

На правах рукописи

ВОЛГИНА

Надежда Евгеньевна

**Биохимические аспекты формирования барьерного
фенотипа эндотелиоцитов человека при совместном
культивировании с аллогенными астроцитами**

03.01.04 – Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН, **Чехонин Владимир Павлович**

Официальные оппоненты:

Ярыгин Константин Никитич

доктор биологических наук, член корреспондент РАМН,
ФГБУ «ИБМХ» РАМН, зав. лабораторией

Ширинский Владимир Павлович

доктор биологических наук, профессор, ФГБУ Институт
экспериментальной кардиологии РКНПК МЗ РФ, зав.
лабораторией

Ведущее учреждение: Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Защита состоится «__» мая 2013 г. в __⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета Д 001.010.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАМН

Автореферат разослан «__» 2013 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

Актуальность исследования

Высокоселективная проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) по отношению к лекарственным препаратам лимитирует спектр используемых в клинике веществ до 2% [Pardridge W. et al. 2002, 2007, Patel M. et al. 2009], что ставит перед исследователями задачу массового скрининга и отбора потенциальных терапевтических агентов путем анализа их физико-химических свойств и оценки терапевтической эффективности в доклинических испытаниях *in vivo*. Проведение подобных исследований при поиске возможного лекарственного средства ограничивается временем, стоимостью и активной конкуренцией со стороны фармакологических компаний [Naik P., Cucullo L. 2012].

В связи с этим было разработано стратегически новое направление для тестирования ксенобиотиков и новых биологически активных веществ *in vitro* с использованием морфофункционального базиса ГЭБ - эндотелиальных клеток.

Особая роль ГЭБ, высокоэффективной биологической системы, поддерживающей гомеостаз нервной ткани, предопределяет фенотипические особенности эндотелиальных клеток: наличие межклеточных плотных контактов, экспрессия транспортеров обратного выброса, низкий уровень пиноцитоза и малое количество фенестр [Abbott N.J. et al. 2002-2010, Begley D. J. et al., 2002, Engelhardt V. et al., 2003, Nag S., 2003]. В условиях *in vitro* клетки теряют свои уникальные характеристики вследствие дедифференцировки, что является неизбежным процессом при изъятии клеток их естественного микроокружения [Garberg P. et al., 2005, Nakagawa S. et al., 2009, Wolburg H. et al., 2009]. Являясь своеобразным шлюзом между кровеносным руслом и нервной тканью, астроцитарная глия находится в тесном контакте с аблюминальной поверхностью эндотелиальных клеток и может, по мнению ряда исследователей [Aird W., 2012, Matthew A. et al., 2012], эпигенетически индуцировать образование специфического барьерного фенотипа церебральным эндотелием. При этом совместное культивирование эндотелиальных клеток с астроцитами приводит к повышению синтеза белков плотных контактов [Sobue K. et al., 1999, Estrada C. Et al., 1990, Janzer R. et al., 1987-1993, Wolburg H. 1994-2009], частичному восстановлению уровня экспрессии гамма-глутамилтранспептидазы [El Hafny V. et al., 1997], специфических транспортеров гексоз и транспортера обратного выброса [Bauer V. et al., 2005, Wilhelm I. et al., 2011, Abbott N.J. et al. 2012]. Воссоздание этого микроокружения *in vitro* может способствовать развитию барьерных свойств у изначально небарьерного эндотелия, что свидетельствует о гибкости изменения фенотипа [Hayashi Y. et al., 1997, Colgan O.S. et al., 2008] в ответ на стимулирующие факторы. В настоящее

время существуют различные вариации моделей ГЭБ как в структурном, так и в техническом плане, которые совершенствуются в стремлении более точного и полного воспроизведения свойств барьера. Интерес к ним растет не только с практической точки зрения (для прогнозирования проницаемости лекарств через ГЭБ), но и в теоретическом плане, поскольку модели ГЭБ представляются незаменимым инструментом в исследовании молекулярных взаимодействий, лежащих в их основе и регулирующих проницаемость церебрального эндотелия в норме и при патологии.

Цель исследования: разработать воспроизводимую *in vitro* модель гематоэнцефалического барьера на основе совместного культивирования эндотелиоцитов пуповинной вены и астроцитов человека, применимую для скрининга проницаемости веществ различной химической природы через гистогематические барьеры, а также для исследований факторов, модулирующих состояния межклеточных контактов и регулирующих транспорт через ГЭБ.

Задачи исследования:

1. Получить чистую культуру эндотелиальных клеток вены пуповины человека, верифицировать её по экспрессии основных маркёров.
2. Получить чистую культуру астроцитов из мозга человека и охарактеризовать по экспрессии основных маркёров.
3. Подобрать оптимальные условия культивирования нецеребральных эндотелиальных клеток и аллогенных астроцитов для возможности реализации эпигенетического влияния.
4. Изучить основные параметры, характерные для фенотипа эндотелиоцитов, формирующих ГЭБ (белки плотных контактов, трансэндотелиальное сопротивление и проницаемость), применительно к культуре эндотелиальных клеток пупочной вены до и после совместного культивирования с астроцитами человека.
5. Исследовать влияние воспалительных медиаторов на экспрессию белков адгезивных контактов (вазкулярно-эндотелиальный кадгерин, катенин), а также на уровень трансэндотелиального сопротивления и проницаемости в культурах эндотелиальных клеток, до и после сокультивирования с астроцитами человека.
6. Изучить перспективы применения модели барьера на основе нецеребральных эндотелиальных клеток и астроцитов человека в качестве тест-системы для количественного анализа проницаемости широкого спектра веществ методом пассивного транспорта.

Научная новизна исследования

Впервые на основе сокультивирования нецеребральных эндотелиальных клеток вены пуповины человека с астроцитами человека разработана модель гистогематического барьера, характеризующаяся параметрами сходными с фенотипом эндотелиоцитов, формирующих ГЭБ. Впервые изучены перспективы применения такой модели в качестве тест-системы для количественного анализа проницаемости широкого спектра веществ методом пассивного транспорта, а также возможности регулирования проницаемости через ГЭБ путем модулирования экспрессии белков плотных контактов.

Практическая значимость

Модель ГЭБ на основе эндотелиальных клеток вены пуповины человека, сокультивированных с аллогенными астроцитами, применима для скрининга диффузионной проницаемости различных веществ через гистогематические барьеры в системе *in vitro*, а также изучения влияния факторов, оказывающих воздействие на структуру плотных и адгезивных контактов.

Положения выносимые на защиту

1. Совместное культивирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека с аллогенными астроцитами вызывает эпигенетические изменения в экспрессии белков плотных контактов в культуре HUVEC.
2. В ходе сокультивирования с человеческими астроцитами эндотелий пупочной вены приобретает барьерный фенотип, характеризующийся повышением трансклеточного сопротивления и снижением проницаемости.
3. Модель барьера на основе совместной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены и человеческих астроцитов применима для анализа проницаемости фармакологических препаратов путем диффузионного процесса и может служить тест-системой при первичном скрининге широкого спектра веществ.

Внедрение результатов исследования

Предложенная модель барьерного эндотелия использовалась в качестве тест системы для оценки проницаемости ряда фармакологических препаратов в ходе выполнения первого этапа научно-исследовательского проекта «Разработка программных средств для оценки и прогнозирования проницаемости гематоэнцефалического барьера для физиологически активных веществ».

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на XXVI (89-й) СЕССИИ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ РАМН (14-15 июня 2012 г), VI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2011) и на совместной научно – практической конференции коллектива сотрудников кафедры медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Пирогова и сотрудников отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «ГНЦ ССП им. В.П. Сербского» от 29 августа 2012 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них четыре – статьи в журналах рекомендованных ВАК.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста, иллюстрирована 14 рисунками и 4 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, отражающей результаты собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 196 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение и анализ первичной культуры HUVES. Для получения первичных культур эндотелиоцитов из вены пуповины человека использовали модификацию метода, описанного *Eric A. Jaffe* [Davis J., 2007]. В стерильных условиях полость вены промывали DPBS (Invitrogen) до полного удаления крови, заполняли 0,2% раствором коллагеназы в DPBS и подвергали ферментативной диссоциации внутренний слой вены - интиму. Пуповину переносили в стакан с DPBS с добавлением 0,9mM CaCl₂, 0,493 mM MgCl₂, 5,56 mM глюкозы, 0,327 mM пирувата натрия и инкубировали при 37°C 20 минут. Раствор коллагеназы, содержащий клетки, собирали в пробирку 50 мл путем перфузии полости вены 20 мл среды 199 (Invitrogen). Полученный таким образом элюат осаждали и клеточный осадок суспендировали в среде DMEM/F12 (Invitrogen), обогащенной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 2mM L-глутамином, 10 нг/мл bFGF (Sigma), 10 мкг/мл гепарином, 200 мкг/мл ростовой добавкой ECGS (Sigma), гидрокортизоном 1 мкг/мл (Sigma), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки высаживали на субстрат, состоящий из фибронектина и коллагена IV 10 мкг/мл (Sigma), и культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Культуры пассировали с использованием раствора трипсин (0,02%) –ЭДТА (0,01%).

Выделение астроцитов из неонатального мозга. Применяли метод, описанный *David Weinstein* [Weinstein D., 1997] в нашей модификации. Кратковременную

ферментативную диссоциацию ткани мозжечка осуществляли в два приема с использованием раствора трипсин – ДНКазы. Полученный гомогенат проводили через фильтр 20 мкм (Fisher) и собирали клеточную суспензию, которую затем разделяли на градиенте плотности Перкола (GE Healthcare). Обогащенную астроцитами фракцию в ростовой среде вносили в культуральный флакон 25 см², предварительно покрытый поли-L-лизином. В целях селекции астроцитов проводили дополнительный этап очистки. Спустя 3 часа после процедуры выделения герметично закрытый культуральный флакон помещали на платформу с возвратно-поступательным движением при скорости 200 rpm. Открепившиеся клетки отмывали средой DMEM/F12. С первых пассажей проверяли экспрессию глиофибрилярного кислого белка (GFAP) и нестина, анализ систематически повторяли в процессе культивирования.

Совместное культивирование с астроцитами и с добавлением 8-(4-хлорофинилтио)-аденозин 3',5'-цикломонофосфата. Все эксперименты по оценке влияния факторов, модулирующих структурные свойства эндотелиальных клеток, проводились на вставках Transwell (Corning-Costar), снабжённых полупроницаемыми поликарбонатными мембранами с размером пор 0,4 мкм, позволяющими разделить астроциты и эндотелиоциты, не ограничивая при этом их коммуникацию посредством обмена ростовыми факторами, цитокинами и другими активными соединениями. В наших опытах были выбраны следующие варианты культивирования эндотелиальных клеток:

- эндотелиальные клетки, растущие на внутренней стороне полупроницаемой мембраны в ростовой среде;
- эндотелиальные клетки, растущие на внутренней стороне полупроницаемой мембраны, аллогенные астроциты – на внешней поверхности той же мембраны;
- эндотелиальные клетки на внутренней стороне полупроницаемой мембраны в среде с добавлением 8-(4-хлорофинилтио)- аденозин 3',5'-цикломонофосфата.

Изучение экспрессии белков плотных и адгезивных контактов. Иммуноцитохимический анализ экспрессии белков плотных и адгезивных контактов проводили на фиксированном монослое эндотелиальных клеток. Препараты культуры HUVEC инкубировали с коктейлем антител, содержащим 1-5 мкг/мл моноклональных антитела к клаудину-5 (Invitrogen), васкулярно-эндотелиальному кадгерину (Abcam, Великобритания) и одним из видов поликлональных антител: к окклюдину (Abcam, Великобритания), ZO1 (Abcam, Великобритания) или β -катенину (Invitrogen, США) в течение ночи, отмывали и проявляли с помощью антивидовых антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488 и Alexa 594 в разведении 1:500 (Goat antimouse Alexa Fluor 488 и Goat antirabbit Alexa Fluor 594, Invitrogen). Ядра докрашивали DAPI (Invitrogen, США). Все

разведения и отмывки осуществляли с использованием PBS (pH 7,4) с добавлением 0,2% Tween – 20, 0,2% Triton X – 100 и 1% нормальной сыворотки козы.

Экстракцию белков проводили путем лизиса эндотелиальных клеток буфером RIPA (150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5 % диоксихолата натрия 50 мМ Tris pH=8,0, 5мМЭДТА) с добавлением ингибиторов протеаз (ProteoBlock, Fermentas). Для разделения высокомолекулярных белков в ПААГ-электрофорезе использовали 7,5% разделяющий гель. Перенос белков с ПААГ на поливинилиденфторидную мембрану проводили по методике *Renart* и *Burnette* [Renart J., Sandoval I, 1984, Burnette W., 2011] с использованием модуля для «мокрого» переноса («Biorad», США). Первичные антитела проявляли антителами, специфичными к Fab фрагментам иммуноглобулинов кролика и мыши (A0545, A3682, «Sigma», США) в разведении 1:200000. В качестве референсного белка выступал β -актин (anti- β -actin antibody-loading control, Abcam, Великобритания)

ПЦР в реальном времени мРНК белков плотных и адгезивных контактов. Для выделения тотальной РНК из образцов эндотелиальных клеток применяли TRIzol Reagent (Invitrogen), концентрацию РНК измеряли с помощью прибора Nanovue Plus (GE Healthcare). Постановку реакции обратной транскрипции осуществляли, используя 500 нг матричной РНК и 20 мкм случайного декануклеотидного праймера, входящего в набор реактивов «Евроген» для синтеза первой цепи кДНК на матрице РНК (MMLV kit, «Евроген»).

ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора Step One Plus (Applied Biosystems) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I в присутствии референсного красителя ROX. Последовательности используемых в реакции праймеров генов интереса VE-cadherin, b-catenin, CLDN-5, OCLN, ZO-1 были получены с помощью программы Beacon Designer 7 (Premier Biosoft International) и приведены в таблице 1. Референсным геном был выбран HPRT1, кодирующий фермент гипоксантин фосфорибозилтрансферазу 1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности праймеров для ПЦР	
Праймеры	Последовательность нуклеотидов
VE-cadherin -forward	CGCAATAGACAAGGACAT
-reverse	GCCGTGTTATCGTGATTA
b-catenin -forward	AAGCCACAAGATTACAAGAA
-reverse	ATCAGCAGTCTCATTCOA
CLDN5 -forward	TTAACAGACGGAATGA
-reverse	AAGCGAAATCCTCAG

OCN	-forward	GAAGAGCAGGAAGGTCAA
	-reverse	CGCCAGTTGTGTAGTCT
ZO-1	-forward	ATTCCTTAGTGTCCAA
	-reverse	CCTGAGCAGTATCTT
HPRT-1	-forward	GTCAGGCAGTATAATCCA
	-reverse	GGCTTATATCCAACACTTC

Условия проведения реакции были оптимизированы под используемую реакционную смесь qPCRMix-HS SYBR+ROX («Евроген») и 40 циклов амплификации выполнялись согласно рекомендованному производителем режиму: предварительная денатурация – при 95°C в течение 5 минут, денатурация – при температуре 95°C в течение 20 секунд, отжиг – при 55°C в течение 1 минуты. Относительный уровень экспрессии целевых генов рассчитывали по следующей формуле $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak J., Thomas D., 2001].

Измерение трансэндотелиального сопротивления. Измерения трансэндотелиального сопротивления производили при формировании 100% монослоя эндотелиальных клеток, начиная с третьего дня совместного культивирования (ко-культивирования) с астроцитами, с периодичностью один раз в два дня с помощью системы Epithelial-volt-ohm meter и электродной камеры Endohm–12 (World Precision Instruments, USA). Величина сопротивления мембраны без клеток ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) вычиталась из значений измерений каждого варианта культивирования. Перед проведением эксперимента камеру с концентрическими электродами стерилизовали 70% этанолом в течение 15 минут, калибровали в среде DMEM-F12 без сыворотки. В этой же среде инкубировали клетки на вставках в течение 20 минут. Объем среды в отсеке камеры непосредственно при измерении составлял 2,5 мл, во вставке – 0,5 мл.

Измерение проницаемости. Объем буфера с флуоресцирующим агентом во внутреннем (донорном) отсеке вставки Transwell составлял 1,5 мл, в лунку планшета (акцепторный отсек) вносили 2,5 мл буфера Ringer-HEPES, pH=7,4. Через определённые интервалы времени (15, 30, 60 мин) отбирали из акцепторного отсека аликвоту, объёмом 100 мкл и заменяли 100 мкл свежей среды для сохранения постоянства гидростатического давления. Детекцию флуоресценции полученных образцов проводили с помощью планшетного анализатора VICTORX3 («PerkinElmer», USA).

Проницаемость оценивали по коэффициенту, рассчитываемому по формуле: $P = (V_a / \text{area} \cdot \text{time}) \cdot ([C_{\text{acceptor}}] / [C_{\text{donor}}])$, где V_a - объём акцептора, мл; area – площадь мембраны вставки $1,12 \text{ cm}^2$; time – время измерения, секунды; $[C_{\text{acceptor}}]$, $[C_{\text{donor}}]$ – концентрация натрий флуоресцеина в акцепторном и донорном отсеке соответственно.

Изучение влияния воспалительных медиаторов. Растворы гистамина, брадикинина (10^{-5} М) и α -тромбина (1Ед/мл) в буфере измерения (Ringer-HEPES) инкубировали с монослоем эндотелиальных клеток в течение 60 мин. Через определенные временные интервалы (10, 30, 60 мин) измеряли трансэндотелиальное сопротивление и по окончании эксперимента оценивали проницаемость монослоя эндотелия для альбумина, меченного FITC.

Измерение проницаемости фармакологических препаратов. Навески сухих веществ ателолола, домперидона, верапамила, карбамзепина, феназона растворяли в DMSO до концентрации 10 мМ, последующие разведения выполняли в буфере Ringer-HEPES. Перед измерением проницаемости через монослой эндотелиальных клеток производили иммуноцитотоксическую оценку действия препаратов в концентрациях 100 мкМ, 10 мкМ, 0,1 мкМ на монокультуру HUVEC с целью определения рабочей концентрации. Собранные образцы растворов тестируемых веществ анализировали методом ВЭЖХ в системе Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, USA) с ультрафиолетовым детектором (Agilent Technologies, USA) и автосемплером для автоматического введения проб. Хроматографическое исследование образцов, объемом 10 мкл, проводили с использованием колонки ZORBAX (4,6 x 150 мм) с обращенной фазой Eclipse Plus C-18 (5 μ m). Элюировали со скоростью потока 0.6 мл/мин смесью 0,05М буфера однозамещенного фосфата калия, содержащего (0,3% триэтиламина), и ацетонитрила в соотношении 70:30. Фиксацию пика вещества осуществляли ультрафиолетовым детектором при длине волны 280 нм.

По результатам хроматографии определяли значения субстанции, прошедшей через мембрану и сравнивали с фоновыми значениями холостой пробы до нанесения препаратов. Для этого определяли величину площади пика для каждой пробы в отдельные интервалы времени и пересчитывали на наномоли исследуемого вещества в мл с вычетом фонового значения, полученных от контрольных образцов.

Для каждой временной точки было определено среднее значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Характеристика первичных культур и создание модели барьера

Морфология полученных эндотелиоцитов на ранних пассажах соответствовала описанной в литературе и в фазово-контрастной микроскопии монослой выглядел как булыжная мостовая (рис.1 Б). Визуализация антителами к фактору фон Виллебрандта (рис.1 В) специфически выявляла осмиофильные структуры, тельца Вэйбеля-Палладе, депонирующие синтезированные в клетке секретлируемые белки. Кроме того, 100% пула

клеток захватывали ацелированный липопротеин низкой плотности (рис.1 Г), интернализация которого осуществляется посредством рецепторного эндоцитоза. Астроциты человека на первых пассажах после выделения сохраняли экспрессию нестина, однако в процессе культивирования промежуточные филаменты всего пула клеток становились GFAP-позитивными (рис.1 Д, Е), что соответствует зрелому состоянию клеток. Литературные данные свидетельствуют в пользу необходимости присутствия GFAP для формирования физиологически активного ГЭБ [Liedtke W. et al., 1996].

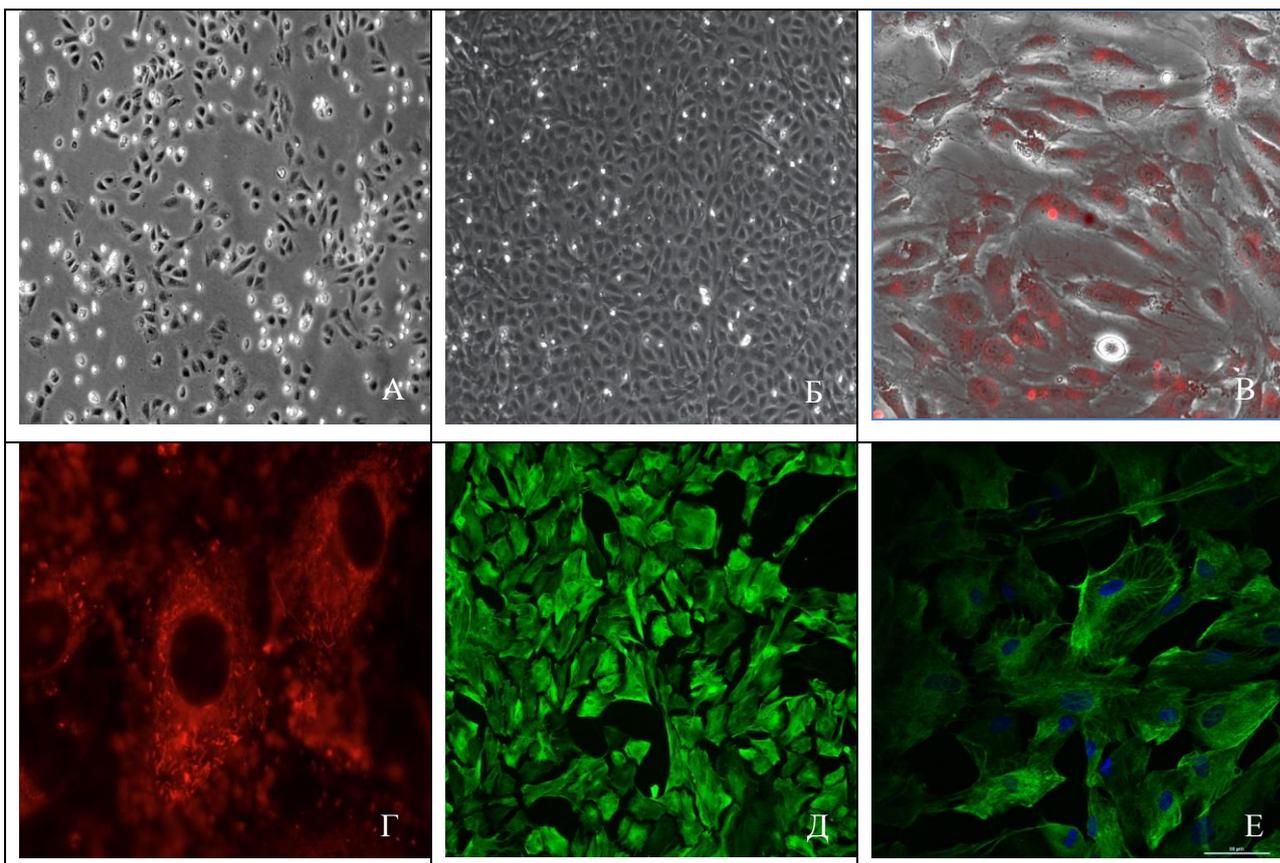


Рисунок 1. Фазово-контрастная микроскопия и иммуноцитохимический анализ культур эндотелиальных клеток HUVEC и астроцитов. А – эндотелиальные клетки на вторые сутки после процедуры выделения. Б – образование монослоя к седьмым суткам культивирования эндотелиоцитов. Увеличение x400. В - захват клетками HUVEC DiI-Ac-LDL. Увеличение x600. Г - окрашивание культуры HUVEC антителами к фактору фон Виллебрандта. Увеличение x1000. Д - дифференцированные GFAP- позитивные астроциты в культуре. Окрашивания с помощью антител к нестину не наблюдалось. Увеличение x400. Е – визуализация промежуточных филаментов в цитоплазме человеческих астроцитов. Ядра докрашены DAPI. Увеличение x600.

Анализ трансэндотелиального сопротивления

Функциональную оценку монослоя эндотелиальных клеток проводили с помощью измерения трансэндотелиального сопротивления, дающего информацию о плотности роста клеток и электрическом сопротивлении. Максимум значения сопротивления зарегистрирован на 7 день совместного культивирования HUVEC и человеческих

астроцитов и оказался на $41,5 \pm 6,1\%$ выше значения, полученного для монослоя эндотелиоцитов в условиях ростовой среды (рис. 2). Эффект насыщения, достижения пика сопротивления за определенный временной промежуток без дальнейшего увеличения, объясняется контактным ингибированием роста клеток, при достижении их максимальной плотности в культуре. Уже после 72 часов на $43,6 \pm 3,4\%$ увеличилось сопротивление клеток, стимулированных 8-(4-хлорофинилтио)- аденозин $3',5'$ -цикломонофосфатом, но к седьмому дню результат измерения был лишь на $29,2 \pm 2,8\%$ выше значения сопротивления эндотелиальных клеток контрольной культуры HUVEC (рис.2).

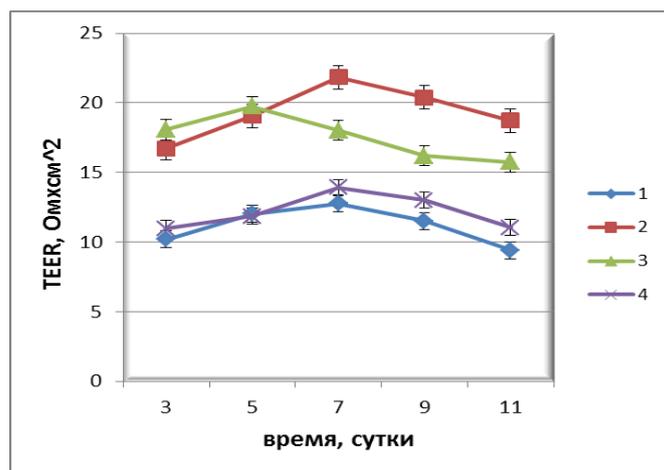


Рисунок 2. Динамика изменения трансэндотелиального сопротивления. Эндотелиальные клетки: 1 – в условиях ростовой среды; 2 – сокультивированные с астроцитами человека; 3 – стимулированные производным цАМФ; 4 – сокультивированные с мышинными фибробластами.

Таким образом, более пролонгированный и стабильный эффект повышения трансэндотелиального сопротивления достигается при совместном культивировании двух типов клеток. Важно отметить, что специфичность влияния GFAP-положительных астроцитов на повышение трансэндотелиального сопротивления была подтверждена при измерении данного параметра у эндотелиальных клеток, сокультивированных с мышинными фибробластами, значения которого оказались близкими к значениям монослоя эндотелиальных клеток. Таким образом, причиной повышения сопротивления является не физическое присутствие монослоя клеток с обеих сторон мембраны, но результат их взаимодействия.

Анализ формирования межэндотелиальных контактов

Иммуноцитохимическим методом были визуализированы белки плотных контактов со значительно большей интенсивностью флуоресценции в совместной культуре с астроцитами человека (ко-культуре) по сравнению с монослоем HUVEC. При этом в первом случае клаудин-5 и ZO-1 образовали неразрывную протяженную цепь по периферии клеток, что является феноменологическим признаком интеграции белков в структуру барьера (рис.3 Г, Е).

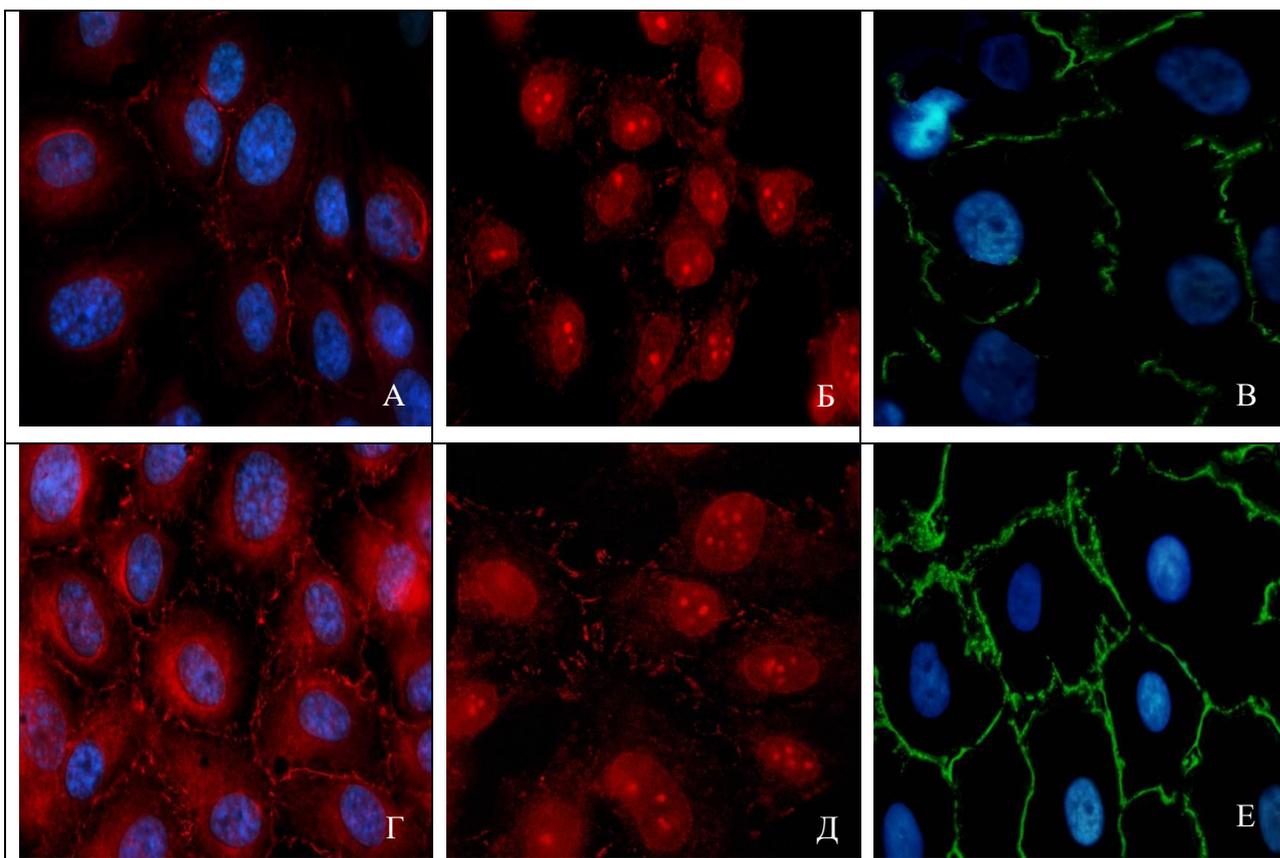


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентный анализ белков плотных контактов в культуре HUVEC.

А, Б, В - эндотелиальные клетки, культивируемые в условиях ростовой среды, окрашивание с помощью антител к ZO-1, окклюдину («Abscam»), клаудину-5 («Invitrogen») соответственно. Г, Д, Е - визуализация белков ZO-1, окклюдина, клаудина-5 соответственно в культуре эндотелиальных клеток, сокультивированных с астроцитами. Ядра клеток – DAPI («Invitrogen»). Увеличение x1000. Анти-ZO-1 и анти-окклюдин антитела проявляли антикроличьими иммуноглобулинами конъюгированными с Alexa Fluor 594 (красный), анти-клаудин-5 антитела проявляли антимишинными иммуноглобулинами конъюгированными с Alexa Fluor 488 (зеленый), ядра докрашены DAPI (синий).

Оценка подобного влияния астроцитов на культуру эндотелиальных клеток была подтверждена в иммуноблоте и методом ПЦР. Результаты количественной оценки экспрессии исследуемых белков методом иммуноблоттинга свидетельствуют, что при сокультивировании эндотелиальных клеток с астроцитами уровень экспрессии окклюдина в лизатах увеличивался на $44,4 \pm 5,2\%$, ZO-1 на $50 \pm 3\%$, клаудина-5 на $70,6 \pm 8,4\%$. Показана интенсификация экспрессии белков плотных контактов клетками, стимулированными производным цАМФ: на $40 \pm 3,1\%$ для окклюдина, на $61,4 \pm 7,9\%$ для клаудина-5, количество цитоплазматического ZO-1 возрастает на $47,4 \pm 7,5\%$ (рис.4).

По итогам трех независимых опытов уровень экспрессии исследуемых мРНК белков плотных контактов в ко-культуре повысился для клаудина-5 в $7,4 \pm 0,3$ раза, для

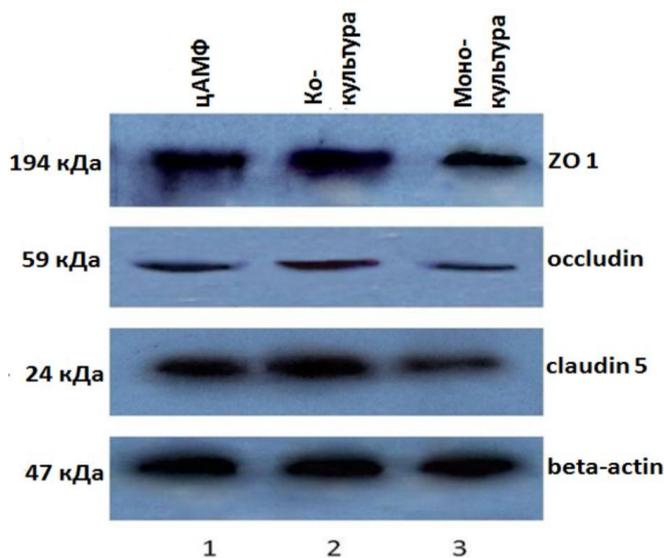


Рисунок 4. Экспрессия белков плотных контактов в лизатах эндотелиальных клеток.

1- эндотелиальные клетки, стимулированные воздействием цАМФ;
 2 – эндотелиальные клетки, сокультивированные с астроцитами;
 3 – эндотелиальные клетки в условиях ростовой среды.

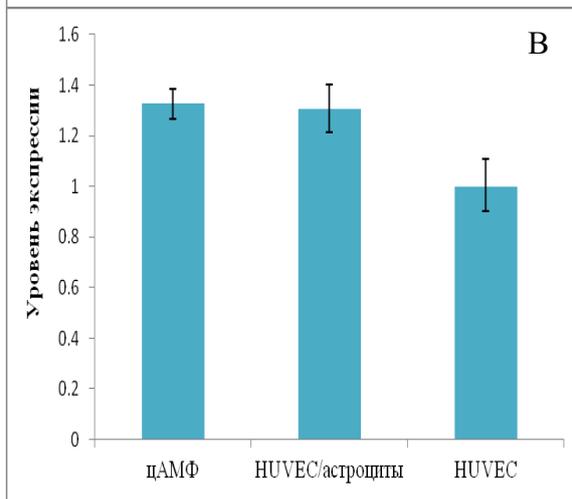
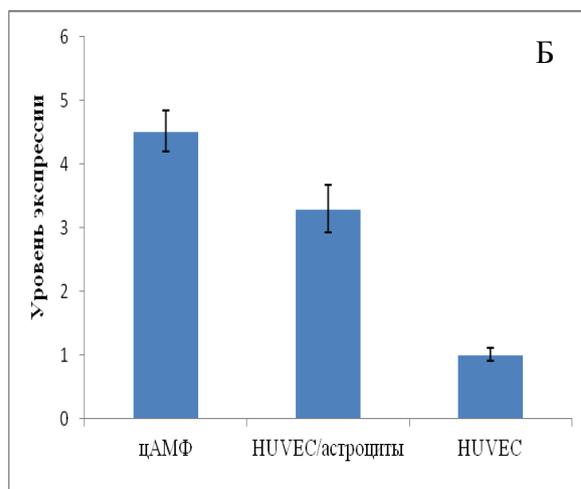
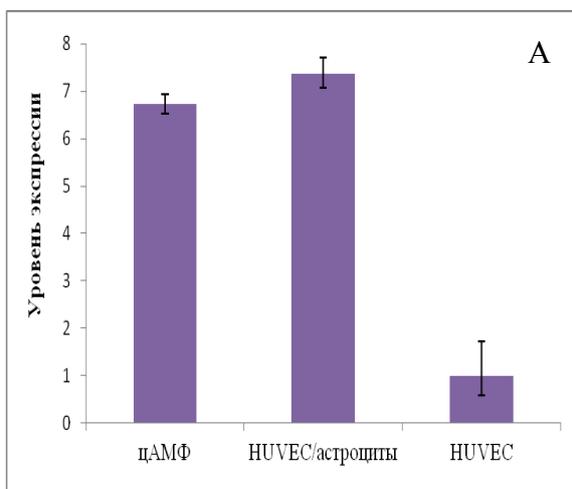


Рисунок 5. Уровни экспрессии генов:
 А – клаудина-5, Б – окклюдина, В – ZO-1 в культурах эндотелиальных клеток:
 цАМФ – обработанных производным цАМФ,
 HUVES/астроциты – сокультивированных с аллогенными астроцитами,
 HUVES – в монокультуре.

окклюдина – в $3,3 \pm 0,4$ раза, что оказалось достоверно выше контроля-монокультуры, для ZO1 результат был статистически недостоверен вследствие малой выборки и составил $1,3 \pm 0,1$ раза (рис.5).

Ожидалось, что стимуляция эндотелиальных клеток культивированием с астроцитами, вызовет также повышение синтеза белков адгезивных контактов, которые находятся в постоянном взаимодействии с компонентами плотных контактов. Однако

достоверной значимой разницы между количеством васкулярно-эндотелиального кадгерина в анализируемых образцах клеток не было выявлено (рис.6, 7), только в ПЦР анализе показано незначительное повышение экспрессии гена данного белка в культуре (рис.8). Основываясь на полученных данных, мы сделали вывод о том, что фактором, оказывающим влияние на синтез VE-кадгерина, является степень плотности роста клеток, которая достигнув максимума в монослое, обуславливает стабильный уровень синтеза кадгерина и замедление процесса фосфорилирования белка.

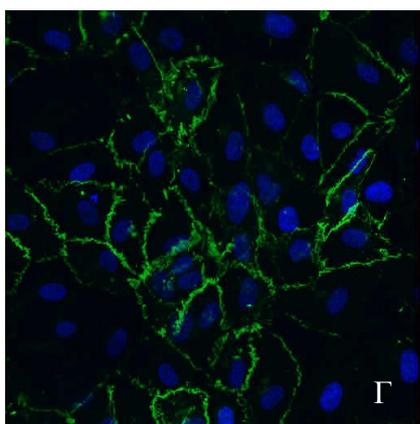
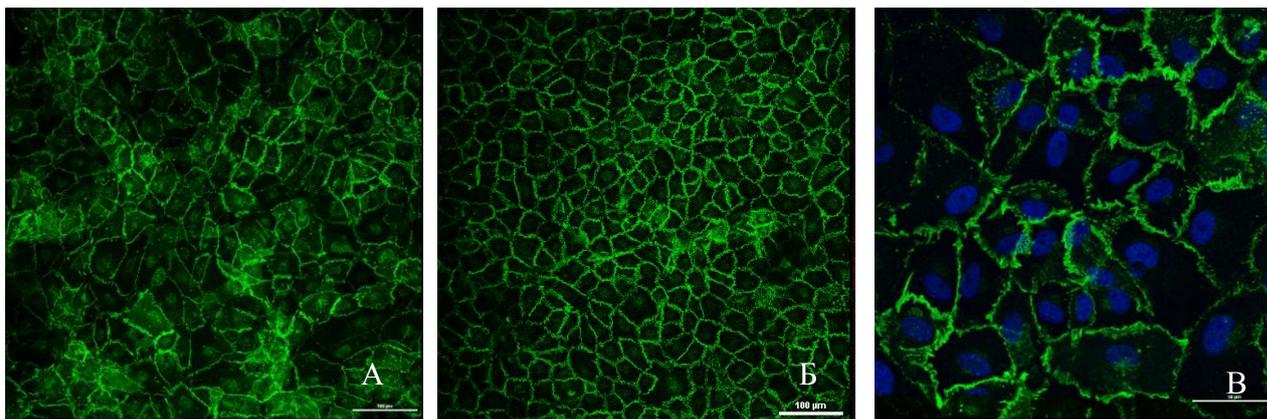
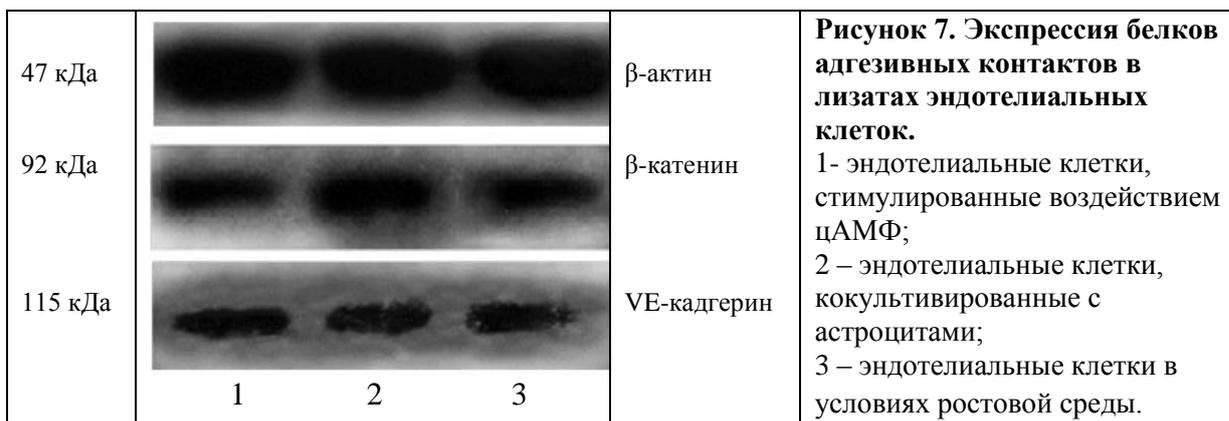


Рисунок 6. Иммунофлуоресцентный анализ белков адгезивных контактов в культуре HUVEC. А, В - эндотелиальные клетки, культивированные в условиях ростовой среды, окрашивание с помощью антител к VE-кадгерину («Abcam»), β - катенину («Invitrogen») соответственно. Увеличение $\times 100$. Б, Г - визуализация белков VE-кадгерина, β - катенина соответственно в культуре эндотелиальных клеток, ко-культивированных с астроцитами. Анти – VE-кадгерин и β – катенин антитела проявляли антикриоличьими иммуноглобулинами конъюгированными с Alexa Fluor 488 (зеленый), ядра докрашены DAPI (синий). («Invitrogen»). Увеличение $\times 600$.

Методом иммуноблоттинга в анализируемых препаратах лизата эндотелиоцитов детектировали меньшую экспрессию белка β -катенина по сравнению с количеством его трансмембранного партнера VE-кадгерина (рис.7). ПЦР анализ выявил различия в уровне экспрессии гена между образцами: клетки, сокультивированные с астроцитами человека и стимулированные аналогом цАМФ, содержали меньше мРНК по сравнению с интактной культурой HUVEC (рис.8, Б). В иммуноцитохимическом анализе β -катенин визуализировался по периферии мембран клеток с наличием областей с менее активной цитоплазматической флуоресценцией в монослое ко-культуры эндотелиальных клеток и



перестройкой в комплексе белков адгезии при стабилизации состояния контактов. Участок катенина, находящийся в цитозоле, связан с комплексом деструкции, содержащим киназы, которые фосфорилируют β-катенин, тем самым инактивируют его, делая доступным для убиквитина с последующей деградацией в протеосомах. В цитозоле выявляется сравнительно низкий уровень нефосфорилированной (активной) формы белка. Найденные отличия в экспрессии гена β-катенина между стимулированными клетками и интактным монослоем могут свидетельствовать о большей стабильности адгезивных контактов, ограничении пролиферации и миграции клеток в условиях, в большей степени соответствующих естественному состоянию – при взаимодействии с астроцитами.

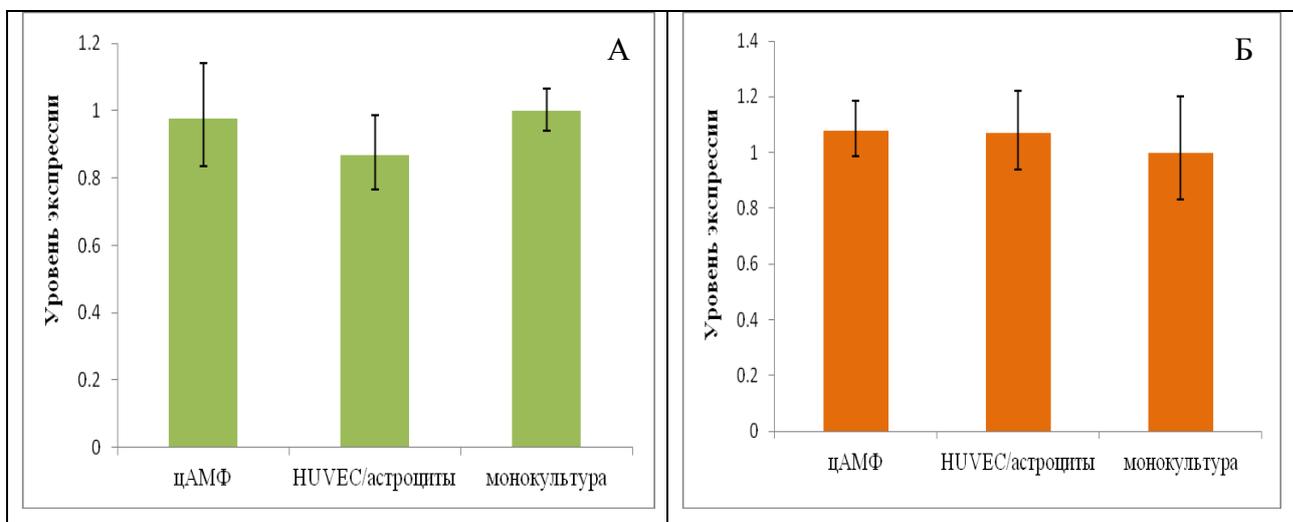


Рисунок 8. Уровень экспрессии генов белков адгезивных контактов: А – β-катенина, Б – VE – кадгерина в культурах эндотелиальных клеток: цАМФ – обработанных производным цАМФ, HUVEC/астроциты – сокультивированных с аллогенными астроцитами, HUVEC – в монокультуре.

Значения коэффициента проницаемости для натрий флуоресцеина оказались минимальными в случае ко-культуры, что было предопределено повышением уровня клаудина-5, наличие которого в плотных контактах снижает трансмембранный транспорт низкомолекулярных веществ в эндотелии. Средняя величина проницаемости натрий

флуоресцеина через монослой ко-культуры составила $1.45 \cdot 10^{-5}$ см/сек, что на 36% меньше значения проницаемости эндотелиоцитов в контроле – монокультуре (рис.9).

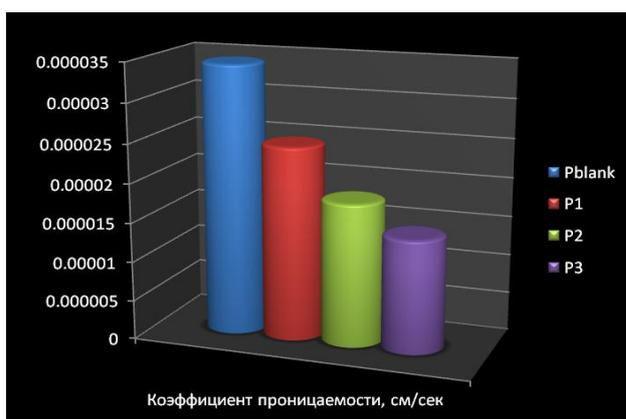


Рисунок 9. Проницаемость монослоя эндотелиальных клеток для натрий флуоресцеина. Pblank – полупроницаемая мембрана культуральной вставки; P1 – монослой эндотелиальных клеток; P2 – стимулирование цАМФ; P3 – совместное культивирование с астроцитами.

Такой эффект объясняется убылью доли межклеточного транспорта за счет формирования развитой сети контактов в монослое эндотелиальных клеток, стимулированных влиянием астроцитов, нежели снижением уровня трансклеточного переноса. Флуоресцеин натрия является субстратом для транспортёров обратного выброса в ГЭБ, но в нецеребральной эндотелии их экспрессия низка и проницаемость молекул трейсера происходит в основном межклеточно [Eliers M. Et al., 2008].

Оценка влияния воспалительных медиаторов

Действие медиаторов мы оценивали по параметрам изменения проницаемости и структуры межклеточных контактов. Менее заметным результат действия тромбина оказался в случае эндотелиоцитов, сокультивированных с астроцитами: дезагрегация клеток и нарушение целостности межклеточных контактов происходило преимущественно на периферии монослоя лишь в некоторых участках, при этом расстояние между соседними клетками не превышало размер самих клеток. Добавление тромбина вызывает фосфорилирование белков адгезии по тирозиновым остаткам, как следствие, кадгерин практически полностью был элиминирован из межклеточных контактов монокультуры HUVEC (рис.10 Д), тогда как в эндотелиоцитах ко-культуры достаточно активно визуализировался (рис. 11 Д). Влияние гистамина и брадикинина привело к заметно меньшим изменениям в конформации молекул адгезивных контактов, но послужило причиной образования межклеточных щелей наряду с дезорганизацией монослоя в монокультуре HUVEC без потери клетками адгезии к субстрату (рис.10 А-Г). В случае культуры, стимулированной влиянием астроцитов, видимых изменений в фазово-контрастной микроскопии не наблюдалось, но в иммуноцитохимическом анализе обнаружилось появление участков разрыва контактов между соседними кадгеринами при

обработке клеток гистамином и уменьшение интенсивности флюоресценции на границах клетки при визуализации с помощью антител к катенину (рис. 11 А, Б).

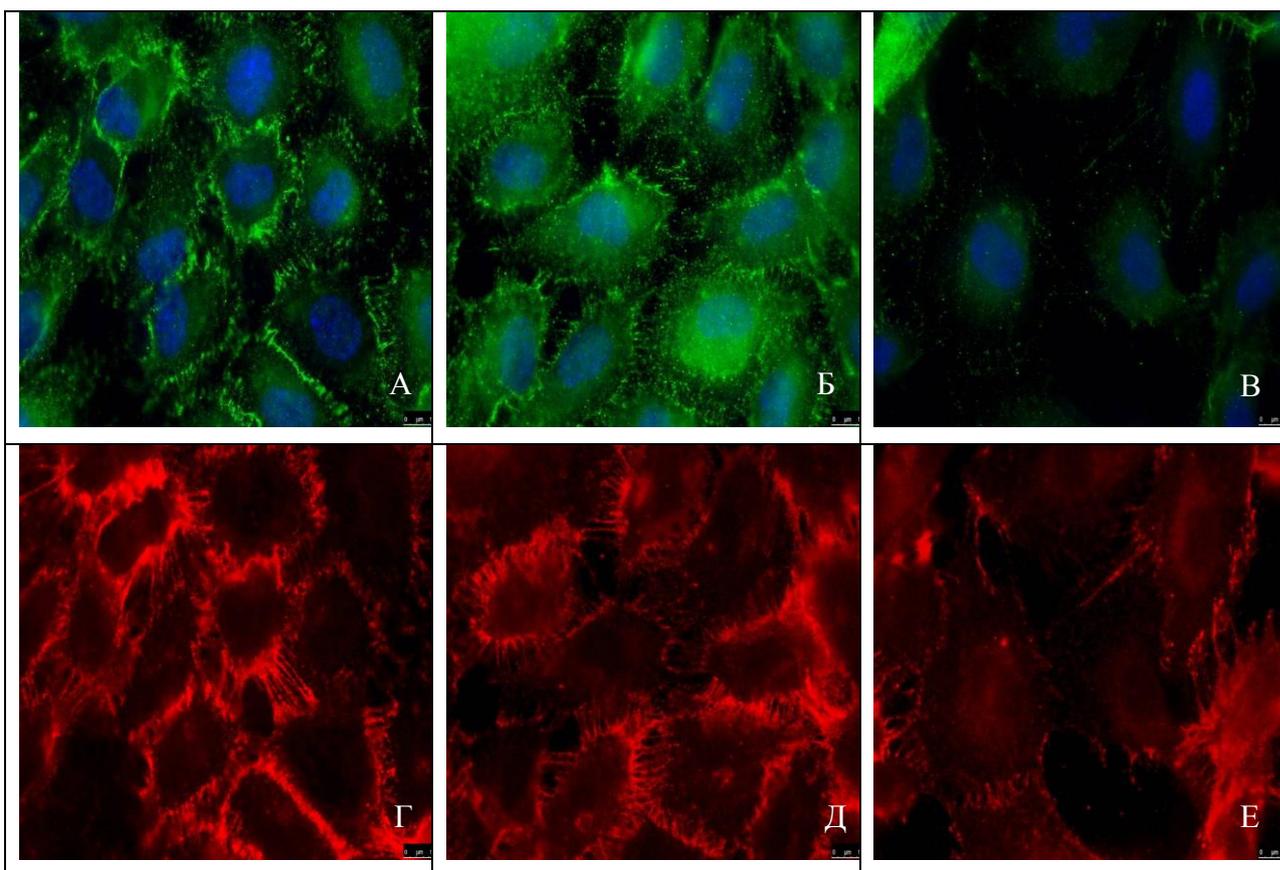
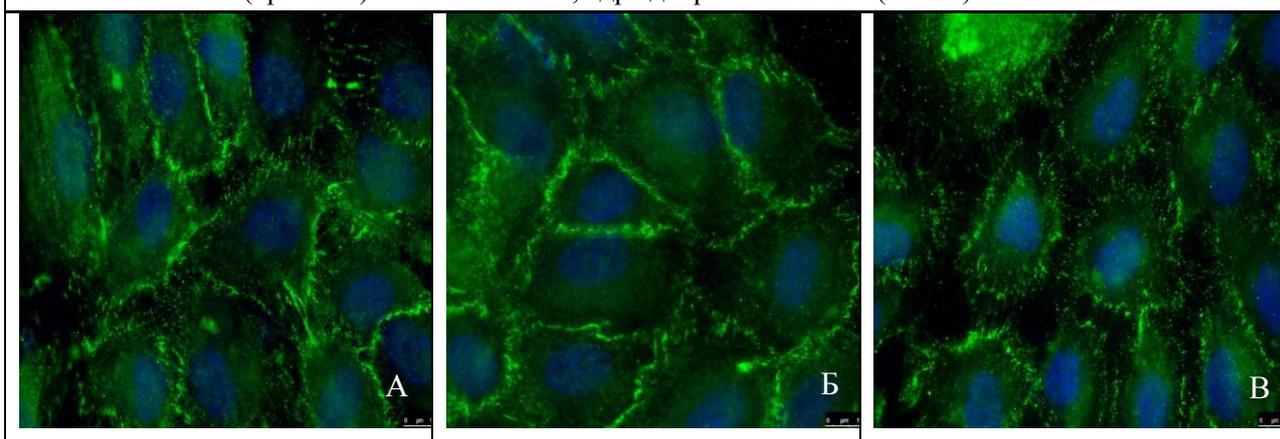


Рисунок 10. Иммуноцитохимический анализ адгезивных контактов культуры HUVEC. А, В, Д – визуализация VE-кадгерина в клетках, обработанных гистамином, брадикинином, тромбином соответственно. Б, Г, Е – локализация β -катенина в культуре эндотелиальных клеток при воздействии гистамина, брадикинина, тромбина. Анти-VE-кадгерин и β -катенин антитела проявляли антикроличьими иммуноглобулинами конъюгированными с Alexa Fluor 488 (зеленый) и Alexa Fluor 594 (красный) соответственно, ядра докрашены DAPI (синий). Увеличение $\times 1000$.



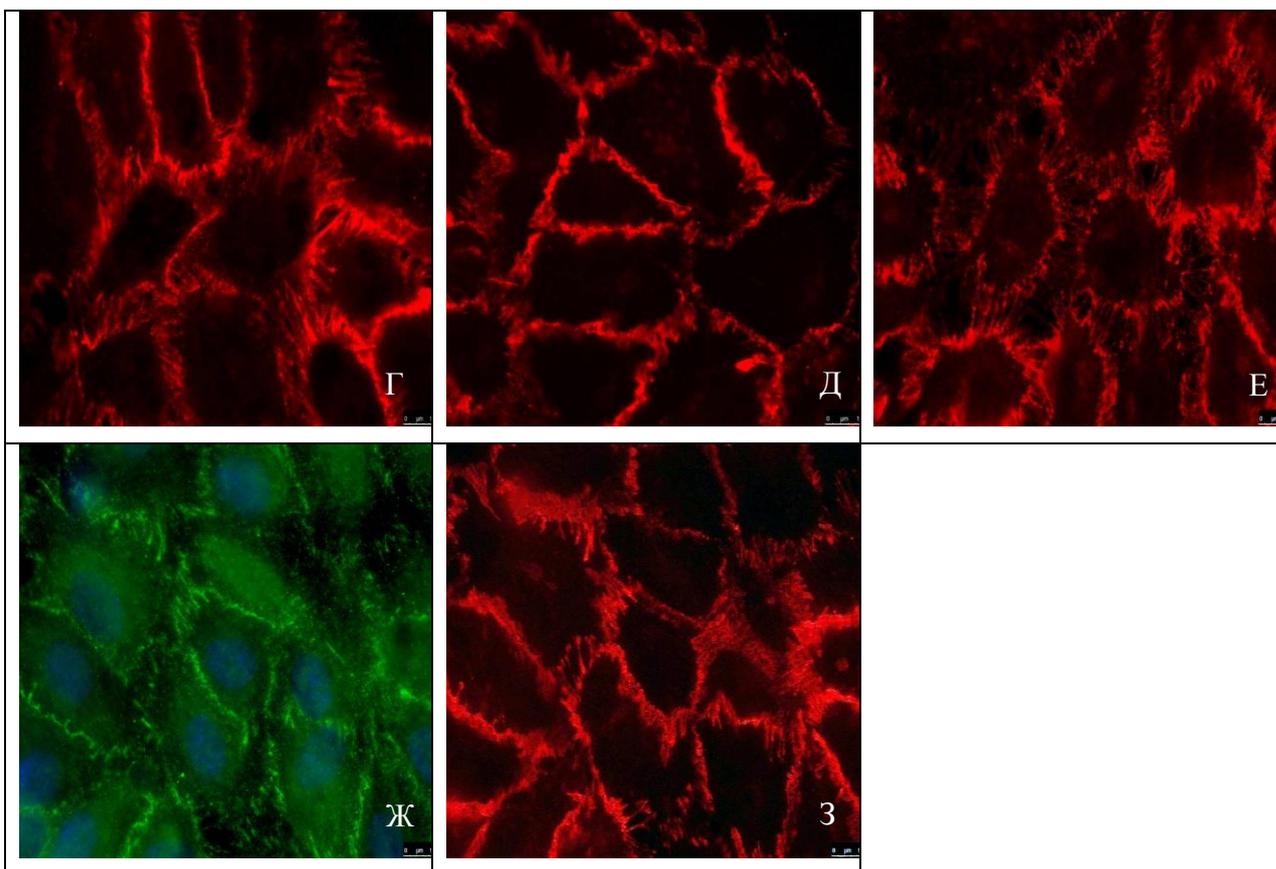


Рисунок 11. Иммуноцитохимический анализ адгезивных контактов клеток HUVEC, стимулированных культивированием с аллогенными астроцитами. А, В, Д – визуализация VE-кадгерина в клетках, обработанных гистамином, брадикинином, тромбином. Б, Г, Е - локализация β -катенина в культуре эндотелиальных клеток при воздействии гистамина, брадикинина, тромбина. Ж, З – интактная культура клеток. Анти-VE-кадгерин и β -катенин антитела проявляли антикरोличьими иммуноглобулинами конъюгированными с Alexa Fluor 488 (зеленый) и Alexa Fluor 594 (красный), ядра докрашены DAPI (синий). Увеличение $\times 1000$.

Для оценки того, насколько реорганизация в структуре адгезивных контактов отражает изменения физиологических параметров, мы измерили проницаемость эндотелия для альбумина, меченного FITC и трансэндотелиальное сопротивление.

Более чем в два раза коэффициент проницаемости для культуры, стимулированной влиянием астроцитов (HUVEC+), оказался меньше значения, полученного для монокультуры (HUVEC-), и составил $1,17 \cdot 10^{-6}$ см/сек и $2,83 \cdot 10^{-6}$ см/сек соответственно (рис.12). Тридцатиминутное воздействие тромбина резко повысило коэффициент проницаемости альбумина до $7,38 \cdot 10^{-6}$ см/сек, обработка клеток гистамином привела к увеличению коэффициента проницаемости до $6,54 \cdot 10^{-6}$ см/сек, воздействие брадикинина оказало меньший эффект на возрастание проницаемости, составив $3,42 \cdot 10^{-6}$ см/сек.

Динамика снижения трансэндотелиального сопротивления отражала общую картину роста проницаемости при воздействии медиаторов на эндотелий, при этом меньшим изменениям подвергались клетки, сокультивированные с астроцитами. Тромбин

оказал максимум своего действия к 60 минуте и снизил TEER до $8 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ в монокультуре по сравнению с $14\pm 1 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ в ко-культуре, действие гистамина привело к уменьшению сопротивления до 14 ± 1 и $24 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ (в монокультуре эндотелиоцитов и культуре с астроцитами соответственно) в течение 30 минут и далее практически не изменялось. Эффект брадикинина на клетки, напротив, оказался несколько отсроченным по времени и достиг минимального значения $13,5\pm 0,5 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ и $23\pm 1 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$ приблизительно в последние 30 минут эксперимента, что, по-видимому, связано с различным механизмом действия этих медиаторов.

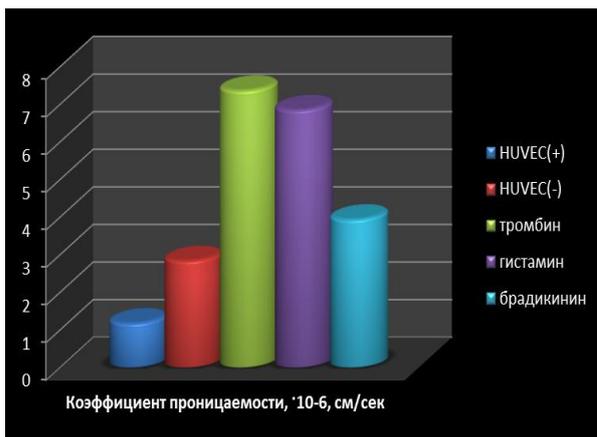


Рисунок 12. Коэффициент проницаемости альбумина через монослой эндотелиальных клеток.

HUVEC (+) – эндотелиальные клетки, стимулированные сокультивированием с астроцитами.

HUVEC(-) – эндотелиальные клетки, культивированные в условиях ростовой среды. Тромбин, гистамин, брадикинин – медиаторы, воздействовавшие на монослой HUVEC (-).

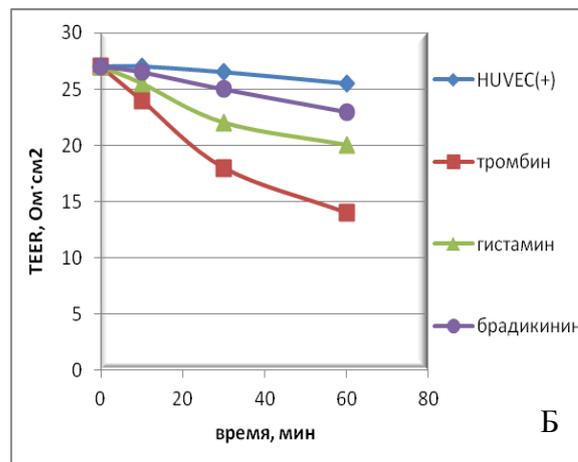
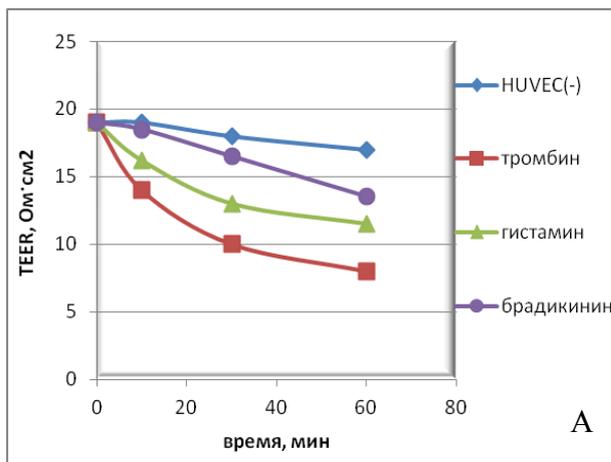


Рисунок 13. Динамика измерения сопротивления в культуре HUVEC. А – результаты, полученные на культуре HUVEC(-), Б – показатели сопротивления для клеток, сокультивированных с астроцитами HUVEC(+).

Измерение проницаемости для физиологически-активных веществ и оценка активности Р- гликопротеина

В целях оценки возможного участия систем обратного выброса в процессе переноса фармакологических препаратов через монослой культуры HUVEC измеряли транспорт родамина 123 через монослой эндотелиальных клеток в монокультуре и при совместном культивировании с аллогенными астроцитами. В качестве ингибитора функции Р-гликопротеина (Р-рр) использовали верапамил, действие которого объясняется

тем, что молекулы препарата и родамина 123 конкурируют за связывание с одним сайтом молекулы гликопротеина. Полученные нами данные величины эффлюкса свидетельствуют в пользу низкой экспрессии P-gp как в монокультуре HUVEC, так и в культуре астроцитов человека, что сводит транспорт родамина 123 к пассивной диффузии (рис.14). Отметим, что при совместном культивировании эндотелиальных клеток с аллогенными астроцитами, рассчитываемый уровень эффлюкса приближается по значению к 2, но не достигает его. Таким образом, функция P-gp в культуре нецеребральных эндотелиальных клетках не реализуется, что приводит к градиентному повышению концентрации веществ в цитозоле в случае их прохождения через мембрану. Совокупность растворимых и нерастворимых факторов, продуцируемых астроцитами, оказывается недостаточным фактором для повышения экспрессии гликопротеина до значимого уровня, приводящего к преобладанию обратного вывода малых молекул красителя над диффузионным процессом накопления в клетке.

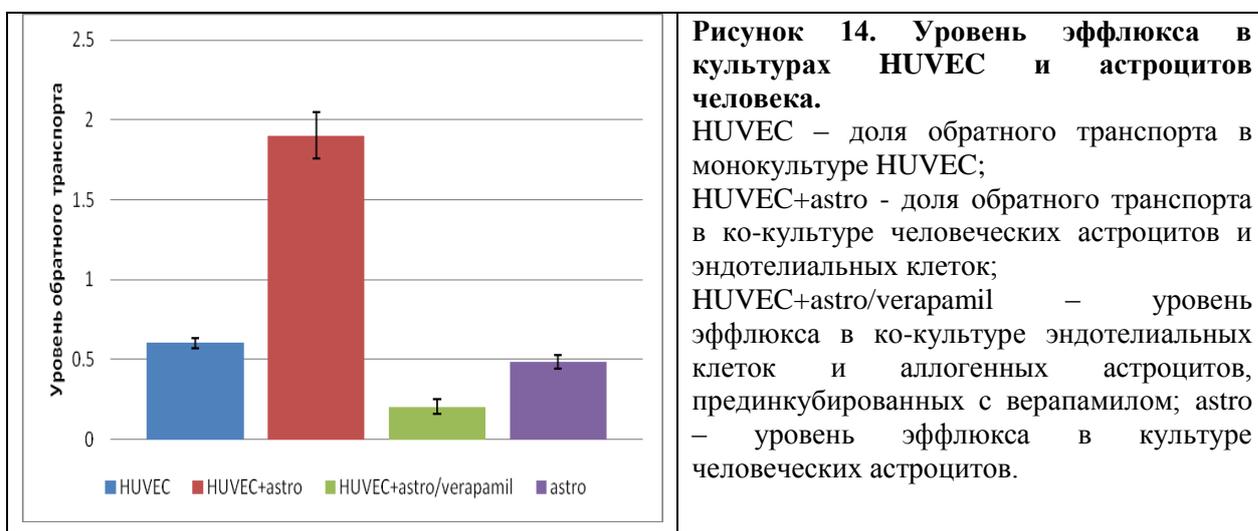


Рисунок 14. Уровень эффлюкса в культурах HUVEC и астроцитов человека.

HUVEC – доля обратного транспорта в монокультуре HUVEC;
 HUVEC+astro - доля обратного транспорта в ко-культуре человеческих астроцитов и эндотелиальных клеток;
 HUVEC+astro/verapamil – уровень эффлюкса в ко-культуре эндотелиальных клеток и аллогенных астроцитов, прединкубированных с верапамилом;
 astro – уровень эффлюкса в культуре человеческих астроцитов.

Основным показателем доступности препаратов для ЦНС является логарифм распределения между кровью и мозгом, определяющийся отношением концентраций исследуемого вещества между средами организма. Поскольку коэффициент проницаемости описывает процесс диффузионной массопередачи, важно было сравнить полученные нами данные со значениями логарифма распределения, учитывающего возможные *in vivo* виды транспорта. Для этой цели мы использовали значения, рассчитанные методом компьютерного прогнозирования. Модель *in silico* основывалась на базе данных, содержащей следующие поля: коэффициент распределения в системе октанол – вода, растворимость химических соединений в воде, абсорбция, связывание с белками, биодоступность, спектр прогнозируемого действия на ЦНС. Вещества, согласно полученным данным проницаемости, расположили в последовательности возрастания измеренной величины: атенолол < верапамил < карбамазепин < феназон < домперидон.

Теоретически спрогнозированный порядок увеличения логарифма распределения препаратов выглядел так: домперидон < верапамил = атенолол < феназон < карбамазепин. Нарушение порядка величин проницаемости соединений на уровне *in vitro* с использованием клеточной модели и предсказанным математически, связано с участием в условиях *in vivo* активного транспорта. Домперидон, верапамил, согласно литературным данным, являются субстратами для транспортёра обратного выброса. Представлялось важным оценить, насколько процесс обратного транспорта влияет на показатели коэффициента проницаемости и существует ли корреляция данных между результатами, полученными на нашей модели и данными, опубликованными в литературе с применением других моделей барьера. Сведения, опубликованные в литературе и результаты собственных экспериментов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Коэффициенты проницаемости фармакологических препаратов через модели ГЭБ.				
Название препарата	Молекулярная масса, г/моль	Транспорт	Коэффициент проницаемости, $\cdot 10^{-6}$ см/сек	
			Собственные результаты	Литературные данные (Nakagawa S. and others, 2009)
атенолол	226	пассивный гидрофильный	2.68	2.49
карбамазепин	236	пассивный липофильный	228.87	198.53
феназон	188	пассивный липофильный	184.86	221.51
домперидон	426	обратный выброс	528.7	—
верапамил	491	обратный выброс	37.93	23.51

Для веществ, подвергающихся пассивному липофильному переносу, диапазон сравниваемых показателей был значительно уже и не превышал 50% от модуля наименьшей величины коэффициента проницаемости. В случае верапамила ожидаемой разницы между моделями не наблюдалось, ввиду того, что данный препарат блокирует функцию P-гр в церебральном эндотелии, сводя транспорт к процессу градиентного переноса. Таким образом, для веществ, транспорт которых описывается процессом простой диффузии, наблюдается воспроизведение результатов, полученных с применением модели, предложенной нами и модели на основе церебрального эндотелия, в

пределах расхождений, обусловленных различиями в структурных характеристиках эндотелия и условиями проведения эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами была исследована возможность переключения фенотипа эндотелиальных клеток вены человека на барьерный, характеризующий ГЭБ. Триггером этого процесса служили аллогенные астроциты, влияние которых осуществлялось посредством совместного культивирования с эндотелиальными клетками в системе Transwell. На первом этапе работы были реализованы протоколы получения первичных культур эндотелиоцитов и астроцитов, клетки охарактеризованы по экспрессии основных маркеров, подтверждена чистота полученных культур. Были выбраны условия совместного культивирования двух типов клеток, оптимальные для реципрокного воздействия. Наше внимание было сфокусировано на анализе изменений в структуре плотных и адгезивных контактов нецеребрального эндотелия. Исследование трансмембранных белков плотных контактов окклюдина, клаудина-5 и их цитоплазматического партнера ZO-1 методами иммуноцитохимии и иммуноблоттинга выявило усиление экспрессии этих белков в ко-культуре HUVEC с аллогенными астроцитами. ПЦР анализ подтвердил наблюдаемый эффект воздействия астроцитов: уровень экспрессии исследуемых генов белков плотных контактов в ко-культуре повысился для клаудина-5 в $7,4 \pm 0,3$, для окклюдина $3,3 \pm 0,4$, что оказалось достоверно выше контроля-монокультуры, для ZO1 результат был статистически недостоверен вследствие малой выборки и составил $1,3 \pm 0,1$.

Ожидаемой значимой разницы между количеством васкулярно-эндотелиального кадгерина в образцах ко-культуры и монокультуры эндотелиальных клеток не было выявлено, однако в ПЦР анализе показано незначительное повышение экспрессии гена данного белка в совместной культуре. Основываясь на полученных данных, мы сделали вывод о том, что фактором, регулирующим синтез VE-кадгерина, является степень плотности роста клеток, которая достигнув максимума в монослое, обуславливает стабильный уровень синтеза кадгерина. Таким образом, действие аллогенных астроцитов на эндотелиальные клетки выражается в формировании комплекса развитых межэндотелиальных соединений, в которые интегрируются белки плотных контактов. Физиологические параметры при этом характеризуются повышением сопротивления и снижением проницаемости для низкомолекулярных веществ. Что в свою очередь позволяет сделать вывод об эпигенетическом влиянии астроцитов человека на приобретение нецеребральным эндотелием барьерных свойств.

На втором этапе работы была исследована возможность модулирования состояния адгезивных контактов при воздействии воспалительных медиаторов. Показана большая стабильность комплекса VE-кадгерина и β -катенина к обработке клеток тромбином, гистамином, брадикинином в случае эндотелиоцитов сокультивированных с астроцитами. При этом проведена динамика изменения состояния адгезивных контактов в аспекте измерения трансэндотелиального сопротивления и проницаемости для альбумина, конъюгированного с FITC. Барьерный эндотелий может служить удобным инструментом *in vitro* для изучения действия биологически активных молекул и изучения иницируемых ими процессов *in vivo*.

Заключительным этапом работы явилась валидация предложенной модели на основе нецеребрального эндотелия и аллогенных астроцитов для тестирования фармакологических препаратов. Был проведен анализ активности обратного транспортера P-gp, выявивший низкий уровень эффлюксного белка в культуре HUVEC. Методом компьютерного моделирования был произведен расчет логарифма распределения кровь-мозг для каждого из веществ и результаты были сопоставлены со значениями коэффициента проницаемости, полученными на модели барьера. Для веществ – несубстратов P-gp, перенос которых осуществляется пассивной диффузией, показаны сопоставимые результаты, что дает возможность практического применения предложенной модели для анализа проницаемости широкого спектра веществ.

ВЫВОДЫ

1. Последовательное применение гомогенизации препарата интимы пупочной вены человека, ферментативной диссоциации гомогената и фракционирования клеточной суспензии дает возможность получить культуру эндотелиоцитов, характеризующуюся поглощением ацетилированного протеина низкой плотности и визуализируемую антителами к фактору фон Виллебранта.
Последовательное применение гомогенизации ткани мозга плода человека, ферментативной диссоциации гомогената и фракционирования клеточной суспензии позволяет получить культуру астроцитов, характеризующуюся высоким уровнем экспрессии GFAP.
2. Ко-инкубирование препарата культуры эндотелиоцитов человека с астроцитами человека в системе для совместного культивирования клеток *TransWell* в течение 7-10 дней позволяет получить культуру эндотелиоцитов, характеризующуюся специфическими свойствами эндотелиоцитов гематоэнцефалического барьера, проявляющимися в повышении параметров трансэндотелиального сопротивления,

снижении диффузной проницаемости, а также интенсификации экспрессии белков плотных межклеточных контактов.

3. Количественный иммуноблоттинг лизата эндотелиальных клеток после 7-10 суточного сокультивирования их с клеточным препаратом культуры астроцитов человека позволяет достоверно детектировать повышение уровня экспрессии белков плотных контактов: ZO-1 на $50 \pm 3,1\%$, окклюдина на $44,4 \pm 5,2\%$, клаудина-5 на $70,6 \pm 8,4\%$ по сравнению с эндотелиоцитами в монокультуре.

Количественный анализ параметров трансэндотелиального сопротивления и проницаемости монослоя эндотелиоцитов после сокультивирования с астроцитами человека в системе *TransWell* в течение 7-10 дней дает возможность детектировать достоверное увеличение резистентности на $41,5 \pm 2,9\%$ по сравнению с культурой эндотелиоцитов небарьерного фенотипа. При этом проницаемость монослоя эндотелиоцитов для натрий флуоресцеина достоверно снижается на $36 \pm 3,1\%$.

4. Уровень экспрессии генов белков плотных контактов коррелирует с результатами иммуноблоттинга и свидетельствует о повышении синтеза белков при совместном культивировании эндотелиальных клеток и астроцитов человека: для окклюдина в $3,28 \pm 0,39$ раз, для клаудина – 5 в $7,37 \pm 0,33$ раз и ZO-1 в $1,31 \pm 0,10$ раза по сравнению с монокультурой HUVEC.

Количество мРНК белков адгезивных контактов (VE-кадгерина и β -катенина), определенное методом ОТ-ПЦР, не зависит от условий культивирования эндотелиальных клеток, а определяется степенью конфлюентности монослоя.

5. Воздействие биологически активных медиаторов воспаления - брадикинина, тромбина и гистамина на монослой эндотелиоцитов после совместного культивирования с астроцитами человека в системе *TransWell* в течение 7-10 дней в меньшей степени ($15,2 \pm 1,5\%$ для тромбина, $17,8 \pm 1,6$ для гистамина, $5,8 \pm 0,8$ для брадикинина) достоверно снижает трансэндотелиальное сопротивление и экспрессию белков адгезивных контактов - VE-кадгерина, β -катенина по сравнению с монослоем эндотелиоцитов небарьерного фенотипа.
6. Количественный анализ коэффициентов проницаемости монослоя эндотелиоцитов после сокультивирования с астроцитами человека в системе *TransWell* для фармакологических препаратов с различными трансбарьерными эффлюксными характеристиками: верапамила, домперидона, карбамазепина, атенолола и феназона, позволил обосновать возможность применения подобной системы для количественного анализа проницаемости широкого спектра веществ методом пассивного транспорта.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Волгина Н.Е.**, Гурина О.И., Гриненко Н.Ф., Баклаушев В.П., Иванова Н.В., Чехонин В.П. Экспрессия белков плотных контактов эндотелиоцитами пупочной вены человека, сокультивированными с аллогенными астроцитами // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. N3. С.129-135.
2. Чехонин В.П., Баклаушев В.П., Юсубалиева Г.М., **Волгина Н.Е.**, Гурина О.И. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера // Вестник РАМН. 2012. N8. С. 66 – 78.
3. Лагунин А.А., Глоризова Т.А., Дмитриев А.В., **Волгина Н.Е.**, Поройков В.В. Компьютерная оценка взаимодействия фармакологических веществ с Р-гликопротеином // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. N 10. С.520 -525.
4. Шейн С., Гурина О., Леопольд А., Баклаушев В., Корчагина А., Гриненко Н., **Волгина Н.**, Рябухин И., Чехонин В. Получение моноклональных антител к рекомбинантному фактору роста эндотелия сосудов Generation of monoclonal antibodies to recombinant vascular endothelial growth factor // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. N1. С.139-142.
5. **Волгина Н.Е.**, Гриненко Н.Ф., Баклаушев В.П. Особенности развития барьерного фенотипа у эндотелиоцитов пупочной вены человека при ко-культивировании с аллогенными астроцитами. VI Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. Москва, Россия. Материалы докладов. 2011. N1. С.195.