

УДК 57.088

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ СРАВНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ГЭБ*Д.А. Сахаров, Ю.М. Аверина, А.Ю. Курбатов, М.А. Ветрова**Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» Москва, Россия*

Были разработаны методики анализа состояния клеточных культур ГЭБ. Использованы методы ПЦР и микроскопии для исследования характеристик клеточных культур, входящих в коллекцию. По результатам ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа, клетки, выбранные для формирования микрофлюидной клеточной модели ГЭБ, обладают ярко выраженной экспрессией всех характерных маркеров: клетки эндотелия микрососудов головного мозга iPS-EC, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток IMR90-4, обладают ярко выраженной экспрессией vFW, CD31, ZO1, GLUT1, BCRP, MDR1; иммортализованные перициты сосудов головного мозга imHBVP – ярко выраженной экспрессией α SMA, PDGFR β ; иммортализованные астроциты fNA-hTERT – ярко выраженной экспрессией GFAP, S100 β , A2B5, O4.

Разработана методика сокультивирования клеток эндотелия iPS-EC, перицитов и астроцитов для формирования клеточного барьера в составе модели ГЭБ[1, 2].

Для сокультивирования клеток эндотелия, перицитов и астроцитов проведен выбор и экспериментальная оценка микропористых мембран и внеклеточного матрикса. Для адгезии клеток выбраны компоненты ВКМ, близкие к составу базальной мембраны микрососудов головного мозга человека. Для нанесения ВКМ и адгезии клеток выбрана микропористая мембрана из полкарбоната (PC) в составе мембранных вставок Transwell, с площадью мембраны 0,143 см², толщиной мембраны 10 мкм, диаметром пор 3 мкм.

Для культивирования клеточной модели ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды был выбран микробиореактор (МБР) Nomunculus, включающий блок управления и сменный клеточный блок (чип). Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены оптимальные параметры циркуляции питательной среды.

Для анализа проницаемости клеточного барьера в составе модели ГЭБ в качестве модельных веществ были выбраны [13C] сахароза, FITC-декстран 4 кДа, FITC-декстран 70 кДа. Полученные значения проницаемости [13C] Сахарозы через клеточный барьер в условиях циркуляции питательной среды близки к физиологическим значениям коэффициента проницаемости сахарозы. Наиболее плотный, малопроницаемый для FITC-декстранов в течение длительного времени клеточный барьер формируется при культивировании моделей ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды при режиме 1,5 ГЦ, ± 10 кПа. Проницаемость для FITC-декстранов на 1-2 порядка ниже проницаемости FITC-декстранов через клеточный барьер в составе известных микрофлюидных и статических клеточных моделей ГЭБ, а также на порядок ниже проницаемости ГЭБ для FITC-декстранов in situ[3].

Через 3, 7, 14 и 30 дней после начала культивирования клеточных моделей ГЭБ в МБР были определены следующие параметры клеточного барьера: TEER клеточного барьера; жизнеспособность клеток в составе модели ГЭБ; фенотип клеток в составе модели ГЭБ (экспрессия характерных маркеров клеток эндотелия, перицитов и астроцитов, наличие плотных контактов между клетками эндотелия); проницаемость клеточного барьера для модельных веществ. В результате проведенного экспериментального анализа установлено, что клеточный барьер в составе немодифицированной микрофизиологической клеточной модели ГЭБ обладает следующими характеристиками, сохраняющимися в течение 30 дней после начала культивирования в МБР: высокой жизнеспособностью клеток (более 80 %) в составе клеточного барьера; плотными контактами (ZO1) между клетками эндотелия; TEER, приближенным к физиологическому ($> 2000 \text{ Ом}\times\text{см}^2$); коэффициентом проницаемости для сахарозы, приближенным к физиологическому ($3\text{--}12\times 10^8 \text{ см/с}$ или $0,18\text{--}0,72\times 10^{-5} \text{ см/мин}$); осуществляет транспорт низкомолекулярных и высокомолекулярных веществ (модельных веществ) между апикальной и базальной стороной клеточного барьера; в клетках эндотелия, перицитах и астроцитах в составе клеточного барьера сохраняется высокая экспрессия характерных маркеров.

Проведена валидация методики сокультивирования клеточных культур, входящих в ГЭБ. В соответствии с методикой сокультивирования получали образцы клеточной модели ГЭБ. Получение образцов осуществляли в трех независимых повторах.

В каждом из повторов в полученных образцах анализировали TEER и проницаемость сахарозы через клеточный барьер в составе сформированных образцов клеточной модели ГЭБ. В каждом из трех независимых повторов получены близкие значения TEER и коэффициентов проницаемости сахарозы. Результаты валидации указывают на то, что получение клеточной модели ГЭБ в соответствии с разработанной методикой сокультивирования приводит к формированию клеточного барьера со стабильно воспроизводимыми характеристиками [2].

Также была проведена модификация клеточных культур с использованием технологии CRISPR/Cas для создания модели ГЭБ с заданными свойствами. Для модификации были выбраны астроциты fHA-hTERT. С помощью технологии CRISPR/Cas был проведен нокаут гена GFAP в астроцитах, проведена селекция и выбран клон, у которого отсутствовала достоверная экспрессия GFAP. Клетки-потомки выбранного клона были заморожены в достаточном количестве для формирования банка модифицированных с помощью CRISPR/Cas клеточных культур, предназначенных для создания модели ГЭБ[4,5].

Соглашение о предоставлении субсидии № 14.583.21.0066

ЛИТЕРАТУРА

1. K.L. Sellgren, B.T. Hawkins, and S. Grego, "An optically transparent membrane supports shear stress studies in a three-dimensional microfluidic neurovascular unit model.," *Biomicrofluidics*, vol. 9, no. 6, p. 061102, Nov. 2015.
2. D.S. Grant, C.P. Leblond, H.K. Kleinman, S. Inoue, and J.R. Hassell, "The incubation of laminin, collagen IV, and heparan sulfate proteoglycan at 35 degrees C yields basement membrane-like structures.," *J. Cell Biol.*, vol. 108, no. 4, pp. 1567–74, Apr. 1989.
3. L. Shi, M. Zeng, Y. Sun, and B.M. Fu, "Quantification of Blood-Brain Barrier Solute Permeability and Brain Transport by Multiphoton Microscopy," *J. Biomech. Eng.*, vol. 136, no. 3, p. 031005, Feb. 2014.
4. F.R. Walter et al., "A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 222, pp. 1209–1219, Jan. 2016
5. F. Alqahtani, E.A. Chowdhury, R. Bhattacharya, B. Noorani, R. Mehvar, and U. Bickel, "Brain Uptake of [13C] and [14C] Sucrose Quantified by Microdialysis and Whole Tissue Analysis in Mice.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 46, no. 11, pp. 1514–1518, Nov. 2018.