УДК 612.824:616.8:577.1

# ПОВРЕЖДЕНИЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ СТРЕССЕ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ: БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И НОВЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

## Обзор

© 2021 А.Б. Салмина<sup>1,2</sup>\*, Ю.К. Комлева<sup>2</sup>, Н.А. Малиновская<sup>2</sup>, А.В. Моргун<sup>2</sup>, Е.А. Тепляшина<sup>2</sup>, О.Л. Лопатина<sup>2</sup>, Я.В. Горина<sup>2</sup>, Е.В. Харитонова<sup>2</sup>, Е.Д. Хилажева<sup>2</sup>, А.Н. Шуваев<sup>2</sup>

Отдел исследований мозга, ФГБНУ «Научный центр неврологии», 125367 Москва, Россия
 НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022 Красноярск, Россия; электронная почта: allasalmina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2021 После доработки 31.03.2021 Принята к публикации 23.04.2021

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является структурно-функциональным элементом нейроваскулярной единицы (НВЕ), включающей в себя клетки нейрональной, глиальной и эндотелиальной природы. В числе основных задач функционирования НВЕ — поддержание контроля метаболизма и химического гомеостаза в ткани головного мозга, обеспечение адекватного кровотока в активных регионах, регуляция процессов нейропластичности, что находит свое отражение в реализации сложного комплекса межклеточных взаимодействий. Современные варианты моделей ГЭБ и НВЕ, статические и динамические, существенно расширили исследовательские возможности, однако ряд вопросов, в частности персонификация модели, остается не решенным. Кроме того, применение любых моделей связано со сложностью в воспроизведении патофизиологических механизмов, обусловливающих нарушение целостности барьера при заболеваниях центральной нервной системы. В обзоре рассмотрены современные представления о клеточно-молекулярных механизмах и метаболических процессах, контролирующих проницаемость ГЭБ, а также патобиохимические механизмы и проявления повреждения ГЭБ при стрессе и нейродегенеративных заболеваниях, включая проблемы и перспективы создания *in vitro* моделей ГЭБ и НВЕ для трансляционных исследований в неврологии и нейрофармакологии. Работы в области изучения ГЭБ формируют новые возможности для развития смежных направлений — регенеративной медицины, нейрофармакологии и нейрореабилитации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: головной мозг, гематоэнцефалический барьер, стресс, нейродегенерация.

DOI: 10.31857/S0320972521060130

## **ВВЕДЕНИЕ**

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является структурно-функциональным элементом нейроваскулярной единицы (НВЕ), включающей в себя клетки нейрональной, глиальной и эндотелиальной природы. В число основных задач функционирования НВЕ входит поддержание контроля метаболизма и химического гомео-

Принятые сокращения: ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; НВЕ — нейроваскулярная единица; иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЦНС — центральная нервная система;  $A\beta$  — бета-амилоид; APP — предшественник бета-амилоида; P-gp — P-гликопротеин; TEER — трансэндотелиальное электрическое сопротивление (transendothelial electric resistance).

стаза в ткани головного мозга, обеспечение адекватного кровотока в активных регионах, регуляция процессов нейропластичности, что находит свое отражение в реализации сложного комплекса межклеточных взаимодействий в норме, при стрессе, нейродегенерации, нейроинфекции, нарушениях развития головного мозга [1-5].

Селективная трансцеллюлярная и парацеллюлярная проницаемость ГЭБ становится препятствием для использования многих препаратов с нейротропной активностью: значительная часть лекарственных средств и/или их носителей не достигают своих мишеней в клетках головного мозга, что создает серьезную проблему для лечения психических, неврологических, онкологических заболеваний. Кроме того, патоло-

<sup>\*</sup> Адресат для корреспонденции.

гически повышенная неконтролируемая проницаемость ГЭБ характерна практически для всех видов патологии центральной нервной системы (ЦНС), что способствует развитию альтерации ткани (например, вследствие отека головного мозга, геморрагических осложнений) и неврологического дефицита [1–3]. Следует отметить, что изучение клеточно-молекулярных механизмов повреждения и восстановления НВЕ и ГЭБ является большим самостоятельным направлением в современных экспериментальных и клинических нейронауках, прогресс которого во многом определяется качеством реконструируемых *in vitro* моделей ГЭБ и НВЕ.

Для исследования механизмов функционирования НВЕ и ГЭБ, оценки проницаемости лекарств-кандидатов и носителей через ГЭБ, разработки новых методов управления проницаемостью барьера применяют разнообразные модели *in vitro*. Модели ГЭБ *in vitro* могут быть созданы из разных типов клеток (например, церебральный эндотелий, перициты, астроглия) человеческого и животного происхождения. Обычно для «сборки» модели in vitro используют клетки эндотелия сосудов, но при этом необходимо принимать во внимание существенные отличия в проницаемости и метаболизме клеток церебрального эндотелия от клеток эндотелия сосудов других тканей. В частности, среди этих различий следует упомянуть высокий уровень митохондриальной активности, уникальный экспрессионный профиль, низкий уровень фенестрации клеток церебрального эндотелия, поэтому предпочтительным является применение клеток эндотелия микрососудов головного мозга [4, 5]. Использование в составе модели клеток других типов опционально, например, валидированы модели, включающие эндотелий, перициты и астроглию, либо эндотелий, астроциты и нейроны [6, 7]. Статические варианты моделей включают:

- 1) transwell-модели, где эндотелиоциты располагаются на полупроницаемой мембране, как правило, дистанцированной от остальных клеток;
- 2) модели с клетками в составе аналога внеклеточного матрикса, например, в гидрогеле;
- 3) сфероидные модели, «собранные» по принципу самоорганизации (смешивание эндотелиоцитов, перицитов и астроглии в культуре при определенных условиях обеспечивает формирование сфероидов с эндотелиоцитами, располагающимися по периферии конгломерата) [8, 9].

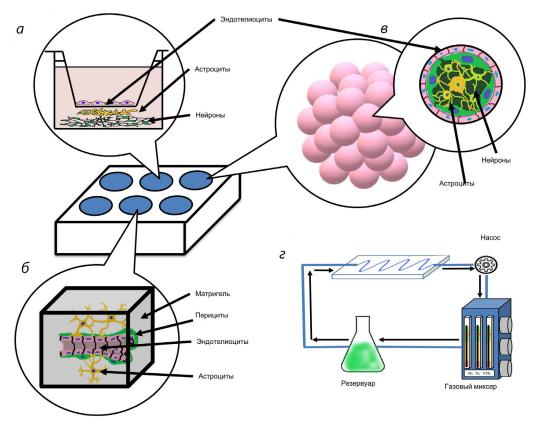
Динамические (микропотоковые) модели ГЭБ являются очень разнообразными, что определяется микроархитектурой чипа и материалом, из которого он изготовлен [10]. Схематическое изображение всех перечисленных форматов *in vitro* моделей ГЭБ представлено на рис. 1.

Критическим фактором, определяющим возможности формирования модели ГЭБ in vitro, является достижение клетками эндотелия свойств, характерных для эндотелиоцитов церебральных микрососудов; даже полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) церебральные эндотелиоциты не обладают экспрессионным профилем, характерным для реального церебрального эндотелия в составе ГЭБ [11]. Это, фактически, является препятствием для создания полноценных персонифицированных моделей ГЭБ, сформированных из клеток-потомков иПСК. Различия структурных и функциональных параметров клеток эндотелия, полученных из иПСК разных людей, существенно снижают информативность такой модели, в частности в контексте оценки индивидуальной чувствительности к действию фармакологических препаратов. Кроме того, оценка и (при возможности) коррекция метаболического статуса и экспрессионного профиля клеток-компонентов ГЭБ важны для достижения функциональной компетентности клеток в составе in vitro модели, применения технологий направленного открытия барьера или подавления его патологической проницаемости при стрессе и нейродегенерации [9, 11].

Современные варианты моделей ГЭБ и НВЕ, статические и динамические, существенно расширили исследовательские возможности, однако ряд вопросов остается не решенным, в частности, как было указано выше, персонификация моделей для конкретного пациента. Кроме того, в применении и статических, и динамических моделей существует важная проблема, связанная со сложностью в воспроизведении патофизиологических и биохимических механизмов, обусловливающих нарушение структурно-функциональной целостности барьера при заболеваниях ЦНС, в результате чего тестирование лекарств-кандидатов на «здоровых» моделях может дать результаты, не соответствующие ситуации с патологически измененным барьером. Преодоление этой проблемы возможно только за счет использования новых знаний о клеточно-молекулярных механизмах повреждения ГЭБ и НВЕ при патологии.

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЭБ

Селективная и контролируемая проницаемость ГЭБ *in vivo* обеспечивается тесным функциональным сопряжением нескольких видов



**Рис. 1.** Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: a — модели на культуральных вставках (полупроницаемые мембраны);  $\delta$  — модели с использованием гидрогеля/матригеля;  $\delta$  — сфероидная самоорганизующаяся модель;  $\epsilon$  — микрофлюидная модель

клеток. Клетки эндотелия микрососудов головного мозга формируют монослой и, экспрессируя большое число транспортеров и каналов, имеют возможность регулировать перенос химических соединений. Кроме того, межклеточные контакты могут в определенных условиях выступать в качестве пути для пассажа клеток периферической крови в ткань головного мозга. Перициты, окружающие эндотелий, поддерживают (метаболически, секреторно) функциональную активность эндотелиоцитов, а также участвуют в формировании ГЭБ. Периваскулярная астроглия, контактирующая с базальной мембраной клеток эндотелия, регулирует структурную целостность и метаболическую активность монослоя эндотелиоцитов. Кроме того, другие клетки-компоненты НВЕ (нейроны, олигодендроциты, микроглия) оказывают влияние на проницаемость барьера [4].

В целом, результаты экспериментальных и клинических исследований последних двух десятилетий убедительно демонстрируют, что основными факторами, определяющими проницаемость ГЭБ, являются:

1) экспрессия белков межклеточных контактов: плотных (например, клаудины, окклюди-

- ны) и адгезионных (например, JAM, ZO-1), ответственных за парацеллюлярную проницаемость;
- 2) экспрессия белков-транспортеров и каналов (например, монокарбоксилатные транспортеры, транспортеры глюкозы, Р-гликопротеин (P-gp), RAGE-рецепторы, LRP), реализующих трансцеллюлярную проницаемость;
- 3) структурно-функциональная целостность церебральных эндотелиоцитов (метаболический статус, в том числе сохранность функции митохондрий, которыми чрезвычайно богаты эти клетки), а также экспрессия в них белковкомпонентов клеточных сигнальных путей (рецепторы, G-белки, ферменты, транскрипционные факторы);
- 4) широкий спектр межклеточных взаимодействий (астроцит-эндотелиальных, перицитэндотелиальных), продукция и действие цитокинов, нейро- и глиотрансмиттеров, факторов роста;
- 5) состояние базальной мембраны, состоящей из белков внеклеточного матрикса, которая окружает слой эндотелиоцитов и обладает своеобразной микроархитектурой и порозностью;
  - б) степень зрелости ГЭБ [12−15].

Парацеллюлярная проницаемость ГЭБ *in vivo* минимальна в физиологических условиях, в результаты чего т.н. трансэндотелиальное электрическое сопротивление (transendothelial electric resistance, TEER) может достигать 1500-2000 Ом/см<sup>2</sup> [16] и даже 8000 Ом/см<sup>2</sup> [17]. К сожалению, в условиях *in vitro* моделей ГЭБ достижение таких значений практически невозможно, поэтому для исследовательских целей достаточным считается сопротивление порядка 150-200 Ом/см<sup>2</sup> [4, 6]. В основе механизмов поддержания минимальной парацеллюлярной проницаемости лежит экспрессия белков плотных и адгезионных контактов. Плотные контакты (tight junctions, TJs) сформированы в участках контакта клеток церебрального эндотелия из белков семейства клаудинов (CLDN) и окклудинов (OCLN), обладающих способностью взаимодействовать с аналогичными белками контактирующих клеток, что обеспечивает естественную (механическую) преграду для пассажа молекул и клеток [18]. Вторым важным компонентом регуляторного механизма парацеллюлярной проницаемости являются адгезионные контакты (adherens junctions, AJs), сформированные белками клеточной адгезии – ZO-1, JAM-белками суперсемейства иммуноглобулинов, кадгеринами [16]. Одной из важных функций белков адгезионных контактов является образование внутриклеточных мультибелковых платформ (скаффолдов), что важно для скоординированного ответа эндотелиальных клеток на действие факторов, способных привести к нарушению структурно-функциональной целостности барьера (механических воздействий, активированных лейкоцитов или бактериальных агентов). В этой связи интересной представляется роль скаффолд-образующего белка ZO-1, который координирует межмолекулярные взаимодействия трансмембранных и цитозольных белков, в частности окклудинов, клаудинов и белков цитоскелета, а также коннексинов [16, 19]. Важно отметить, что экспрессия белков плотных контактов весьма чувствительна к действию разнообразных по природе повреждающих факторов: например, депривация кислорода и глюкозы или даже обычная смена питательной среды в условиях культивирования клеток церебрального эндотелия in vitro вызывают увеличение парацеллюлярной проницаемости, сопровождающееся снижением экспрессии CLDN1, CLDN5, ZO-1, окклудина [20]. Насколько это может влиять на воспроизводимость результатов, полученных с использованием in vitro моделей ГЭБ и НВЕ, остается не выясненным.

Примечательно, что наименее изученной, как ни парадоксально, в контексте регуляции

парацеллюлярной проницаемости ГЭБ является роль коннексинов (Сх), формирующих межклеточные каналы - коннексоны, или щелевые контакты (gap junctions, GJs). Коннексоны участвуют в пассаже достаточно крупных молекул (НАД+, АТР, лактат) и ионов (кальций), а также быстро реагируют на изменения метаболизма клеток [5]. Еще сравнительно недавно экспрессия Сх в головном мозге считалась прерогативой астроцитов, которые используют коннексоны для формирования астроглиального синцития [5], микроокружения в нейрогенных нишах головного мозга или для взаимодействия астроцитов с олигодендроглией [21], однако новые данные указывают на то, что коннексины не менее актуальны для взаимодействия клеток эндотелия в пределах ГЭБ, причем они могут оказывать и негативное влияние на целостность барьера: подавление активности Сх43 способно снижать патологически повышенную проницаемость ГЭБ [22]. Показано, что подавление межклеточной коммуникации при участии Сх43 является результатом гипоксически-ишемического повреждения астроцитов, что сопровождается активацией полуканалов Сх43, высвобождающих лактат, НАД+, АТР во внеклеточное пространство, способствуя тем самым паракринной и аутокринной сигнализации в ткани [23], поэтому логично предположить, что аналогичные события в клетках эндотелия могут приводить к увеличению пассивной парацеллюлярной проницаемости ГЭБ.

Молекулы тромбоцитарно-эндотелиальной клеточной адгезии (PECAM-1, или CD31) участвуют в контроле парацеллюлярной проницаемости ГЭБ, однако они локализованы вне мультибелкового комплекса плотных и адгезионных контактов. CD31 является несубстратным лигандом лейкоцитарного СD38, трансмембранного гликопротеина, конвертирующего НАД<sup>+</sup> в циклическую ADP-рибозу, индуцирующую мобилизацию кальция из внутриклеточных кальциевых депо в цитозоль [24, 25], что является необходимым для реализации клеточных механизмов адгезии активированных лейкоцитов к эндотелию. СD31 также участвует в регуляции ремоделирования сосудов и ангиогенеза, может выступать в качестве молекулы-механосенсора, при этом недостаточность его экспрессии в клетках эндотелия церебральных микрососудов ассоциирована с повышенной проницаемостью ГЭБ, например, при нейровоспалении [13].

Наиболее распространенным методом оценки парацеллюлярной проницаемости ГЭБ *in vivo* является инфузия в кровь молекул, проникновение которых между клетками церебрального эндотелия лимитировано размером. Например, от-

рицательно заряженная гидрофильная молекула флуоресцеина натрия (0,365 кДа) может проникать через ГЭБ парацеллюлярно, поэтому накопление этого зонда в ткани мозга свидетельствует о минимальном повреждении плотных или адгезионных контактов. При более выраженном повреждении целостности эндотелиального слоя в ткань из крови начинают проникать молекулы красителя Эванса синего (Evans blue), связанного с альбумином (69 кДа), или высокомолекулярные декстраны (10–70 кДа) [26, 27].

В последние годы появились новые методы, позволяющие регистрировать парацеллюлярную проницаемость ГЭБ у животных и человека *in vivo*:

- 1) инфракрасная спектроскопия (NIRS, near-infrared spectroscopy) с индоцианином зеленым, обладающим быстрым клиренсом из ткани, например, для оценки состояния ГЭБ у пациентов с травмой головного мозга; NIRS обеспечивает возможность проведения перманентного нейромониторинга и последовательной регистрации перфузии головного мозга и проницаемости ГЭБ [28];
- 2) магнитно-резонансная томография (МРТ) высокого разрешения с контрастированием: накопление контрастного агента на основе гадолиния (гадопентенат димеглюмина, гадодиамид, гадотерат меглюмина, гадобутрол, гадотеридол) во внеклеточном периваскулярном пространстве приводит к увеличению времени продольной релаксации и интенсивности сигнала на Т1-взвешенных изображениях, однако результаты применения таких протоколов, как правило, трудно сопоставимы ввиду различий в методиках анализа изображений [29, 30];
- 3) позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с радиолигандами (например, с 2-амино<sup>3</sup>С-изобутиратом), позволяющими оценить проницаемость ГЭБ, кинетика накопления которых в периваскулярном пространстве в участках повреждения головного мозга более информативна, чем в случае применения МРТ с контрастированием [31].

Для тестирования парацеллюлярной проницаемости *in vitro* обычно используют измерение TEER (вольтметрия) либо определение концентрации зондов (например, FITC-декстранов, липосом, наночастиц) по обе стороны барьера. Кроме того, вовлеченность Cx43 в поддержание целостности плотных контактов эндотелиального слоя может быть визуализирована с помощью гидрофильного красителя Люцифера желтого (Lucifer yellow), который может проникать через сформированные Cx43 полуканалы [6]. Примечательно, что сходные методические подходы реализуются и в статических (trans-

well), и в микропотоковых (микрофлюидных) моделях ГЭБ, причем существует достаточно много вариантов регистрации TEER, например, с использованием интегрированных в микрофлюидные чипы платиновых электродов [32]. В целом, в условиях *in vitro* парацеллюлярная проницаемость является одним из наиболее часто регистрируемых параметров. Отсутствие сформированного *in vitro* монослоя эндотелиоцитов препятствует достижению высоких значений TEER, является причиной высокой порозности барьера, поэтому в таких условиях изучение механизмов проницаемости барьера становится некорректным.

Следует отметить, что преодоление парацеллюлярного барьера представляет собой одну из задач доставки лекарственных препаратов или диагностических средств в ткань головного мозга (в том числе и в виде неклассических форм, например, наночастиц) [33], тогда как патологически повышенная парацеллюлярная проницаемость ответственна за развитие отека головного мозга и миграцию лейкоцитов в ткань с последующим развитием нейровоспаления [34, 35]. Доставка лекарственных соединений и их носителей может считаться успешной в том случае, если все компоненты барьера преодолены (эндотелий, перициты, базальная мембрана, астроциты), и соединение в неизмененном виде поступило во внеклеточное периваскулярное пространство. Для достижения этой цели обычно используются методы обратимого и контролируемого «открытия» барьера, например, ультразвуком или за счет стимуляции рецепторов, обеспечивающих локальную вазодилятацию (например, аденозиновых рецепторов) [36, 37]. В этом контексте применение in vitro моделей является очень востребованным, так как оно позволяет осуществлять скрининговые исследования новых протоколов и персонифицировать терапевтические подходы в обозримом будущем [38].

С другой стороны, очевидна и доказана роль повреждения белков межклеточных контактов церебральных эндотелиоцитов в патогенезе большого круга нейродегенеративных заболеваний, травмы и ишемии головного мозга [39, 40], а новые данные свидетельствуют о вовлеченности аналогичных механизмов в прогрессирование депрессии и шизофрении [41]. В таком случае возникает необходимость снижения избыточной проницаемости ГЭБ для купирования реакции нейровоспаления либо интенсификации процессов клиренса токсических соединений с использованием функциональных возможностей периваскулярных астроцитов [42].

Трансцеллюлярная проницаемость ГЭБ определяется активностью большого числа кана-

лов и транспортеров, обладающих субстратной специфичностью, а также кавеолин-опосредованных механизмов. Считают, что за счет кавеолина-1 (CAV1), взаимодействующего с белками плотных контактов, трансцеллюлярная и парацеллюлярная проницаемости ГЭБ тесно связаны друг с другом [12]. Например, повышение проницаемости ГЭБ при острой ишемии связывают не столько с разрушением структуры плотных контактов, сколько с усилением эндотелиального кавеолин- и клатрин-зависимого трансцитоза, подразумевающего формирование большого числа эндотелиальных везикул, транспортирующих молекулы через клетку эндотелия в ткань головного мозга или в кровь [43].

Одним из ключевых транспортеров, экспрессирующихся в мембране клеток церебрального эндотелия, является Р-гликопротеин (P-gp, MDR-белок, продукт экспрессии гена *ABCB1*), функционирующий в качестве экструзора для гидрофобных молекул и принадлежаший к семейству АТР-связывающих транспортеров [44]. Избыточная активность Р-др обеспечивает транспорт из ткани головного мозга в кровь ксенобиотиков, в том числе лекарственных соединений (что может обусловливать формирование мультирезистентности), тогда как недостаточная активность этого транспортера ассоциирована со старением [44]. Интересно, что обеспечение прохождения ряда лекарственных соединений через ГЭБ за счет применения сфокусированного ультразвука подавляет экспрессию Р-др, что также способствует достижению препаратом молекул-мишеней в клетках ЦНС [45].

Не менее важна роль Р-др в клетках церебрального эндотелия как транспортера бета-амилоида (АВ): постоянно образующийся в ткани головного мозга из предшественника амилоида (АРР) Аβ должен быть перемещен в кровь (т.н. клиренс амилоида) во избежание аккумуляции его агрегированных форм и развития нейродегенерации альцгеймеровского типа [46]. Более того, экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что АРР экспрессируется в эндотелии микрососудов и выполняет ряд физиологических функций (регуляция ангиогенеза, контроль нейрогенеза в обильно васкуляризованных нейрогенных нишах), что, предположительно, характерно и для генерируемого в НВЕ АВ (проангиогенное действие, восстановление поврежденного эндотелиального слоя) [47]. Таким образом, Р-др в клетках эндотелия микрососудов головного мозга может выступать и в качестве значимого регулятора биодоступности АВ, что, в конечном счете, оказывает влияние на процессы ангиогенеза и барьерогенеза.

Клетки церебрального эндотелия экспрессируют широкий спектр (более 300) транспортеров, относящихся к семейству SLC (solute carrier transporter), чье функционирование необходимо для трансфера аминокислот, глюкозы, лактата, ионов, витаминов, жирных кислот [48]. Оценка их экспрессии, а также экспрессии белков плотных контактов и определение уровня TEER является обязательным этапом валидации целостности монослоя эндотелия in vitro. Например, такой комплексный подход применяется для подтверждения функциональной компетентности клеток эндотелия церебральных микрососудов, полученных из иПСК [49]. Экспрессионный профиль SLC в клетках эндотелия микрососудов меняется в процессе развития организма [50], а в условиях *in vitro* он чувствителен даже к изменениям состава питательной среды, в частности, экспрессия SLC2A1, SLC16A1 и SLC7A5 (но не белков плотных контактов) прогрессивно снижается при культивировании по сравнению с их экспрессией в клетках эндотелия, свежевыделенных из капилляров [51]. Эти обстоятельства следует учитывать при моделировании ГЭБ и НВЕ in vitro, а также при разработке других моделей, воспроизводящих характерные для разных периодов онтогенеза особенности функционирования барьера. Для оценки трансцеллюлярной проницаемости барьера *in vivo* могут быть применены методы, регистрирующие проницаемость барьера для субстратов тех или иных транспортеров (например, верапамил используется в качестве субстрата для P-gp). Существуют различные трейсеры (радиолиганды), позволяющие оценить проницаемость ГЭБ для лекарственных препаратов *in vivo* с помощью ПЭТ, а также для решения предиктивных задач в *in vitro* моделях [7, 52, 53]. Кроме того, in vitro такая исследовательская задача часто сводится к оценке изменений экспрессии соответствующих белков-транспортеров и концентрации транспортируемых ими метаболитов в разных компартментах модели [54]. В условиях in vivo парацеллюлярная и трансцеллюлярная проницаемость может быть достаточно эффективно оценена с помощью протоколов спектральной визуализации, оптической когерентной томографии [55, 56]. Основные механизмы регуляции парацеллюлярной и трансцеллюлярной проницаемости барьера схематично представлены на рисунке 2.

Метаболический статус клеток церебрального эндотелия имеет существенное значение для поддержания целостности ГЭБ. В первую очередь это связано с активной работой митохондрий, количество которых в этом типе эндотелиоцитов больше, чем в эндотелии капилляров дру-

гой локализации [57]. Именно поэтому развитие митохондриальной дисфункции при действии фармакологических ингибиторов работы митохондрий или бактериальных токсинов провоцирует нарушение целостности барьера [58]. Особое значение этот фактор приобретает при ангиогенезе и барьерогенезе, т.к. достижение функциональной компетентности клеток эндотелия сопряжено с интенсивным биогенезом митохондрий, что следует учитывать и при воспроизведении *in vitro* моделей ГЭБ или НВЕ (например, при дифференцировке стволовых клеток в клетки эндотелия или при культивировании эндотелиальных прогениторных клеток в составе НВЕ) [59].

В клетках ГЭБ высок уровень гликолитической активности, что особенно характерно для периваскулярной астроглии и перицитов. Тем не менее подавление гликолиза в эндотелиоцитах также существенно влияет на их функциональное состояние, в частности это приводит к редуцированию процессов ангиогенеза [59, 60]. Периваскулярные астроциты активно утилизируют глюкозу, поступающую в НВЕ из крови за счет работы транспортеров глюкозы, активно экспрессирующихся в клетках эндотелия и астроглии. Астроциты конвертируют ее в лактат, который затем покидает клетки через монокарбоксилатные транспортеры МСТ1, МСТ4 или Сх43-полуканалы и захватывается клетками эндотелия и нейронами. Так реализуется один из механизмов глиоваскулярного контроля: увеличение локальной концентрации лактата способствует вазодилятации в функционально активных регионах головного мозга, кроме того, лактат реализует проангиогенное действие [59, 61]. Примечательно, что особенности энергопродукции в клетках церебрального эндотелия позволили некоторым авторам провести аналогию между эндотелиоцитами и опухолевыми клетка-

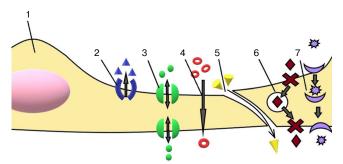


Рис. 2. Механизмы проницаемости гематоэнцефалического барьера. 1 — Эндотелиальная клетка; 2 — эффлюксные транспортеры (P-gp, BCRP, MRP); 3 — транспортеры растворенных веществ (SLC); 4 — пассивная диффузия; 5 — парацеллюлярный транспорт; 6 — рецептор-опосредованный транспорт; 7 — адсорбционный трансцитоз

ми в части реализации эффекта Варбурга для стабильной генерации лактата [62]. Кроме того, клетки эндотелия микрососудов головного мозга обладают не только транспортерами лактата (в частности, МСТ1), но и рецепторами лактата GPR81, причем сниженная экспрессия обоих белков наблюдается при развитии нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом in vitro [63].

Рецепторы лактата GPR81 принадлежат к большой группе белков, GPCRs (G-protein coupled receptors), которые экспрессируются в клетках церебрального эндотелия. Будучи вовлеченными в сигнальную трансдукцию, контролирующую экспрессию белков плотных, щелевых и адгезионных контактов, они тем самым определяют проницаемость барьера. Например, S1P2 (представитель группы рецепторов сфингозин-1-фосфата) является регулятором дифференцировки эндотелиоцитов, активности Р-др, экспрессии клаудина-5 и окклудина, а рецептор лизофосфатидной кислоты, LPAR6, регулирует проницаемость ГЭБ за счет модуляции Rho-зависимых механизмов ремоделирования цитоскелета [64, 65].

Межклеточная коммуникация в пределах НВЕ и ГЭБ очень разнообразна и не может быть детализирована в пределах одного обзора. Вместе с тем понимание механизмов астроцит-эндотелиальных, перицит-эндотелиальных, нейронастроглиальных взаимодействий необходимо не только для разработки новых технологий управления проницаемостью ГЭБ, но и для создания in vitro моделей ГЭБ, НВЕ и васкуляризованной нейрогенной ниши, максимально точно учитывающих характер такой коммуникации в условиях нормы и патологии [1, 5, 60, 66]. В частности, коммуникация астроцитов и эндотелия реализуется в пределах НВЕ/ГЭБ за счет активности большого числа глиотрансмиттеров (серин, глутамат), метаболитов (лактат, жирные кислоты), цитокинов и хемокинов [67].

Особого внимания заслуживают механизмы развития нейровоспаления с участием клеток астроглиальной, микроглиальной и эндотелиальной природы, а также мигрирующих через барьер в ткань головного мозга лейкоцитов периферической крови. С учетом того, что клетки церебрального эндотелия экспрессируют рецепторы цитокинов и TLR-рецепторы, распознающие молекулы патогенов (PAMPs, pathogen-associated molecular pattern molecules) [2], эндотелий ГЭБ является активным участником индукции и прогрессирования системного воспаления и локального нейровоспаления. В частности, недавно было продемонстрировано, что в физиологических условиях микроглия НВЕ необходима

для поддержания адекватной экспрессии белков плотных контактов (например, CLDN5), тогда как при развитии системного воспаления активированные клетки микроглии разрушают контакты отростков астроцитов с клетками церебрального эндотелия, тем самым способствуя развитию патологической проницаемости ГЭБ; соответственно, подавление активации микроглии этому препятствует [68].

Не менее актуален вклад перицитов в поддержание целостности ГЭБ: отношение количества перицитов к количеству эндотелиоцитов в церебральных микрососудах в 10—30 раз выше, чем в капиллярах других тканей [69], а наличие прямых контактов между этими двумя типами клеток отражает вовлеченность перицитов в регуляцию парацеллюлярной проницаемости и трансцитоза. Действительно, во многих моделях ГЭБ *in vitro* было показано, что включение перицитов в их состав значительно улучшает показатели TEER [70, 71].

Модуляция механизмов межклеточной коммуникации в ГЭБ *in vivo* и *in vitro* традиционно достигается применением фармакологических агентов, однако внедрение и развитие протоколов прецизионного контроля активности астроцитов дает новые возможности в селективной регуляции проницаемости барьера. Например, управление секрецией глиотрансмиттеров осуществляется с использованием методов опто- и хемогенетики [72].

Базальная мембрана, окружающая клетки ГЭБ, по своей структуре соответствует внеклеточному матриксу. Она имеет толщину до 100-200 нм и включает в свой состав такие белки, как коллаген IV, ламинин, нидоген (энтактин) и гепарансульфат протеогликаны (перлекан, агрин, коллаген XVIII), а также тромбоспондины, фибулин и прочие белки, которые синтезируются клетками эндотелия микрососудов головного мозга и астроцитами [73–75]. Клетки ГЭБ являются не только продуцентами белков базальной мембраны, но также могут секретировать матриксные металлопротеиназы, разрушающие белки, тем самым повышая проницаемость ГЭБ. Такой механизм наиболее очевиден при развитии нейровоспаления и гипоксии, а при физиологических условиях - в динамике барьерогенеза и при ремоделировании церебральных микрососудов/ангиогенезе [76, 77]. Было показано, что добавление указанных белков в модели ГЭБ в качестве подложки для слоя клеток эндотелия или перицитов существенно улучшает показатели TEER [74]. Кроме того, в настоящее время разрабатываются новые материалы, способные имитировать структуру и микроархитектуру базальной мембраны, а также делать ее доступной для каталитической активности протеаз, что определяет ее способность к ремоделированию и деградации, а также пригодность к применению в *in vitro* моделях ГЭБ [78].

Степень зрелости ГЭБ к моменту рождения до сих пор остается предметом дискуссий: некоторые авторы считают, что ГЭБ является зрелым уже к рождению, другие придерживаются точки зрения о том, что требуется не менее 2-3 недель постнатального развития для окончательного созревания барьера, что, фактически, определяется характером церебрального ангиогенеза [79, 80]. Барьерогенез in vitro регулируется HIF-1-опосредованными событиями [81] и лактат-продуцирующей активностью периваскулярной астроглии [60], что делает *in vitro* модели ГЭБ, созданные с использованием церебральных эндотелиоцитов, полученных от животных на самых ранних стадиях онтогенеза, пригодными для изучения молекулярных механизмов формирования барьера в норме и при патологии. С другой стороны, феномен избыточного церебрального неоангиогенеза, характерный для ряда нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера [82], требует дополнительного изучения формирования и поддержания целостности барьера в стареющем головном мозге. Известно, что динамические изменения экспрессии различных белков характеризуют разные этапы онтогенеза, в том числе физиологическое старение [83], поэтому моделирование ГЭБ in vitro, учитывающего возрастные аспекты состояния клеток-компонентов барьера, является весьма нетривиальной задачей [4]. Более того, простая экстраполяция данных, полученных на клеточных моделях без учета возрастных особенностей организма, может привести к некорректным выводам о механизмах реализации тех или иных процессов, при которых степень зрелости барьера или интенсивность ангиогенеза/барьерогенеза являются значимыми.

## ПАТОБИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И ПРОЯВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЭБ ПРИ СТРЕССЕ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Развитие патологически повышенной проницаемости ГЭБ при остром и хроническом стрессе является экспериментально и клинически доказанным феноменом, причем характер стрессора, индуцирующего такого рода повреждение, не играет специфической роли. Например, хронический иммобилизационный стресс у крыс вызывает увеличение проницаемости ГЭБ в гиппокампе, мозжечке [84], миндалевидном теле, что соот-

ветствует области нарушения экспрессии белков плотных и адгезионных контактов и увеличению локальной концентрации провоспалительных цитокинов [85]. Примечательно, что хронический стресс, связанный с ограничением движения экспериментальных животных, приводит не только к увеличению проницаемости ГЭБ, но и к ремоделированию сосудов (уменьшению их диаметра и размера) вследствие дизрегуляции экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и CLDN5 [86]. Полученные недавно данные свидетельствуют о том, что стресс, обусловленный действием интенсивного звука (музыки громкостью 90–100 дБ и частотой до 10 кГц в течение 2 ч), индуцирует патологическую проницаемость ГЭБ у экспериментальных мышей в 11 исследованных регионах мозга с нарушением экспрессии окклудина и CLDN5, апоптозом клеток эндотелия; при этом барьер имеет тенденцию к восстановлению проницаемости через 4 ч после действия острого стрессора [87].

Стресс раннего периода жизни индуцируется факторами, действующими пренатально или в раннем постнатальном периоде, что приводит к нарушениям развития головного мозга, аберрантному поведению (депрессия) и формированию т.н. «феномена раннего программирования» (повышение риска развития нейродегенерации в отдаленных периодах онтогенеза) [88, 89]. Перинатальная гипоксия и сепарация от матери вызывает у крыс изменения экспрессии МСТ1 и МСТ4 в клетках эндотелия микрососудов головного мозга, что сопровождается снижением эффективности барьерогенеза в срок до 14 суток постнатального развития [90]. Эти процессы ассоциированы с изменением экспрессии белков плотных контактов и кавеолина (CLDN5, ZO-1, JAM1, Cav1), белковучастников HIF-1-сопряженных клеточных сигнальных систем (HIF-1, GSK3, Rac1, GLUT, NFAT), изменением продукции про- и антиангиогенных факторов клетками астроглиальной природы (VEGF, TS, MMP2, MMP9) и их рецепторов в клетках церебрального эндотелия (VEGFR2, CD36, CD47), изменением экспрессии белков-регуляторов транспорта, рецепции лактата в клетках HBE (MCT1, MCT4, CD147, GPR81) в коре, гиппокампе и миндалевидном теле модельных животных (данные получены на 7-й и 70-й дни постнатального развития) [91].

При болезни Альцгеймера дисфункция НВЕ и ГЭБ обусловлена несколькими механизмами:

- 1) церебральная гипоперфузия, нарушение клиренса и аккумуляция Аβ в сосудистой стенке, а также в базальной мембране ГЭБ [74, 92];
- 2) повреждение клеток эндотелия и перицитов [70];

- 3) дизрегуляция аквапорина AQP4 в периваскулярной астроглии [93];
- 4) ремоделирование микрососудов головного мозга, приводящее к усиленному неоангиогенезу с формированием капилляров с патологически проницаемой стенкой [82];
- 5) изменение продукции энергии в эндотелиоцитах вследствие повреждения митохондрий и нарушения митохондриальной динамики [57, 94];
- 6) развитие локальной инсулинорезистентности и нейровоспаления [95];
- 7) миграция активированной микроглии в периваскулярное пространство, секреция провоспалительных цитокинов [96];
- 8) дисфункция глимфатической системы головного мозга, препятствующая эффективному клиренсу продуктов метаболизма и поврежденных белков [97];
- 9) нарушение экспрессии белков-транспортеров в клетках эндотелия (в частности, P-gp и SLC), что способствует нарушению трансцитоза, прогрессированию метаболических нарушений, аберрантному ангиогенезу, формированию измененной чувствительности к действию фармакологических препаратов [98—100].

Первичные дефекты в транспортных механизмах клеток церебрального эндотелия или в формировании плотных и адгезионных межклеточных контактов способствуют аккумуляции Ав в ткани головного мозга; существует и обратная зависимость - прогрессирующая нейродегенерация ответственна за вторичное повреждение ГЭБ [101]. Дополнительными факторами, способствующими дисфункции НВЕ и повреждению ГЭБ при болезни Альцгеймера, являются локальная инсулинорезистентность, нейровоспаление и окислительный стресс [70]. Повышение проницаемости ГЭБ является одним из ключевых компонентов патогенеза когнитивной дисфункции при болезни мелких сосудов головного мозга, характеризующейся деменцией [102]. Поврежденный ГЭБ (преимущественно в области гиппокампа) – один из самых ранних маркеров когнитивного дефицита иной (не альцгеймеровской) этиологии [103, 104].

Повреждение ГЭБ является важным компонентом патогенеза и других видов хронической нейродегенерации. Аберрантный ангиогенез сопровождает развитие болезни Паркинсона (по типу гиперваскуляризации с патологически высокой проницаемостью микрососудов, как при болезни Альцгеймера) и болезни Гентингтона (нарушение ангиогенной активности эндотелия) [105, 106]. ГЭБ при болезни Паркинсона характеризуется повышенной проницаемостью, нарушениями экспрессии белков-транспорте-

ров, в частности Р-др [107] и белков плотных контактов, развитием глиоза и неоангиогенеза в области стриатума [40]. Повреждение ГЭБ при болезни Гентингтона связано с нарушением структурно-функциональной целостности барьера, что определяется повреждением клеток эндотелия церебральных микрососудов, снижением их ангиогенной активности и барьерных свойств, как впервые было показано на клетках эндотелия, полученных из иПСК пациентов с этим заболеванием [106]. Исследования in vivo показали, что характерными признаками повреждения ГЭБ при болезни Гентингтона являются увеличение плотности микрососудов со снижением их среднего диаметра в стриатуме и снижение экспрессии белков плотных контактов, причем такие нарушения развиваются на самых ранних стадиях нейродегенерации [39].

Результатом всех перечисленных изменений в структуре и функциональной активности ГЭБ при стрессе и нейродегенерации могут быть следующие патогенетически значимые события:

- 1) прогрессирование нейровоспаления вследствие облегченной миграции лейкоцитов и трансфера молекул с провоспалительной активностью в ткань головного мозга;
- 2) нарушение нейрогенеза вследствие расстройства функционирования т.н. васкулярного скаффолда нейрогенных ниш (субвентрикулярная зона, субгранулярная зона);
- 3) изменение механизмов нейропластичности вследствие нарушения процессов ангиогенеза;
- 4) повреждение механизмов глиоваскулярного контроля вследствие дизрегуляции продукции, транспорта и рецепции лактата в активных зонах головного мозга;
- 5) нарушение фармакокинетики лекарственных препаратов;
- 6) прогрессирование неврологического, в том числе когнитивного, дефицита, поведенческих расстройств (тревожность, депрессия) (таблица).

Очевидно, что изучение патобиохимических механизмов дисфункции ГЭБ при стрессе и нейродегенерации является актуальной задачей современной нейрохимии и нейробиологии, а ее решение существенным образом зависит от прогресса в разработке новых моделей НВЕ и ГЭБ для трансляционных исследований *in vitro*.

## ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ *in vitro* МОДЕЛЕЙ ГЭБ И НВЕ

В настоящее время основным подходом к моделированию НВЕ и ГЭБ становится приме-

нение протоколов, позволяющих воссоздать многомерные межклеточные взаимодействия в пределах этих структур [108, 109]. Поэтому наряду с моделями, выполненными с использованием технологии transwell (размещение эндотелиальных клеток планарно и дистантно от остальных клеток-компонентов НВЕ/ГЭБ), все большее распространение получают модели с воспроизведением 3D-структуры НВЕ/ГЭБ (размещение клеток в составе аналога внеклеточного матрикса, например, в гидрогеле) [110]. Кроме того, в качестве моделей интерес представляют сфероиды, состоящие из астроцитов и нейронов, окруженных слоем перицитов и клеток эндотелия церебральных микрососудов [8], а также органоиды, полученные из стволовых клеток, в том числе из иПСК [111–113]. Следует отметить, что органоиды в меньшей степени пригодны для изучения НВЕ и ГЭБ в силу технологических трудностей с достижением их васкуляризации.

Несмотря на определенные технические сложности, необходимость создания новых моделей ГЭБ и НВЕ не вызывает сомнений, так как тестирование проницаемости ГЭБ, например, для лекарств-кандидатов на лабораторных животных является более дорогостоящим, трудоемким и этически спорным, а также может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. С использованием моделей других гистогематических барьеров было показано, что более 3/4 всех прототипов лекарственных средств, которые были успешно испытаны на животных моделях, потерпели неудачу при последующих клинических испытаниях [114]. Не менее проблематичным, по крайней мере, на настоящий момент, является применение *in silico* моделей ГЭБ. Они достаточно эффективны при анализе лекарственной структуры с хорошо изученным механизмом действия, однако малопригодны для оценки проницаемости барьера для соединений с ранее не описанными структурой и свойствами. Кроме того, анализ влияния соединений на сами клетки ГЭБ также является непростой задачей [115]. Разумеется, внедрение технологий машинного обучения обеспечит существенный прогресс в применении *in silico* моделей ГЭБ [116].

В связи с указанными проблемами применения *in vivo* и *in silico* моделей ГЭБ, создание новых *in vitro* моделей остается ключевой задачей нейробиоинженерии, -химии и -биологии. Модель ГЭБ *in vitro* должна соответствовать ряду критериев, выполнение которых необходимо для ее применения в трансляционных исследованиях, в частности это определенная проницаемость, экспрессия транспортных молекул и белков тесных контактов, геометрия модели,

Основные механизмы и последствия нарушений структурно-функциональной целостности ГЭБ при стрессе и нейродегенерации

Вид патологии	Характеристика повреждения ГЭБ	Патогенетически значимые последствия повреждения ГЭБ
Стресс раннего периода жизни	нарушение экспрессии белков плотных контактов, транспортеров лактата; изменение локальной продукции и рецепции молекул с про- и антиангиогенной активностью	аберрантный барьерогенез и ангиогенез в раннем постнатальном периоде; нарушения нейропластичности — подавление нейрогенеза вследствие повреждения васкулярного скаффолда нейрогенных ниш; формирование «феномена раннего программирования»
Болезнь Альцгеймера	нарушение клиренса и отложение амилоида в сосудистой стенке; развитие локального нейровоспаления; амилоид-индуцированная митохондриальная дисфункция в клетках эндотелия; гипометаболизм глюкозы и нарушение метаболического сопряжения нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов; избыточный ангиогенез с формированием сосудов с высокой проницаемостью; изменения экспрессии белков-транспортеров, повреждение перицитов	развитие церебральной амилоидной ангиопатии с ремоделированием сосудов, приводящей к нарушению микроциркуляции, в том числе в гиппокампе, и способствующее гибели нейронов и нарастанию когнитивного дефицита; развитие нейровоспаления и локальной инсулинорезистентности в ткани мозга
Болезнь Паркинсона	ремоделирование сосудов — гиперваскуляризация с патологически высокой проницаемостью сосудистой стенки; развитие глиоза; нарушение экспрессии белков плотных контактов и белковтранспортеров	нарушение микроциркуляции в стриатуме, приводящее к энергодефициту и гибели нейронов; прогрессирование нейровоспаления и неврологического дефицита
Болезнь Гентингтона	аккумуляция агрегированного хантингтина; подавление ангиогенеза; нарушение экспрессии белков плотных контактов; повреждение клеток церебрального эндотелия; активация перицитов	редуцирование диаметра микрососудов стриатума; прогрессирование нейровоспаления; реализация сосудистого компонента патогенеза заболевания

присутствие внеклеточного матрикса, возможность совместного культивирования с другими клетками ГЭБ и НВЕ (например, астроцитами, перицитами) [117]. В исследовательской практике и на рынке в настоящее время представлены разнообразные модели ГЭБ *in vitro*: статические, динамические, моно- и мультиклеточные, причем зачастую они предлагаются в виде «клеточных конструкторов», элементы которых соединяются в микропланшетах *ex tempore* [80, 118].

В целом, основные преимущества клеточных моделей ГЭБ *in vitro* включают следующие параметры:

- 1) стандартизированный подход к оценке проницаемости барьера, высокая воспроизводимость полученных результатов;
- 2) возможность оценки метаболических и функциональных изменений, происходящих в ГЭБ, с оценкой межклеточных взаимодействий в норме и при патологии;
- 3) имитация транспортных свойств ГЭБ, критичных для оценки эффективности новых способов управления проницаемостью ГЭБ;
- 4) легкость в применении, сокращение времени при проведении фармакологических исследований [119].

Применительно к микрофлюидным моделям дополнительными преимуществами являются минимальные размеры и, соответственно, минимальные расходы клеток, реактивов, питательных сред, а также воспроизведение некоторых механизмов активации и/или повреждения клеток эндотелия, которые возникают в результате движения крови в микрососуде [4, 38, 119]. В контексте валидности модели ГЭБ это означает возможность достижения большего уровня TEER, характеризующего структурную и функциональную целостность барьера, по сравнению со статическими моделями. В динамической модели TEER достигает  $2000-4000 \text{ Ом/см}^2$ , а в аналогичной статической модели — всего 120—150 Ом/см<sup>2</sup> [80, 118]. Интересно, что культивирование клеток эндотелия церебральных микрососудов из иПСК позволило получить монослой с TEER более 5000 Ом/см<sup>2</sup>, что обусловлено адекватной экспрессией белков-компонентов плотных и адгезионных контактов, а также трансмембранных транспортеров [49]. В целом, новое поколение in vitro моделей ГЭБ хорошо зарекомендовало себя для изучения молекулярного патогенеза нейродегенеративных заболеваний и тестирования лекарств-кандидатов. Тем не менее нерешенным остался достаточно широкий круг методологических вопросов, в частности, связанных с функциональной компетентностью клеток церебрального эндотелия (например, «эндотелиоциты», полученные из индуцированных плюрипотентных клеток, не демонстрируют соответствующий экспрессионный профиль и являются более приближенными к эпителию), разработкой новых (био)скаффолдов для создания 3D-моделей с контролируемой проницаемостью и сопоставимыми с реальными межклеточными взаимодействиями, с воспроизведением в моделях «естественных» механизмов движения жидкости вдоль эндотелиального слоя [9, 71, 120, 121], поэтому создание новых in vitro моделей ГЭБ является важной задачей современной нейроинженерии и нейрохимии. Решение этих вопросов обеспечит прогресс в разработке и клиническом применении персонифицированных моделей ГЭБ, пригодных для индивидуальной оценки проницаемости барьера для нейротропных препаратов, а также в развитии технологий «brain-on-chip».

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Механизмы функционирования ГЭБ в физиологических условиях, а также при заболеваниях ЦНС переместились в фокус нейрохимиков и нейробиологов в течение последних двух десятков лет, что связано с необходимостью решения не только фундаментальных, но и прикладных задач. Действительно, в настоящее время накапливается все больше экспериментальных и клинических доказательств того, что повреждение

ГЭБ не только маркирует развитие нейродегенерации, нейровоспаления или гипоксии головного мозга, но и вносит существенный вклад в прогрессирование патологии, является ранним (вполне возможно, досимптоматическим) признаком заболевания, может быть «мишенью» для разработки современных технологий коррекции неврологического дефицита.

Для решения этих задач и обеспечения максимально быстрого и эффективного трансфера результатов в практическую деятельность требуется создание новых моделей ГЭБ, НВЕ и головного мозга *in vitro*, которые могут быть успешно валидированы для их применения в трансляционных исследованиях. Прогресс в этом направлении обеспечивается достижениями в области биохимии, клеточной биологии, молекулярной биологии, биоинженерии, биофотоники, визуализации. Несомненно, развитие таких исследований сформирует и новые возможности для смежных направлений — регенеративной медицины, нейрофармакологии и нейрореабилитации.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ ( $H \coprod -2547.2020.7$ ).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Khilazheva, E. D., Boytsova, E. B., Pozhilenkova, E. A., Solonchuk, Y. R., and Salmina, A. B. (2015) Obtaining a three-cell model of a neurovascular unit *in vitro*, *Cell Tissue Biol.*, **9**, 447-451, doi: 10.1134/s1990519x15060048.
- Tohidpour, A., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., Martynova, G. P., et al. (2017) Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 7, 276, doi: 10.3389/fcimb.2017.00276.
- Моргун А. В., Кувачева Н. В., Таранушенко Т. Е., Хилажева Е. Д., Малиновская Н. А., и др. (2013) Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции, Вестник Российской академии медицинских наук, 68, 26-35, doi: 10.15690/vramn.v68i12.856.
- Osipova, E. D., Komleva, Y. K., Morgun, A. V., Lopatina, O. L., Panina, Y. A., et al. (2018) Designing *in vitro* bloodbrain barrier models reproducing alterations in brain aging, *Front. Aging Neurosci.*, 10, 234-234, doi: 10.3389/fnagi. 2018 00234
- 5. Salmina, A., Morgun, A., Kuvacheva, N., Lopatina, O., Komleva, Y., et al. (2014) Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin

- 43 story, *Rev. Neurosci.*, **25**, 1-15, doi: 10.1515/revneuro-2013-0044.
- Sharma, B., Luhach, K., and Kulkarni, G. T. (2019) 4 In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery. in Brain Targeted Drug Delivery System (Gao, H., and Gao, X., eds.) Academic Press, pp. 53-101.
- Mabondzo, A., Bottlaender, M., Guyot, A. C., Tsaouin, K., Deverre, J. R., and Balimane, P. V. (2010) Validation of in vitro cell-based human blood-brain barrier model using clinical positron emission tomography radioligands to predict in vivo human brain penetration, Mol. Pharm., 7, 1805-1815, doi: 10.1021/mp1002366.
- 1805-1815, doi: 10.1021/mp1002366.
   Cho, C. F., Wolfe, J. M., Fadzen, C. M., Calligaris, D., Hornburg, K., et al. (2017) Blood-brain-barrier spheroids as an *in vitro* screening platform for brain-penetrating agents, *Nat. Commun.*, 8, 15623, doi: 10.1038/ncomms15623.
- 9. Appelt-Menzel, A., Cubukova, A., Günther, K., Edenhofer, F., Piontek, J., et al. (2017) Establishment of a human blood-brain barrier co-culture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **8**, 894-906, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.02.021.
- Bonakdar, M., Graybill, P. M., and Davalos, R. V. (2017) A microfluidic model of the blood—brain barrier to study per-

- meabilization by pulsed electric fields, *RSC Adv.*, **7**, 42811-42818, doi: 10.1039/c7ra07603g.
- Lu, T. M., Houghton, S., Magdeldin, T., Durán, J. G. B., Minotti, A. P., et al. (2021) Pluripotent stem cell-derived epithelium misidentified as brain microvascular endothelium requires ETS factors to acquire vascular fate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2016950118, doi: 10.1073/ pnas.2016950118.
- Knowland, D., Arac, A., Sekiguchi, K. J., Hsu, M., Lutz, S. E., et al. (2014) Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke, *Neuron*, 82, 603-617, doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.003.
- j.neuron.2014.03.003.

  13. Wimmer, I., Tietz, S., Nishihara, H., Deutsch, U., Sallusto, F., et al. (2019) PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular t-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation, *Front. Immunol.*, 10, doi: 10.3389/fimmu.2019.00711.
- Front. Immunol., 10, doi: 10.3389/fimmu.2019.00711.
   De Bock, M., Van Haver, V., Vandenbroucke, R. E., Decrock, E., Wang, N., and Leybaert, L. (2016) Into rather unexplored terrain-transcellular transport across the bloodbrain barrier. Glia. 64, 1097-1123. doi: 10.1002/glia.22960.
- brain barrier, *Glia*, **64**, 1097-1123, doi: 10.1002/glia.22960.

  15. Kaplan, L., Chow, B. W., and Gu, C. (2020) Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling, *Nat. Rev. Neurosci.*, **21**, 416-432, doi: 10.1038/s41583-020-0322-2.
- 16. Stamatovic, S. M., Keep, R. F., and Andjelkovic, A. V. (2008) Brain endothelial cell—cell junctions: how to "open" the blood brain barrier, *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 179-192, doi: 10.2174/157015908785777210.
- 17. Erickson, M. A., Wilson, M. L., and Banks, W. A. (2020) *In vitro* modeling of blood-brain barrier and interface functions in neuroimmune communication, *Fluids Barr. CNS*, 17, 26-26, doi: 10.1186/s12987-020-00187-3.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B. E. (2003) Tight junction proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 81, 1-44, doi: 10.1016/s0079-6107(02)00037-8.
- 19. Rhett, J. M., Jourdan, J., and Gourdie, R. G. (2011) Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1, *Mol. Biol. Cell*, 22, 1516-1528, doi: 10.1091/mbc.E10-06-0548.
- Tornabene, E., Helms, H. C. C., Pedersen, S. F., and Brodin, B. (2019) Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial cells/astrocyte co-cultures, *PLoS One*, 14, e0221103, doi: 10.1371/ journal.pone.0221103.
- 21. Basu, R., and Das Sarma, J. (2018) Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelination and demyelination, *J. Biosci.*, **43**, 1055-1068, doi: 10.1007/s12038-018-9811-0.
- 1068, doi: 10.1007/s12038-018-9811-0.
  22. Johnson, A. M., Roach, J. P., Hu, A., Stamatovic, S. M., Zochowski, M. R., et al. (2018) Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure, *FASEB J.*, 32, 2615-2629, doi: 10.1096/fj.201700699R.
- Contreras, J. E., Sánchez, H. A., Eugenin, E. A., Speidel, D., Theis, M., et al. (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 495-500, doi: 10.1073/pnas.012589799.
- Salmina, A., Inzhutova, A., Morgun, A., Okuneva, O., Malinovskaia, N., et al. (2012) NAD+-converting enzymes in neuronal and glial cells: CD38 as a novel target for neuroprotection, Vestnik Rossiīskoī Akademii Meditsinskikh Nauk/Rossiīskaia Akademiia Meditsinskikh Nauk, 67, 29-37, doi: 10.15690/vramn.v67i10.413.
- Alla, B. S., Raissa Ya, O., Mami, N., and Haruhiro, H. (2006) ADP-ribosyl cyclase as a therapeutic target for central nervous system diseases, *Central Nervous System Agents Med. Chem.*, 6, 193-210, doi: 10.2174/187152406778226699.

- Yao, L., Xue, X., Yu, P., Ni, Y., and Chen, F. (2018) Evans blue dye: a revisit of its applications in biomedicine, Contrast Media Mol. Imaging, 73, 1-10, doi: 10.1155/2018/7628037.
- 27. Mathiesen Janiurek, M., Soylu-Kucharz, R., Christoffersen, C., Kucharz, K., and Lauritzen, M. (2019)
  Apolipoprotein M-bound sphingosine-1-phosphate regulates blood-brain barrier paracellular permeability and transcytosis, *eLife*, **8**, e49405, doi: 10.7554/eLife.49405.
- Forcione, M., Chiarelli, A. M., Davies, D. J., Perpetuini, D., Sawosz, P., et al. (2020) Cerebral perfusion and bloodbrain barrier assessment in brain trauma using contrastenhanced near-infrared spectroscopy with indocyanine green: a review, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 40, 1586-1598, doi: 10.1177/0271678x20921973.
- Israeli, D., Tanne, D., Daniels, D., Last, D., Shneor, R., et al. (2011) The Application of MRI for depiction of subtle blood brain barrier disruption in stroke, *Int. J. Biol. Sci.*, 7, 1-8, doi: 10.7150/ijbs.7.1.
- Heye, A. K., Culling, R. D., Valdés Hernández, M. D. C., Thrippleton, M. J., and Wardlaw, J. M. (2014) Assessment of blood—brain barrier disruption using dynamic contrastenhanced MRI. A systematic review, *NeuroImage: Clin.*, 6, 262-274, doi: 10.1016/j.nicl.2014.09.002.
- 31. Okada, M., Kikuchi, T., Okamura, T., Ikoma, Y., Tsuji, A. B., et al. (2015) *In vivo* imaging of blood-brain barrier permeability using positron emission tomography with 2-amino-[3-11C]isobutyric acid, *Nucl. Med. Commun.*, 36, 1239-1248, doi: 10.1097/mnm.000000000000385.
- 32. Liang, Y., and Yoon, J.-Y. (2021) *In situ* sensors for bloodbrain barrier (BBB) on a chip, *Sensors Actuators Rep.*, 3, 100031, doi: 10.1016/j.snr.2021.100031.
- 33. Azarmi, M., Maleki, H., Nikkam, N., and Malekinejad, H. (2020) Transcellular brain drug delivery: A review on recent advancements, *Int. J. Pharm.*, **586**, 119582, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119582.
- 34. Winger, R. C., Koblinski, J. E., Kanda, T., Ransohoff, R. M., and Muller, W. A. (2014) Rapid remodeling of tight junctions during paracellular diapedesis in a human model of the blood-brain barrier, *J. Immunol.*, **193**, 2427-2437, doi: 10.4049/jimmunol.1400700.
- Winkler, L., Blasig, R., Breitkreuz-Korff, O., Berndt, P., Dithmer, S., et al. (2021) Tight junctions in the bloodbrain barrier promote edema formation and infarct size in stroke ambivalent effects of sealing proteins, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 41, 132-145, doi: 10.1177/0271678x20904687.
- Gao, X., Qian, J., Zheng, S., Changyi, Y., Zhang, J., et al. (2014) Overcoming the blood-brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagonist, *ACS Nano*, 8, 3678-3689, doi: 10.1021/nn5003375.
   Burgess, A., Shah, K., Hough, O., and Hynynen, K.
- 37. Burgess, A., Shah, K., Hough, O., and Hynynen, K. (2015) Focused ultrasound-mediated drug delivery through the blood-brain barrier, *Expert Rev. Neurother.*, **15**, 477-491, doi: 10.1586/14737175.2015.1028369.
- 491, doi: 10.1586/14737175.2015.1028369.
  38. Ahn, S. I., Sei, Y. J., Park, H.-J., Kim, J., Ryu, Y., et al. (2020) Microengineered human blood-brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms, *Nat. Commun.*, 11, 175, doi: 10.1038/s41467-019-13896-7.
- 39. Di Pardo, A., Amico, E., Scalabri, F., Pepe, G., Castaldo, S., et al. (2017) Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington disease, *Sci. Rep.*, 7, 41316, doi: 10.1038/srep41316.
- 40. Gray, M. T., and Woulfe, J. M. (2015) Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **35**, 747-750, doi: 10.1038/jcbfm.2015.32.
- 41. Greene, C., Hanley, N., and Campbell, M. (2020) Bloodbrain barrier associated tight junction disruption is a hallmark feature of major psychiatric disorders, *Translat. Psychiatry*, **10**, 373, doi: 10.1038/s41398-020-01054-3.
- 42. Cockerill, I., Oliver, J.-A., Xu, H., Fu, B. M., and Zhu, D. (2018) Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of

- Amyloid-β from the BBB. in Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System (Fu, B. M., and Wright, N. T., eds.) Springer International Publishing, Cham, pp. 261-278.
- 43. Xu, X., Zhu, L., Xue, K., Liu, J., Wang, J., et al. (2021) Ultrastructural studies of the neurovascular unit reveal enhanced endothelial transcytosis in hyperglycemiaenhanced hemorrhagic transformation after stroke, CNS Neurosci. Ther., 27, 123-133, doi: 10.1111/cns.13571.
- 44. Van Assema, D. M. E., Lubberink, M., Boellaard, R., Schuit, R. C., Windhorst, A. D., et al. (2012) P-glycoprotein function at the blood-brain barrier: effects of age and gender, *Mol. Imaging Biol.*, **14**, 771-776, doi: 10.1007/s11307-012-0556-0.
- 45. Aryal, M., Fischer, K., Gentile, C., Gitto, S., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2017) Effects on P-glycoprotein expression after blood-brain barrier disruption using focused ultrasound and microbubbles, *PLoS One*, 12, e0166061, doi: 10.1371/journal.pone.0166061.
- Wang, W., Bodles-Brakhop, A. M., and Barger, S. W. (2016) A role for P-glycoprotein in clearance of Alzheimer amyloid β-peptide from the brain, *Curr. Alzheimer Res.*, 13, 615-620, doi: 10.2174/1567205013666160314151012.
- 47. Ristori, E., Donnini, S., and Ziche, M. (2020) New insights into blood-brain barrier maintenance: the homeostatic role of β-amyloid precursor protein in cerebral vasculature, *Front. Physiol.*, **11**, 1056-1056, doi: 10.3389/fphys.2020.01056.
- 48. Geier, E. G., Chen, E. C., Webb, A., Papp, A. C., Yee, S. W., et al. (2013) Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **94**, 636-639, doi: 10.1038/clpt.2013.175.
- 49. Goldeman, C., Andersen, M., Al-Robai, A., Buchholtz, T., Svane, N., et al. (2021) Human induced pluripotent stem cells (BIONi010-C) generate tight cell monolayers with blood-brain barrier traits and functional expression of large neutral amino acid transporter 1 (SLC7A5), Eur. J. Pharm. Sci., 156, 105577, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105577.
- Omori, K., Tachikawa, M., Hirose, S., Taii, A., Akanuma, S. I., et al. (2020) Developmental changes in transporter and receptor protein expression levels at the rat bloodbrain barrier based on quantitative targeted absolute proteomics, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 35, 117-123, doi: 10.1016/j.dmpk.2019.09.003.
- Goldeman, C., Ozgür, B., and Brodin, B. (2020) Culture-induced changes in mRNA expression levels of efflux and SLC-transporters in brain endothelial cells, *Fluids Barriers CNS*, 17, 32, doi: 10.1186/s12987-020-00193-5.
- CNS, 17, 32, doi: 10.1186/s12987-020-00193-5.
  52. Josserand, V., Pélerin, H., de Bruin, B., Jego, B., Kuhnast, B., et al. (2006) Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by *in vivo* imaging with positron emission tomography and using an *in vitro* model of the human blood-brain barrier, J. Pharmacol. Exp. Ther., 316, 79-86, doi: 10.1124/jpet.105.089102.
- 53. Roux, G. L., Jarray, R., Guyot, A. C., Pavoni, S., Costa, N., et al. (2019) Proof-of-concept study of drug brain permeability between *in vivo* human brain and an *in vitro* iPSCs-human blood-brain barrier model, *Sci. Rep.*, **9**, 16310, doi: 10.1038/s41598-019-52213-6.
- Li, Y., Sun, X., Liu, H., Huang, L., Meng, G., et al. (2019) Development of human *in vitro* brain-blood barrier model from induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells to predict the *in vivo* permeability of drugs, *Neurosci. Bull.*, 35, 996-1010, doi: 10.1007/s12264-019-00384-7.
   Feng, W., Zhang, C., Yu, T., Semyachkina-
- Feng, W., Zhang, C., Yu, T., Semyachkina-Glushkovskaya, O., and Zhu, D. (2019) *In vivo* monitoring blood-brain barrier permeability using spectral imaging through optical clearing skull window, *J. Biophotonics*, 12, e201800330, doi: 10.1002/jbio.201800330.
- Semyachkina-Glushkovskaya, O., Chehonin, V., Borisova, E., Fedosov, I., Namykin, A., et al. (2018) Photodynamic opening of the blood-brain barrier and

- pathways of brain clearing, *J. Biophotonics*, **11**, e201700287, doi: 10.1002/jbio.201700287.
- 57. Kluge, M. A., Fetterman, J. L., and Vita, J. A. (2013) Mitochondria and endothelial function, *Circ. Res.*, **112**, 1171-1188, doi: 10.1161/circresaha.111.300233.
- 58. Doll, D. N., Hu, H., Sun, J., Lewis, S. E., Simpkins, J. W., and Ren, X. (2015) Mitochondrial crisis in cerebrovascular endothelial cells opens the blood-brain barrier, *Stroke*, **46**, 1681-1689, doi: 10.1161/strokeaha.115.009099.
- Malinovskaya, N. A., Komleva, Y. K., Salmin, V. V., Morgun, A. V., Shuvaev, A. N., et al. (2016) Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling, Front. Physiol., 7, doi: 10.3389/fphys.2016.00599.
- Salmina, A. B., Kuvacheva, N. V., Morgun, A. V., Komleva, Y. K., Pozhilenkova, E. A., et al. (2015) Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 64, 174-184, doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.005.
- 61. Khilazheva, E. D., Kuvacheva, N. V., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., et al. (2016) Modulation of lactate production, transport and reception by cells in the model of brain neurovascular unit, *Eksp. Klin. Farmakol.*. **79**, 7-12.
- Klin. Farmakol., 79, 7-12.
  62. Verdegem, D., Moens, S., Stapor, P., and Carmeliet, P. (2014) Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism, Cancer Metab., 2, 19, doi: 10.1186/2049-3002-2-19.
- 63. Boitsova, E. B., Morgun, A. V., Osipova, E. D., Pozhilenkova, E. A., Martinova, G. P., et al. (2018) The inhibitory effect of LPS on the expression of GPR81 lactate receptor in blood-brain barrier model *in vitro*, *J. Neuroinflammation*, **15**, 196-196, doi: 10.1186/s12974-018-1233-2.
- 64. Pluimer, B. R., Colt, M., and Zhao, Z. (2020) G protein-coupled receptors in the mammalian blood-brain barrier, *Front. Cell Neurosci.*, **14**, 139-139, doi: 10.3389/fncel. 2020.00139.
- 65. Kim, D. G., Jang, M., Choi, S. H., Kim, H. J., Jhun, H., et al. (2018) Gintonin, a ginseng-derived exogenous lysophosphatidic acid receptor ligand, enhances bloodbrain barrier permeability and brain delivery, *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**, 1325-1337, doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2018.03.158.
- Pozhilenkova, E. A., Lopatina, O. L., Komleva, Y. K., Salmin, V. V., and Salmina, A. B. (2017) Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain, *Rev. Neurosci.*, 28, 397-415, doi: 10.1515/revneuro-2016-0071.
- Osipova, E. D., Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Morgun, A. V., Pisareva, N. V., Malinovskaya, N. A., et al. (2018) Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability, *Rev. Neurosci.*, 29, 567-591, doi: 10.1515/revneuro-2017-0092.
- Haruwaka, K., İkegami, A., Tachibana, Y., Ohno, N., Konishi, H., et al. (2019) Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation, *Nat. Commun.*, 10, 5816, doi: 10.1038/s41467-019-13812-z.
- Winkler, E. A., Sagare, A. P., and Zlokovic, B. V. (2014) The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol.*, 24, 371-386, doi: 10.1111/bpa.12152.
- Salmina, A. B., Komleva, Y. K., Lopatina, O. L., and Birbrair, A. (2019) Pericytes in Alzheimer's disease: novel clues to cerebral amyloid angiopathy pathogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1147, 147-166, doi: 10.1007/978-3-030-16908-4 7.
- 71. Stone, N. L., England, T. J., and O'Sullivan, S. E. (2019) A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, doi: 10.3389/fncel. 2019.00230.
- Salmina, A. B., Gorina, Y. V., Erofeev, A. I., Balaban, P. M., Bezprozvanny, I. B., and Vlasova, O. L. (2021)

- Optogenetic and chemogenetic modulation of astroglial secretory phenotype, *Rev. Neurosci.*, doi: 10.1515/revneuro-2020-0119.
- Xu, L., Nirwane, A., and Yao, Y. (2018) Basement membrane and blood-brain barrier, *Stroke Vasc. Neurol.*, 4, 78-82, doi: 10.1136/svn-2018-000198.
- 74. Thomsen, M. S., Routhe, L. J., and Moos, T. (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 37, 3300-3317, doi: 10.1177/0271678x17722436.
- Thomsen, M. S., Birkelund, S., Burkhart, A., Stensballe, A., and Moos, T. (2017) Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the bloodbrain barrier, *J. Neurochem.*, 140, 741-754, doi: 10.1111/jnc.13747.
- Kanda, H., Shimamura, R., Koizumi-Kitajima, M., and Okano, H. (2019) Degradation of extracellular matrix by matrix metalloproteinase 2 is essential for the establishment of the blood-brain barrier in Drosophila, iScience, 16, 218-229, doi: 10.1016/j.isci.2019.05.027.
- 77. Muri, L., Leppert, D., Grandgirard, D., and Leib, S. L. (2019) MMPs and ADAMs in neurological infectious diseases and multiple sclerosis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 3097-3116, doi: 10.1007/s00018-019-03174-6.
- Ferro, M. P., Heilshorn, S. C., and Owens, R. M. (2020) Materials for blood brain barrier modeling *in vitro*, *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, 140, 100522, doi: 10.1016/j.mser.2019. 100522.
- Blanchette, M., and Daneman, R. (2015) Formation and maintenance of the BBB, *Mech. Dev.*, **138**, 8-16, doi: 10.1016/j.mod.2015.07.007.
- doi: 10.1016/j.mod.2015.07.007.
  80. Saili, K. S., Zurlinden, T. J., Schwab, A. J., Silvin, A., Baker, N. C., et al. (2017) Blood-brain barrier development: Systems modeling and predictive toxicology, *Birth Defects Res.*, 109, 1680-1710, doi: 10.1002/bdr2.1180.
- 81. Ruzaeva, V. A., Morgun, A. V., Khilazheva, E. D., Kuvacheva, N. V., Pozhilenkova, E. A., et al. (2016) Development of blood-brain barrier under the modulation of HIF activity in astroglialand neuronal cells *in vitro*, *Biomed. Khim.*, **62**, 664-669, doi: 10.18097/pbmc20166206664.
- 82. Biron, K. E., Dickstein, D. L., Gopaul, R., and Jefferies, W. A. (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease, *PLoS One*, **6**, e23789, doi: 10.1371/journal.pone.0023789.
- 83. Verheggen, I. C. M., de Jong, J. J. A., van Boxtel, M. P. J., Gronenschild, E. H. B. M., Palm, W. M., et al. (2020) Increase in blood—brain barrier leakage in healthy, older adults, *GeroScience*, **42**, 1183-1193, doi: 10.1007/s11357-020-00211-2.
- 84. Skultétyová, I., Tokarev, D., and Jezová, D. (1998) Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats, *Brain Res. Bull.*, **45**, 175-178, doi: 10.1016/s0361-9230(97)00335-3.
- 85. Xu, G., Li, Y., Ma, C., Wang, C., Sun, Z., et al. (2019) Restraint stress induced hyperpermeability and damage of the blood-brain barrier in the amygdala of adult rats, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 32-32, doi: 10.3389/fnmol.2019.00032.
- Lee, S., Kang, B.-M., Kim, J., Min, J., Kim, H., et al. (2018) Real-time *in vivo* two-photon imaging study reveals decreased cerebro-vascular volume and increased bloodbrain barrier permeability in chronically stressed mice, *Sci. Rep.*, 8, doi: 10.1038/s41598-018-30875-y.
- 87. Semyachkina-Glushkovskaya, O., Esmat, A., Bragin, D., Bragina, O., Shirokov, A. A., et al. (2020) Phenomenon of music-induced opening of the blood-brain barrier in healthy mice, *Proc. Biol. Sci.*, **287**, 20202337-20202337, doi: 10.1098/rspb.2020.2337.
- 88. Malinovskaya, N. A., Morgun, A. V., Lopatina, O. L., Panina, Y. A., Volkova, V. V., et al. (2018) Early life stress: consequences for the development of the brain, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **48**, 233-250, doi: 10.1007/s11055-018-0557-9.

- Lopatina, O. L., Panina, Y. A., Malinovskaya, N. A., and Salmina, A. B. (2021) Early life stress and brain plasticity: from molecular alterations to aberrant memory and behavior, *Rev. Neurosci.*, 32, 131-142, doi: 10.1515/revneuro-2020-0077.
- 90. Morgun, A. V., Kuvacheva, N. V., Khilazheva, E. D., Pozhilenkova, E. A., Gorina, Y. V., et al. (2016) Perinatal brain injury is accompanied by disturbances in expression of SLC protein superfamily in endotheliocytes of hippocampal microvessels, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 161, 770-774, doi: 10.1007/s10517-016-3506-z.
- 774, doi: 10.1007/s10517-016-3506-z.
  91. Kuvacheva, N. V., Morgun, A. V., Malinovskaya, N. A., Gorina, Y. V., Khilazheva, E. D., et al. (2016) Tight junction proteins of cerebral endothelial cells in early postnatal development, *Cell Tissue Biol.*, 10, 372-377, doi: 10.1134/s1990519x16050084.
- 92. Sweeney, M. D., Sagare, A. P., and Zlokovic, B. V. (2018) Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 133-150, doi: 10.1038/nrneurol. 2017.188.
- 93. Zeppenfeld, D. M., Simon, M., Haswell, J. D., D'Abreo, D., Murchison, C., et al. (2017) Association of perivascular localization of aquaporin-4 with cognition and Alzheimer's disease in aging brains, *JAMA Neurol.*, **74**, 91-99, doi: 10.1001/jamaneurol. 2016.4370.
- 94. Parodi-Rullán, Ř., Sone, J. Y., and Fossati, S. (2019) Endothelial mitochondrial dysfunction in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Disease*, **72**, 1019-1039, doi: 10.3233/jad-190357.
- 95. Gorina, Y., Salmina, A., Kuvacheva, N., Komleva, Y., Fedyukovich, L., et al. (2014) Neuroinflammation and insulin resistance in Alzheimer's disease, *Sib. Med. Rev.*, 11-19, doi: 10.20333/25000136-2014-4-11-19.
- 96. Thériault, P., ElAli, A., and Rivest, S. (2015) The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Res. Ther.*, 7, 41, doi: 10.1186/s13195-015-0125-2.
- 97. Kyrtsos, C. R., and Baras, J. S. (2015) Modeling the role of the glymphatic pathway and cerebral blood vessel properties in Alzheimer's disease pathogenesis, *PLoS One*, **10**, e0139574, doi: 10.1371/journal.pone.0139574.
- 98. Jia, Y., Wang, N., Zhang, Y., Xue, D., Lou, H., and Liu, X. (2020) Alteration in the function and expression of SLC and ABC transporters in the neurovascular unit in Alzheimer's disease and the clinical significance, *Aging Dis.*, **11**, 390-404, doi: 10.14336/ad.2019.0519.
- Sekhar, G. N., Fleckney, A. L., Boyanova, S. T., Rupawala, H., Lo, R., et al. (2019) Region-specific bloodbrain barrier transporter changes leads to increased sensitivity to amisulpride in Alzheimer's disease, *Fluids Barriers* CNS, 16, 38, doi: 10.1186/s12987-019-0158-1.
- 100. Zoufal, V., Wanek, T., Krohn, M., Mairinger, S., Filip, T., et al. (2020) Age dependency of cerebral P-glycoprotein function in wild-type and APPPS1 mice measured with PET, J. Cereb. Blood Flow Metab., 40, 150-162, doi: 10.1177/0271678x18806640.
- 101. Sagare, A. P., Bell, R. D., and Zlokovic, B. V. (2013) Neurovascular defects and faulty amyloid-β vascular clearance in Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **33 Suppl 1**, S87-100, doi: 10.3233/jad-2012-129037.
- 102. Wardlaw, J. M., Makin, S. J., Valdés Hernández, M. C., Armitage, P. A., Heye, A. K., et al. (2017) Blood-brain barrier failure as a core mechanism in cerebral small vessel disease and dementia: evidence from a cohort study, *Alzheimer's Dement.*, **13**, 634-643, doi: 10.1016/j.jalz.2016.09.006.
- 103. Nation, D. A., Sweeney, M. D., Montagne, A., Sagare, A. P., D'Orazio, L. M., et al. (2019) Blood—brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction, *Nat. Med.*, **25**, 270-276, doi: 10.1038/s41591-018-0297-y.
- 104. Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., et al. (2015) Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus, *Neuron*, **85**, 296-302, doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032.

- 105. Desai Bradaric, B., Patel, A., Schneider, J. A., Carvey, P. M., and Hendey, B. (2012) Evidence for angiogenesis in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, and progressive supranuclear palsy, *J. Neural Transm. (Vienna)*, 119, 59-71, doi: 10.1007/s00702-011-0684-8.
- 106. Lim, R. G., Quan, C., Reyes-Ortiz, A. M., Lutz, S. E., Kedaigle, A. J., et al. (2017) Huntington's disease iPSC-derived brain microvascular endothelial cells reveal WNT-mediated angiogenic and blood-brain barrier deficits, *Cell Rep.*, 19, 1365-1377, doi: 10.1016/j.celrep. 2017.04.021.
- 107. Pan, Y., and Nicolazzo, J. A. (2018) Impact of aging, Alzheimer's disease and Parkinson's disease on the bloodbrain barrier transport of therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **135**, 62-74, doi: 10.1016/j.addr.2018.04.009.
- 108. Chaves, C., Do, T. M., Cegarra, C., Roudières, V., Tolou, S., et al. (2020) Non-human primate blood-brain barrier and *in vitro* brain endothelium: from transcriptome to the establishment of a New model, *Pharmaceutics*, 12, doi: 10.3390/pharmaceutics12100967.
- doi: 10.3390/pharmaceutics12100967.
  109. Wevers, N. R., Kasi, D. G., Gray, T., Wilschut, K. J., Smith, B., et al. (2018) A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport, *Fluids Barriers CNS*, 15, 23, doi: 10.1186/s12987-018-0108-3.
- 110. Lee, S., Chung, M., and Li Jeon, N. (2018) 3D brain angiogenesis model to reconstitute maturation of functional human blood-brain barrier *in vitro*, *bioRxiv*, 471334, doi: 10.1101/471334.
- 111. Qian, T., Maguire, S. E., Canfield, S. G., Bao, X., Olson, W. R., et al. (2017) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells, *Sci. Adv.*, 3, e1701679, doi: 10.1126/sciadv.1701679.
- 112. Hartlaub, A. M., McElroy, C. A., Maitre, N. L., and Hester, M. E. (2019) Modeling human brain circuitry using pluripotent stem cell platforms, *Front. Pediatr.*, 7, doi: 10.3389/fped.2019.00057.
- 113. Grifno, G. N., Farrell, A. M., Linville, R. M., Arevalo, D., Kim, J. H., et al. (2019) Tissue-engineered blood-brain

- barrier models via directed differentiation of human induced pluripotent stem cells, *Sci. Rep.*, **9**, 13957-13957, doi: 10.1038/s41598-019-50193-1.
- doi: 10.1038/s41598-019-50193-1.

  114. Huh, D., Leslie, D. C., Matthews, B. D., Fraser, J. P., Jurek, S., et al. (2012) A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 159ra147, doi: 10.1126/scitranslmed.3004249.
- 115. Kortagere, S., Chekmarev, D., Welsh, W. J., and Ekins, S. (2008) New predictive models for blood-brain barrier permeability of drug-like molecules, *Pharm. Res.*, 25, 1836-1845, doi: 10.1007/s11095-008-9584-5.
- 116. Wang, Z., Yang, H., Wu, Z., Wang, T., Li, W., Tang, Y., and Liu, G. (2018) *In silico* prediction of blood-brain barrier permeability of compounds by machine learning and resampling methods, *ChemMedChem*, **13**, 2189-2201, doi: 10.1002/cmdc.201800533.
- 117. DeStefano, J. G., Jamieson, J. J., Linville, R. M., and Searson, P. C. (2018) Benchmarking *in vitro* tissue-engineered blood-brain barrier models, *Fluids Barriers CNS*, 15, 32, doi: 10.1186/s12987-018-0117-2.
- 118. Elbakary, B., and Badhan, R. K. S. (2020) A dynamic perfusion based blood-brain barrier model for cytotoxicity testing and drug permeation, *Sci. Rep.*, **10**, 3788, doi: 10.1038/s41598-020-60689-w.
- Buchroithner, B., Mayr, S., Hauser, F., Priglinger, E., Stangl, H., et al. (2021) Dual channel microfluidics for mimicking the blood-brain barrier, ACS Nano, doi: 10.1021/acsnano.0c09263.
- 120. Miranda-Azpiazu, P., Panagiotou, S., Jose, G., and Saha, S. (2018) A novel dynamic multicellular co-culture system for studying individual blood-brain barrier cell types in brain diseases and cytotoxicity testing, *Sci. Rep.*, **8**, 8784, doi: 10.1038/s41598-018-26480-8.
- 121. Campisi, M., Shin, Y., Osaki, T., Hajal, C., Chiono, V., and Kamm, R. D. (2018) 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes, *Biomaterials*, **180**, 117-129, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.014.

## BLOOD-BRAIN BARRIER BREAKDOWN IN STRESS AND NEURODEGENERATION: BIOCHEMICAL MECHANISMS AND NEW MODELS FOR TRANSLATIONAL RESEARCH

### Review

A. B. Salmina<sup>1,2\*</sup>, Yu. K. Komleva<sup>2</sup>, N. A. Malinovskaya<sup>2</sup>, A. V. Morgun<sup>2</sup>, E. A. Teplyashina<sup>2</sup>, O. L. Lopatina<sup>2</sup>, Ya. V. Gorina<sup>2</sup>, E. V. Kharitonova<sup>2</sup>, E. D. Khilazheva<sup>2</sup>, and A. N. Shuvaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Brain Research Department, Scientific Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, 660022 Krasnoyarsk, Russia; E-mail: allasalmina@mail.ru

The blood-brain barrier (BBB) is a structural and functional element of the neurovascular unit (NVU), which includes cells of neuronal, glial and endothelial nature. Among the main tasks of NVU functioning are maintaining the control of metabolism and chemical homeostasis in the brain tissue, ensuring adequate blood flow in active regions, regulating neuroplasticity processes, which is reflected in the implementation of intercellular interactions in normal conditions, under stress, neurodegeneration, neuroinfection, neurodevelopmental diseases. Current versions of the BBB and NVU models, static and dynamic, have significantly expanded the research capabilities, but a number of issues remain unresolved, in particular, the personification of models for a patient. In addition, the application of both static and dynamic models has an important problem associated with the difficulty in reproducing the pathophysiological mechanisms responsible for the damage of the structural and functional integrity of the barrier in diseases of the central nervous system. Solving the problem requires more knowledge about the cellular and molecular mechanisms of BBB and NVU damage in pathology. This review discusses the current state of the cellular and molecular mechanisms that control the BBB permeability, the pathobiochemical mechanisms and manifestations of BBB breakdown in stress and neurodegenerative diseases, as well as the problems and prospects of creating *in vitro* BBB and NVU models for translational studies in neurology and neuropharmacology. Deciphering BBB (patho)physiology will give us new opportunities for the development of regenerative medicine, neuropharmacology and neurorehabilitation.

Keywords: brain, blood-brain barrier, stress, neurodegeneration