

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки уровней белков плотных контактов демонстрируют, что эндотелиальные клетки в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* в результате присутствия перицитов и их влияния приобретают экспрессионный профиль, более приближенный к условиям *in vivo*, а значит, формируют более компетентный и менее проницаемый монослой.

Кроме того, опираясь на данные иммуноцитохимического анализа, можно заключить, что зарегистрированные нами более высокие значения ТЭС в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* обусловлены не только наличием дополнительного слоя клеток на культуральной вставке, что логично приводило бы к более высоким показателям, но также более высокими уровнями белков плотных контактов эндотелиальных клеток.

На основании этого стоит отметить, что присутствие всех клеточных типов НВЕ/ГЭБ необходимо для формирования у них фенотипа, приближенного к реальным условиям, поскольку только во взаимодействии друг с другом у клеток формируется необходимый экспрессионный профиль. Кроме того, полученные данные подчеркивают значимую роль перицитов как метаболического звена, участвующего в сопряжении клеток ГЭБ и формировании его барьерных свойств.

Таким образом, использование перицитов делает четырехклеточную Transwell-модель ГЭБ *in vitro* более релевантной по сравнению со стандартной трехклеточной моделью. Наряду с этим, данная модель сохраняет все преимущества стандартной Transwell-модели, поскольку остается простой в реализации и управлении, дешевой и позволяет использовать все тот же широкий спектр методов исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по результатам участия в стажировках “Освоение современных методов получения и культивирования клеток и органоидов головного мозга для решения задач персонализированной неврологии и регенеративной медицины” и “Освоение современных методов иммуногистохимии, электронной микроскопии в нейроморфологии”, поддержанных Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках конкурса проектов организации участия студентов, аспирантов и молодых ученых в конференциях, научных мероприятиях и стажировках (II очередь 2021 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными соблюдали все принципы гуманности, изложенные в Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Работа была одобрена на заседании локального этического ко-

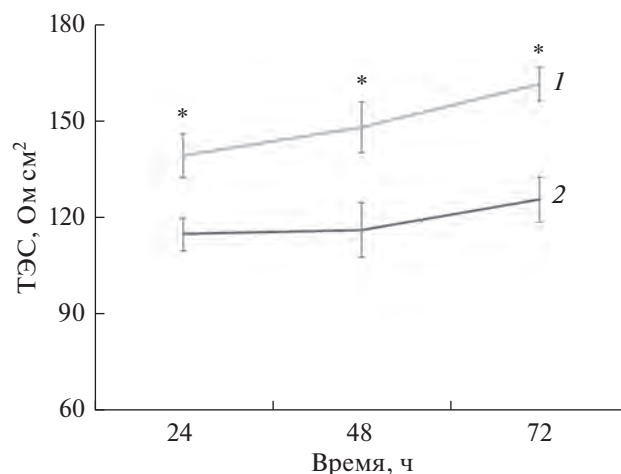


Рис. 3. Показатели трансэндотелиального сопротивления (ТЭС) в трех- (1) и четырехклеточной (2) моделях ГЭБ *in vitro*. * Различия достоверны при $p \leq 0.05$.

митета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 8 от 06.10.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. 2015. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. Цитология. Т. 57. № 10. С. 710. (Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B. 2015. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 57. № 10. P. 710.)
- Crouch E.E., Doetsch F. 2018. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. Nat. Protoc. V. 13. P. 738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.158>
- Hatherell K., Couraud P.-O., Romero I.A., Weksler B., Pilkington G.J. 2011. 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. V. 199. P. 223. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.05.012>
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. Microvasc. Res. V. 90. P. 199. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.00>
- Nortley R., Korte N., Izquierdo P., Hirunpattarasilp C., Mishra A., Jaunmuktane Z., Kyrargyri V., Pfeiffer T., Khennouf L., Madry C., Gong H., Richard-Loendt A., Huang W., Saito T., Saïdo T.C. et al. 2019. Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to peri-

- cytes. *Science*. V. 365. Article no. eaav9518. <https://doi.org/10.1126/science.aav9518>
- 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. 2018. Human cortex spheroid with a functional blood brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling. *Sci. Rep.* V. 8. P. 7413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25603-5>
- Shin Y., Choi S.H., Kim E., Bylykbashi E., Kim J.A., Chung S., Kim D.Y., Kamm R.D., Tanzi R.E. 2019. blood–brain barrier dysfunction in a 3D *in vitro* model of Alzheimer’s disease. *Adv. Sci.* V. 6. P. 1900962. <https://doi.org/10.1002/advs.201900962>
- Srinivasan B., Kolli A.R. 2019. Transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) to measure the integrity of blood–brain barrier. *Neuroinformatics*. N.Y.: Humana Press. P. 142. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8946-1_6
- Stone N.L., England T.J., O’Sullivan S.E. 2019. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Front. Cell Neurosci.* V. 13. P. 230. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00230>
- Sweeney M.D., Ayyadurai S., Zlokovic B.V. 2016. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* V. 19. P. 771. <https://doi.org/10.1038/nn.4288>
- Yang S., Jin H., Zhu Y., Wan Y., Opoku E.N., Zhu L., Hu B. 2017. Diverse functions and mechanisms of pericytes in ischemic stroke. *Curr. Neuropharmacol.* V. 15. P. 892. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170112170226>

Pericytes as an Essential Part in Transwell Models of the BBB *in Vitro*

A. I. Mosiagina^{a, *}, E. D. Khilazheva^a, and A. V. Morgun^a

^aResearch Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

In this study we aimed to demonstrate the advantages of using a quadruple culture model of the blood–brain barrier (BBB) *in vitro* in comparison with a common triple culture model, as well as to show the impact of pericytes on endothelial cells of the BBB. We co-cultured primary rat brain microvascular endothelial cells (BMECs), pericytes, astrocytes and neurons in a Transwell BBB model *in vitro*. Then, we carried out quantitative analysis to compare transendothelial electrical resistance (TEER) values, as well as expression levels of tight junction proteins, ZO1 and JAM1, in the triple culture and the quadruple culture Transwell BBB models *in vitro*. According to the obtained data, the quadruple culture model of the BBB *in vitro* has advantages over the triple culture model, since the presence of pericytes is accompanied by higher TEER values and higher expression levels of tight junction proteins in endothelial cells. The results presented in the study are consistent with the world scientific literature and confirm the hypothesis that pericytes not only offer mechanical support for endothelial cells, but also play a key role in signaling networks between different cell types of the neurovascular unit (NVU) and thus regulate the barrier functions of the BBB. According to this, co-culture of BMECs, astrocytes, and neurons with pericytes is essential for BMECs optimum phenotype and offers a closer representation of the *in vivo* environment.

Keywords: blood-brain barrier, Transwell, pericytes, neurovascular unit, tight junctions