

Модельная система гематоэнцефалического барьера на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток**Пикина Арина Сергеевна***Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: arina.pikina@yandex.ru

Центральная нервная система (ЦНС) является одним из самых труднодоступных объектов для доставки фармакологических средств из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) - ключевой структуры, которая регулирует ограниченный транспорт молекул из кровотока в головной мозг и обеспечивает гомеостаз в ЦНС [2]. Неэффективность транспорта разрабатываемых препаратов через ГЭБ может быть вызвана различными причинами, включая как недостатки в фармакокинетических и физико-химических свойствах транспортируемых молекул, так и структурно-функциональными изменениями ГЭБ вследствие прогрессирования заболевания. В связи с этим, в ряде случаев терапия многих нейродегенеративных заболеваний затруднена и на данный момент требует новых путей решения этой проблемы. Разработка моделей ГЭБ *in vitro* позволила сильно продвинуться в неврологических и нейробиологических исследованиях, однако прогрессу в создании новых клинических эффективных препаратов препятствуют ограничения и недостатки существующих моделей, такие как сложности в воспроизведении цитоархетиктоники, работе с первичными культурами нейронов [4, 5, 6, 7]. Поэтому для изучения и тестирования терапевтических агентов необходимо создание упрощённых, воспроизводимых моделей ГЭБ, в которых были бы воссозданы основные свойства и функции нативного барьера. Отдельный интерес представляют модели на основе дифференцированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), представляющих неограниченный источник клеточного материала с широким потенциалом для дифференцировок [1, 2, 8].

В данной работе мы получали модель ГЭБ в планшетах Transwell™, а также в системе 3D-сфероидов. Для этого мы использовали нейроэпителиальные клетки-предшественники (NPC) и эндотелиоциты, полученные из ИПСК с помощью направленной дифференцировки в нейральном и эндотелиальном направлениях, соответственно, а также клеток пуповинной вены человека (HUVES). Васкуляризированные нейральные органоиды получали в планшетах AggreWell™ и культивировали в мини-биореакторах на орбитальном шейкере. Модели в Transwell™ получали наслаиванием NPC и HUVES или дифференцированных эндотелиоцитов на мембраны внутренних лунок планшета. Для характеристики полученных моделей использовали метод иммуноцитохимического маркирования нейрального белка $\beta 3$ -тубулина, глиального белка GFAP, белков плотных контактов окклюдина, клаудина и zonula-occludens 1 (ZO-1), а также поверхностных белков эндотелия CD31 и CD105. Для сравнения культур дифференцированных эндотелиоцитов и HUVES использовали метод количественной ПЦР. Также мы измерили трансмембранное сопротивление методом TEER и провели тестирование на проницаемость с помощью декстрана и олигонуклеотидов, меченных флуоресцеином, в системах Transwell™.

В результате мы получили модели, отвечающие основным характеристикам моделей ГЭБ *in vitro* и демонстрирующие синтез вышеперечисленных маркёров, что позволяет в перспективе рассматривать их в качестве систем для изучения функционирования барьера, нейродегенеративных заболеваний и тестирования транспорта различных препаратов.

Источники и литература

- 1) A. Appelt-Menzel, A. Cubukova, and M. Metzger, “Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-Culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluripotent Stem Cells,” *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–22, 2018, doi: 10.1002/cpsc.62.
- 2) S. Bagchi, T. Chhibber, B. Lahooti, A. Verma, V. Borse, and R. D. Jayant, “In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: An overview,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 13, pp. 3591–3605, 2019, doi: 10.2147/DDDT.S218708.
- 3) G. N. Grifno et al., “Tissue-engineered blood-brain barrier models via directed differentiation of human induced pluripotent stem cells,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50193-1.
- 4) M. Salman et al., “An in-vitro BBB-on-a-chip open model of human blood-brain barrier enabling advanced optical imaging,” *bioRxiv*, p. 2020.06.30.175380, 2020.
- 5) A. B. Salmina et al., “Blood–Brain Barrier Breakdown in Stress and Neurodegeneration: Biochemical Mechanisms and New Models for Translational Research,” *Biochemistry (Moscow)*, vol. 86, no. 6. Pleiades journals, pp. 746–760, Jun. 01, 2021. doi: 10.1134/S0006297921060122.
- 6) C. Simonneau et al., “Investigating receptor-mediated antibody transcytosis using blood–brain barrier organoid arrays,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 18, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12987-021-00276-x.
- 7) F. Sivandzade and L. Cucullo, “In-vitro blood–brain barrier modeling: A review of modern and fast-advancing technologies,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 38, no. 10, pp. 1667–1681, 2018, doi: 10.1177/0271678X18788769.
- 8) M. Yamashita, H. Aoki, T. Hashita, T. Iwao, and T. Matsunaga, “Inhibition of transforming growth factor beta signaling pathway promotes differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial-like cells,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 17, no. 1, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1186/s12987-020-00197-1.