

## ПОЛУЧЕНИЕ ТРЕХКЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОВАСКУЛЯРНОЙ ЕДИНИЦЫ IN VITRO

© *Е. Д. Хилажева,<sup>1</sup> Е. Б. Бойцова, Е. А. Пожиленкова,  
Ю. Р. Солончук, А. Б. Салмина*

*Красноярский государственный медицинский университет  
им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, 660022;  
<sup>1</sup>электронный адрес: elena.hilazheva@mail.ru*

В настоящее время существует множество способов моделирования гематоэнцефалического барьера и нейроваскулярной единицы *in vitro*. Все предложенные модели имеют свои недостатки и преимущества, связанные с особенностями получения и использования. Настоящая работа посвящена исследованию возможности получения трехклеточной модели нейроваскулярной единицы (НВЕ) *in vitro* на основе прогениторных клеток, выделенных из головного мозга эмбрионов крыс. Из полученных прогениторных клеток культивировали нейросферы с последующей дифференцировкой в астроциты и нейроны. Также из эмбриональных клеток головного мозга выделяли эндотелиоциты. Непосредственной единицей наблюдения были клеточные сокультуры в чашках Петри. При дифференцировке прогениторных клеток образование монослоя астроцитов происходит через 7—9 сут, нейронов — через 10—14 сут, эндотелиоцитов — через 7 сут. Разработанный протокол одновременного выделения и культивирования всех типов клеток позволяет сократить сроки получения трехклеточной модели НВЕ *in vitro* и уменьшить количество используемых животных, а также расходных материалов и реактивов.

Ключевые слова: нейроваскулярная единица, гематоэнцефалический барьер, модель *in vitro*, прогениторные клетки, сокультивирование.

Принятые сокращения: ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, НВЕ — нейроваскулярная единица, ЦНС — центральная нервная система, Сх 43 — Коннексин 43, GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок, NSE — нейрон-специфическая енолаза.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) осуществляет активное взаимодействие между кровотоком и центральной нервной системой (ЦНС), не только ограничивая транспорт в мозг потенциально опасных веществ, но и регулируя его жизнедеятельность, питание и выведение продуктов метаболизма. Изучение механизмов функционирования ГЭБ — одна из ключевых задач, решение которой имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Известно, что при различных видах патологии ЦНС имеет место нарушение проницаемости ГЭБ, причем эти изменения носят избирательный характер и зачастую являются причиной неэффективности терапевтического воздействия (Begley, 2004). Таким образом, в настоящее время для исследования потенциальных нейро- и психотропных лекарственных препаратов необходима адекватная и воспроизводимая модель ГЭБ *in vitro*.

Структурно-функциональной основой ГЭБ является нейроваскулярная единица (НВЕ). В настоящее время среди моделей ГЭБ *in vitro* по особенностям культивирования выделяют моноклеточные (культивирование одного типа клеток, чаще эндотелиоцитов) и мультиклеточные (сокультивирование двух и более типов клеток —

астроцитов, нейронов, эндотелиоцитов и перицитов) модели.

В зависимости от происхождения клеток, входящих в состав моделей ГЭБ, выделяют модели с использованием клеток немозгового (Wilhelm et al., 2011) и мозгового происхождения (Bernas et al., 2010), а также комбинированные модели (Cohen-KashiMalina et al., 2009). В настоящее время в арсенале ученых имеется достаточный выбор способов моделирования ГЭБ и НВЕ *in vitro* в зависимости от поставленных целей и задач. Все существующие модели имеют свои недостатки, ограничения и преимущества (Моргун и др., 2012).

Целью настоящей работы было получение модели НВЕ *in vitro* на основе прогениторных клеток, выделенных из головного мозга эмбрионов крыс. Задачи исследования: выделение прогениторных клеток нейроглиально-го происхождения и эндотелиоцитов из головного мозга эмбрионов крыс, формирование на основе полученных клеток трехклеточной модели НВЕ *in vitro*, а также оценка возможности использования полученной модели для изучения особенностей межклеточного взаимодействия и энергетического сопряжения в (пато)физиологических условиях.

## Материал и методика

Материалом для создания модели НВЕ служил головной мозг 14—16-суточных эмбрионов крыс линии Wistar, из которого выделяли прогениторные клетки. Из полученных прогениторных клеток культивировали нейросферы с последующей дифференцировкой в астроциты и нейроны (Моргун и др., 2013). Эндотелиоциты выделяли по модифицированному протоколу (Kumar, Vasudevan, 2014). Манипуляции с клетками до их посева в культуральную среду проводили на льду. Непосредственной единицей наблюдения были клеточные сокультуры в чашках Петри.

Выделение и дифференцировка прогениторных клеток в астроциты и нейроны. Эвтазию беременных самок проводили передозировкой анестетика и производили забор эмбрионов (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011). Головной мозг извлекали, помещали в 2%-ный раствор глюкозы в PBS, отделяли кору больших полушарий и переносили в коническую пробирку, содержащую 2%-ный раствор глюкозы в PBS. После осаждения под действием силы тяжести кусочков ткани удаляли супернатант и проводили ресуспендирование в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США) путем тритурации ткани до получения однородной суспензии клеток с последующим добавлением еще 1 мл той же среды.

После осаждения неразделенных кусочков ткани отобранный супернатант переносили в стерильные пробирки и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин с последующим удалением супернатанта и повторной тритурацией осадка в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Подсчет клеток осуществляли с помощью цитометра Scepter CellCounter (Millipore, США).

Полученные эмбриональные клетки в количестве  $1.4 \cdot 10^6$  кл./мл засеивали в культуральные флаконы T-25 cm<sup>2</sup> (Corning, США) с 10 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Культивирование осуществляли в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C. Через 24—48 ч наблюдали образование нейросфер. Жизнеспособные нейросферы на фазовом контрасте выглядят полупрозрачными сфероидами, состоящими из множества клеток, несущих на своей поверхности микрошипы (рис. 1). На 7-е сут диаметр нейросфер составляет около 100—120 мкм.

В дальнейшем проводили направленную дифференцировку нейросфер в астроциты в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США) и в нейроны в среде Neuronal Medium (ScienCell, США).

Выделение и культивирование эндотелиоцитов. Эндотелиоциты выделяли по модифицированному протоколу (Kumar, Vasudevan, 2014). После отделения коры больших полушарий для культивирования нейронов и астроцитов изолировали передний мозг, который является источником не только прогениторных и стволовых астроглиальных клеток, но и эндотелиоцитов (Plane et al., 2010). Выделенную ткань помещали в пробирку с холодным 2%-ным раствором глюкозы в PBS с последующими диссоциацией ткани до гомогенного состояния и центрифугированием при 800 g в течение 5 мин при 20 °C. Полученный осадок ресуспендировали в растворе коллагеназы и диспазы (1 мг/мл) в DMEM, инкубировали 2 мин при комнатной температуре и повторно центрифугировали при 800 g в течение 5 мин. К полученному осадку добавляли DMEM с DNase I (0.001 мг/мл) и центрифуги-

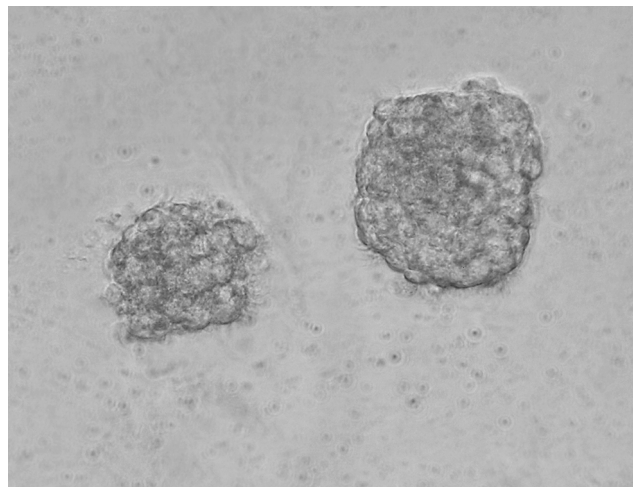


Рис. 1. Нейросферы.

гировали при 800 g в течение 5 мин, после чего отмывали в DMEM с последующим центрифугированием при 300 g в течение 10 мин. Полученные клетки ресуспендировали в среде ECCM (ScienCell, США), засеивали в количестве  $1.7 \cdot 10^7$  кл./мл в 35-миллиметровую культуральную чашку с адгезивным покрытием и культивировали в инкубаторе при 37 °C с 5 % CO<sub>2</sub>. Замену среды производили каждые 2 сут. Через 7 сут наблюдали образование монослоя эндотелиальных клеток.

Субкультивирование и формирование трехклеточной модели. После дифференцировки прогениторных клеток в астроциты и нейроны проводили пассаж клеток с последующим формированием двухкомпонентной сокультуры нейронов и астроцитов. Смесь астроцитов и нейронов культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % FBS, гепарин (10 нг/мл), bFGF (0.5 нг/мл), EGF (20 пг/мл) и раствор антибиотика-антимикотика (пенициллина 1 ед./мл, стрептомицина 1 мкг/мл и амфотерицина Б 2.5 нг/мл). После достижения данной сокультурой конфлюэнтности 90 % проводили наложение эндотелиоцитов. Далее клетки культивировали в вышеуказанной среде с добавлением 10 % ECGS в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C. Замену среды производили каждые 2 сут.

Иммуноцитохимический анализ. Для идентификации типа клеток НВЕ определяли следующие маркеры: нейрон-специфическую енолазу (NSE), глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP), специфичный для астроцитов, и фактор Виллебранда (vWf), специфичный для эндотелиоцитов. Для оценки формирования функциональных связей между клетками ГЭБ регистрировали наличие белка плотных контактов ZO-1 и основного структурного компонента щелевых контактов — Коннексина 43 (Cx 43).

Число клеток с белками-маркерами оценивали двойным непрямым методом иммуноферментного окрашивания согласно протоколу фирмы-производителя с использованием первичных антител к Cx 43 (1 : 100), GFAP (1 : 100), NSE (1 : 200), а также анти-vWf-антител (1 : 200) и анти-ZO-1-антител (1 : 200). В качестве вторичных использовали моноклональные антитела, меченные AlexaFluor 488, AlexaFluor 647, AlexaFluor 555 (1 : 400).

Использованные реактивы: основная культуральная среда для прогениторных клеток NeuroCult NS-A

Доля клеток разного типа в монокультуре и в модели НВЕ in vitro

Тип культуры	Доля клеток, %		
	NSE-положительных (нейроны)	GFAP-положительных (астроциты)	vWf-положительных (эндотелиоциты)
Монокультура	94.5 ± 5.1	92.2 ± 6.0	86.4 ± 4.6
Сокультура	24.3 ± 1.7	49.8 ± 2.0	25.9 ± 1.8

Proliferation Kit, состоящая из NeuroCult NS-A Basal Medium (Rat) и NeuroCult NS-A Proliferation Supplement (Rat), гепарин, основной фактор роста фибробластов bFGF и эпидермальный фактор роста EGF (Stemcell, США) (Goustard-Langelier, 2013); культуральная среда для астроцитов Astrocyte Medium, состоящая из Basal Medium, FBS, AGS и P/S solution (ScienCell, США); культуральная среда для нейронов Neuronal Medium (ScienCell, США), состоящая из Basal Medium, FBS, NGS и P/S solution; культуральная среда для эндотелиоцитов Endothelial Cell Culture Medium (ECCM) (ScienCell, США), состоящая из ECM, FBS, ECGS и раствора антибиотика-антимикотика (ThermoScientific HyClone, США); коллагеназа и диспаза (Sigma-Aldrich, США); DMEM и DNase I (StemCell, США).

Первичные антитела к Сх 43 (SpringBioscience, США, E2740), антитела к GFAP (BioLegend, США, 644702), антитела к NSE (Abcam, США, ab134015), анти-vWf (Abcam, США, ab6994) и анти-ZO-1 (Santa-Cruz, США, sc-10804). В качестве вторичных использовали моноклональные антитела, меченные AlexaFluor 488 (Abcam, США, ab150117), AlexaFluor 647 (Abcam, США, ab150171) и AlexaFluor 555 (Abcam, США, ab150078).

Статистическая обработка. Использовали основные методы описательной статистики. Описание количественных признаков представлено в виде  $M \pm s$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $s$  — стандартное отклонение.

## Результаты и обсуждение

Показатели чистоты культур клеток-компонентов модели НВЕ представлены в таблице. В ходе исследования установили, что во всех случаях дифференцировки прогениторных клеток в астроциты образование монослоя клеток происходит через 7—9 сут с момента посева. Монослой астроцитов стабильно сохранялся в течение 14 сут, доля GFAP-положительных клеток в культуре колебалась в пределах 80—98 %.

При дифференцировке прогениторных клеток в нейроны монослой клеток образовывался на 10—14-е сут, при этом доля NSE-положительных клеток составляла  $94.5 \pm 5.1$  %.

В отношении эндотелиоцитов установлены образование монослоя клеток на 7-е сут и стабильность сохранения монослоя при поддержании культуры в течение 12 сут. Чистота монокультуры эндотелиоцитов колебалась в пределах 70—90 %.

После формирования трехклеточной модели НВЕ in vitro соотношение нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов составило 1 : 2 : 1 (см. таблицу), что соответствует физиологическим нейрон-глиальным показателям головного мозга.

Существующие модели ГЭБ предполагают использование астроцитов и эндотелиоцитов в соотношении 1 : 1 (Lien et al., 2012), а эндотелиоцитов, астроцитов и перicyтов — в соотношении 1 : 5 : 1 (Ogunshola, 2007). Для

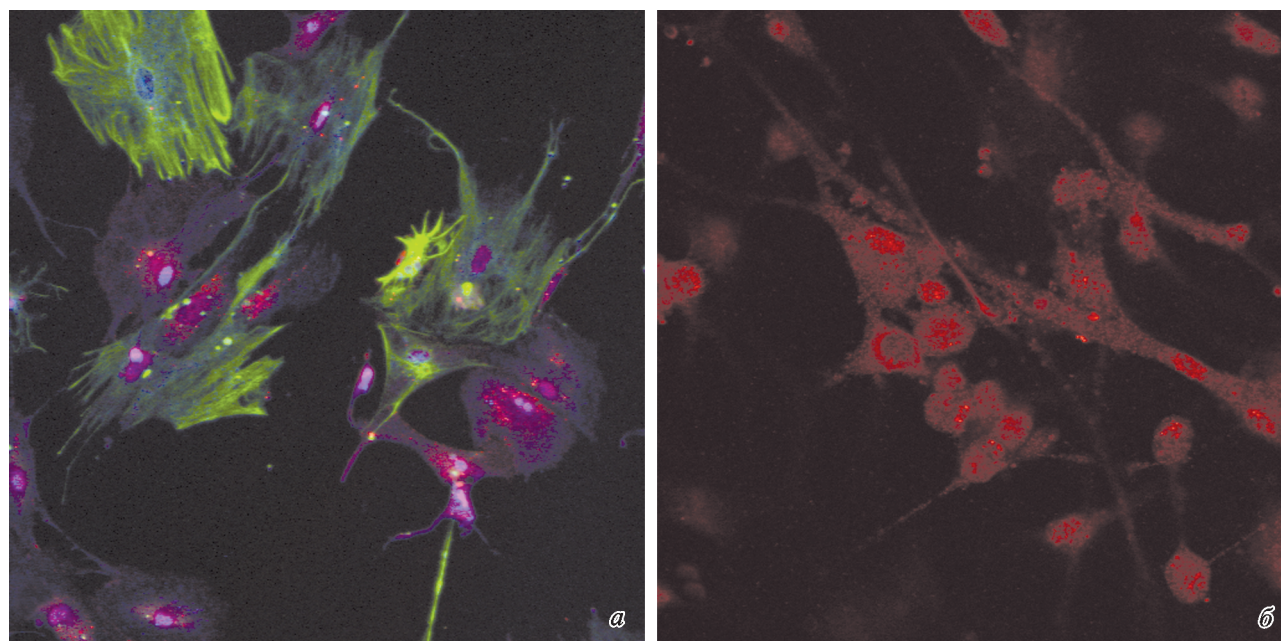


Рис. 2. Типы клеток в модели НВЕ in vitro.

Микрофотографии клеток в модели НВЕ in vitro: зеленым отмечены GFAP-положительные клетки (астроциты), синим — NSE-положительные клетки (нейроны), красным — Сх 43 в местах межклеточных контактов (а) и ZO-1 в эндотелиоцитах (б). Конфокальная микроскопия, 250×.



изучения особенностей транспортных систем в ГЭБ предлагается соотношение нейронов и эндотелиоцитов 1 : 1 (Watson et al., 2013). Тем не менее оптимальное количество эндотелиоцитов, необходимое для моделирования ГЭБ *in vitro*, в настоящее время точно не установлено (Liprmann et al., 2011).

В сокультуре определили долю клеток, экспрессирующих Сх 43 :  $5.7 \pm 1.8$ ,  $6.3 \pm 3.4$  и  $9.5 \pm 1.0$  % для нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов соответственно. Все эндотелиоциты клеточной модели экспрессировали ZO-1, что характерно для эндотелиоцитов ГЭБ (рис. 2) (Хуе et al., 2013).

Существующие в настоящее время протоколы моделирования НВЕ предполагают двухэтапное выделение клеток, что требует большего времени и увеличения количества экспериментальных животных, реактивов и питательных сред. Как правило, эндотелиоциты, входящие в такие модели, имеют нецеребральное происхождение и получены от животных в постнатальном периоде.

Таким образом, разработанный протокол одновременного выделения и культивирования трех типов клеток НВЕ (нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов) позволяет сократить сроки получения трехклеточной модели НВЕ, уменьшить количество используемых животных, расходных материалов и реактивов. Кроме того, преимуществом данной модели является церебральное происхождение всех компонентов, полученных от одного животного, что обеспечивает воспроизведение с максимальной точностью естественных межклеточных взаимодействий, составляющих основу ГЭБ. Выявление в нашей трехклеточной модели НВЕ белков ZO-1 и Сх 43 указывает на возможность ее использования для изучения особенностей нейрон-астроглиальных, астроцит-эндотелиальных взаимодействий и энергетического сопряжения в (пато)физиологических условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-25000-54).

### Список литературы

Моргун А. В., Кувачева Н. В., Комлева Ю. К., Пожиленкова Е. А., Кутищева И. А., Гагарина Е. С., Таранушенко Т. Е., Озерская А. В., Окунева О. С., Салмина А. Б. 2012. Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: современное состояние

проблемы и перспективы. *Анналы клин. эксперим. неврол.* 4 : 42—50. (Morgun A. V., Kuvacheva N. V., Komleva Yu. K., Pozhilenkova E. A., Kutischeva I. A., Gagarina E. S., Taranushenko T. E., Ozerskaya A. V., Okuneva O. S., Salmina A. B. 2012. Blood-brain barrier model *in vitro*: state of the art and perspectives. *Ann. Clin. Exp. Neurol.* 4 : 42—50.)

Begley D. J. 2004. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 10 : 1295—1312.

Bernas M. J., Cardoso F. L., Daley S. K., Weinand M. E., Campos A. R., Ferreira A. J., Hoying J. B., Witte M. H., Brites D., Persidsky Y., Ramirez S. H., Brito M. A. 2010. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an *in vitro* cellular model of the blood-brain barrier. *Nat. Protoc.* 5 : 1265—1272.

Cohen-KashiMalina K., Cooper I., Teichberg V. I. 2009. Closing the gap between the *in vivo* and *in vitro* blood-brain barrier tightness. *Brain Res.* 1284 : 12—21.

Guide for the care and use of laboratory animals: eighth edition. 2011. Washington, DC: Nat. Acad. Press. 248 p.

Kumar T. P., Vasudevan A. 2014. Isolation and culture of endothelial cells from the embryonic forebrain. *J. Vis. Exp.* 83 : e51021.

Lien C. F., Mohanta S. K., Frontczak-Baniewicz M., Swiny J. D., Zablocka B., Górecki D. C. 2012. Absence of glial  $\alpha$ -dystrobrevin causes abnormalities of the blood-brain barrier and progressive brain edema. *J. Biol. Chem.* 287 : 41 374—41 385.

Lippmann E. S., Weidenfeller C., Svendsen C. N., Shusta E. V. 2011. Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 119 : 507—520.

Ogunshola O. 2007. Development of a novel multicellular 3-dimensional blood brain barrier *in vitro* model. *ALTEX.* 24 : 95—96.

Plane J. M., Andjelkovic A. V., Keep R. F., Parent J. M. 2010. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiol. Dis.* 37 : 218—227.

Watson P. M. D., Paterson J. C., Thom G., Ginman U., Lundquist S., Webster C. I. 2013. Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust *in vitro* models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier. *BMC Neurosci.* 14 : 59.

Wilhelm I., Fazakas C., Krizbai I. A. 2011. *In vitro* models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp.* 71 : 113—128.

Xue Q., Liu Y., Qi H., Ma Q., Xu L., Chen W., Chen G., Xu X. 2013. A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat. *Int. J. Biol. Sci.* 9 : 174—189.

Поступила 1 IV 2015

### THE MODEL OF NEUROVASCULAR UNIT *IN VITRO* CONSISTING OF THREE CELLS TYPES

E. D. Khilazheva,<sup>1</sup> E. B. Boytsova, E. A. Pozhilenkova, Yu. R. Solonchuk, A. B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, 660022;

<sup>1</sup> e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

There are many ways to model blood brain barrier and neurovascular unit *in vitro*. All existing models have their disadvantages, advantages and some peculiarities of preparation and usage. We obtained the three-cells neurovascular unit model *in vitro* using progenitor cells isolated from the rat embryos brain (Wistar, 14—16 d). After withdrawal of the progenitor cells the neurospheres were cultured with subsequent differentiation into astrocytes and neurons. Endothelial cells were isolated from embryonic brain too. During the differentiation of progenitor cells the astrocytes monolayer formation occurs after 7—9 d, neurons monolayer — after 10—14 d, endothelial cells monolayer — after 7 d. Our protocol for simultaneous isolation and cultivation of neurons, astrocytes and endothelial cells reduces the time needed to obtain neurovascular unit model *in vitro*, consisting of three cells types and reduce the number of animals used. It is also important to note the cerebral origin of all cell types, which is also an advantage of our model *in vitro*.

Key words: neurovascular unit, blood-brain barrier, model *in vitro*, progenitor cells, co-culture.