19 поддерживали в недифференцированном состоянии в культуральных чашках, а затем культивировали в виде эмбриональных телец (ЭТ) с нулевого по 3-й день в присутствии РК (1 мкМ, <0.1% DMSO, “Sigma-Aldrich”) в качестве агентов, индуцирующих агрегацию клеток (стадия 1). ЭТ поддерживали в среде для предшественников, состоящей из α -MEM, 2 мМ глутамина, 2.2 мг/л бикарбоната, 1% антибиотика-антимикотика и 2% FBS (стадия 2). Агрегаты ЭТ диссоциировали в 1%-ном трипсине (“Gibco”) и переносили на чашки для тканевых культур, культуральные планшеты или покрытые поли-*L*-лизинном покровные стекла для терминальной дифференци-

ровки (стадия 3). Дезорганизованные клетки Р19 росли в отсутствие РК и НАЦ. Дифференцированные клетки поддерживались в среде для дифференцировки нейронов, состоящей из модифицированной Дульбекко среды Игла: питательной смеси F-12 (DMEM/F12, “Gibco”), 2 мМ глутамин, 1% АА и 10% FBS. Терминальная дифференцировка достигалась выдерживанием клеток до созревания в течение 13 дней.

Иммунофлуоресценция. Клетки фиксировали и пермеабелизировали в течение 5 мин в смеси метанол/ацетон (50/50) при комнатной температуре и обрабатывали 0.1 М PBS, 3% H₂O₂ для элиминации эндогенной пероксидазной активности. Затем клетки блокировали в течение 1 ч в PBS, содержащем 5% сывороточного альбумина крупного рогатого скота (BSA). Для двойного иммуномечения клетки обрабатывали первичными антителами, а затем вторичными биотинилированными антителами, конъюгированными с Alexa-488 или -594 (“Molecular Probes”). Использовали первичные антитела к тирозингидроксилазе (TH) в разведении 1 : 1000, к белку 2, ассоциированному с микротрубочками (MAP-2; 1 : 300), к глиальному кислому фибриллярному белку (GFAP; 1 : 1000) и к глутаматдекарбоксилазе (GAD; 1 : 1000) производства фирмы “Santa Cruz Biotechnology”. Конфокальные изображения получали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (LSM 510 Meta; “Carl Zeiss”, Швейцария) при длине волны возбуждения 488 нм (Alexa-488) и 594 нм (Alexa-594).

Исследования *in vivo*. Во всех опытах *in vivo* использовали самцов мышей линии C57BL/6 весом примерно 25 г, полученных из Samtaco (“Kyunggi-do”, Корея). Опыты проводили в точном соответствии с правилами, принятыми в Университете Chung-Ang. После анестезии пентобарбиталом в пучки стриатума (на расстоянии 0.0 мм от брегмы, 2.0 мм латерально от средней линии, 3.0 мм вентрально от твердой мозговой оболочки) стереотаксически вводили 3 мкл 6-гидроксидофамина (6-OHDA, 3 мкг/мкл в солевом растворе “Sigma-Aldrich”). Резцовую пластинку устанавливали на 3.55 мм ниже нулевого положения (межушная линия).

Через 2 нед. тестировали индуцируемое амфетамином ротационное поведение животных, получавших 6-OHDA (амфетамин в дозе 0.1 мг/кг, внутривенно). Тестирование проводили с интервалом 1.5 мин. Животных с ротационной асимметрией в течение по меньшей мере 400 полных поворотов за 1 ч в сторону, в которую вводили OHDA, отбирали для трансплантации клеток. Индуцируемую амфетамином ротацию тестировали через 2, 4 и 6 нед. после трансплантации.

На 3-й день после начала эмбриогенеза клетки обрабатывали трипсином и суспендировали в куль-

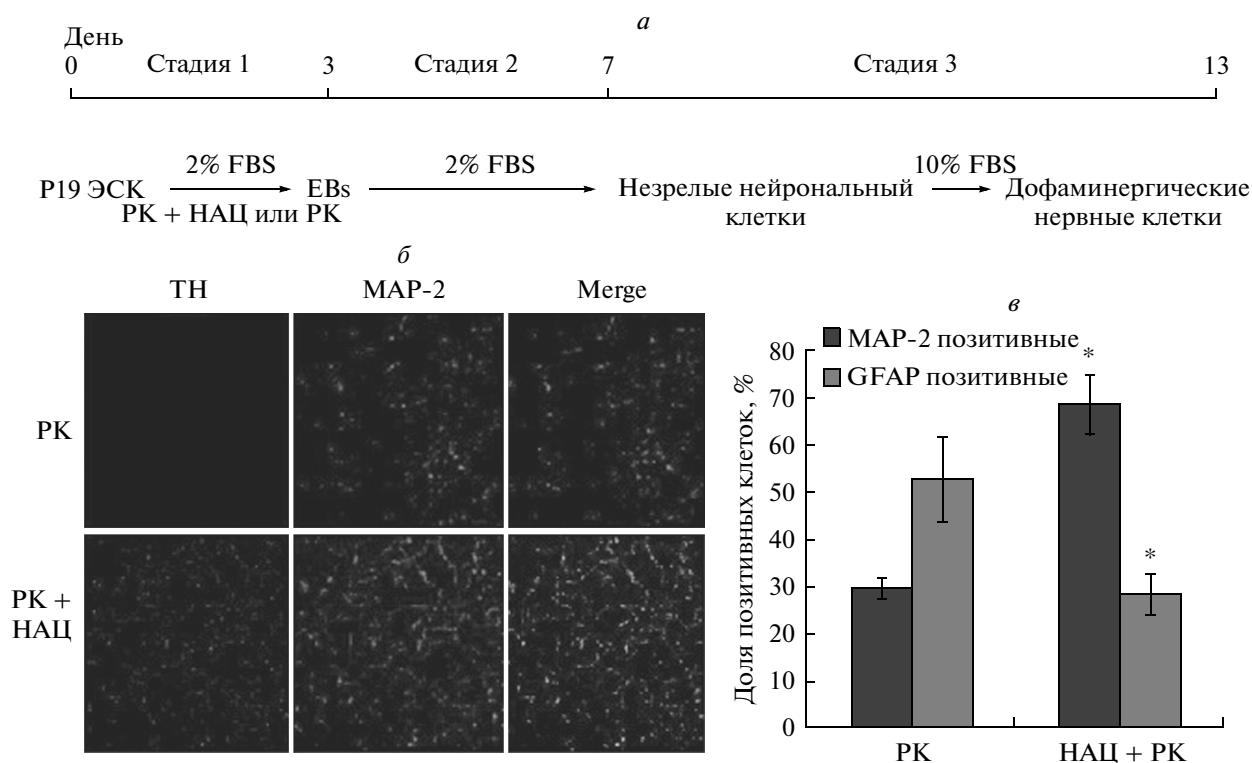


Рис. 1. Схема проведения нейрональной дифференцировки и характеристика эмбриональных стволовых клеток P19, индуцированных *N*-ацетилцистеином совместно с РК. *а* – Схема проведения нейрональной дифференцировки ЭСК P19 под действием РК или НАЦ + РК. *б* – Дифференцированные ЭСК P19 (стадия 3) после двойного окрашивания антителами против ТН (дофаминергические нейроны слева) и против MAP-2 (зрелые нейроны в середине). *в* – Справа наложение двух изображений. Соотношение позитивных по MAP-2 (нейроны) и GFAP (глиальные клетки) дифференцированных ЭСК P19. Приведены средние значения \pm SEM (квадратичное отклонение). Статистически значимыми (*) считали различия при $p < 0.05$ по отношению к обработке только РК. Здесь и на рис. 2–4: ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; НАЦ – *N*-ацетилцистеин; РК – ретиноевая кислота; ТН – тирозингидроксилаза; MAP-2 – белок 2, ассоциированный с микротрубочками; GFAP – кислый фибриллярный глиальный белок.

туральной среде. После анестезии фенобарбиталом животных помещали в стереотаксическую рамку. Через иглу 26-го размера в поврежденный стриатум (0.0 мм от брегмы, 2.0 мм латерально от средней линии, 3.4 мм вентрально от твердой мозговой оболочки) вводили 5 мкл суспензии клеток (4000 клеток/мкл), меченных Hoechst 33342 (опытная группа) или фосфатно-солевым буфером, PBS, (контрольная группа).

Через 2 или 6 нед. после трансплантации животным давали наркоз и проводили внутрисердечную перфузию 4%-ным параформальдегидом в PBS. Головной мозг удаляли и проводили через серию растворов, содержащих сахарозу в повышающейся концентрации (15–30%) в PBS, в течение ночи, а затем делали срезы на замораживающем микротоме (Leica CM 1850; “Leica Microsystems GmbH”, ФРГ). Срезы мозга обрабатывали антителами к ТН (1 : 300), нестину (1 : 50) и MAP-2 фирмы “Santa Cruz Biotechnology” как описано выше. Изображения фотографировали с использованием конфокального микроскопа (LSM 510 Meta, “Carl Zeiss”).

Подсчет клеток и статистический анализ. Иммунореактивные клетки подсчитывали в 6–12 случайно отобранных участках каждой ячейки, используя окулярную сетку при увеличении 40 \times или 200 \times . В каждом опыте анализировали от трех до шести культуральных ячеек. Данные выражали как средние значения \pm SEM. При анализе более двух групп статистическое сравнение проводили, используя программу ANOVA (SPSS).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

НАЦ усиливает дифференцировку ЭСК P19 в дофаминергические нейроны

Для анализа роли НАЦ в дифференцировке ЭСК P19 в дофаминергические нейроны использовали систему нейрональной дифференцировки, инициированной на эмбриональной стадии (рис. 1а, стадия 1). На стадии 1, ранней стадии, определяющей судьбу клеток, клетки дополнительно обрабатывали НАЦ вместе с РК. ЭСК P19 подвергали дифференцировке в условиях низкой концентрации сыворотки (стадии 1 и 2), а затем

дифференцированные ЭСК P19 созревали в среде с высокой концентрацией сыворотки (рис. 1а).

Мы проверили, влияет ли усиление эмбриогенеза под действием НАЦ на долю клеток, дифференцирующихся в нейроны. С этой целью ЭСК P19, дифференцированные под действием РК и НАЦ + РК, исследовали с помощью иммунофлуоресценции. Эффективность экспрессии маркера зрелых нейронов (MAP-2) повышалась более чем в 2 раза при индукции ЭСК P19 под действием НАЦ + РК (примерно 70%) по сравнению с индукцией, вызванной только РК (примерно 30%) (рис. 1б, в). Доля клеток, позитивных по глиальному маркеру (GFAP), изменялась противоположным образом (рис. 1в).

Ведет ли обработка НАЦ к дифференцировке в дофаминергические или ГАМКергические нейроны? Чтобы ответить на этот вопрос клетки из развившихся ЭТ подвергали дифференцировке в течение 10 дней. Примерно 50% MAP-2-позитивных клеток, дифференцировавшихся под НАЦ + РК, были ТН-позитивными и представляли собой дофаминергические нейроны. При дифференцировке под действием одной РК таких клеток было только 10% (рис. 1б, рис. 2). Интересно, что доля GAD-положительных клеток, представляющих собой ГАМКергические нейроны, была примерно одинаковой (около 20%, рис. 2). Эти данные показывают, что НАЦ улучшает дифференцировку клеток в дофаминергические нейроны.

В животной модели болезни Паркинсона НАЦ повышает эффективность терапии с использованием ЭСК P19

Далее для изучения действия НАЦ на дифференцировку в дофаминергические нейроны *in vivo* клетки, обработанные *in vitro* только в течение первых трех дней (рис. 1а), трансплантировали модельным мышам, проявления БП у которых индуцировали введением 6-ОНДА. Как следует из рис. 3а,б, через 2 нед. после трансплантации многие пересаженные клетки, обработанные НАЦ и позитивные по Hoechst 33342 и нестину (маркер предшественников нейронов), обнаруживались в области стриатума. Однако в этой же области головного мозга мышей, которым ввели контрольные клетки, обработанные только РК, выявлено существенно меньше клеток, позитивных по двум маркерам. Более того, намного больше клеток, позитивных по MAP-2 и ТН, выявляется через 6 нед после трансплантации клеток, обработанных НАЦ, по сравнению с контрольными клетками, обработанными только РК (рис. 3в,г).

Функциональное восстановление оценивали, используя тест моторной асимметрии, индуцированной амфетамином, на модели БП через 6 недель после пересадки клеток, дифференцированных

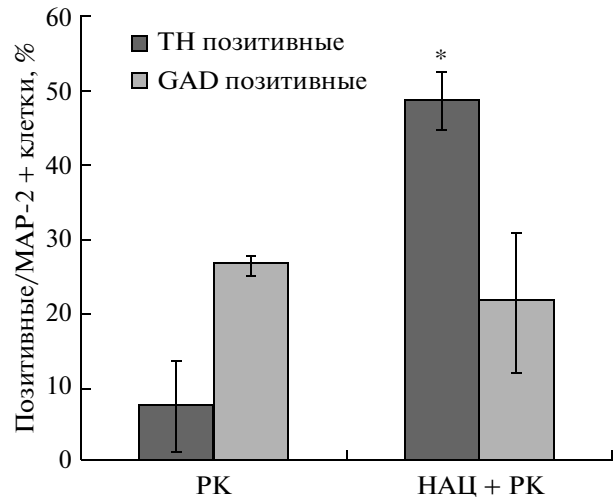


Рис. 2. Характеристика полученных из ЭСК P19 GAD (ГАМК)- и ТН (дофамин)-позитивных клеток. Соотношение ТН- и GAD-позитивных клеток среди MAP-2 позитивных клеток. Приведены средние значения \pm SEM. * – Статистически значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к обработке только РК.

под действием НАЦ + РК или только РК. После введения клеток, обработанных НАЦ, наблюдали существенное улучшение функционального состояния животных. Аномальное вращение (ротация), представляющее собой проявление паркинсонизма, постепенно снижалось в течение 4 недель, а затем оставалось на достигнутом уровне (рис. 4). Напротив, улучшение состояния контрольных мышшей, которым не пересаживали стволовые клетки или пересаживали клетки, обработанные только РК, было незначительным (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Недавно были опубликованы результаты исследований, посвященных разработке методов дифференцировки стволовых клеток или иПСК в дофаминергические нейроны [6, 11]. Однако, несмотря на интенсивные исследования и большое внимание средств массовой информации, применение стволовых клеток в терапии неврологических заболеваний остается весьма проблематичным. Должны быть разработаны эффективные стратегии получения стволовых клеток, подходящих для клинического использования [12, 13].

иПСК сходны с ЭСК по уровню плюрипотентности и способности индуцировать возникновение опухолей. иПСК пригодны для клеточной терапии БП, так как не подвергаются иммунному отторжению. Применение иПСК не вызывает этических проблем, что наблюдается при использовании ЭСК [14].

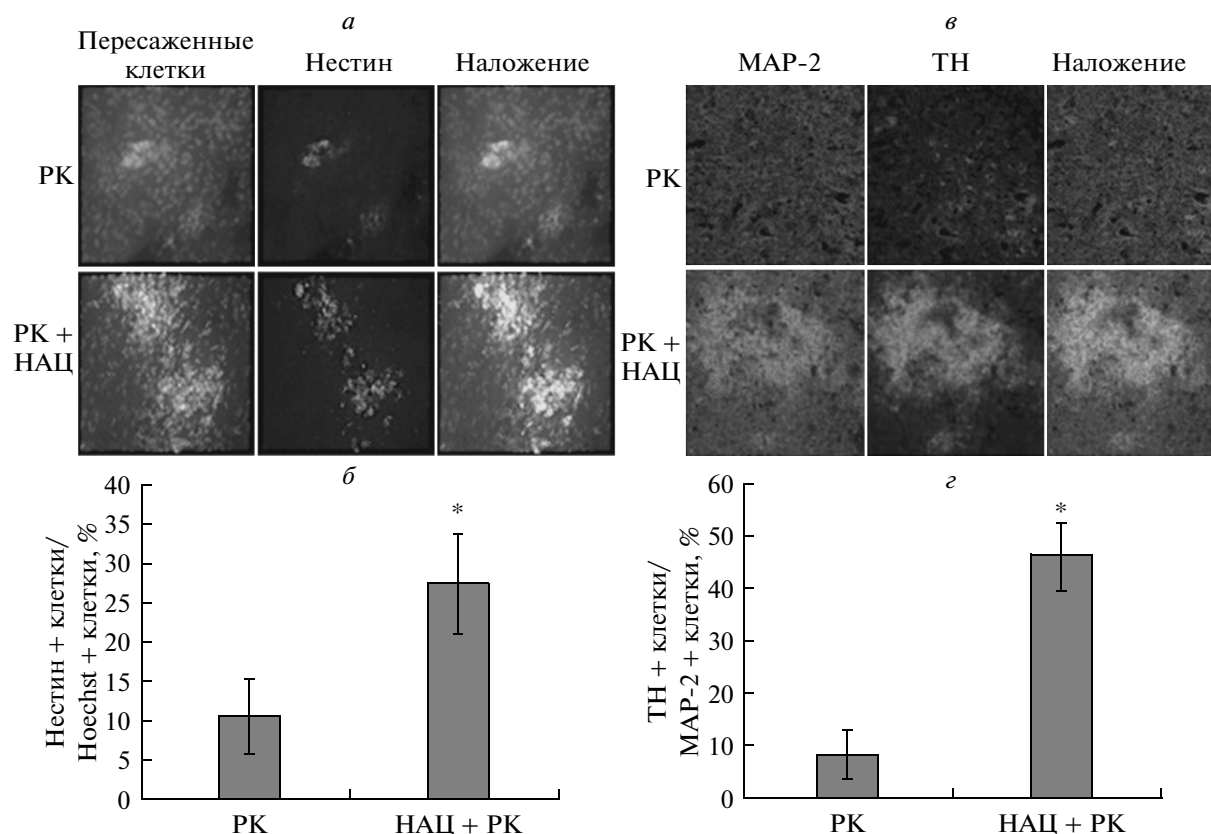


Рис. 3. Пересадка и дифференцировка нейрональных клеток, индуцированных НАЦ + РК, в животной модели болезни Паркинсона (БП). Клетки пересаживали в область стриатума мышам, которым за 2 нед. до этого ввели 6-ОНДА. *а* – Выживание пересаженных ЭСК Р19 детектировали в стриатуме через определенные промежутки времени, благодаря окрашиванию клеток перед пересадкой красителем Hoechst 33258. Срезы головного мозга мышей с полупаркинсонизмом через 2 нед. после пересадки окрашивали антителами против нестина – маркера предшественников нейрональных клеток. *б* – Доля нестин-позитивных клеток среди позитивных по окрашиванию Hoechst 33258. *в* – Полученные с помощью конфокального микроскопа изображения окрашенной на TH (середина) и MAP-2 (слева) ткани стриатума мышей с полупаркинсонизмом через 4 нед. после пересадки клеток Р19, индуцированных РК или НАЦ + РК. *г* – Доля клеток с двойным окрашиванием антителами против TH и MAP-2.

Однако недавно показали, что использование иПСК в отсутствие строгого контроля может приводить к возникновению опухолей [15, 16]. Следовательно, необходимы методы, позволяющие избавиться клетки от функций, способных индуцировать образование опухолей.

Как следует из данных Massimiliano и соавт. [6], индуцированные дофаминергические клетки, экспрессирующие три фактора транскрипции – *Mash1*, *Nurr1* и *Lmx1a*, могут генерировать функциональные дофаминергические нейроны из фибробластов *in vitro*. Эти результаты очень интересны с точки зрения снижения риска индукции опухолевого роста и направления клеток по пути дифференцировки в дофаминергические нейроны. Однако эти клетки должны сохранять жизнеспособность в течение длительного времени, с высокой эффективностью дифференцироваться в дофаминергические нейроны и хорошо встраиваться в окружающую ткань.

Наши результаты показывают, что обработка клеток НАЦ усиливает нейрональную дифференцировку, индуцируемую РК. Более того, доля дофаминергических нейронов сильно увеличивается среди пересаженных клеток *in vivo*. Перед пересадкой стволовые клетки обрабатывают НАЦ только в течение первых 3 сут, т.е. путь дифференцировки предпочтительно в дофаминергические нейроны инициируется на ранних стадиях и развивается необратимо. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс образования ЭТ существен для определения судьбы дифференцирующихся стволовых клеток, и согласуются с более ранними сообщениями о том, что образование ЭТ абсолютно необходимо для дифференцировки и предшествует ей [17].

Интересно, что наши результаты, показывающие снижение количества клеток, положительных по GFAP, в условиях обработки НАЦ, означают, что НАЦ подавляет глиальную дифференци-

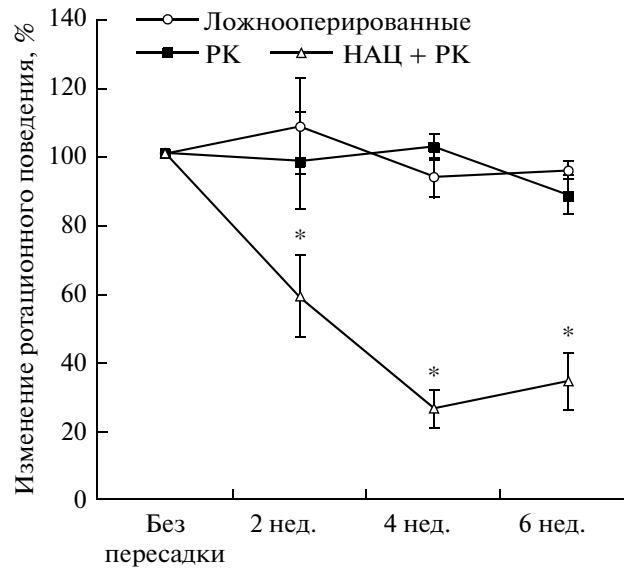


Рис. 4. Восстановление поведения мышей, моделирующих БП, после пересадки клеток, индуцированных НАЦ + РК. Динамика индуцированного амфетамином вращательного ответа. Подсчет вращений проводили через 2, 4 и 6 нед. после пересадки клеток. Представлены изменения вращательного балла у каждого животного по сравнению с его значением до пересадки клеток. Приведены средние значения \pm SEM. * – Значимые различия ($p < 0.05$) по отношению к значениям при обработке только РК.

ровку, так как GFAP экспрессируется в глиальных клетках [18, 19]. Кроме того, доля ГАМКергических нейронов (GAD-положительных клеток) одинакова как при обработке, так и в отсутствие обработки НАЦ, что говорит о возможном подавлении путей дифференцировки нейронов других типов, отличных от ГАМКергических. Эти результаты означают, что НАЦ может быть полезным агентом для повышения содержания нейронов в результате дифференцировки стволовых клеток. Эти нейроны предполагается использовать в клеточной терапии БП в большей степени, чем при других заболеваниях головного мозга. Пересаженные клетки, позитивные по MAP-2 и TH, выявлены в стриатуме даже у мышей, которым вводили клетки, обработанные только РК, причем в больших количествах, чем *in vitro* (10%, рис. 2).

Эти данные свидетельствуют о том, что условия в стриатуме после воздействия 6-OHDA могут быть благоприятными для дифференцировки пересаженных экзогенных стволовых клеток в дофаминергические нейроны. Эти результаты согласуются с несколькими ранее опубликованными сообщениями о влиянии окружения на дифференцировку пересаженных нейрональных стволовых клеток [20].

Наконец, восстановление поведения после трансплантации стволовых клеток, обработанных НАЦ, было чрезвычайно эффективным и поддерживалось в течение 6 нед.

Следует отметить, что НАЦ сильно улучшает нейрональную дифференцировку, подавляя глиальную. Более того, НАЦ вносит вклад в определение дифференцировки дофаминергических нейронов по необратимому механизму на ранней стадии. Пересаженные клетки, обработанные НАЦ, хорошо приживались в стриатуме животных, служащих моделью БП. Большая часть этих клеток дифференцируется в дофаминергические нейроны. Обработанные НАЦ трансплантированные стволовые клетки эффективно ослабляют проявления паркинсонизма в течение 6 нед в отличие от клеток, обработанных только РК.

Эти данные подчеркивают, что начальная временная обработка НАЦ может использоваться для получения клеток, направленных по пути дифференцировки в дофаминергические нейроны и предназначенных для клеточной терапии БП.

Работа поддержана грантом Корейских медицинских технологий (исследовательский проект A085138) Министерства здравоохранения, соцзащиты и поддержки семьи Республики Южная Корея (The Korea Healthcare technology R&D Project (A085138), Ministry for Health, Welfare & Family Affairs).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agid Y. 1991. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet*. **337**, 1321–1324.
2. Kish S.J., Shannak K., Hornykiewicz O. 1988. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with

- idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N. Engl. J. Med.* **318**, 876–880.
3. Sun J., Gao Y., Yang L., Li Z., Lu G., Yew D. 2007. Neural-tube-derived neuroepithelial stem cells: a new transplant resource for Parkinson's disease. *Neuroreport.* **18**, 543–547.
 4. Trzaska K.A., Rameshwar P. 2011. Dopaminergic neuronal differentiation protocol for human mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* **698**, 295–303.
 5. Yan Y., Yang D., Zarnowska E.D., Du Z., Werbel B., Valliere C., Pearce R.A., Thomson J.A., Zhang S.C. 2005. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem. Cells.* **23**, 781–790.
 6. Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretzkova E., Lazarevic D., Taverna S., Leo D., Sotnikova T.D., Menegon A., Roncaglia P., Colciago G., Russo G., Carninci P., Pezzoli G., Gainetdinov R.R., Gustincich S., Dityatev A., Broccoli V. 2011. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature.* **476**, 224–227.
 7. Roussa E., Kriegstein K. 2004. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres. *Neurosci. Lett.* **361**, 52–55.
 8. Malaspina A., Pearce R.K., Graeber M.B. 2003. Nuclear hormone and orphan receptors: their role in neuronal differentiation and cytoprotection and in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Dev. Neurosci.* **25**, 375–383.
 9. Yan C.Y., Greene L.A. 1998. Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. *J. Neurosci.* **18**, 4042–4049.
 10. Ferrari G., Yan C.Y., Greene L.A. 1995. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurosci.* **15**, 2857–2866.
 11. Cho E.G., Zaremba J.D., McKercher S.R., Talantova M., Tu S., Masliah E., Chan S.F., Nakanishi N., Terskikh A., Lipton S.A. 2011. MEF2C enhances dopaminergic neuron differentiation of human embryonic stem cells in a parkinsonian rat model. *PLoS one.* **6**, e24027.
 12. Rossi F., Cattaneo E. 2002. Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 401–409.
 13. Zhang Z., Jin D., Yang Z., Shen B., Liu M. 2011. Effects of 17beta-estradiol pre-treated adult neural stem cells on neuronal differentiation and neurological recovery in rats with cerebral ischemia. *Brain Inj.* **25**, 227–236.
 14. Jiang H., Ren Y., Yuen E.Y., Zhong P., Ghaedi M., Hu Z., Azabdaftari G., Nakaso K., Yan Z., Feng J. 2012. Parkinson controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **3**, 668.
 15. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J., Hedlund E., Fu D., Soldner F., Broccoli V., Constantine-Paton M., Isacson O., Jaenisch R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **105**, 5856–5861.
 16. Cai J., Yang M., Poremsky E., Kidd S., Schneider J.S., Iacovitti L. 2010. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. *Stem Cells Dev.* **19**, 1017–1023.
 17. Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., Dehay C., Savatier P., Samarut J. 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 10)**, 3181–3188.
 18. Choi B.H., Kim R.C. 1984. Expression of glial fibrillary acidic protein in immature oligodendroglia. *Science.* **223**, 407–409.
 19. Domowicz M.S., Henry J.G., Wadlington N., Navarro A., Kraig R.P., Schwartz N.B. 2011. Astrocyte precursor response to embryonic brain injury. *Brain Res.* **1389**, 35–49.
 20. Reekmans K., Praet J., Daans J., Reumers V., Pauwels P., van der Linden A., Berneman Z.N., Ponsaerts P. 2011. Current challenges for the advancement of neural stem cell biology and transplantation research. *Stem Cell Rev.* **262–278**.