

УДК 612.824

DOI 10.17802/2306-1278-2021-10-3-109-120

МОДЕЛИ ГЭБ *IN VITRO*: ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ, ТЕКУЩЕЕ ПОЛОЖЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

А.И. Мосягина¹, А.В. Моргун¹, А.Б. Салмина^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Партизана Железняка, 1, Красноярск, Российская Федерация, 660022; ² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Волоколамское шоссе, 80, Москва, Российская Федерация, 125367

Основные положения

• Проведен анализ имеющихся на сегодняшний день данных исследований гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro*. Описаны предпосылки возникновения и генезис клеточных моделей ГЭБ в мировой научной практике и методы оценки их компетентности. Предложены классификация моделей ГЭБ *in vitro*, сравнительная таблица преимуществ и недостатков каждой модели и возможные области их применения; проанализированы современные тренды, проблемы и перспективы использования клеточных моделей ГЭБ.

Резюме

Все больше исследователей фокусируют внимание не на эндотелиальных клетках как отдельных единицах гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), но на сложных взаимоотношениях различных типов клеток внутри нейроваскулярной единицы, для чего широко используют различные модели ГЭБ *in vitro*. Основной точкой приложения таких моделей являются исследования проницаемости ГЭБ для различных молекул, патологических и лекарственных, в рамках изучения заболеваний и создания способов таргетной доставки терапевтических веществ в центральную нервную систему. В данной статье на основании российской и зарубежной научной литературы проведен анализ существующих моделей ГЭБ *in vitro*, их преимуществ и недостатков; освещены ключевые параметры, согласно которым оценивают релевантность модели ГЭБ *in vitro*; предложена унифицированная классификация таких моделей. По результатам анализа можно заключить, что наблюдается тенденция к переходу от 2D-моделей на полупроницаемых вставках к 3D-моделям на основе клеточных сфероидов и микрофлюидных чипов. Кроме того, использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека вместо первичных клеток, выделенных от животных, позволит с большей достоверностью масштабировать результаты, полученные *in vitro*, на условия *in vivo*.

Ключевые слова

Гематоэнцефалический барьер • Transwell • Матригель • Сфероиды • Микрофлюидика

Поступила в редакцию: 28.06.2021; поступила после доработки: 16.08.2021; принята к печати: 03.09.2021

OVERVIEW OF EXISTING *IN VITRO* BBB MODELS: ADVANTAGES AND DISADVANTAGES, CURRENT STATE AND FUTURE PROSPECTS

А.И. Mosiagina¹, А.В. Morgun¹, А.Б. Salmina^{1,2}

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasensky” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 1, Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022; ² Research Center of Neurology, 80, Volokolamskoye Hwy, Moscow, Russian Federation, 125367

Highlights

• The review presents an analysis of the currently available data regarding the *in vitro* blood-brain barrier (BBB) models. The prerequisites for the emergence and brief history of cell-based *in vitro* BBB models in the world scientific practice and methods for assessing their competence are disclosed.

Для корреспонденции: Ангелина Ивановна Мосягина, angelina.mosiagina@gmail.com; адрес: ул. Партизана Железняка 1, Красноярск, Россия, 660022

Corresponding author: Angelina I. Mosiagina, angelina.mosiagina@gmail.com; 1, Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, Russia, 660022

A classification of *in vitro* BBB models, a comparative table of advantages and disadvantages of each model and possible areas of their application, current trends, problems, and prospects in the use of cellular BBB models are presented.

Abstract

There is growing research focusing on endothelial cells as separate units of the blood-brain barrier (BBB), and on the complex relationships between different types of cells within a neurovascular unit. To conduct this type of studies, researchers use vastly different *in vitro* BBB models. The main objective of such models is to study the BBB permeability for different molecules, and to advance the current level of understanding the mechanisms of disease and to develop methods of targeted therapy for the central nervous system. The analysis of the existing *in vitro* BBB models and their advantages/disadvantages was conducted using the clinical trial data obtained in Russian/foreign countries. In this review, the authors highlight the most relevant assessment parameters and propose a unified classification of *in vitro* BBB models. According to the performed analysis, there is a tendency to move from 2D BBB models based on semipermeable inserts to 3D BBB spheroid and microfluidic organ-on-chip models. Moreover, the use of human induced pluripotent stem cells instead of animal primary cells will make it possible to reliably scale the results obtained *in vitro* to conditions *in vivo*.

Keywords

Blood-brain barrier • Transwell • Matrigel • Spheroids • Microfluidics

Received: 28.06.2021; received in revised form: 16.08.2021; accepted: 03.09.2021

Список сокращений

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер ТЭС – трансэндотелиальное электрическое сопротивление
НВЕ – нейроваскулярная единица ЦНС – центральная нервная система

Введение

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой сложноустроенную систему, включающую различные высокоспециализированные типы клеток, основными из которых являются эндотелиальные клетки, выстилающие сосудистую сеть головного мозга и обеспечивающие барьерную функцию [1]. Другими резидентными клетками ГЭБ являются перициты, внедренные в аблюминальную базальную мембрану [2], астроциты, находящиеся в непосредственном контакте с другими клетками с помощью синаптических нервных окончаний [3], и нейроны [4]. Эти четыре типа клеток в совокупности с внеклеточным матриксом формируют так называемую нейроваскулярную единицу (НВЕ) [5]. Барьерная функция ГЭБ заключается в регуляции обмена элементов между кровью и мозгом и контролируется различными механизмами. Так, особенностями эндотелиального слоя микрососудов головного мозга являются наличие плотных и адгезивных контактов между эндотелиальными клетками (рис. 1) и почти полное отсутствие фенестраций, что обеспечивает высокую электрическую резистентность клеточного монослоя и контролируемую парацеллюлярную проницаемость. Следующим механизмом служит способность специфических транспортных систем и рецепторов, таких как Р-гликопротеин, белок устойчивости рака молочной железы (BCRP), белки множественной лекарствен-

ной резистентности (MRPs) и др., в просвете микрососуда и вне него регулировать межклеточный транспорт [6]. Кроме того, ключевым фактором, определяющим дифференцировку и функционирование эндотелиальных клеток, является локальное мультিকлеточное микроокружение внутри ГЭБ [7].

Первые модели ГЭБ начали появляться еще в 1970-х гг. и представляли собой культуры изолированных микрососудов головного мозга [8]. В дальнейшем усовершенствование технологий выделения и культивирования микрососудов позволило получать культуры первичных эндотелиальных клеток [9]. Возможность получать чистые культуры клеток значительно способствовала развитию исследований в области ГЭБ *in vitro*, поскольку позволила избирательно создавать условия для моделирования НВЕ и точно влиять на ее компоненты. Следующим этапом в моделировании ГЭБ стало сокультивирование эндотелиальных клеток с астроцитами, в результате которого было доказано влияние астроцитов на выполнение эндотелиальными клетками барьерной функции: отмечалось значимое увеличение количества плотных контактов и уровня их организации [10]. Впоследствии при создании мультিকлеточных моделей ГЭБ стали использовать и перициты, при этом показатели трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) в трехклеточных моделях ГЭБ, содержащих в составе эндотелиальные клетки, перициты и

астроциты, были выше, чем в моделях сокультивирования эндотелиоцитов только с перипитами или только с астроцитами [11]. Исследования, проводимые на клеточных культурах головного мозга, стали фундаментом для создания более простых, экономически выгодных, гибких и контролируемых моделей ГЭБ *in vitro*.

Цель настоящего литературного анализа – ознакомление читателя с современными моделями ГЭБ *in vitro*, оценка их преимуществ и недостатков, освещение ключевых параметров релевантности, а также предложение унифицированной классификации таких моделей. Для решения поставленной цели проведен поиск литературных данных с использованием баз данных: PubMed/MEDLINE, Scopus, WoS, РИНЦ. При литературном анализе в 38% случаев использованы источники старше 5 лет.

Классификация моделей ГЭБ *in vitro*

На сегодняшний день разработано и исследовано множество моделей ГЭБ *in vitro*. В данной статье предлагается классифицировать их в зависимости от: 1) взаиморасположения клеток; 2) клеточного состава; 3) наличия или отсутствия тока жидкости. Таким образом, все имеющиеся модели условно можно разделить на: 1) 2D-модели и 3D-модели; 2) одно-, дву- и трехклеточные, мультикомпонентные; 3) статические и динамические. В зависимости от способа сокультивирования клеток 2D-модели, включающие два и более типа клеток, подразделяются на контактные, если разные типы клеток находятся в прямом контакте посредством разделяющей их полупроницаемой мембраны, и неконтактные, где клетки разных типов разобщены.

Ключевые параметры оценки моделей ГЭБ *in vitro*

Ключевые параметры, которыми должны обладать релевантные модели ГЭБ *in vitro*, включают: 1) физиологичный ответ клеток на биомеханические стимулы; 2) имитацию ламинарного тока жидкости и резистентности внеклеточного матрикса; 3) прямое взаимодействие клеток [12].

Трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление (ТЭС) принято научным сообществом в качестве универсального показателя целостности клеточного монослоя, с помощью которого можно оценить его барьерные функции. Оценка ТЭС широко применяется не только в базовых моделях на полупроницаемых вставках, но и более сложных моделях, как например орган-на-чипе [13]. Подробное описание технологии измерения ТЭС представлено в статье В. Srinivasan и др. (2019) [14]. В среднем показатели ТЭС в ГЭБ человека составляют $1500\text{--}8000 \Omega \times \text{см}^2$, у крыс этот показатель колеблется от $5\ 900$ до $8\ 000 \Omega \times \text{см}^2$. Чем глубже в модели отражаются физиологические

параметры ГЭБ, тем более высоких значений ТЭС можно достигнуть. Так, сокультивирование эндотелиальных клеток с клетками других типов или имитация тока жидкости увеличивают ТЭС [14].

Другим широко распространенным методом исследования проницаемости является использование молекул различного размера и полярности, таких как маннитол (молекулярная масса 182 кДа), инулин (5 500 кДа), сахароза (342 кДа) или флуоресцентно меченые декстраны (варьирует до 10 млн) [15]. Этим методом можно исследовать периваскулярную систему выведения, необходимую для элиминации крупных полярных молекул, для которых нет специфических транспортеров.

С помощью иммуноцитохимического окрашивания определяют экспрессию белков плотных и адгезивных контактов. К системе плотных контактов относятся: интегральные мембранные белки клаудин-1/3/5/12, окклюдин и молекулы клеточной адгезии JAM-1/2/3, а также вспомогательные (аксессуарные) белки ZO-1/2/3, сингулин и другие. Адгезивные контакты представлены кадгерин-катениновым комплексом и ассоциированными белками: α -, β - и γ -катенин, N- и VE-кадгерин [16]. Основными эффлюксными транспортерами являются

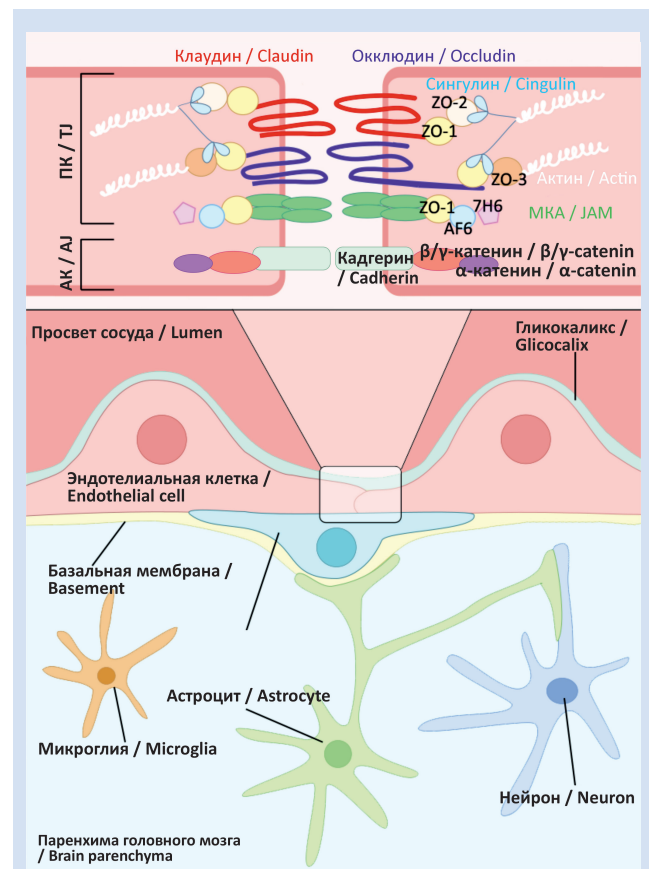


Рисунок 1. Схематическое изображение плотных и адгезивных контактов на поверхности эндотелиальных клеток

Примечание: АК – адгезивные контакты; МКА – молекулы клеточной адгезии; ПК – плотные контакты.

Figure 1. Schematic representation of tight and adherent junctions on the surface of endothelial cells

Note: AJ – adherent junctions; JAM – junction adhesion molecules; TJ – tight junctions.

P-гликопротеин, BCRP, белки семейства MRP [17]. К ключевым представителям белков транспортных систем относят многочисленные белки семейства SLC (транспортёры растворенных веществ), например белок-переносчик глюкозы GLUT, белок-переносчик нейтральных аминокислот LAT, белок-переносчик органических анионов OATP, инсулиновый рецептор IR, рецептор трансферрина TfR, рецептор липопротеинов низкой плотности LDLR и ассоциированный с ним белок LPR и другие [18].

2D-модели ГЭБ *in vitro*

Монокультуры эндотелиальных клеток

Первыми разработанными и одновременно наиболее примитивными моделями ГЭБ *in vitro* считаются монокультуры эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга (рис. 2, а). Однако нельзя считать данные модели неоправданными, поскольку показано, что ГЭБ может выполнять барьерную функцию и без присутствия астроцитарного компонента, как это происходит у амфибий [19]. Кроме того, недостаток барьерной функции в монокультурах можно компенсировать. Так, например, продемонстрировано, что использование питательной среды, кондиционированной астроцитами, способствует увеличению показателей ТЭС и снижению проницаемости эндотелиального монослоя для декстранов и пропидий йодида [20]. Кроме того, возможно культивировать эндотелиальные клетки в астроцит-кондиционированном внеклеточном матриксе, что также будет способствовать уменьшению проницаемости [21]. Монокультура эндотелиальных клеток использована нами при моделировании нейровоспаления. Выявлено, что воздействие индукторов нейровоспаления вирусного и бактериального генеза приводит к снижению секреции и транспорта лактата эндотелиальными клетками, а также уменьшению уровня экспрессии белков плотных контактов ZO-1 [22].

*Transwell-модели ГЭБ *in vitro**

Первой моделью ГЭБ *in vitro* с использованием фильтра для обеспечения прямого контакта между клетками, расположенными в виде монослоя на обеих его сторонах, считается модель M.P. Dehouck и др. (1990) на примере сокультуры эндотелиальных клеток и астроцитов [23]. В подобной модели значения ТЭС были выше, чем в моно- или сокультурах клеток НВЕ, и составляли примерно $660 \Omega \times \text{см}^2$, что обусловлено более обширным представительством плотных контактов на поверхности клеток эндотелия. На сегодняшний день двумерные модели на полупроницаемых вставках, так называемые Transwell systems (см. рис. 2, б), являются наиболее часто встречаемыми и широко используемыми в исследованиях ГЭБ *in vitro*. Transwell-модель представляет собой вставку с полупроницаемой мембраной из полистирола или поликарбоната толщиной 10 мкм и

порами размером 400 нм и плотностью 108 пор/мм², помещенную в лунку культурального планшета таким образом, что сформированы две камеры: наружная (люминальная), расположенная сверху вставки, и внутренняя (аблюминальная), расположенная между вставкой и дном лунки. Наружная камера имитирует пространство со стороны просвета сосуда, поэтому с этой стороны мембраны, как правило, культивируют монослой эндотелиальных клеток. Таким образом, при добавлении в лунку планшета различных молекул, патологических или лекарственных, возможно исследовать механизмы проницаемости ГЭБ и моделировать заболевания центральной нервной системы (ЦНС), например болезнь Альцгеймера [24], гипоксическое повреждение ЦНС [25] и др. Внутренняя камера имитирует паренхиму головного мозга, для ее имитации используют астроциты, нейроны или перициты, культивируемые в трех вариациях: с нижней стороны вставки, на дне лунки или комбинируя оба способа [26]. Кроме того, с использованием Transwell-моделей возможно моделирование так называемых нейрогенных ниш – областей головного мозга, в которых протекает нейрогенез. Данная технология использована нами для определения влияния адресной фотоактивации астроцитов, подвергнутых воздействию бета-амилоидного пептида, на клетки, входящие в состав нейрогенных ниш. Показано, что оптогенетическая стимуляция астроцитов способствует восстановлению процессов нейрогенеза, нарушенных действием амилоида [27].

Хотя Transwell-модель ГЭБ *in vitro* и разработана в 1990 г., она обладает рядом преимуществ по сравнению с остальными моделями, что обуславливает ее наиболее широкую представленность в исследованиях ГЭБ *in vitro*. К преимуществам использования можно отнести простоту воспроизведения, что экономит время- и трудозатраты, а также обеспечивает дешевизну и высокую контролируемость. Данная модель удобна для последующего применения таких методов, как оценка ТЭС, иммуноцитохимическое окрашивание, оценка проницаемости с использованием декстранов и флуоресцентных красителей, например Lucifer Yellow. Однако существует и ряд значительных ограничений. Так, в двумерных моделях ГЭБ *in vitro* эндотелиальные клетки спонтанно дифференцируют и быстро теряют свои ГЭБ-подобные функции, приобретая более общий эндотелиальный фенотип, что носит название фенотипического сдвига [28]. В дополнение к этому многие из современных моделей ГЭБ *in vitro* не позволяют достичь трехмерной организации клеток, требующейся для правильной клеточной дифференцировки, позиционных эффектов и поляризации. Таким образом, 2D-модели не учитывают важность межклеточных взаимодействий, что объясняет расхождение в изучении ГЭБ в условиях *in vitro* и *in vivo* [29]. Например, в случае когда используют

относительно высокие концентрации компонентов *in vitro*, где современные клеточные модели не способны рассчитать показатели активного транспорта из-за бедной экспрессии рецепторов [30]. Соответственно, недостаточность внутриклеточного транспорта и экспрессии поверхностных рецепторов делает исследования рецептор-зависимых транспортных механизмов *in vitro* менее значимыми в существующих 2D-моделях ГЭБ. Таким образом, изучение ГЭБ *in vitro* требует создания новых экспериментальных систем, которые бы обладали ключевыми характеристиками НВЕ *in vivo*. Это идея привела к созданию 3D-моделей ГЭБ.

3D-модели ГЭБ *in vitro*

Модели ГЭБ in vitro на основе внеклеточного матрикса

Как известно, в головном мозге клетки расположены в трехмерной организации, что обуславливает сложность и множественность межклеточных взаимодействий. Поэтому одной из актуальных и требующих решения проблем современных моделей ГЭБ *in vitro* является необходимость создания условий для свободного и трехмерного взаимодействия клеток. Первым шагом в этом направлении стали модели на основе коллагеновых гелевых матриксов (см. рис. 2, *b*). Коллаген является универсальным компонентом соединительной ткани и выступает в роли опорного субстрата для клеток, поддерживая их пространственную организацию, а следовательно, может служить искусственным скаффолдом в исследованиях *in vitro*. Первые работы с использованием коллагена в качестве матрикса для клеток различного типа проведены еще в 1930-х гг. [31], в последующих исследованиях на эндотелиальных клетках показано, что гелевые матрицы индуцируют ангиогенез, выполняя роль скаффолда, в котором клетки способны свободно мигрировать, пролиферировать и дифференцироваться, самоорганизуясь в трубчатые структуры [32]. В современных исследованиях чаще всего используют модели на основе внеклеточного матрикса «Матригель» [33]. К преимуществам таких моделей можно отнести простоту в использовании, экономическую доступность, способность имитировать морфологию ГЭБ *in vivo*. Тем не менее у данной технологии есть ряд значимых ограничений. Несмотря на то что матрикс обеспечивает трехмерную пространственную организацию клеток, крайне сложно воспроизвести состав матрицы, схожий с реальными условиями, причем пропуск даже незначительных компонентов внеклеточного матрикса может изменить его свойства, а значит, и особенности самоорганизации микрососудов. Кроме того, матриксные модели не воспроизводят условия тока крови, что также влияет на морфологию клеток и их сигнальные функции. Важным фактором является и сложность в доставке питательных компонентов клеткам, находящимся

в матриксе. Вследствие перечисленных факторов вкуче с нестабильной воспроизводимостью данные модели имеют низкую трансляционную и фармацевтическую привлекательность [34].

Сфероидные модели ГЭБ in vitro

Первая сфероидная модель ГЭБ *in vitro* создана группой исследователей под руководством E. Ulrich (2013) [35]. Представленная модель состояла из смешанной культуры клеток: первичных эндотелиальных клеток человека, первичных пери- и астроцитов человека. Стоит отметить, что образование мультিকлеточной сфероидной модели ГЭБ не зависело от поддержки скаффолда, так как три типа клеток самостоятельно определяли все межклеточные взаимодействия. В результате сокультивирования эндотелиальные клетки, астро- и перициты самоорганизовывались в сфероидные структуры, где эндотелиальные клетки представляли внешний слой, ядро состояло из астроцитов, а перициты располагались в среднем слое (см. рис. 2, *c*).

В модели C. Cho и др. (2017) проведено сравнение Transwell-технологии и сфероидной мультিকлеточной модели ГЭБ [36]. Так, сфероидная модель является более выгодной для воспроизведения условий, схожих с *in vivo*, поскольку отличается более высоким уровнем экспрессии белков плотных и адгезивных контактов (ZO-1, окклюдин, клаудин-5), эффлюксных насосов (P-гликопротеин, β -катенин) и транспортеров (LRP-1). Следующая модель, представляющая интерес для рассмотрения, разработана G. Nzou и коллегами (2018) и включала шесть типов клеток, полученных от человека: эндотелиальные клетки микрососудов головного мозга, перициты, астроциты, клетки микроглии, олигодендроциты и нейроны [37]. По результатам исследования сфероиды также характеризовались высоким уровнем экспрессии белков плотных и адгезивных контактов (ZO-1, клаудин-5, VE-кадгерин, β -катенин), эффлюксных насосов (P-гликопротеин) и транспортеров (GLUT-1).

Сфероидные модели относительно просты в использовании, воспроизводимы, обладают характеристиками, близкими к условиям *in vitro*, и демонстрируют релевантный ответ в меняющихся физиологических условиях. Важной особенностью сфероидных моделей является их способность сохранять жизнеспособность до 21 сут, благодаря чему возможно изучение долгосрочных эффектов токсичности различных веществ [37]. Все это делает их перспективным инструментом исследования проницаемости ГЭБ, нейротоксичности, разработки механизмов таргетной доставки лекарственных веществ в головной мозг и моделирования патологий ЦНС [38]. К недостаткам подобных моделей можно отнести их статичность, невозможность измерения ТЭС, техническую сложность в проведении иммуноцитохимического окрашивания и определении

проницаемости, недостаточность питания «ядра» сфероидов из-за гипоксии [35]. С подробным протоколом формирования сфероидов ГЭБ *in vitro* можно ознакомиться в статье S. Bergmann и др. (2018) [39].

Микрофлюидные модели ГЭБ *in vitro*

На сегодняшний день модели на основе микрофлюидных чипов являются наиболее перспективными, так как выполняют сразу ряд важнейших функций: обеспечивают трехмерную организацию клеток, прямое взаимодействие между клетками разных типов и имитируют поток крови. Ламинарный поток крови в просвете микрососудов головного мозга обеспечивает постоянное давление на стенки эндотелиальных клеток, называемое напряжением сдвига. Последнее активирует апикальные механорецепторы (интегрины, кавеолы, G-белок, ионные каналы), что приводит к запуску механотрансдукционных сигнальных путей и является пусковым механизмом для фенотипических изменений в эндотелиальных клетках [40]. Эндотелиальные клетки, подверженные давлению тока жидкости, становятся более крупными и плоскими и имеют большее количество эндцитотических пузырьков, микрофиламентов и клатрин-покрытых ямок, что напоминает эндоте-

лиальные клетки ГЭБ *in vivo* [41]. Кроме того, напряжение сдвига индуцирует продукцию активных форм кислорода и оксида азота (II) NO, увеличивает экспрессию белков плотных и адгезивных контактов у эндотелиальных клеток, а также экспрессию ассоциированных с ними генов [17].

Микрофлюидный чип представляет собой сеть микроканалов, вытравленных или полученных методом мягкой литографии в материале подложки из стекла, окисленного кремния или полидиметилсилоксана. Внутри чипа располагается проницаемая мембрана, разделяющая люминальный и аблюминальный слой. Мембрана является платформой для сокультивирования клеток по обеим сторонам – эндотелиальных клеток со стороны просвета и других клеток со стороны паренхимы (рис. 2, *d*). Важными факторами являются толщина мембраны, плотность пор и их размер, поскольку они могут влиять на сигнальную трансдукцию между клетками. Чаще всего используют следующие параметры: толщина мембраны 10 мкм, размер пор 0,2–0,4 мкм, плотность пор 108/мм² [42].

Первые микрофлюидные чипы разработаны в начале 1990-х гг. из стекла или окисленного кремния и

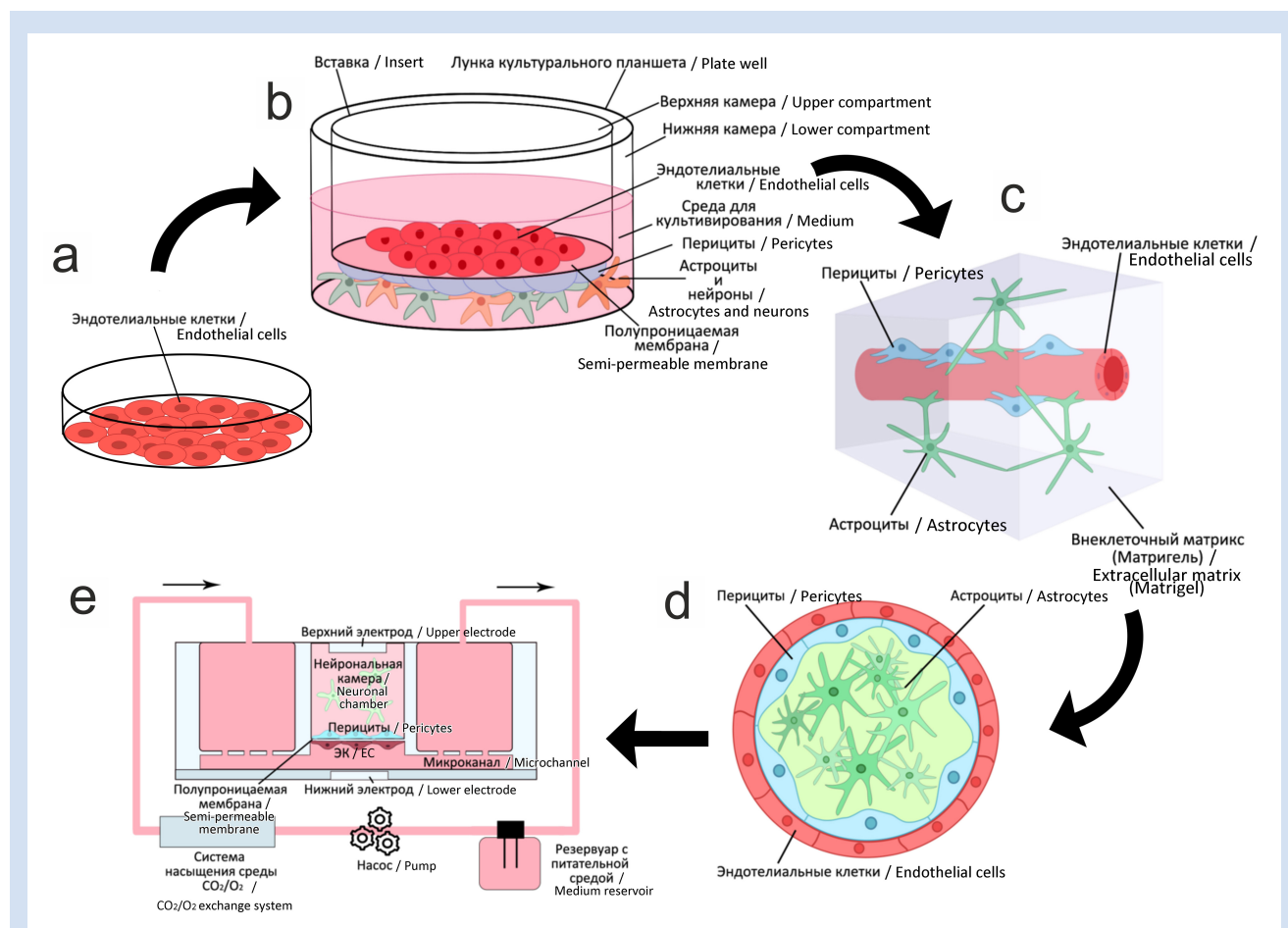


Рисунок 2. Эволюция и схематическое изображение моделей гематоэнцефалического барьера *in vitro*: *a* – монокультуры эндотелиальных клеток; *b* – Transwell-модели; *c* – модели на основе внеклеточного матрикса; *d* – сфероидные модели; *e* – микрофлюидные модели

Примечание: ЭК – эндотелиальные клетки.

Figure 2. Evolution and schematic representation of the blood-brain barrier models *in vitro*: *a* – monocultures of endothelial cells; *b* – transwell-models; *c* – models based on extracellular matrix; *d* – spheroidal models; *e* – microfluidic models

Note: EC – endothelial cells.

были использованы в микромеханических и разделительных системах. Одной из первых работ по применению микрофлюидных технологий в биомедицине является исследование M.D. Frame и соавт. (1995), в котором эндотелиальные клетки были культивированы внутри микроканала и подвергались перфузии культуральной среды на протяжении 24 ч [43]. Следующей работой, приведшей к созданию первой полноценной микрофлюидной системы, стало исследование K.A. Stanness и др. (1996), где были сокультивированы эндотелиальные клетки аорты быка и астроциты глиомы С6 крысы [44]. Модель состояла из камеры с микрокапилляром, стенки которого представляли собой мембрану из полого полиэстерового волокна. Эндотелиальные клетки культивировали на люминальной стороне мембраны, а астроциты на аблюминальной, ток жидкости обеспечивался насосом, закачивающим культуральную среду в камеру. Последующие модели усложнялись как в клеточном составе, так и устройстве. Значительным шагом вперед стало использование полидиметилсилоксана в микрофлюидике. Благодаря прозрачности полидиметилсилоксан позволяет визуализировать происходящие внутри микроканалов события в реальном времени. Также в силу эластичности он невероятно прочен и, что более важно, удобен для воспроизведения таких органов-на-чипе, в которых клетки подвергаются постоянному механическому воздействию. Классическим и наиболее известным подобным примером является модель легкие-на-чипе [45]. Отдельного внимания заслуживает технология 3D-печати в микрофлюидике, постепенно вытесняющая метод мягкой литографии благодаря простоте, возможности воспроизводить сложные пространственные структуры и использовать широкий спектр материалов. Метод 3D-печати заключается в использовании 3D-модели для ее послойного и высокоточного конструирования с помощью систем автоматизированного проектирования.

Примером современной микрофлюидной системы является модель В.М. Маоз и коллег (2018) [46], в которой инкорпорированы три микрофлюидных чипа: один чип моделировал паренхиму головного мозга, а два остальных – инфлюкс/эффлюкс в пределах ГЭБ. Мозг-на-чипе был представлен нейральными стволовыми клетками человека и астроцитами, а ГЭБ-на-чипе включал монослой эндотелиальных клеток в «сосудистой» (нижней) камере и перициты с астроцитами в «периваскулярной» (верхней) камере. Больше микрофлюидных моделей рассмотрено в статье M.I. Teixeira и соавт. (2020) [47].

Современные возможности 3D-печати позволяют исследователям быть невероятно гибкими в дизайне чипа и интегрировать мультифункциональные биосенсоры, микроэлектроды и системы визуализации для мониторинга в режиме реального времени. Также микрофлюидные модели за счет

постоянного ламинарного тока жидкости по микроканалам обеспечивают автоматизированное питание клеток, снижают риск контаминации и создают напряжение сдвига, что обуславливает клеточную морфологию, приближенную к условиям *in vivo*. К недостаткам микрофлюидных моделей относятся отсутствие стандартизированных параметров, сложность оценки ТЭС и показателей напряжения сдвига. Данные модели трудоемки в воспроизведении и использовании, требуют специальной подготовки исследователей и наличия специализированного оборудования, что лимитирует их доступность среди научного сообщества.

Заключение

У каждой из существующих моделей ГЭБ *in vitro* есть преимущества и недостатки (таблица), однако ни одна из них не является идеальной, так как не воспроизводит барьерные функции *in vivo*, такие как высокие показатели ТЭС, экспрессия белков транспортных и эффлюксных систем и межклеточных контактов. Модель ГЭБ должна представлять собой динамическую систему, чувствительную к питательным, воспалительным, гемодинамическим и фармакологическим стимулам, а также учитывать трехмерную организацию ГЭБ и ламинарный поток жидкости. И последнее, но немаловажное условие: модель должна быть интуитивно понятной и простой в использовании, эффективной по экономическим и временным затратам, масштабируемой и контролируемой.

Решением многих исследовательских задач может стать создание компьютерных моделей ГЭБ *in silico* [48]. В перспективе именно компьютерные модели будут являться наиболее удобными для прогнозирования воздействия лекарственных веществ и их биодоступности в ЦНС с точки зрения времени и трудозатрат, а также экономической выгоды. Так, многие фармацевтические компании уже внедрили эту технологию в ранние этапы разработки препаратов [49]. Однако качество компьютерных моделей полностью зависит от вводимых параметров. Тогда как многие физико-химические характеристики лекарственного вещества могут быть предсказаны по его химической структуре, информации относительно транспортных механизмов и метаболической трансформации в ГЭБ крайне мало.

Другим перспективным направлением является использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Клетки, выделенные от животных, отличаются по характеристикам от клеток человека, а потому модели ГЭБ на животных клетках нельзя напрямую масштабировать на условия *in vivo*, что затрудняет их применение в исследованиях фармацевтических препаратов и механизмов заболеваний ЦНС [50]. С другой стороны, получение первичных культур клеток лимитировано

Преимущества и недостатки моделей ГЭБ *in vitro*
Advantages and disadvantages of the BBB models *in vitro*

Модели ГЭБ <i>in vitro</i> / BBB model <i>in vitro</i>	Преимущества / Advantages	Недостатки / Disadvantages
Монокультуры эндотелиальных клеток / Monocultures of endothelial cells	<ul style="list-style-type: none"> • Простота / Simplicity • Экономическая доступность / Affordability 	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие напряжения сдвига / No «shear stress» • Двумерная организация / 2D-organization • Отсутствие других клеток / Lack of other cell types • Низкая масштабируемость / Low scalability
Transwell-модели / Transwell-models	<ul style="list-style-type: none"> • Простота / Simplicity • Экономическая доступность / Affordability • Контролируемость / Controllability • Спектр методов исследования / Range of research methods 	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие напряжения сдвига / No «shear stress» • Двумерная организация / 2D-organization • Фенотипический сдвиг / «Phenotypic drift» • Низкая масштабируемость / Low scalability
Модели на основе внеклеточного матрикса / ECM-based models	<ul style="list-style-type: none"> • Простота / Simplicity • Экономическая доступность / Affordability • Трехмерная организация / 3D-organization 	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие напряжения сдвига / No «shear stress» • Низкая воспроизводимость состава матрицы / Low reproducibility of ECM composition • Недостаточность питания / Lack of nutrition
Сфероидные модели / Spheroids	<ul style="list-style-type: none"> • Простота / Simplicity • Экономическая доступность / Affordability • Трехмерная организация / 3D-organization • Отсутствие скаффолда / No need in a scaffold • Высокая масштабируемость / High scalability 	<ul style="list-style-type: none"> • Отсутствие напряжения сдвига / No «shear stress» • Гипоксия «ядра» сфероида / Hypoxia of a spheroid's «core» • Невозможность оценки ТЭС / Impossibility of TEER measurement • Сложность проведения ИЦХ / Difficulty in ICC
Микрофлюидные модели ГЭБ <i>in vitro</i> / Microfluidic BBB models <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Гибкость / Flexibility • Трехмерная организация / 3D-organization • Напряжение сдвига / «Shear stress» • Постоянное питание клеток / Constant nutrition of cells • Низкий риск контаминации / Reduced risk of contamination • Высокая масштабируемость / High scalability 	<ul style="list-style-type: none"> • Сложность / Complexity • Отсутствие стандартизированных параметров / Lack of standardized parameters • Сложность оценки ТЭС и напряжения сдвига / Difficulty in TEER and «shear stress» measurement

Примечание: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ИЦХ – иммуноцитохимия; ТЭС – трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

Note: BBB – blood-brain barrier; ECM – extracellular matrix; ICC – immunocytochemistry; TEER – transendothelial electrical resistance.

в силу биоэтических причин. Решением данной проблемы могут стать и уже становятся индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, основным преимуществом которых является возможность создания персонализированной модели патологии конкретного пациента, от которого они выделены.

За последние пятьдесят лет спектр существующих моделей ГЭБ *in vitro* значительно расширился. Можно подвести итог и охарактеризовать следующую тенденцию: несмотря на то что двумерные модели остаются незаменимым инструментом в исследованиях проницаемости ГЭБ, они не отвечают запросам времени и проигрывают трехмерным моделям в значимости результатов. Использование сфероидов и полученных с помощью 3D-печати микрофлюидных моделей набирает популярность среди лабораторий по всему миру. В перспективе широкая доступность трехмерных моделей не только в лабораториях экономически развитых,

но и развивающихся стран обеспечит прогресс в понимании механизмов функционирования ГЭБ, патофизиологии таких состояний, как острая и хроническая нейродегенерация, нейровоспаление, ишемическое повреждение головного мозга; даст толчок развитию персонализированной медицины и алгоритмов таргетной доставки лекарственных веществ в ЦНС.

Конфликт интересов

А.И. Мосягина заявляет об отсутствии конфликтов интересов. А.В. Моргун заявляет об отсутствии конфликтов интересов. А.Б. Салмина входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Информация об авторах

Мосягина Ангелина Ивановна, очный аспирант кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, младший научный сотрудник научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии федерального государственного

Author Information Form

Mosiagina Angelina I., MD, PhD student at the Department of Biological Chemistry, Junior Researcher at the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Krasnoyarsk State Medical University named after

бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-7344-7925

Morgun Andrey Vasильевич, доктор медицинских наук доцент кафедры педиатрии института последипломного образования, декан педиатрического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-9644-5500

Салмина Алла Борисовна, доктор медицинских наук, профессор главный научный сотрудник научно-исследовательского института молекулярной медицины и патобиохимии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Российская Федерация; главный научный сотрудник и заведующая лабораторией экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4012-6348

Professor V.F. Voino-Yasenetsky” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-7344-7925

Morgun Andrey V., MD, PhD, Associate Professor at the Department of Pediatrics, Institute of Postgraduate Education, Chair, Department of Pediatrics, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-9644-5500

Salmina Alla B., MD, PhD, Professor, Leading Researcher at the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation; Leading Researcher, Head of the Laboratory of Experimental Neurocytology, Department of Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4012-6348

Вклад авторов в статью

MAI – интерпретация и анализ данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

MAB – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

SAB – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

MAI – data interpretation and analysis, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MAV – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

SAB – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Langen U.H., Ayloo S., Gu C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2019; 35: 591–613. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062608
- Mäe M.A., He L., Nordling S., Vazquez-Liebanas E., Nahar K., Jung B., Li X., Tan B.C., Chin F.J., Cazenave-Gassiot A., Wenk M.R., Zarb Y., Lavina B., Quaggin S.E., Jeansson M., Gu C., Silver D.L., Vanlandewijck M., Butcher E.C., Keller A., Betsholtz C. Single-Cell Analysis of Blood-Brain Barrier Response to Pericyte Loss. *Circ Res.* 2021; 128 (4): e46-e62. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317473
- Heithoff B.P., George K.K., Phares A.N., Zuidhoek I.A., Munoz-Ballester C., Robel S. Astrocytes are necessary for blood-brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia.* 2021; 69 (2): 436-472. doi:10.1002/glia.23908
- Kaplan L., Chow B.W., Gu C. Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling. *Nat Rev Neurosci.* 2020; 21 (8): 416–432. doi:10.1038/s41583-020-0322-2
- Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron.* 2017; 96 (1): 17–42. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.030
- Sweeney M.D., Zhao Z., Montagne A., Nelson A.R., Zlokovic B.V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 2019; 99 (1): 21-78. doi:10.1152/physrev.00050.2017
- Villabona-Rueda A., Erice C., Pardo C.A., Stins M.F. The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center. *Front Cell Neurosci.* 2019; 405. doi:10.3389/fncel.2019.00405
- Joó F., Karnushina I. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios.* 1973; 8 (29): 41–48
- Bowman P.D., Ennis S.R., Rarey K.E., Betz A.L., Goldstein G.W. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol.* 1983; 14 (4): 396–402. doi:10.1002/ana.410140403
- Tao-Cheng J.H., Nagy Z., Brightman M.W. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci.* 1987; 7 (10): 3293–3299. doi:10.1523/JNEUROSCI.07-10-03293.1987
- Hatherell K., Couraud P.-O., Romero I.A., Weksler B., Pilkington G.J. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-,

- and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods*. 2011; 199 (2): 223–229. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.05.012
12. Liu Y., Gill E., Huang Y.Y.S. Microfluidic on-chip biomimicry for 3D cell culture: a fit-for-purpose investigation from the end user standpoint. *Futur Sci OA*. 2017; 3 (2): FSO173. doi:10.4155/fsoa-2016-0084
13. van der Helm M.W., Odijk M., Frimat J.-P., van der Meer A.D., Eijkel J.C.T., van den Berg A., Segerink L.I. Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips. *Biosens Bioelectron*. 2016; 85: 924–929. doi:10.1016/j.bios.2016.06.014
14. Srinivasan B., Kolli A.R. *Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance (TEER) to Measure the Integrity of Blood-Brain Barrier*. Humana Press, New York, NY: Springer New York; c2019. 99–114p. (Barichello T., editor. *Blood-Brain Barrier*. *Neuromethods*; vol 142). doi:10.1007/978-1-4939-8946-1_6
15. Hladky S.B., Barrand M.A. Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 2018; 15 (1): 30. doi:10.1186/s12987-018-0113-6
16. Bayir E., Sendemir A. Role of Intermediate Filaments in Blood-Brain Barrier in Health and Disease. *Cells*. 2021; 10 (6): 1400. doi:10.3390/cells10061400
17. Kadry H., Noorani B., Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*. 2020; 17 (1): 69. doi:10.1186/s12987-020-00230-3
18. Abdul Razzak R., Florence G.J., Gunn-Moore F.J. Approaches to CNS Drug Delivery with a Focus on Transporter-Mediated Transcytosis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (12): 3108. doi:10.3390/ijms20123108
19. Crone C., Olesen S.P. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*. 1982; 241 (1): 49–55. doi:10.1016/0006-8993(82)91227-6
20. 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. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.029
21. Hartmann C., Zozulya A., Wegener J., Galla H.-J. The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an *in vitro* study. *Exp Cell Res*. 2007; 313 (7): 1318–1325. doi:10.1016/j.yexcr.2007.01.024
22. Бойцова Е.Б., Моргун А.В., Осипова Е.Д., Мартынова Г.П., Салмина А.Б. Изменение рецепции и транспорта лактата церебральным эндотелием под воздействием индуктора вирусного и бактериального воспаления *in vitro*. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5 (1): 8-14. doi:10.23946/2500-0764-2020-5-1-8-14
23. Dehouck M.P., Méresse S., Delorme P., Fruchart J.C., Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem*. 1990; 54 (5): 1798–1801. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb01236.x
24. Cenini G., Hebisch M., Iefremova V., Flitsch L.J., Breitzkreuz Y., Tanzi R.E., Kim D.Y., Peitz M., Brüstle O. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci*. 2021; 110: 103568. doi:10.1016/j.mcn.2020.103568
25. Моргун А.В., Кувачева Н.В., Хилажева Е.Д., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б. Особенности экспрессии коннексинов клетками нейроваскулярной единицы в норме и при гипоксии в условиях эксперимента. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014; 13 (6): 5-9. doi:10.20538/1682-0363-2014-6-5-9
26. Modarres H.P., Janmaleki M., Novin M., Saliba J., El-Hajj F., RezayatiCharan M., Seyfoori A., Sadabadi H., Vandal M., Nguyen M.D., Hasan A., Sanati-Nezhad A. *In vitro* models and systems for evaluating the dynamics of drug delivery to the healthy and diseased brain. *J Control Release*. 2018; 273: 108-130. doi:10.1016/j.jconrel.2018.01.024
27. Моргун, А. В., Осипова, Е. Д., Бойцова, Е. Б., Шуваев, А. Н., Комлева, Ю. К., Труфанова, Л. В., Вайс, Е. Ф., Салмина, А. Б. Астроцит-опосредованные механизмы регуляции нейрогенеза в модели нейрогенной ниши *in vitro* при действии Аβ1-42. *Биомедицинская химия*. 2019; 65 (5): 366-373. doi:10.18097/PBMC20196505366
28. Urich E., Lazić S.E., Molnos J., Wells I., Freskgård P.-O. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive *in vitro* blood-brain barrier models. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e38149. doi:10.1371/journal.pone.0038149
29. Neuwelt E., Abbott N.J., Abrey L., Banks W.A., Blakley B., Davis T., Engelhardt B., Grammas P., Nedergaard M., Nutt J., Pardridge W., Rosenberg G.A., Smith Q., Drewes L.R. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol*. 2008; 7 (1): 84–96. doi:10.1016/S1474-4422(07)70326-5
30. Hakkarainen J.J., Jalkanen A.J., Kääriäinen T.M., Keski-Rahkonen P., Venäläinen T., Hokkanen J., Mönkkönen J., Suhonen M., Forsberg M.M. Comparison of *in vitro* cell models in predicting *in vivo* brain entry of drugs. *Int J Pharm*. 2010; 402 (1–2): 27–36. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.016
31. Ehrmann R.L., Gey G.O. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen2. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1956; 16 (6): 1375–1403. doi:10.1093/jnci/16.6.1375
32. Davis G.E., Koh W., Stratman A.N. Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007; 81 (4): 270–285. doi:10.1002/bdrc.20107
33. Wang H., Yang H., Shi Y., Xiao Y., Yin Y., Jiang B., Ren H., Chen W., Xue Q., Xu X. Reconstituting neurovascular unit with primary neural stem cells and brain microvascular endothelial cells in three-dimensional matrix. *Brain Pathol*. 2021; 31 (5): e12940. doi:10.1111/bpa.12940
34. Bhalerao A., Sivandzade F., Archie S.R., Chowdhury E.A., Noorani B., Cucullo L. *In vitro* modeling of the neurovascular unit: advances in the field. *Fluids Barriers CNS*. 2020; 1–20. doi:10.1186/s12987-020-00183-7
35. Urich E., Patsch C., Aigner S., Graf M., Iacone R., Freskgård P.O. Multicellular self-assembled spheroidal model of the blood brain barrier. *Sci Rep*. 2013; 3: 1500. doi:10.1038/srep01500
36. Cho C., Wolfe J.M., Fadzen C.M., Calligaris D., Hornburg K., Chiocca E.A., Agar N.Y.R., Pentelute B.L., Lawler A.E. Blood-brain-barrier spheroids as an *in vitro* screening platform for brain-penetrating agents. *Nat Commun*. 2017; 8: 1–14. doi:10.1038/ncomms15623.
37. Nzou G., Wicks R.T., Wicks E.E., Seale S.A., Sane C.H., Chen A., Murphy S.V., Jackson J.D., Atala A.J. Human Cortex Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 7413. doi:10.1038/s41598-018-25603-5
38. Sokolova V., Nzou G., Meer S.B. Van Der, Ruks T., Heggen M., Loza K., Hagemann N., Murke F., Giebel B., Hermann D.M., Atala A.J., Epple M. Acta Biomaterialia Ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) can penetrate and enter cell nuclei in an *in vitro* 3D brain spheroid model. *Acta Biomater*. 2020; 111: 349–362. doi:10.1016/j.actbio.2020.04.023
39. Bergmann S., Lawler S.E., Qu Y., Fadzen C.M., Wolfe J.M., Regan M.S., Pentelute B.L., Agar N.Y.R., Cho C.-F. Blood-brain-barrier organoids for investigating the permeability of CNS therapeutics. *Nat Protoc*. 2018; 13 (12): 2827–2843. doi:10.1038/s41596-018-0066-x
40. Ando J., Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J*. 2009; 73 (11): 1983–1992. doi:10.1253/circj.cj-09-0583
41. Rochfort K.D., Cummins P.M. *In Vitro Cell Models of the Human Blood-Brain Barrier: Demonstrating the Beneficial Influence of Shear Stress on Brain Microvascular Endothelial Cell Phenotype*. Humana Press, New York, NY: Springer New York; 2019. 71–98p. doi:10.1007/978-1-4939-8946-1_5
42. Jiang L., Li S., Zheng J., Li Y., Huang H. Recent Progress in Microfluidic Models of the Blood-Brain Barrier. *Micromachines*. 2019; 10 (6): 375. doi:10.3390/mi10060375

43. Frame M.D., Sarelius I.H. A system for culture of endothelial cells in 20-50-microns branching tubes. *Microcirculation*. 1995; 2 (4): 377–385. doi:10.3109/10739689509148282.

44. Stanness K.A., Guatteo E., Janigro D. A dynamic model of the blood-brain barrier “in vitro”. *Neurotoxicology*. 1996; 17 (2): 481–496.

45. Huh D., Leslie D.C., Matthews B.D., Fraser J.P., Jurek S., Hamilton G.A., et al. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med*. 2012; 4 (159): 159ra147. doi:10.1126/scitranslmed.3004249

46. Maoz B.M., Herland A., FitzGerald E.A., Grevesse T., Vidoudez C., Pacheco A.R., Sheehy S.P., Park T.-E., Dauth S., Mannix R., Budnik N., Shores K., Cho A., Nawroth J.C., Segrè D., Budnik B., Ingber D.E., Parker K.K. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic

coupling of endothelial and neuronal cells. *Nat Biotechnol*. 2018; 36 (9): 865–874. doi:10.1038/nbt.4226

47. Teixeira M.I., Amaral M.H., Costa P.C., Lopes C.M., Lamprou D.A. Recent Developments in Microfluidic Technologies for Central Nervous System Targeted Studies. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (6): 542. doi:10.3390/pharmaceutics12060542

48. Shityakov S., Förster C.Y. Computational simulation and modeling of the blood-brain barrier pathology. *Histochem Cell Biol*. 2018; 149 (5): 451–459. doi:10.1007/s00418-018-1665-x

49. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017; 13 (11): 1147–1158. doi:10.1080/17425255.2017.1389897

50. Essayan-Perez S., Zhou B., Nabet A.M., Wernig M., Huang Y.A. Modeling Alzheimer's disease with human iPSC cells: advancements, lessons, and applications. *Neurobiol Dis*. 2019; 130: 104503. doi:10.1016/j.nbd.2019.104503

REFERENCES

1. Langen U.H., Ayloo S., Gu C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2019; 35: 591–613. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062608

2. Mäe M.A., He L., Nordling S., Vazquez-Liebanas E., Nahar K., Jung B., Li X., Tan B.C., Chin F.J., Cazenave-Gassiot A., Wenk M.R., Zarb Y., Lavina B., Quaggin S.E., Jeansson M., Gu C., Silver D.L., Vanlandewijck M., Butcher E.C., Keller A., Betsholtz C. Single-Cell Analysis of Blood-Brain Barrier Response to Pericyte Loss. *Circ Res*. 2021; 128 (4): e46–e62. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317473

3. Heithoff B.P., George K.K., Phares A.N., Zuidhoek I.A., Munoz-Ballester C., Robel S. Astrocytes are necessary for blood-brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia*. 2021; 69 (2): 436–472. doi:10.1002/glia.23908

4. Kaplan L., Chow B.W., Gu C. Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling. *Nat Rev Neurosci*. 2020; 21 (8): 416–432. doi:10.1038/s41583-020-0322-2

5. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*. 2017; 96 (1): 17–42. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.030

6. Sweeney M.D., Zhao Z., Montagne A., Nelson A.R., Zlokovic B.V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 21–78. doi:10.1152/physrev.00050.2017

7. Villabona-Rueda A., Erice C., Pardo C.A., Stins M.F. The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center. *Front Cell Neurosci*. 2019; 405. doi:10.3389/fncel.2019.00405

8. Joó F., Karnushina I. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios*. 1973; 8 (29): 41–48

9. Bowman P.D., Ennis S.R., Rarey K.E., Betz A.L., Goldstein G.W. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol*. 1983; 14 (4): 396–402. doi:10.1002/ana.410140403

10. Tao-Cheng J.H., Nagy Z., Brightman M.W. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci*. 1987; 7 (10): 3293–3299. doi:10.1523/JNEUROSCI.07-10-03293.1987

11. Hatherell K., Couraud P.-O., Romero I.A., Weksler B., Pilkington G.J. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods*. 2011; 199 (2): 223–229. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.05.012

12. Liu Y., Gill E., Huang Y.Y.S. Microfluidic on-chip biomimicry for 3D cell culture: a fit-for-purpose investigation from the end user standpoint. *Futur Sci OA*. 2017; 3 (2): FSO173. doi:10.4155/fsoa-2016-0084

13. van der Helm M.W., Odijk M., Frimat J.-P., van der Meer A.D., Eijkel J.C.T., van den Berg A., Segerink L.I. Direct quantification of transendothelial electrical resistance

in organs-on-chips. *Biosens Bioelectron*. 2016; 85: 924–929. doi:10.1016/j.bios.2016.06.014

14. Srinivasan B., Kolli A.R. Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance (TEER) to Measure the Integrity of Blood-Brain Barrier. Humana Press, New York, NY: Springer New York; c2019. 99–114p. (Barichello T., editor. Blood-Brain Barrier. Neuromethods; vol 142). doi:10.1007/978-1-4939-8946-1_6

15. Hladky S.B., Barrand M.A. Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 2018; 15 (1): 30. doi:10.1186/s12987-018-0113-6

16. Bayir E., Sendemir A. Role of Intermediate Filaments in Blood-Brain Barrier in Health and Disease. *Cells*. 2021; 10 (6): 1400. doi:10.3390/cells10061400

17. Kadry H., Noorani B., Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS*. 2020; 17 (1): 69. doi:10.1186/s12987-020-00230-3

18. Abdul Razzak R., Florence G.J., Gunn-Moore F.J. Approaches to CNS Drug Delivery with a Focus on Transporter-Mediated Transcytosis. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (12): 3108. doi:10.3390/ijms20123108

19. Crone C., Olesen S.P. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*. 1982; 241 (1): 49–55. doi:10.1016/0006-8993(82)91227-6

20. 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. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.029

21. Hartmann C., Zozulya A., Wegener J., Galla H.-J. The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study. *Exp Cell Res*. 2007; 313 (7): 1318–1325. doi:10.1016/j.yexcr.2007.01.024

22. Boytsova E.B., Morgun A.V., Osipova E.D., Martinova G.P., Salmina A.B. Change of reception and lactate transport by cerebral endothelium under the influence of viral and bacterial inflammation in vitro. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina - Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5 (1): 8–14. (In Russian). doi:10.23946/2500-0764-2020-5-1-8-14

23. Dehouck M.P., Méresse S., Delorme P., Fruchart J.C., Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem*. 1990; 54 (5): 1798–1801. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb01236.x

24. Cenini G., Hebisch M., Iefremova V., Flitsch L.J., Breitkreuz Y., Tanzi R.E., Kim D.Y., Peitz M., Brüstle O. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci*. 2021; 110: 103568. doi:10.1016/j.mcn.2020.103568

25. Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Khilazheva Y.D., Taranushenko T.Y., Salmina A.B. The features of connexins

expression in the cells of neurovascular unit in normal conditions and hypoxia in vitro. Byulleten' sibirskoy meditsiny - Bulletin of Siberian Medicine. 2014; 13 (6): 5-9 (In Russian). doi:10.20538/1682-0363-2014-6-5-9

26. Modarres H.P., Janmaleki M., Novin M., Saliba J., El-Hajj F., RezayatiCharan M., Seyfoori A., Sadabadi H., Vandal M., Nguyen M.D., Hasan A., Sanati-Nezhad A. In vitro models and systems for evaluating the dynamics of drug delivery to the healthy and diseased brain. J Control Release. 2018; 273: 108-130. doi:10.1016/j.jconrel.2018.01.024

27. Morgun A.V., Osipova E.D., Boytsova E.B., Shuvaev A.N., Komleva Yu.K., Trufanova L.V., Vais E.F., Salmina A.B. Astroglia-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche in vitro treated with Abeta1-42. Biomeditsinskaya Khimiya - Biomedical Chemistry. 2019; 65 (5): 366-373 (in Russian). doi:10.18097/PBMC20196505366

28. Urich E., Lazic S.E., Molnos J., Wells I., Freskgård P.-O. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. PLoS One. 2012; 7 (5): e38149. doi:10.1371/journal.pone.0038149

29. Neuwelt E., Abbott N.J., Abrey L., Banks W.A., Blakley B., Davis T., Engelhardt B., Grammas P., Nedergaard M., Nutt J., Pardridge W., Rosenberg G.A., Smith Q., Drewes L.R. Strategies to advance translational research into brain barriers. Lancet Neurol. 2008; 7 (1): 84-96. doi:10.1016/S1474-4422(07)70326-5

30. Hakkarainen J.J., Jalkanen A.J., Kääriäinen T.M., Keski-Rahkonen P., Venäläinen T., Hokkanen J., Mönkkönen J., Suhonen M., Forsberg M.M. Comparison of in vitro cell models in predicting in vivo brain entry of drugs. Int J Pharm. 2010; 402 (1-2): 27-36. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.016

31. Ehrmann R.L., Gey G.O. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen. JNCI J Natl Cancer Inst. 1956; 16 (6): 1375-1403. doi:10.1093/jnci/16.6.1375

32. Davis G.E., Koh W., Stratman A.N. Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. Birth Defects Res C Embryo Today. 2007; 81 (4): 270-285. doi:10.1002/bdrc.20107

33. Wang H., Yang H., Shi Y., Xiao Y., Yin Y., Jiang B., Ren H., Chen W., Xue Q., Xu X. Reconstituting neurovascular unit with primary neural stem cells and brain microvascular endothelial cells in three-dimensional matrix. Brain Pathol. 2021; 31 (5): e12940. doi:10.1111/bpa.12940

34. Bhalerao A., Sivandzade F., Archie S.R., Chowdhury E.A., Noorani B., Cucullo L. In vitro modeling of the neurovascular unit: advances in the field. Fluids Barriers CNS. 2020; 1-20. doi:10.1186/s12987-020-00183-7

35. Urich E., Patsch C., Aigner S., Graf M., Iacone R., Freskgård P.O. Multicellular self-assembled spheroidal model of the blood brain barrier. Sci Rep. 2013; 3: 1500. doi:10.1038/srep01500

36. Cho C., Wolfe J.M., Fadzen C.M., Calligaris D., Hornburg K., Chiocca E.A., Agar N.Y.R., Pentelute B.L., Lawler A.E. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents. Nat Commun. 2017; 8: 1-14. doi:10.1038/ncomms15623.

37. Nzou G., Wicks R.T., Wicks E.E., Seale S.A., Sane C.H., Chen A., Murphy S.V., Jackson J.D., Atala A.J. Human Cortex Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. Sci Rep. 2018; 8 (1): 7413. doi:10.1038/s41598-018-25603-5

38. Sokolova V., Nzou G., Meer S.B. Van Der, Ruks T., Heggen M., Loza K., Hagemann N., Murke F., Giebel B., Hermann D.M., Atala A.J., Epple M. Acta Biomaterialia Ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) can penetrate and enter cell nuclei in an in vitro 3D brain spheroid model. Acta Biomater. 2020; 111: 349-362. doi:10.1016/j.actbio.2020.04.023

39. Bergmann S., Lawler S.E., Qu Y., Fadzen C.M., Wolfe J.M., Regan M.S., Pentelute B.L., Agar N.Y.R., Cho C.-F. Blood-brain-barrier organoids for investigating the permeability of CNS therapeutics. Nat Protoc. 2018; 13 (12): 2827-2843. doi:10.1038/s41596-018-0066-x

40. Ando J., Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. Circ J. 2009; 73 (11): 1983-1992. doi:10.1253/circj.cj-09-0583

41. Rochfort K.D., Cummins P.M. In Vitro Cell Models of the Human Blood-Brain Barrier: Demonstrating the Beneficial Influence of Shear Stress on Brain Microvascular Endothelial Cell Phenotype. Humana Press, New York, NY: Springer New York; 2019. 71-98p. doi:10.1007/978-1-4939-8946-1_5

42. Jiang L., Li S., Zheng J., Li Y., Huang H. Recent Progress in Microfluidic Models of the Blood-Brain Barrier. Micromachines. 2019; 10 (6): 375. doi:10.3390/mi10060375

43. Frame M.D., Sarelius I.H. A system for culture of endothelial cells in 20-50-microns branching tubes. Microcirculation. 1995; 2 (4): 377-385. doi:10.3109/10739689509148282.

44. Stanness K.A., Guatteo E., Janigro D. A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro". Neurotoxicology. 1996; 17 (2): 481-496.

45. Huh D., Leslie D.C., Matthews B.D., Fraser J.P., Jurek S., Hamilton G.A., et al. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. Sci Transl Med. 2012; 4 (159): 159ra147. doi:10.1126/scitranslmed.3004249

46. Maoz B.M., Herland A., FitzGerald E.A., Grevesse T., Vidoudez C., Pacheco A.R., Sheehy S.P., Park T.-E., Dauth S., Mannix R., Budnik N., Shores K., Cho A., Nawroth J.C., Segrè D., Budnik B., Ingber D.E., Parker K.K. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. Nat Biotechnol. 2018; 36 (9): 865-874. doi:10.1038/nbt.4226

47. Teixeira M.I., Amaral M.H., Costa P.C., Lopes C.M., Lamprou D.A. Recent Developments in Microfluidic Technologies for Central Nervous System Targeted Studies. Pharmaceutics. 2020; 12 (6): 542. doi:10.3390/pharmaceutics12060542

48. Shityakov S., Förster C.Y. Computational simulation and modeling of the blood-brain barrier pathology. Histochem Cell Biol. 2018; 149 (5): 451-459. doi:10.1007/s00418-018-1665-x

49. Alqahtani S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2017; 13 (11): 1147-1158. doi:10.1080/17425255.2017.1389897

50. Essayan-Perez S., Zhou B., Nabet A.M., Wernig M., Huang Y.A. Modeling Alzheimer's disease with human iPSC cells: advancements, lessons, and applications. Neurobiol Dis. 2019; 130: 104503. doi:10.1016/j.nbd.2019.104503

Для цитирования: Мосягина А.И., Моргунов А.В., Салмина А.Б. Модели ГЭБ in vitro: преимущества и недостатки, текущее положение и перспективы развития. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021;10(3): 109-120. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-109-120

To cite: Mosiagina A.I., Morgun A.V., Salmina A.B. Overview of existing in vitro BBB models: advantages and disadvantages, current state and future prospects. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2021;10(3): 109-120. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-3-109-120