

Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: современное состояние проблемы и перспективы

А.В. Моргун, Н.В. Кувачева, Ю.К. Комлева, Е.А. Пожиленкова, И.А. Кутищева, Е.С. Гагарина, Т.Е. Таранушенко, А.В. Озерская, О.С. Окунева, А.Б. Салмина

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (Красноярск)

В обзоре рассматриваются существующие экспериментальные модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*, применяемые для исследований проницаемости и межклеточных взаимодействий. В настоящее время для указанных целей применяются монослойные, многослойные и компьютерные модели. Первично выделенные клетки, входящие в состав моделей *in vitro*, могут быть мозгового и немозгового происхождения. Также используются перевиваемые линии клеток и со-культуры клеток.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, экспериментальные модели, центральная нервная система, астроциты, нейроны, перициты, межклеточные взаимодействия

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) осуществляет активное взаимодействие между кровотоком и центральной нервной системой (ЦНС). Изучение механизмов функционирования ГЭБ – одна из ключевых задач, решение которой имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Известно, что физиологическая проницаемость ГЭБ нарушается при различных видах патологии ЦНС (ишемия, гипоксия головного мозга, травмы и опухоли, нейродегенеративные заболевания), причем изменения проницаемости носят избирательный характер и зачастую являются причиной неэффективной фармакотерапии [8].

Клеточные элементы ГЭБ и механизмы транспорта соединений через барьер

Анатомические элементы, из которых складывается структура барьера, не только защищают мозг, но и регулируют его жизнедеятельность, питание, выведение продуктов обмена веществ. Этими элементами являются функционально и анатомически связанные между собой эндотелиоциты капилляров головного мозга, астроциты, нейроны и перициты, в последнее время объединяемые понятием «нейроваскулярная единица» [40].

Эндотелиоциты. Эндотелиоциты капилляров головного мозга значительно отличаются от эндотелия других органов и тканей организма. Именно им отводится основная роль непосредственной регуляции проницаемости ГЭБ. Основные отличия эндотелиоцитов ГЭБ и периферических сосудов представлены в табл. 1. Кроме указанных особенностей, эндотелиоцитами ГЭБ секретируются вещества, регулирующие функциональную активность стволовых клеток ЦНС в постнатальном периоде (лейкемия-ингибирующий фактор – LIF, нейротрофический фактор мозга – BDNF, фактор роста фибробластов – FGF, инсулиноподобный фактор роста – IGF, сосудистый эндотелиальный фактор роста – VEGF, интерлейкин-8 – IL-8 и др.).

В дополнение к физическому барьеру, сформированному взаимодействующими клетками, ГЭБ имеет высокое электрическое сопротивление, которое формирует электрический барьер для полярных веществ и ионов, проникновение которых в паренхиму мозга осуществляется посредством пассивной диффузии или активного транспорта. Указанное электрическое сопротивление формируется, в основном, эндотелиоцитами – так называемое трансэндотелиальное электрическое сопротивление (Transendothelial Electrical Resistance – TEER).

В физиологических условиях электрическое сопротивление составляет более 1000 Ом/см² [38]. При этом отмечается четкая обратная зависимость между его величиной и

таблица 1: Сравнительная характеристика эндотелиальных клеток ГЭБ и периферических сосудов.

Свойство/показатель	Эндотелий ГЭБ	Периферический эндотелий
Плотные контакты	присутствуют	отсутствуют
Пиноцитоз	снижен	выраженный
Фенестрации	отсутствуют	присутствуют в большом количестве
Электрическое сопротивление	высокое (>1000 Ом/см ²)	низкое (<100 Ом/см ²)
Периваскулярное пространство	маленькое	большое
Щелочная фосфатаза	присутствует	отсутствует
γ-глутамилтранспептидаза	присутствует	отсутствует
Моноаминоксидаза	присутствует	отсутствует
Транспортеры глюкозы	присутствуют	отсутствуют
Внутриклеточный пул митохондрий	10% и более	менее 5%
Рецепторы инсулина	присутствуют	отсутствуют
Рецепторы трансферина	присутствуют	отсутствуют

проницаемостью ГЭБ, а также прямая зависимость между количеством эндотелиальных клеток и плотностью их контактов.

Перициты. Перициты являются удлинёнными клетками, расположенными вдоль продольной оси капилляра, которые своими многочисленными отростками охватывают капилляры и посткапиллярные венулы, контактируют с эндотелиальными клетками и аксонами нейронов. Для цитоплазмы перицитов характерно наличие фибриллярных элементов и микропиноцитозных пузырьков, на мембранах которых выявляется АТФ-азная активность. Перициты передают нервный импульс от нейрона на эндотелициты, что приводит к накоплению или потере клеточной жидкости. Это, в свою очередь, приводит к изменению просвета сосудов [66]. В настоящее время перициты считаются малодифференцированными клеточными элементами, участвующими в ангиогенезе, эндотелиальной пролиферации и воспалительных реакциях [33], оказывают стабилизирующий эффект на новые сформировавшиеся сосуды и приостанавливают их рост, влияют на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Именно перициты способствуют окончательному развитию сосудов и переходу их в стабильное состояние. В случае отсутствия перицитов отмечается эндотелиальная гиперплазия, патологическая васкуляризация головного мозга и повышенная проницаемость ГЭБ [5].

Астроциты. Работа всех транспортных систем ГЭБ контролируется астроцитами [3]. Эти клетки окутывают своими окончаниями сосуды и контактируют непосредственно с эндотелиоцитами [28], оказывают существенное влияние на формирование плотных контактов между эндотелиоцитами и определяют их свойства [2, 83]. При этом эндотелиоциты приобретают способность к повышенной экстружии ксенобиотиков из ткани мозга [45]. Астроциты, так же как и перициты, являются посредниками в передаче регулирующих сигналов от нейронов к эндотелиоцитам сосудов [7] через кальций-опосредованные и пуринергические взаимодействия [100]. Они вырабатывают различные нейроактивные вещества, включая нейропептиды, факторы роста, эйкозаноиды и стероиды [60], регулируют проницаемость воды через ГЭБ посредством белка аквапорина (AQP4). Максимальная экспрессия указанного белка обнаружена в местах контакта астроцитов с эпителиоцитами [74]. Большое число астроцитов вокруг сосудов можно объяснить повышенной потребностью нейронов в глюкозе и особенностями нейрон-астроцитарных взаимодействий. Астроциты экспрессируют транспортеры глюкозы, конвертируют глюкозу в лактат и доставляют его к нейронам [84], осуществляя важную роль в нейрон-астроглиальном метаболическом сопряжении.

Нейроны. Капилляры мозга иннервируются норадреналин-, серотонин-, ацетилхолин- и ГАМК-ергическими нейронами [40]. Нейроны входят в состав нейроваскулярной единицы и оказывают существенное влияние на функции ГЭБ. Они индуцируют экспрессию ГЭБ-ассоциированных белков в эндотелиоцитах, регулируют просвет сосудов головного мозга и проницаемость ГЭБ [86].

Таким образом, все клетки-компоненты ГЭБ находятся в тесной анатомической и функциональной связи между собой (рис. 1), что и обеспечивает уникальность данного биологического барьера.

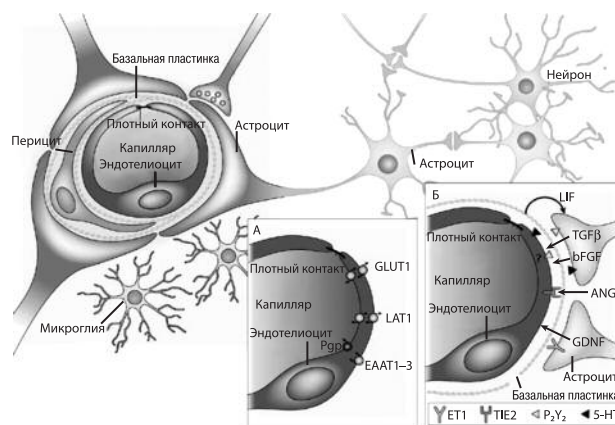


рис. 1: Общая схема строения ГЭБ и основные медиаторы, обеспечивающие межклеточные взаимодействия [3].

А) EAAT1–3 – транспортеры глутамата 1–3; GLUT1 – переносчик глюкозы 1; LAT1 – система крупных нейтральных аминокислот; Pgp – гликопротеин P;
 Б) 5-HT – серотонин; ANG1 – ангиопозитин 1; bFGF – основной фактор роста фибробластов; ET1 – эндотелин 1; GDNF – глиальный нефротрофический фактор; LIF – лейкоингибирующий фактор; P₂Y₂ – пуринергический рецептор; TGF-β – трансформирующий фактор роста бета-β; PIE2 – эндотелиальный рецептор тирозинкиназы 2.

Поступление определенных эндогенных соединений в мозг осуществляется посредством различных транспортных механизмов (пассивный транспорт – диффузия, активный – требующий энергии). Диффузия соединений через плазматическую мембрану эндотелиальных клеток зависит от их физико-химических свойств (растворимость в липидах, молекулярная масса, электрический заряд и степень ионизации). S.I. Rapoport и соавт. описали взаимосвязь между диффузией через ГЭБ и растворимостью соединений в липидах [68]. Жирорастворимые вещества легко проникают в плазматическую мембрану эндотелиальных клеток и так же легко уравниваются между тканями мозга и сосудами [13]. Показана тесная корреляция липидной растворимости соединений и их гематоэнцефалической проницаемости [87].

Однако не все липофильные соединения легко проникают через ГЭБ. Идентифицированы многообразные специальные комплексы, осуществляющие активный транспорт определенных веществ в мозг и, таким образом, поддерживающие постоянство химического гомеостаза в ЦНС [22].

Патофизиология гематоэнцефалического барьера при заболеваниях ЦНС

При нормальном функционировании ГЭБ не только регулирует поступление лекарственных или эндогенных веществ в мозг, но и контролирует трансбарьерную миграцию клеток. Нормально функционирующий слой клеток эндотелия обеспечивает тромборезистентную поверхность, что предотвращает адгезию лейкоцитов, тромбоцитов и активацию факторов коагуляции, изолирует мозг от контроля иммунной системы и позволяют лишь некоторым мононуклеарным клеткам (например, активированным Т-клеткам) мигрировать в ЦНС.

таблица 2: Примеры заболеваний и соответствующих патофизиологических механизмов, связанных с нарушением проницаемости ГЭБ.

№	Заболевание	Изменения ГЭБ	
		Патологические факторы и процессы	Результат
1	Рассеянный склероз	Повышение уровня цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО, в ликворе; увеличение молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 на эндотелиоцитах; активация В-лимфоцитов. Образование пор в эндотелиоцитах, увеличение числа мультивезикулярных телец и пузырьков в эндотелиоцитах; разрыв плотных контактов, индуцированный фибринолизом	Синтез антител к миелину, формирование очагов воспалительной демиелинизации
2	Бактериальный менингит	Проникновение ряда бактерий (чаще всего <i>Hemophilus influenzae</i> , <i>Necisseria meningitidis</i> и др.), через ГЭБ в ткани ЦНС и ликвор, их размножение. Отек мозга, повышение внутричерепного давления и изменения мозгового кровотока. Проникшие в ткань мозга лейкоциты запускают воспалительный процесс, в результате которого защитные механизмы ГЭБ становятся недостаточными для контроля других бактерий и инфекций	Воспаление, выделение цитокинов, преимущественно ИЛ-6 и ФНО. Дегенерация нейронов, повреждение зрительной, слуховой и других систем
3	Ишемия	Увеличение продукции свободных радикалов, (таких как супероксид и NO), прооксидантов, протеолитических ферментов и цитокинов в ткани мозга. Повреждение клеток глии или нейронов, разрушение мембран и увеличение повторного регионального мозгового кровотока; развитие цитотоксического отека	Периваскулярные воспалительные реакции, в которых ГЭБ может играть определенную роль при выработке хемоаттрактантов
4	Болезнь Альцгеймера	Периваскулярные макрофаги, гипертрофия астроцитов и микроглии; появление ИЛ-1 на ранних этапах болезни и его влияние на синтез предшественника бета-амилоида, накопление бета-амилоида в нейронах; накопление молекул адгезии ICAM-1 в мозге на эндотелиоцитах; проникновение лимфоцитов в ткань головного мозга и их участие в воспалительных реакциях, характерных для болезни Альцгеймера	Некротические изменения в эндотелиальных клетках, нарушения в микроциркуляторном русле, включая изменения базальной мембраны, определенных рецепторов и белков, связанных с эндотелиоцитами

Низкая экспрессия основных антигенов комплекса гистосовместимости, небольшое количество антиген-презентирующих клеток, а также особенности лимфоциркуляции делают ЦНС изолированной от воздействия иммунной системы [39, 93]. Однако при воспалении наблюдается массивная миграция лейкоцитов в ткань мозга (рассеянный склероз – РС, энцефалит и т.д.) [4, 49]. Миграция мононуклеаров в ЦНС часто сопровождается увеличением потока сывороточных белков, которые транспортируются в ликвор. Кроме того, эндотелиоциты мозга, клетки микроглии и периваскулярные макрофаги в конечном итоге вовлекаются в нейроиммунный ответ [22]. Барьерная функция ГЭБ может коренным образом измениться при различных заболеваниях ЦНС: в этих условиях повышенную проницаемость ГЭБ связывают с открытием плотных контактов, активностью пиноцитоза и формированием трансэндотелиальных каналов [46]. При большинстве заболеваний ЦНС описывается воспалительный процесс,

затрагивающий микроциркуляторное русло, вызывающий активацию глиальных клеток и секрецию медиаторов воспаления в клетках. При этом на эндотелиоцитах увеличивается экспрессия молекул адгезии, что способствует проникновению лейкоцитов в мозговую ткань. Таким образом, дисфункция эндотелиальных клеток ГЭБ является основой для возникновения и прогрессирования заболеваний ЦНС. Например, увеличение эндотелиоцитами продукции ИЛ-6 и некоторых других медиаторов предполагает, что эти медиаторы участвуют в передаче воспалительного сигнала и на другие клетки ЦНС [2, 49, 67, 88]. Наличие цитокинов в ликворе описано при болезни Альцгеймера и шизофрении [40]. Помимо этого, при прогрессировании этих заболеваний наблюдается увеличение пассивного транспорта веществ через открывшиеся плотные контакты, повышение везикулярного транспорта.

В табл. 2 представлены некоторые заболевания и ключевые механизмы, ассоциированные с изменениями проницаемости ГЭБ.

В настоящее время существует ряд моделей ГЭБ, выбор которых определяется задачами, поставленными перед исследователем. Их можно разделить на модели *in vivo*, *in vitro* и *in silico*.

Модели *in vivo*

Радиоизотопные методы. Одним из первых методов оценки проницаемости ГЭБ была методика внутривенного введения изучаемого вещества в организм животных. Согласно этой модели, животным однократно вводят болюс радиоактивных меченых веществ в периферические сосуды, после чего животное декапитуруют и проводят исследование мозга [55]. Разновидностью такой модели является регистрация степени поглощения изучаемых веществ тканями мозга при длительном введении вещества в организм животного. В дальнейшем для исключения влияния метаболизма изучаемого вещества в других органах и тканях было предложено введение радиоактивного вещества в общую сонную артерию животного [62, 64]. Указанная методика позволяет анализировать такие параметры, как рН, осмотическое давление, способность веществ связываться с белками [11].

Еще одним методом исследования особенностей проницаемости и распространения веществ в головном мозге в естественных условиях является использование позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Помимо самого факта проникновения вещества через ГЭБ с помощью ПЭТ можно установить конкретную область проникновения, а также область накопления вещества в головном мозге [91]. Существенным ограничивающим фактором использования этого метода является короткий период полураспада изотопов, высокая стоимость используемого оборудования и отсутствие возможности определения проницаемости исходного вещества и его метаболитов [12].

Зондовые методы. Следующим шагом развития радиоизотопных моделей стало использование микрозондов, которые имплантировались в мозг животных. После введения исследуемых веществ в периферические сосуды зонд, находящийся в головном мозге, регистрировал концентрацию вещества и передавал информацию на регистрирующую аппаратуру. Преимущество данного метода заключается в возможности многократного использования зондов,

а также проведение исследований на свободно двигающихся животных. Основным недостатком является нестабильность результатов, зависящая от локализации зонда и от степени травматизации животного при проведении процедуры имплантации [1, 95].

Модели *in vitro*

Модели *in vitro* основаны, главным образом, на методах культивирования клеток-компонентов ГЭБ. Одними из лучших моделей ГЭБ *in vitro* считаются те, в которых эндотелиальные клетки сосудов головного мозга со-культивируют с астроцитами и/или перицитами. В целом же все модели *in vitro* можно классифицировать следующим образом.

По количеству видов культивируемых клеток в модели:

1. Моноклеточные модели (культивирование одного вида клеток).
2. Мультиклеточные модели (со-культивирование двух и более видов клеток).

В зависимости от источника используемых клеток:

1. Модели, основанные на клетках немозгового происхождения.
2. Модели, основанные на клетках мозгового происхождения:
 - первично-выделенные клетки;
 - клеточные линии.
3. Комбинированные модели.

По фактору учета (имитации) кровотока:

1. Статические модели – клетки находятся в неподвижной среде. В таких моделях не учитывается влияние движения крови или питательных сред.
2. Динамические модели, в которых имитируется кровоток.

Все существующие модели для исследования межклеточных взаимодействий, проницаемости, развития и репарации ГЭБ обладают определенными недостатками и ограничениями, различной степенью сложности их получения и использования.

Модели, основанные на клетках немозгового происхождения

В настоящее время имеется значительное количество публикаций, где описывается использование различных типов эпителиальных клеток и эндотелиоцитов немозгового происхождения при изучении различных функций ГЭБ. Принципиально такие модели представлены монокультурой эпителиоцитов или эндотелиоцитов. Их легко получить и поддерживать [96]. В них прослеживаются определенные общие характеристики с ГЭБ. Однако они не могут считаться полноценными моделями ГЭБ и использоваться для исследований межклеточных взаимодействий разных видов клеток, с учетом значительных отличий в функциональной активности эндотелия сосудов мозга и периферических органов и тканей.

Модель на основе линии MDCK (Madin Darby canine kidney). MDCK – культура клеток почки собаки. Такие модели относительно широко используются для изучения пара-

целлюлярной проницаемости [14, 53, 54, 59, 90]. Общими чертами ее и ГЭБ является наличие плотных контактов, клаудинов и окклюдина. Наряду с этим между MDCK и эндотелиоцитами головного мозга есть ряд отличий. Так, основной белок в клетках MDCK – клаудин-1, тогда как в эндотелиоцитах мозга – клаудин-5. Кроме этого, в эндотелиоцитах отсутствует белок ZO-3, который обнаружен в MDCK [96]. Тем не менее на модели MDCK могут, с некоторыми ограничениями, проводиться исследования парацеллюлярной проницаемости. Кроме того, из-за простоты культивирования и возможности трансфекции модифицированные клетки MDCK используются и для решения других задач – изучения рецепторов липопротеинов низкой плотности, молекулярных механизмов лекарственной устойчивости и т.д. [59, 90]. На этой модели исследовано более ста различных лекарственных веществ.

Модель с использованием пуповинных эндотелиальных клеток человека (HUVEC). Преимущество модели HUVEC состоит в том, что это линия клеток человека, и на ней удобно исследовать особенности развития, миграции, проницаемости эндотелиоцитов человека [48]. Однако эти немозговые клетки не полностью имитируют эндотелиоциты ЦНС.

Модели на основе клеток мозгового происхождения

Одним из ключевых моментов, позволивших создавать модель ГЭБ *in vitro*, стало появление методики успешной изоляции капилляров головного мозга с последующим культивированием эндотелиоцитов сосудов головного мозга [25, 65]. В конце 1980-х гг. стало известно о важной регулирующей роли астроцитов на функции эндотелиоцитов ГЭБ [6], после чего появились модели со-культур эндотелиоцитов и астроцитов [73]. С этого времени началась разработка и использование комбинированных клеточных культур на основе эндотелиоцитов и клеток глии как основного типа модели ГЭБ.

В настоящее время используются культуры эндотелиальных клеток, выделенных из сосудов головного мозга, источником которых служат млекопитающие. Наиболее широко используются эндотелиоциты крыс, мышей, свиней и крупного рогатого скота [29]. Основными преимуществами моделей с использованием клеток грызунов являются: наличие подопытных животных практически в каждой лаборатории, большой набор антител для исследований и возможность получения трансгенных животных. Однако небольшие размеры животных и относительно низкий объем получаемых эндотелиальных клеток оказываются существенным недостатком.

Преимущество использования свиней или крупного рогатого скота для получения эндотелиоцитов – большое количество получаемых клеток. Доступность этих животных ограничена, а биохимические и молекулярные особенности по сравнению с клетками грызунов и человека изучены недостаточно.

Еще одним вариантом создания моделей ГЭБ является использование клеток человека [10, 67, 75]. Основная сложность создания таких моделей заключается в получении материала. Ткань мозга, получаемая во время хирургических манипуляций, обычно не может рассматриваться в качестве «здоровой». Другие способы получения ткани мозга человека не соответствуют этическим нормам и правилам.

Сложность и относительно высокая стоимость выделения и последующего культивирования первичных клеток для создания моделей ГЭБ привели к разработке нескольких перевиваемых **клеточных линий**. По своей сути подобные линии представляют собой моноклеточные модели, содержащие монослой эндотелиоцитов. Эндотелиоциты мозга способны разрастаться и формировать клеточные линии без каких-либо отличий от исходных клеток и могут использоваться достаточно длительное время, вплоть до 35–40 пассажей [24].

Линия RBE4 (эндотелиальные клетки головного мозга крысы). Клетки линии RBE4 обладают характеристиками эндотелиоцитов ГЭБ (одинаковое содержание и активность основных ферментов и Р-гликопротеина) [70]. Это одна из лучших эндотелиальных клеточных линий, т.к. клетки очень долго сохраняют основные черты, присущие клеткам ГЭБ, при многократных пассажах. Используется для изучения особенностей ферментативных систем ГЭБ (щелочная фосфатаза, γ -глутамил транспептидаза), экспрессии Р-гликопротеина внутриклеточного сигналинга, миграции клеток [70, 72, 96].

Линия GP8. Эта линия имеет характеристики, сходные с линией RBE4. Она получена с использованием антигена SV40 [37]. На указанной модели проводят исследования по изучению внутриклеточной сигнализации [52, 88], экспрессии и активности Р-гликопротеина [31, 71].

Линия hCMEC/D3 (эндотелиоциты капилляров мозга человека) является одной из самых качественных линий клеток человека. В этой культуре сохраняются основные характеристики ГЭБ, такие как экспрессия соединительных и транспортных белков [94]. В настоящее время на модели клеточной линии hCMEC/D3 проводят исследования особенностей внутриклеточной сигнализации [35, 51, 76, 97, 99] и регуляции транспорта веществ [15, 21, 98].

Комбинированные культуры клеток (мультиклеточные модели)

После открытия регуляторного воздействия глиальных клеток на свойства ГЭБ [23] были предложены новые модели барьера на основе со-культивирования различных видов клеток. В настоящее время в подавляющем большинстве моделей *in vitro* используются эндотелиоциты мозга и астроциты [3]. Как правило, для получения таких моделей используются и первично-выделенные эндотелиоциты грызунов, свиней и крупного рогатого скота, и клеточные линии. Глиальные клетки также могут быть первичные или перевиваемых линий (например, перевиваемая глиома линии С6) [43]. Особенностью моделей на основе комбинированных культур является возможность использования эндотелиальных клеток от одного вида животных [44, 81, 89] или клеток различного происхождения, например, эндотелиоцитов крупного рогатого скота и астроцитов крысы [26, 102], либо С6-глиомы [69]. Интересно, что хорошие результаты были получены с моделями, основанными на сочетании клеток крысы и мыши [30, 44]. Предпринимались попытки создать комбинированные модели на основе человеческих клеток, однако трудности получения материала и нестойкость полученных моделей определяют нестабильность их характеристик [56].

Модели с использованием эндотелиоцитов свиней и С6-астроглиомы показали характеристики, сходные с моде-

лями *in vivo* [79]. Исследования, выполненные на моделях свиных клеток, выявили важность межклеточных контактов эндотелиоцитов и астроцитов [17]. Было показано, что прямой контакт между эндотелиальными клетками и астроцитами необходим для получения значений трансэндотелиального сопротивления, сопоставимых с моделями *in vivo*. При со-культивировании эндотелиоцитов и астроцитов без прямого контакта между ними были определены различия значений трансэндотелиального сопротивления и проницаемости ГЭБ по сравнению с культурами, где обеспечивался такой межклеточный контакт.

С учетом регулирующего влияния астроцитов на функции эндотелиальных клеток было предложено использовать «ГЭБ-индуцирующую среду», содержащую 1% питательную среду, полученную при со-культивировании эндотелиоцитов и астроцитов, взятую через 48 час после начала инкубации [20].

Со-культуры эндотелиоцитов с перицитами и другими клетками

Для получения таких моделей используют линии эндотелиальных клеток и свежeweделенные перициты. Принципиально важным считается наличие тесного межклеточного контакта. Важность тесного соприкосновения эндотелиоцитов с перицитами была доказана путем исследования изменений трансэндотелиального сопротивления в культуре клеток крыс [41]. При этом оказалось, что перициты индуцируют усиление экспрессии белков лекарственной устойчивости и металлопротеаз в эндотелиоцитах [9, 101]. Кроме этого, существенную роль в развитии специфических свойств эндотелиоцитов ГЭБ играют продуцируемые перицитами эндотелин-1, TGF β и ангиопоэтин-1 [27, 32, 42]. В настоящее время существуют модели, содержащие в со-культуре три вида клеток: эндотелиоциты, астроциты и перициты. Показано, что эти модели обладают более высоким трансэндотелиальным сопротивлением и пониженной проницаемостью [57, 58].

Так как нейроны оказывают существенное влияние на развитие и функционирование ГЭБ, то периодически предпринимаются попытки создания клеточной модели ГЭБ, содержащей в своем составе эти клетки. Модель ГЭБ, в состав которой входят эндотелиоциты, астроциты, перициты и нейроны, приближена по своим функциональным характеристикам к нейроваскулярной единице. Следовательно, применяя такую модель, можно получать наиболее достоверную информацию о характере межклеточных взаимодействий в (пато)физиологических условиях.

Регуляторные влияния на формирование ГЭБ оказывают не только зрелые нейроны, но и эмбриональные нейрональные прогениторные клетки [92]. При этом для индукции экспрессии окклюдинов и образования эндотелиальных плотных контактов непосредственные межклеточные взаимодействия между нейронами и эндотелиоцитами не обязательны, как было продемонстрировано при со-культивировании клеточных линий RBE4 и нейронов коры головного мозга [16].

Основным лимитирующим фактором при создании указанных моделей является трудность в подборе среды, удовлетворяющей потребности разных типов клеток, а также дефицит данных о молекулярных механизмах реализации межклеточных взаимодействий в мультиклеточных ансамблях *in vitro*.

Динамические модели

В работе J.M. Tarbell было доказано, что межклеточное напряжение при контакте эндотелиоцитов с движущимися клетками и/или средой влияет на развитие барьерной функции [85]. Это привело к разработке динамических моделей *in vitro*. Для их создания используются полые волокна (холофайбер), которые имитируют просвет капилляров и в нем культивируют различные клетки ГЭБ. Первые модели были созданы на со-культурах эндотелиоцитов аорты и глиальных клеток [19, 82].

В настоящее время создание динамических моделей ГЭБ основывается на *технологии микропотока (Microfluidic Technology)*. Эта технология позволяет проектировать, изготавливать и использовать устройства для манипуляции жидкости в микронных масштабах. Обычные линейные размеры составляют от нескольких микрометров до нескольких сотен микрометров. Объемы жидкости, с которыми манипулируют внутри этих устройств, как правило, измеряются в диапазоне нанолитр–пиколитр (10^{-9} л – 10^{-12} л). Сами устройства могут быть изготовлены с использованием металла, стекла или полимерных материалов. Большинство подобных устройств, которые используются для проведения молекулярно-клеточных исследований, сделаны из биосовместимых и прозрачных материалов (стекла или силикона). Их применение позволяет проводить исследования особенностей физического состояния эндотелиоцитов и плотных контактов в условиях кровотока, вазоконстрикторные и вазодилатационные эффекты, опосредованные оксидом азота, миграцию клеток, в т.ч. и стволовых, репаративные процессы, межклеточные взаимодействия, скрининг переносчиков лекарственных веществ и самих лекарственных веществ [85]. При применении таких устройств возможно также в режиме реального времени измерять трансэндотелиальное сопротивление, менять параметры тока жидкости и использовать минимальное количество питательных сред и реактивов, что удешевляет работу.

Не так давно была разработана динамическая модель, в которой создавался пульсирующий поток жидкости. За основу клеточной составляющей в указанной модели взяты эндотелиоциты линии hCMEC/D3 и астроциты. Было установлено, что трансэндотелиальное сопротивление составляло около 1000 Ом/см², а в такой же, но статической модели трансэндотелиальное сопротивление составило около 70 Ом/см² [18]; это подтверждает влияние потока жидкости на формирование барьерной функции. Похожие результаты получены на моделях с использованием астроцитов плода человека и при использовании «ГЭБ-индуцирующей среды» без астроцитов [78].

Модели *in silico* (компьютерные модели)

На основе компьютерных моделей предпринимаются попытки прогнозировать проницаемость ГЭБ для различных химических соединений в зависимости от их структуры. Доказано, что проницаемость ГЭБ коррелирует с молекулярными свойствами веществ, липофильностью и молекулярной массой [36]. Однако сегодня компьютерное моделирование возможно лишь для пассивной проницаемости веществ через ГЭБ. Главная проблема создания таких моделей заключается в недостаточной информации о взаимосвязях между молекулярной структурой и активным транспортом или взаимодействии с белками лекарственной устойчивости [11].

таблица 3: Модели ГЭБ *in vitro*.

Модель	Тип модели	Область исследований	Преимущества	Недостатки
Линия MDCK	Моноклеточная статическая немозгового происхождения	Парацеллюлярная проницаемость и проницаемость, опосредованная Р-гликопротеином	Наличие плотных контактов, клаудинов и окклюдина (коммерческая линия)	Отличия в составе белков плотных контактов по сравнению с ГЭБ
Линия HUVEC	Моноклеточная статическая немозгового происхождения	Миграция клеток, проницаемость эндотелиоцитов человека	Линия клеток человека (коммерческая линия)	Неполно имитирует эндотелиоциты ЦНС
Линия RBE4	Моноклеточная статическая мозгового происхождения	Ферментативные системы ГЭБ, экспрессия Р-гликопротеина, внутриклеточный сигналинг, миграция клеток	Одинаковое содержание и активность основных ферментов и Р-гликопротеина (коммерческая линия)	Моноклеточная
Линия GP8	Моноклеточная статическая мозгового происхождения	Внутриклеточный сигналинг эндотелиоцитов	Экспрессия и активность Р-гликопротеина (коммерческая линия)	Моноклеточная
Линия hCMEC/D3	Моноклеточная статическая мозгового происхождения	Соединительные и транспортные белки, внутриклеточный сигналинг, регуляция транспорта веществ	Линия клеток человека, отражающая экспрессию соединительных и транспортных белков, соответствуют модели <i>in vivo</i>	Моноклеточная
Со-культуры	Комбинированная мультиклеточная статическая. Может содержать клетки мозгового и немозгового происхождения	Межклеточные взаимодействия, нейрогенез, проницаемость, клеточная миграция	Приближена по функциональным характеристикам к нейроваскулярной единице	Не стандартизирована, сложности культивирования и подбора среды, удовлетворяющей потребности разных типов клеток, дефицит данных о молекулярных механизмах межклеточных взаимодействий
Microfluidic Technology	Динамические модели	Физическое состояние эндотелиоцитов и плотных контактов в условиях кровотока, вазоконстрикторные и вазодилатационные эффекты, опосредованные NO, миграция клеток, репаративные процессы, межклеточные взаимодействия, скрининг переносчиков лекарственных веществ и самих лекарственных веществ	Максимально приближена к моделям <i>in vivo</i> . Возможно работать с ограниченным количеством клеток, сред и реактивов	Высокая стоимость, сложность в создании модели, отсутствие стандартных протоколов

Таким образом, компьютерные модели могут быть использованы для первоначального анализа пассивной проницаемости соединений тяжелых металлов и пока не могут заменить модели ГЭБ *in vitro* и *in vivo*.

Сравнительная характеристика основных применяемых в настоящее время моделей ГЭБ приведена в табл. 3.

Заключение и перспективы

До сих пор не существует «идеальной» модели ГЭБ. В зависимости от поставленных целей, задач и стоимости, оптимальными могут быть те или иные модели. Примеры, приведенные в данном обзоре, наглядно иллюстрируют тот факт, что дальнейшее развитие в создании моделей ГЭБ может идти по нескольким направлениям.

Во-первых, можно ожидать развития статических комбинированных мультиклеточных моделей, а именно нейроваскулярной единицы, которая максимально соответствует модели *in vivo* по клеточному составу.

Во-вторых, прогнозируется развитие динамических моделей на основе микропотоковой технологии. Несмотря на

сложности создания и высокую стоимость таких моделей, у них имеется ряд бесспорных преимуществ по сравнению с традиционными методами культивирования клеток и исследований. Главная особенность — размеры устройств и возможность работы с небольшим количеством клеток, питательных сред, реактивов, дорогих лекарственных веществ. Еще одно преимущество — культивирование клеток в условиях потока свежеприготовленных питательных сред, т.к. требуются микрообъемы в отличие от обычных биореакторов и классических способов культивирования.

В-третьих, в процессе накопления информации и создания баз данных по особенностям проницаемости для отдельных групп лекарственных веществ и особенностям работы транспортных систем в клетках будут развиваться компьютерные модели. Основное предназначение таких моделей можно обозначить как первоначальный анализ проницаемости уже известных групп соединений, тяжелых металлов и веществ. Учитывая темпы развития компьютерных технологий и искусственных нейронных сетей, модели *in silico* могут появиться уже в ближайшие годы. При использовании общедоступных компьютерных сетей и баз данных такие модели могут стать широко распространенными, общедоступными и популярными.

Список литературы

1. *Aasmundstad T.A., Morland J., Paulsen R.E.* Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by *in vivo* microdialysis sampling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 275: 435–441.
2. *Abbott N.J.* Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 2002; 200: 629–638.
3. *Abbott N.J., Rönnbäck L., Hansson E.* Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7: 41–53.
4. *Andersson P.B., Perry V.H., Gordon S.* The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in central nervous system parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience.* 1992; 48: 169–186.
5. *Armulik A., Genové G., Mäe M. et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010; 468: 557–561.
6. *Arthur F.E., Shivers R.R., Bowman P.D.* Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient *in vitro* model. *Brain Research.* 1987; 433: 155–159.
7. *Ballabh P., Braun A., Nedergaard M.* The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 2004; 16: 1–13.
8. *Begley D.J.* Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther.* 2004; 104: 29–45.
9. *Berezowski V., Landry C., Dehouck M.P. et al.* Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2004; 1018: 1–9.
10. *Bernas M.J., Cardoso F.L., Daley S.K. et al.* Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an *in vitro* cellular model of the blood-brain barrier. *Nat. Protoc.* 2005; 5: 1265–1272.
11. *Bickel U.* How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *Neuro Rx.* 2005; 2: 15–26.
12. *Bonate P.L.* Animal models for studying transport across the blood-brain barrier. *J. Neurosci. Methods.* 1995; 56: 1–15.

13. *Bradbury M.W.* The blood-brain barrier: transport across the cerebral endothelium. *Circ. Res.* 1985; 57: 213–222.
14. *Braun A., Hammerle S., Suda K. et al.* Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 11: 51–60.
15. *Carl S.M., Lindley D.J., Couraud P.O. et al.* ABC and SLC transporter expression and pot substrate characterization across the human CMEC/D3 blood-brain barrier cell line. *Mol. Pharm.* 2010; 7: 1057–1068.
16. *Cestelli A., Catania C., D'Agostino S. et al.* Functional feature of a novel model of blood brain barrier: studies on permeation of test compounds. *J. Control Release.* 2001; 76: 139–147.
17. *Cohen-Kashi Malina K., Cooper I., Teichberg V.I.* Closing the gap between the *in-vivo* and *in-vitro* blood-brain barrier tightness. *Brain Res.* 2009; 1284: 12–21.
18. *Cucullo L., Couraud P.O., Weksler B. et al.* Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28: 312–328.
19. *Cucullo L., McAllister M.S., Kight K.* A new dynamic *in vitro* model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2002; 951: 243–254.
20. *Culot M., Lundquist S., Vanuxeem D. et al.* An *in vitro* blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol. In Vitro* 2008; 22: 799–811.
21. *Dauchy S., Miller F., Couraud P.O.* Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 77: 897–909.
22. *De Vries H.E., Kuiper J., De Boer A.G. et al.* The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.* 1997; 49: 143.
23. *DeBault L.E., Cancilla P.A.* Gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells *in vitro*. *Science.* 1980; 207: 653–655.
24. *DeBault L.E., Henriquez E., Hart M.N., Cancilla P.A.* Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: II. Establishment, identification, and preliminary characterization of an endothelial cell line. *In Vitro* 1981; 17: 480–494.

25. *DeBault L.E., Kahn L.E., Frommes S.P., Cancilla P.A.* Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. *In Vitro* 1979; 15: 473–487.
26. *Dehouck M.P., Mèresse S., Delorme P. et al.* An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* 1990; 54: 1798–1801.
27. *Dehouck M.P., Vigne P., Torpier G. et al.* Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997; 17: 464–469.
28. *Del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M.* Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 2000; 98: 73–81.
29. *Deli M.A., Abrahám C.S., Kataoka Y., Niwa M.* Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol. Neurobiol.* 2005; 25: 59–127.
30. *Deli M.A., Abrahám C.S., Niwa M., Falus A.* N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm. Res.* 2003; 52: 39–40.
31. *Deli M.A., Abrahám C.S., Takahata H., Niwa M.* Tissue plasminogen activator inhibits P-glycoprotein activity in brain endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 411: 3–5.
32. *Dohgu S., Takata F., Yamauchi A. et al.* Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res.* 2005; 1038: 208–215.
33. *Dore-Duffy P.* Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14: 1581–1593.
34. *Fenstermacher J., Gross P., Sposito N. et al.* Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988; 529: 21–30.
35. *Fischer S., Nishio M., Peters S.C.* Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB.* 2009; 23: 2100–2109.
36. *Goodwin J.T., Clark D.E.* In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to "keep in mind". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 315: 477–483.
37. *Greenwood J., Pryce G., Devine L. et al.* SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. *J. Neuroimmunol.* 1996; 71: 51–63.
38. *Gumbleton M., Audus K.L.* Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.* 2001; 90: 1681–1698.
39. *Hafler D.A., Weiner H. L.* T-cells in multiple sclerosis and inflammatory central nervous system diseases. *Immunol. Rev.* 1987; 100: 307–332.
40. *Hawkins B.T., Davis T.P.* The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57: 173–185.
41. *Hayashi K., Nakao S., Nakaoka R.* Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul. Pept.* 2004; 123: 77–83.
42. *Hori S., Ohtsuki S., Hosoya K. et al.* A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J. Neurochem.* 2004; 89: 503–513.
43. *Hu J.G., Wang X.F., Zhou J.S. et al.* Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol. Exp.* 2010; 70: 239–245.
44. *Hutamekalin P., Farkas A.E., Orbók A. et al.* Effect of nicotine and polycyclic aromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol. Int.* 2008; 32: 198–209.
45. *Janzer R.C., Raff M.C.* Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987; 325: 253–257.
46. *Juhler M., Blasberg R.G., Fenstermacher J.D. et al.* A spatial analysis of the blood-brain barrier damage in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1985; 5: 545–553.
47. *Kniesel U., Wolburg H.* Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2000; 20: 57–76.
48. *Langford D., Hurford R., Hashimoto M. et al.* Signalling crosstalk in FGF2-mediated protection of endothelial cells from HIV-gp120. *BMC Neurosci.* 2005; 6: 8–23.
49. *Lassmann H., Zimprich F., Rössler K., Vass K.* Inflammation in the nervous system. Basic mechanisms and immunological concepts. *Rev. Neurol.* 1991; 147: 763–781.
50. *Lee H.T., Chang Y.C., Tu Y.F., Huang C.C.* CREB activation mediates VEGF-A's protection of neurons and cerebral vascular endothelial cells. *J. Neurochem.* 2010; 113: 79–91.
51. *Lim J.C., Kania K.D., Wijesuriya H. et al.* Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases P-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J. Neurochem.* 2008; 106: 1855–1865.
52. *Lupo G., Nicotra A., Giurdanella G. et al.* Activation of phospholipase A(2) and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1735: 135–150.
53. *Mahar-Doan K.M., Humphreys J.E., Webster L.O. et al.* Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303: 1029–103.
54. *Mamo D., Remington G., Nobrega J. et al.* Effect of acute antipsychotic administration on dopamine synthesis in rodents and human subjects using 6-[18F]-l-m-tyrosine. *Synapse* 2004; 52: 153–162.
55. *Mater S., Maickel R.P., Brodie B.B.* Kinetics of penetration of drugs and other foreign compounds into cerebrospinal fluid and brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1959; 127: 205–211.
56. *Megard I., Garrigues A., Orłowski S. et al.* A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation. *Brain Res.* 2002; 927: 153–167.
57. *Nakagawa S., Deli M.A., Kawaguchi H. et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* 2009; 54: 253–263.
58. *Nakagawa S., Deli M.A., Nakao S. et al.* Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol. Neurobiol.* 2007; 27: 687–694.
59. *Nazer B., Hong S., Selkoe D.J.* LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a blood-brain barrier in vitro model. *Neurobiol. Dis.* 2008; 30: 94–102.
60. *Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A.* New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 523–530.
61. *Neuhaus W., Lauer R., Oelzant S. et al.* A novel flow based hollow-fiber blood-brain barrier in vitro model with immortalized cell line PBMEC/C1-2. *J. Biotechnol.* 2006; 125: 127–141.
62. *Oldendorf W. H.* Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Res.* 1970; 24: 372–376.
63. *Oldendorf W.H., Cornford M.E., Brown W.J.* The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* 1977; 1: 409–417.
64. *Oldendorf W.H., Pardridge W.M., Braun, L.D., Crane P.D.* Measurement of cerebral glucose utilization using washout after carotid injection in the rat. *J. Neurochem.* 1982; 38: 1413–1418.
65. *Panula P., Joó F., Rehardt L.* Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. *Experientia* 1978; 34: 95–97.
66. *Peppiatt C.M., Howarth C., Mobbs P., Attwell D.* Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006; 443: 700–704.
67. *Persidsky Y., Stins M., Way D. et al.* A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J. of Immunol.* 1997; 158: 3499–3510.
68. *Rapoport S.I., Ohno K., Pettigrew K.D.* Drug entry into the brain. *Brain Res.* 1979; 172: 354–359.
69. *Raub T.J.* Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 495–503.

70. *Régina A., Koman A., Piciotti M. et al.* Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* 1998; 71: 705–715.
71. *Régina A., Romero I.A., Greenwood J. et al.* Dexamethasone regulation of P-glycoprotein activity in an immortalized rat brain endothelial cell line, GPNT. *J. Neurochem.* 1999; 73: 1954–1963.
72. *Roux F., Durieu-Trautmann O., Chaverot N. et al.* Regulation of gamma-glutamyl-transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 1994; 159: 101–113.
73. *Rubin L.L., Hall D.E., Porter S. et al.* A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 1991; 115: 1725–1735.
74. *Rubino E., Rainero I., Vaula G. et al.* Investigating the genetic role of aquaporin4 gene in migraine. *J. Headache Pain* 2009; 10: 111–114.
75. *Sano Y., Shimizu F., Abe M. et al.* Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J. Cell. Physiol.* 2010; 225: 519–528.
76. *Schreibelt G., Kooij G., Reijerkerk A. et al.* Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB.* 2007; 21: 3666–3676.
77. *Sedlakova R., Shivers R.R., Del Maestro R.F.* Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1999; 31: 149–161.
78. *Siddharthan V., Kim Y.V., Liu S., Kim K.S.* Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 2007; 1147: 39–50.
79. *Smith M., Omidi Y., Gumbleton M.* Primary porcine brain microvascular endothelial cells: biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting. *J. Drug Target* 2007; 15: 253–268.
80. *Sobue K., Yamamoto N., Yoneda K. et al.* Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 1999; 35: 155–164.
81. *Stamatovic S.M., Shakui P., Keep R.F. et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005; 25: 593–606.
82. *Stanness K.A., Westrum L.E., Fornaciari E.* Morphological and functional characterization of an in vitro blood-brain barrier model. *Brain Res.* 1997; 771: 329–342.
83. *Stewart P.A., Wiley M.J.* Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quail-chick transplantation chimeras. *Develop. Biol.* 1981; 84: 183–192.
84. *Takano T., Tian G.F., Peng W. et al.* Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 2006; 9: 260–267.
85. *Tarbell J.M.* Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc. Res.* 2010; 87: 320–330.
86. *Tontsch U., Bauer H.C.* Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 1991; 539: 247–253.
87. *Van Bree J.B., De Boer A.G., Danhof M. et al.* Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier: effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 247: 1233–1239.
88. *Vandamme W., Braet K., Cabooter L., Leybaert L.* Tumour necrosis factor alpha inhibits purinergic calcium signalling in blood-brain barrier endothelial cells. *J. Neurochem.* 2004; 88: 411–421.
89. *Veszelka S., Pásztoi M., Farkas A.E. et al.* Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem. Int.* 2007; 50: 219–228.
90. *Wang Q., Rager J.D., Weinstein K. et al.* Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int. J. of Pharm.* 2005; 288: 349–359.
91. *Webb S., Ott R.J., Cherry S.R.* Quantitation of blood-brain barrier permeability by positron emission tomography. *Phys. Med. Biol.* 1989; 34: 1767–1771.
92. *Weidenfeller C., Svendsen C.N., Shusta E.V.* Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J. Neurochem.* 2007; 101: 555–565.
93. *Wekerle H., Schwab M., Linington C., Meyermann R.* Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1986; 16: 1551–1557.
94. *Weksler B.B., Subileau E.A., Perrière N. et al.* Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB.* 2005; 19: 1872–1874.
95. *Westergren I., Nystrom B., Hamberger A., Johansson B.B.* Intracerebral dialysis and the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 1995; 64: 229–234.
96. *Wilhelm I., Fazakas C., Krizbai I.A.* In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp.* 2011; 71: 113–128.
97. *Wilhelm I., Nagyoszi P., Farkas A.E. et al.* Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J. Neurochem.* 2008; 107: 116–126.
98. *Zastre J.A., Chan G.N., Ronaldson P.T.* Up-regulation of P-glycoprotein by HIV protease inhibitors in a human brain microvessel endothelial cell line. *J. Neurosci. Res.* 2009; 87: 1023–1036.
99. *Zhong Y., Smart E.J., Weksler B. et al.* Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1 Tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the Ras signaling. *J. Neurosci.* 2008; 28: 7788–7796.
100. *Zonta M., Angulo M.C., Gobbo S., et al.* Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neurosci.* 2003; 6: 43–50.
101. *Zozulya A., Weidenfeller C., Galla H.J.* Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res.* 2008; 1189: 1–11.
102. *Zysk G., Schneider-Wald B.K., Hwang J.H.* Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2001; 69: 845–852.

Blood-brain barrier models *in vitro*: current situation and prospects

A.V. Morgun, N.V. Kuvacheva, Yu.K. Komleva, E.A. Pozhilenkova, I.A. Kutishcheva, E.S. Gagarina, T.E. Taranushenko,
A.V. Ozerskaya, O.S. Okuneva, A.B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University (Krasnoyarsk)

Key words: blood-brain barrier, experimental models, central nervous system, astrocytes, neurons, pericytes, intercellular communication

Current experimental models of the blood-brain barrier (BBB) *in vitro* used for studying mechanisms of permeability and intercellular communication are discussed in this review. At present, monolayer, multilayer and computer models are in use for the

above-mentioned purposes. Primary isolated cells that make up the models *in vitro* may have brain and non-brain origin. In addition, transplantable cell lines and co-cultured cells could be used for modeling BBB *in vitro*.

Контактный адрес: Гагарина Екатерина Сергеевна – ст. преподаватель каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ. 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1, e-mail: Ximikat-007@yandex.ru;

Моргун А.В. – асс. каф. педиатрии Института последипломного образования (ИПО) КрасГМУ;

Кувачева Н.В. – доц. каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ;

Комлева Ю.К. – асп. каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ;

Пожиленкова Е.А. – доц. каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ;

Кутишева И.А. – асс. каф. детских инфекционных болезней КрасГМУ;

Таранушенко Т.Е. – зав. кафедрой педиатрии ИПО КрасГМУ;

Озерская А.В. – асс. каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ;

Окунева О.С. – ст. преподаватель каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ;

Салмина А.Б. – зав. каф. биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ.