

Микрофлюидные технологии в изучении и моделировании гематоэнцефалического барьера

А.В. Моргун, В.В. Салмин, Ю.А. Успенская, Е.А. Тепляшина,
А.Б. Салмина

НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Контактная информация: д.м.н. Салмина Алла Борисовна, allasalmina@mail.ru

Разработка моделей гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro* является актуальной задачей нейробиологии и нейрофармакологии. Все большее значение приобретают модели с использованием технологии микрофлюидики, позволяющие изучать и воспроизводить ключевые события церебрального ангиогенеза, барьерогенеза, механизмы поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ, тестировать препараты с потенциальной нейротропной активностью. В обзоре анализируются современные достижения в разработке микрофлюидных моделей ГЭБ, а также наиболее перспективные технологические решения, обеспечивающие качественно новые возможности в создании и применении моделей *in vitro*.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, микрофлюидика, модель *in vitro*.

Введение

Моделирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – одна из важных задач нейробиологии и нейрофармакологии. Применение моделей ГЭБ *in vitro* обеспечивает возможность изучения механизмов поддержания структурно-функциональной целостности барьера, особенностей его повреждения, а также тестирования новых лекарственных соединений с потенциальной нейротропной активностью [2].

В настоящее время у исследователей, которые изучают ГЭБ, в распоряжении есть методики *in vivo*, *in vitro*, *in silico*. У каждой из существующих методик имеются преимущества и недостатки. Модели ГЭБ на экспериментальных животных, несмотря на высокую информативность, являются дорогостоя-

щими, трудоемкими и этически спорными. Не всегда данные, полученные с их помощью, могут быть экстраполированы на человека. Более 80% кандидатов лекарственных средств, которые были успешно испытаны в моделях на животных, потерпели неудачу при клинических испытаниях [18]. Несмотря на это, до настоящего времени модели на экспериментальных животных остаются «золотым стандартом» для нейрофармакологических исследований [29]. В фармацевтической промышленности тестирование лекарств-кандидатов, как правило, всегда проводят на животных, прежде чем они будут испытаны в организме человека. Компьютерные модели ГЭБ используются только для прогнозирования проницаемости на основе базовых знаний, т.е. хорошо изученных

механизмах для определенной лекарственной структуры. Таким образом, получить информацию об эффективности новых препаратов с неизвестными механизмами проницаемости или о том, как сам препарат влияет на проницаемость или активность клеток ГЭБ, с использованием моделей *in silico* практически невозможно [15].

Традиционные методы культивирования имеют преимущество в возможности использования человеческих клеток, но было показано, что некоторые типы клеток, используемых в таких статичных экспериментах, не всегда достигают полной функциональной зрелости и активности. Одновременно с этим отмечается проблема замены питательных сред, которая сама по себе не является физиологическим процессом [12].

Становится очевидной привлекательность методов *in vitro*, которые могут подробно описывать нормальную и патологическую активность изучаемых клеток на молекулярном уровне в условиях имитации кровотока и взаимодействия клеток, которые наблюдаются в организме. В связи с этим открываются широкие перспективы при использовании модельных систем на основе микрофлюидных технологий, т.к. имеется возможность создания благоприятных (и максимально близких к физиологическим) условий окружающей среды для культивирования клеток, поступления химических веществ в строго контролируемых концентрациях.

Микрофлюидные технологии

Физическая основа микрофлюидики — это классические уравнения гидродинамики. Особенности течения жидкости в микроканалах под действи-

ем внешних сил накладывают существенный отпечаток на поведение жидкости: течение зависит от взаимодействия жидкости со стенками канала, потому так актуальны поверхностные явления на границе фаз. Большое значение в тонких каналах имеют поверхностные эффекты, которые в более широких каналах можно было бы практически не учитывать [1]. Возможно, ключевым моментом к проблеме регулирования течений внутри тонких каналов выступает управление поверхностными эффектами. Следовательно, изучение топологии и химического состава поверхностей, используемых для стенок тонких каналов, является одним из приоритетных и не в полной мере изученных направлений микрофлюидики. Это определяет потребность в поиске наиболее соответствующих используемым типам клеток перфузируемых жидкостей и материалов для изготовления микрофлюидных камер. В целом, именно принципы микрогидродинамики, описывающей поведение жидкостей в микро- и наноразмерных системах, составляют основу функционирования микро(нано)флюидных чипов. Необходимо отметить, что к нанофлюидным чипам относят чипы, размеры функциональных элементов которых составляют менее 100 нм, а если переходная область составляет 100 нм – 1 мкм, то такие процессы отражают закономерности классической микрогидродинамики, но с некоторыми особенностями наноразмерных процессов [33].

Проведение некоторых или всех этапов экспериментального исследования в автономном режиме может обеспечить камера, состоящая из комплекса микроили наноразмерных функциональных и объединенных элементов. Именно свой-

ства подвергаемых анализу биологических объектов и особенности протекающих в нем реакций предопределяют специфику и даже уникальность конструктивных качеств микрочипа. Например, для моделирования процессов ангиогенеза необходимо сформировать взаимодействующие каналы и камеры-резервуары для клеток-предшественников или для гуморальных факторов с проангиогенной активностью, а для моделирования процесса нейрогенеза наиболее актуальным является создание такой микроархитектоники чипа, которая бы наилучшим образом воспроизводила сосудистое микроокружение в нейрогенных нишах головного мозга с соответствующими специфическими свойствами клеток эндотелия (транселлюлярный и параселлюлярный транспорт).

Разветвленная сеть микроструктур – микроканалов и микрореакторов – способствует осуществлению реакций в микрофлюидных потоках жидкости, обеспечивает полноценное взаимодействие различных компонентов системы. В связи с этим, формирование сети микроструктур с заданной микроархитектоникой и упорядоченными взаимодействиями позволяет проводить исследования в небольшом объеме, с чередованием разных по содержанию экспериментальных воздействий, с отбором проб в динамике эксперимента [22]. Ограниченность объема взаимодействующих компонентов в микрофлюидной системе определяет возможность регистрации таких маркеров, которые могут остаться не идентифицированными в статических моделях *in vitro* (например, экзосом) [24], либо создание (благодаря заданной конструкции каналов) градиента концентрации веществ, влияющих

на ключевые функции клеток в системе (например, стимулирующих пролиферацию или миграцию клеток) [28]. В этом контексте микрофлюидика смыкается по потенциалу технологических приемов с методами формирования внеклеточного матрикса с заданными свойствами (структурирование и функционализация).

По своей сути микрофлюидная технология в определенной степени объединяет методы *in vivo* и *in vitro*. Для такого нового класса моделей недавно было введено понятие «organ-on-chip» (орган на чипе) [5]. Фактически, речь идет о максимально полном воспроизведении естественного для любой ткани взаимодействия клеток в условиях (микро)потока внеклеточной жидкости, имитирующего доставку питательных веществ и ксенобиотиков к клеткам, а также эффективное отведение продуктов метаболизма. В контексте ГЭБ это еще означает и возможность достижения большего, по сравнению со статическими моделями, уровня трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER), которое характеризует структурную и функциональную целостность барьера: в динамической модели TEER достигает 2000-4000 Ом/см², а в такой же, но статической модели – всего 100-125 Ом/см² [31]. Однако необходимо учитывать, что максимально близкое соответствие условиям *in vivo* может быть достигнуто только при воспроизведении механизмов саморегуляции и обратной связи. Поэтому важен контроль параметров системы и, соответственно, наличие механизмов управления этими параметрами.

Еще одним преимуществом рассматриваемой технологии является возмож-

ность ее использования для решения задач персонализации терапии заболеваний головного мозга при условии использования клеток конкретного донора. Применительно к моделям ГЭБ это означает подход с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), с последующей их дифференцировкой в клетки эндотелия, способные формировать в микрофлюидных каналах капиллярную сеть в полном соответствии с принципами васкулогенеза [35]. В более общем смысле это дает возможность создания и использования персонализированного (характерного для данного конкретного пациента) ГЭБ на микрофлюидном чипе для тестирования эффективности преодоления барьера соединениями, ориентированными на забарьерные молекулы-мишени в ткани головного мозга.

Кроме этого, технология «organ-on-chip» может имитировать функции на уровне взаимодействующих тканей, что составляет основу т.н. «микрофизиологических систем» (табл.).

При оценке возможности и целесообразности применения микропоточковых технологий в моделировании ГЭБ необходимо помнить о том, что в естественных условиях эндотелий церебральных микрососудов находится под постоянным влиянием движущегося потока жидкости (кровь), что существенно модулирует ответ клеток на действие гуморальных регуляторов или контакт с др. клетками сосудистой стенки или крови. В частности, гемодинамика в условиях *in vivo* определяет развитие в клетках эндотелия стресса сдвига и напряжения, который влияет на экспрессию генов, активность ионных каналов, метаболизм клеток, процессы пролиферации и дифференцировки, апоптоз [4]. Воспроизведение таких механобиологических факторов – одна из ключевых задач биоинженерных работ при создании новых моделей ГЭБ *in vitro*. Более того, применение моделей, основанных на технологиях микрофлюидики, позволяет сделать качественно новый шаг в изучении механизмов развития ГЭБ или

Таблица

**Сравнение микрофлюидной технологии «organ-on-chip»
с моделями *in vivo* и *in vitro***

Показатель	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	Organ-on-chips	Ссылки
Человеческая ткань	Нет	Да	Да	[2]
Персонализированная медицина	Нет	Да	Да	[2]
Реалистичное микроокружение	Да	Нет	Да	[20]
Контроль микросреды	Нет	Да	Да	[17]
Функционирование на уровне органов	Да	Ограниченно	Да	[32]
Получение результатов в реальном времени	Нет	Ограниченно	Да	[8]
Высокая пропускная способность, распараллеливание тестирования	Нет	Да	Да	[21]
Параллельные исследования	Нет	Да	Да	[10]
Исследование фармакодинамики / фармакокинетики	Да	Нет	Да	[9]

его восстановления после повреждения, коль скоро именно гемодинамические параметры во многом определяют эффективность миграции и хоминга эндотелиальных прогениторных клеток, а также миграции и дифференцировки резидентных клеток эндотелия в составе ГЭБ [14]. В целом, использование микрофлюидики для моделирования ГЭБ позволяет имитировать физиологическое течение жидкости, которое влияет на функциональную активность церебральных эндотелиоцитов.

Несмотря на то, что проницаемость ГЭБ в настоящее время обычно изучается в клеточных моделях ГЭБ *in vitro*, использование микрофлюидной технологии в формате «organ-on-chip» позволяет провести изучение функциональной активности ГЭБ в целом (или клеток-компонентов барьера в отдельности) в режиме реального времени путем подключения разнообразных датчиков и анализаторов непосредственно к модели.

Примером исследования, которое не может быть проведено на клеточной культуре в полном объеме, является сложный, специализированный механизм активации лейкоцитов в непосредственном контакте с ГЭБ при бактериальных инфекциях [17]. В реализации этого механизма существенную роль играют движение лейкоцитов вдоль эндотелиального слоя, а также процесс трансмиграции, опосредованный взаимодействием большого числа факторов на поверхности эндотелиоцитов и лейкоцитов. Аналогичным образом, применение микропоточковых технологий актуально для изучения процессов тромбообразования в церебральных микрососудах для моделирования изме-

нения эффектов взаимодействия клеток эндотелия и активированных тромбоцитов в динамически меняющемся микроокружении. Еще одним перспективным применением микрофлюидной модели ГЭБ является исследование механизмов поступления эндогенных и экзогенных веществ (в т.ч. лекарственных средств) и процессов выведения метаболитов из ткани мозга. Известно, что контролируемое увеличение проницаемости ГЭБ определяет эффективность таких механизмов, однако не менее существенным фактором является наличие адекватной перфузии в микрососудах головного мозга [16]. Воспроизвести близкие к естественным условия (соответствующее давление перфузирующего раствора, скорость потока и состав перфузата) позволяет использование микропоточковых технологий для моделирования ГЭБ [23].

Таким образом, модель ГЭБ-on-chip с использованием микрофлюидики является дополнительным инструментом для изучения ГЭБ, наряду с классическим культивированием и исследованиями на экспериментальных животных. В зависимости от поставленных задач можно выбрать наиболее подходящую модель ГЭБ-on-chip, учитывая, что в последние годы появился достаточно широкий выбор моделей, а количество публикаций, посвященных указанной проблеме, резко увеличилось.

Каким образом эволюционировали подходы к созданию моделей ГЭБ с использованием микропоточковых технологий?

В 2012 г. в работе R. Booth [8] была опубликована информация о создании микромоделей ГЭБ с использованием микрофлюидной технологии. Устройст-

во из полидиметилсилоксана (PDMS), помещенного между двумя стеклянными пластинками, которое предлагали авторы, представляло собой два канала, которые были отделены друг от друга мембраной из поликарбоната (толщина 10 мкм, поры 0,4 мкм). К верхней и нижней части были подведены электроды, что позволяло регистрировать трансэндотелиальное сопротивление в режиме реального времени, которое составило 180-280 Ом/см², что указывает на наличие полноценного функционального барьера *in vitro*.

В указанной модели использовались астроциты и эндотелиоциты мышей, которые культивировались на разных сторонах мембраны. Скорость потока составляла 2,6 мкл/мин, при этом давление на эндотелиоциты составило 2 мПа и, в принципе, не являлось физиологическим, т.к. в норме давление в капиллярах головного мозга достигает 0,3-2 Па. На собственной модели авторы провели исследования, посвященные регистрации белков плотных контактов, проницаемости ГЭБ, в т.ч. и при изменении pH среды, а также при повышении концентрации гистамина в составе перфузата. Авторами была убедительно показана более высокая эффективность микрофлюидной модели по сравнению с классическим сокультивированием астроцитов и эндотелиоцитов.

Дальнейшее развитие модели R. Booth шло по пути изменения глубины и ширины каналов, смены адгезива (коллаген, фибронектин, полилизин), изменения скорости потока до 2 мл/мин и повышения давления до 1,5 Па. Трансэндотелиальное сопротивление оставалось в пределах 150 Ом/см² [9]. Используя собственную модель ГЭБ-on-chip,

авторы изучили токсичность семи лекарственных препаратов и показали, что измеренные коэффициенты проницаемости в их микрофлюидной модели хорошо коррелируют с результатами, полученными в экспериментах *in vivo*, что демонстрирует высокий потенциал указанной модели для фармакологических исследований.

Также в 2012 г. была опубликована работа [34] о системе для анализа проницаемости микрососудов мозга. Устройство, как и предыдущее, было смонтировано из PDMS на стекле и содержало два параллельных канала диаметром 25 мкм, которые соединялись микроотверстиями диаметром 3-5 мкм. В модели использовали эндотелиоциты пупочной вены человека (HUVEC) и астроцит-кондиционированная среда (ACM). Авторы изучили проницаемость для FITC-меченых декстранов (4, 40, 70 кДа), некоторых лекарственных препаратов с помощью флуоресцентной микроскопии (в реальном времени) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В 2013 г. была опубликована работа [3], описывающая интересное модульное микрофлюидное устройство, моделирующее нейроваскулярную единицу на чипе. Предлагаемое устройство состоит из двух модулей на основе PDMS, которые могут быть изготовлены и использованы для культивирования различных видов клеток по отдельности и собраны вместе на более позднем этапе. Скорость потока составляет 1 мл/ч. Один модуль содержит покрытую полилизинем лунку диаметром 8 мм и глубиной 0,1 мм и используется для культивирования кортикальных клеток (нейрональный модуль). Второй

модуль (сосудистый) шириной 10 мм с каналами длиной 0,1 мм с поликарбонатной мембраной (толщина 7 мкм, поры 8 мкм), покрытой фибронектином, предназначен для культивирования церебрального эндотелия. Авторами была показана высокая жизнеспособность клеток, адекватная дифференцировка нейронов и стабильное функционирование эндотелия, экспрессия белков плотных контактов. На этой модели авторы исследовали изменение проницаемости ГЭБ под действием TNF α .

В 2013 г. было представлено устройство «SYM-BBB» на основе PDMS на предметном стекле. Архитектура устройства была представлена в виде двух кольцевых каналов и предназначена для обеспечения одновременной визуализации при микроскопии. Наружное кольцо (ширина 200 мкм, глубина 100 мкм) – сосудистая часть. Внутреннее кольцо – нейроглиальная часть (ширина 200 мкм, глубина 100 мкм). Каналы соединялись между собой микрозазорами (длина 50 мкм; ширина и глубина – по 3 мкм). В качестве адгезива использовался фибронектин. Во время культивирования клеток скорость потока составила всего 0,1 мкл/мин, что соответствует напряжению сдвига приблизительно 3 мПа и является более низким по сравнению с физиологическим уровнем. На этой модели авторами изучены особенности проницаемости ГЭБ с участием Р-гликопротеина эндотелиоцитов, обеспечивающего экструдию ксенобиотиков, а в качестве контроля авторами использовались стандартные клеточные культуры [25].

В 2015 г. была представлена трехмерная модель ГЭБ с использованием микрофлюидной технологии. Устройство

представляет собой конструкцию на стекле из PDMS, на поверхности которого располагаются продольные и поперечные каналы (ширина и глубина – 5 мкм). Внутри PDMS формируется 2 канала – эндотелиальный и нейроглиальный (диаметр – по 50 мкм), и маленькие перпендикулярные соединительные каналы (5 мкм). Вся конструкция помещается в акриловый планшет с культуральной средой. После покрытия каналов поли-D-лизином они заполняются коллагеном [13]. Авторы изучили особенности миграции нейтрофилов через эндотелиальный слой, влияние интерлейкина-8 и TNF α на проницаемость ГЭБ, экспрессию белков плотных контактов. Кроме этого, авторы моделировали ишемию и гипогликемию, а также оценивали влияние антиоксидантов, исследовали формирование активных форм кислорода и активацию Rho-киназы в результате окислительного стресса в контексте изменения проницаемости ГЭБ.

В том же году была представлена еще одна трехмерная модель нейроваскулярной единицы на основе коллагена. Принцип устройства заключается в том, что в коллагене формируются каналы (трубочки) диаметром 235-360 мкм путем заливки коллагена вокруг микроигл с последующим их удалением. Получившиеся трубочки покрывают фибронектином, внутри них культивируют эндотелиальные клетки [21]. Основные исследования, которые проводили авторы, используя предложенную модель, посвящены трансэндотелиальной проницаемости при нарушении осмолярности крови.

Очень интересная модель ГЭБ на чипе с использованием микрофлюидной техники была представлена Brown с соавт. [11]. Их чип состоит из трех слоев

PDMS: сосудистая камера с входными каналами (ширина 100 мкм, высота 6,2 мм), камера нейроглиальных клеток (ширина 4,75 мм, длина 6,2 мм и глубина 500 мкм) и слой перфузионных каналов (несколько параллельных каналов высотой 100 мкм). Сосудистые и мозговые камеры разделены поликарбонатной мембраной (диаметр пор 0,2 мкм). В качестве адгезива используется ламинин. Скорость потока – 2 мкл/мин, что соответствует давлению 2 мПа. Особенностью этой модели является то, что камера нейроглиальных клеток заполняется коллагеном (матригелем), в котором находятся человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Клетки остаются жизнеспособными до 21 суток. Авторами изучены особенности проницаемости ГЭБ в присутствии глутамата, аскорбиновой кислоты и при холодовом шоке. Кроме того, авторы сообщили о достижении очень высоких значений трансэндотелиального сопротивления (до 2000 Ом/см²), что сопоставимо с этим параметром *in vivo*.

Примером оригинального технического решения может являться создание трехмерной модели ГЭБ в микрофлюидной камере [30] с участием эндотелия, перицитов и астроцитов, в которой достигалась величина парацеллюлярных пор, сопоставимая с параметрами *in vivo*, за счет корректной организации расположения всех трех типов клеток.

Особое положение в ряду микрофлюидных моделей ГЭБ *in vitro* занимают модели, созданные для изучения процессов ангиогенеза, барьерогенеза. К числу таких моделей можно отнести те, в которых акцент делается на подбор оптимального внеклеточного матрикса, заполняющего собой не только камеры,

но и входные и отводящие каналы [27]. Возможность создания в таких системах градиента гуморальных факторов с про- или антиангиогенным эффектом создает предпосылки для детального изучения механизмов образования новых сосудов и тестирования фармакологических препаратов с потенциальным ангиостатическим действием (например, для решения задач терапии опухолей головного мозга) или ангиостимулирующим эффектами (например, для стимуляции репаративного ангиогенеза после повреждения ткани головного мозга). Близкими по задачам являются микрофлюидные системы, формирующие пронеурогенное микроокружение (т.н. «сосудистый скаффолд») для клеток, участвующих в нейрогенезе, что актуально при разработке новых технологий регенеративной неврологии и реализации амбициозных проектов – например, «brain-on-chip» [19].

Заключение

Таким образом, внедрение микрофлюидики революционировало процесс разработки моделей ГЭБ *in vitro* в формате «organ-on-chip». Вместе с тем, эти же этапы в развитии технологии моделирования ГЭБ позволили увидеть ключевые достоинства и недостатки указанного подхода.

В целом, микрофлюидные модели ГЭБ обладают рядом несомненных преимуществ: во-первых, существенно снижается расход используемых реагентов и количество отработанного материала, повышается чувствительность и пропускная способность эксперимента. Во-вторых, в рассматриваемых системах химические реакции осуществляются с более высокой скоростью, лучшим и

более точным результатом, что обусловлено небольшими размерами каналов и значительным коэффициентом поверхности микроканала по отношению к объему жидкости. Нельзя также не отметить более тонкий контроль смешивания реагентов и контроль количества продукта, которое получается после химической реакции. В-третьих, микрофлюидные устройства, применяемые в настоящее время в научных исследованиях (медицинского и биологического профиля), представлены большим спектром различных модификаций. В них используют разнообразные принципы разделения, концентрирования и выявления результата. Так, один чип позволяет концентрировать несколько герметично закрываемых или открытых стационарных сосудов, наполняемых жидким или газообразным веществом, насосом и идущими в разные стороны микрофлюидными каналами [22].

Вместе с тем, можно отметить и существенные недостатки при использовании микрофлюидных технологий при моделировании ГЭБ: несмотря на значительный прорыв в этой области, многие технологические проблемы остаются нерешенными: они связаны, в первую очередь, с оптимизацией движения жидкости в ограниченном пространстве, с перемешиванием жидкостей, увеличением скорости потока жидкости, уменьшением гидродинамической дисперсии. Нельзя исключать и отрицательные эффекты материалов и перфузирующих жидкостей в отношении клеток церебрального эндотелия или клеток неэндотелиальной природы, участвующих в формировании ГЭБ (например, перicyтов, астроцитов). Значимой проблемой остается поиск наиболее удобных

и информативных методов мониторинга состояния клеток в микрофлюидных камерах, для решения этой задачи применяют, например, оптические зонды, в т.ч. экзогенные флуоресцентные красители, эндогенные флуорофоры или экспрессируемые в клетках флуоресцентные белковые биосенсоры [26].

Решение этих технологических проблем, несомненно, обеспечит «прорыв» в развитии микрофизиологических систем для моделирования нейrogenеза, нейропластичности, нейродегенерации с учетом структурно-функциональной целостности ГЭБ. В этой связи прогнозируется новый этап в развитии метода микрофлюидики, связанный с внедрением технологии 3D-принтинга для создания биосовместимых конструкций, прозрачных, легко мониторируемых, с заданными свойствами и недорогих [6]. Этот же подход обеспечит замену гидрогелей в качестве обычного матрикса для клеток в микрофлюидной камере на 3D-полимерные скаффолды, что важно для прижизненной флуоресцентной визуализации клеток в течение длительного времени с высоким разрешением. Не менее интересным является применение технологий 3D-принтинга для инкорпорации в микроканалы или микрокамеры микрофлюидной системы различных структур (например, микромиксеров, микролинз, микрофильтров), как это было недавно показано с применением лазерной двухфотонной фотополимеризации [7].

Кроме всего перечисленного, для ускорения разработки и обеспечения возможности сравнения и проверки различных моделей ГЭБ на чипе необходимо разработать стандартизацию и общие подходы к проблеме среди исследователей. В этом контекста наиболее

актуальны: 1) стандарты в определении проницаемости ГЭБ; 2) применение стандартизированных клеточных линий; 3) конструктивные особенности микрофлюидной камеры с такой топологией и архитектурой, которые бы максимально приближенно к реальным условиям воспроизводили особенности кровотока в микрососудах головного мозга. Вместе с тем, имеющиеся в настоящее время микрофлюидные модели ГЭБ несовершенны именно из-за различий в указанных аспектах, что вызывает значительные расхождения в экспериментальных результатах и сложности в интерпретации полученных данных.

В целом, перспективы совершенствования и применения моделей ГЭБ *in vitro* с использованием технологий микрофлюидики связаны с развитием технологий биоинженерии, биотехнологии, созданием новых биоматериалов и способов их обработки, а также методов визуализации. Прогресс в этих направлениях дает новые возможности в изучении механизмов поддержания структурно-функциональной целостности ГЭБ в норме и при патологии, механизмов барьерогенеза и ангиогенеза в головном мозге, создании новых моделей заболеваний ЦНС, изучении возможностей направленного изменения свойств ГЭБ, тестирования соединений с потенциальной нейротропной активностью.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (соглашение № 14-25-00054).

Список литературы

1. Микрофлюидные системы для химического анализа / под ред. Ю.А. Золотова, В.Е. Курочкина. - М.: ФИЗМАТЛИТ. 2011. 528 с.
2. *Моргун А.В., Кувачева Н.В., Хилажсва Е.Д., Пожисленкова Е.А., Таранушенко Т.Е., Медведева Н.Н., Салмина А.Б.* Технологии изучения и моделирования гематоэнцефалического барьера // Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии: рук-во для врачей. В 3-х томах / под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танащян. - М.: АТМО. 2015. Т. III. С. 134-166.
3. *Achyuta A.K.H., Conway A.J., Crouse R.B., Bannister E.C., Lee R.N., Katnik C.P., Behensky A.A., Cuevas J., Sundaram S.S.* A modular approach to create a neurovascular unit-on-a-chip // Lab. Chip. 2013. Vol. 13. P. 542-553.
4. *Ando J., Yamamoto K.* Effects of shear stress and stretch on endothelial function // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15. № 5. P. 1389-1403.
5. *Bhatia S.N., Ingber D.E.* Microfluidic organs-on-chips // Nat. Biotechnol. 2014. Vol. 32. No. 8. P. 760-772.
6. *Bhattacharjee N., Urrios A., Kang S., Folch A.* The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics // Lab. Chip. 2016. Vol. 16. No. 10. P. 1720-1742.
7. *Bing X., Wen-Qiang D., Jia-Wen L., Yan-Lei H., Liang Y., Chen-Chu Z., Guo-Qiang L., Zhao-Xin L., Jin-Cheng N., Jia-Ru C., Dong W., Su-Ling L., Koji S.* High efficiency integration of three-dimensional functional microdevices inside a microfluidic chip by using femtosecond laser multifoci parallel microfabrication // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 19989.
8. *Booth R., Kim H.* Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (mu BBB) // Lab. Chip. 2012. Vol. 12. P. 1784-1792.
9. *Booth R., Kim H.* Permeability analysis of neuroactive drugs through a dynamic microfluidic in vitro blood-brain barrier model // Annals Biomed. Engineering. 2014. Vol. 42. P. 2379-2391.
10. *Booth R., Noh S., Kim H.A.* multiple-channel, multiple-assay platform for char-

- acterization of full-range shear stress effects on vascular endothelial cells // *Lab. Chip*. 2014. Vol. 14. P. 1880-1890.
11. Brown J.A., Pensabene V., Markov D.A., Allwardt V., Neely M.D., Mingjian S., Britt C.M., Hoilett O.S., Qing Y., Brewer B.M., Samson P.C., McCawley L.J., May J.M., Webb D.J., Deyu L., Bowman A.B., Reiserer R.S., Wikswa J.P. Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor // *Biomicrofluidics*. 2015. Vol. 9. No. 5. P. 1-15.
12. Cao X., Lin H., Muskhelishvili L., Latendresse J., Richter P., Heflich R.H. Tight junction disruption by cadmium in an in vitro human airway tissue model // *Respir. Res.* 2015. Vol. 16. No. 1. P. 30.
13. Cho H., Seo J.H., Wong K.H., Terasaki Y., Park J., Bong K., Arai K., Lo E.H., Irimia D. Three-dimensional blood-brain barrier model for in vitro studies of neurovascular pathology // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 15222.
14. Cucullo L., Hossain M., Puvenna V., Marchi N., Janigro D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology // *BMC Neurosci.* 2011. Vol. 12. P. 40.
15. Filipovic N., Ghimire K., Saveljic I., Milosevic Z., Ruegg C. Computational modeling of shear forces and experimental validation of endothelial cell responses in an orbital well shaker system // *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 2016. Vol. 19. No. 6. P. 581-590.
16. Hellman K., Nielsen P.A., Ek F., Olsson R. An ex vivo model for evaluating blood-brain barrier permeability, efflux, and drug metabolism // *ACS Chem. Neurosci.* 2016. Vol. 7. No. 5. P. 668-680.
17. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip // *Science*. 2010. Vol. 328. P. 1662-1668.
18. Huh D., Torisawa Y.S., Hamilton G.A., Kim H.J., Ingber D.E. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips // *Lab. Chip*. 2012. Vol. 12. No. 12. P. 2156-2164.
19. Karimi M., Bahrami S., Mirshekari H., Basri S.M., Nik A.B., Aref A.R., Akbari M., Hamblin M.R. Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering // *Lab. Chip*. 2016. Vol. 16. No. 14. P. 2551-2571.
20. Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D.E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow // *Lab. Chip*. 2012. Vol. 12. P. 2165-2174.
21. Kim J.A., Kim H.N., Im S.-K., Chung S., Kang J.Y., Choi N. Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template // *Biomicrofluidics*. 2015. Vol. 9. P. 024115.
22. Luni C., Serena E., Elvassore N. Human-on-chip for therapy development and fundamental science // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. Vol. 25. P. 45-50.
23. Nedergaard M. Garbage truck of the brain // *Science*. 2013. Vol. 340. No. 6140. P. 1529-1530.
24. Oh H.J., Shin Y., Chung S., Hwang D.W., Lee D.S. Convective exosome-tracing microfluidics for analysis of cell-non-autonomous neurogenesis // *Biomaterials*. 2016. Vol. 112. P. 82-94.
25. Prabhakarparandian B., Shen M.C., Nichols J.B., Mills I.R., Sidoryk-Wegrzynowicz M., Aschner M., Pant K. SyM-BBB: a microfluidic blood brain barrier model // *Lab. Chip*. 2013. Vol. 13. P. 1093-1101.
26. Senutovitch N., Verneti L., Boltz R., DeBiasio R., Gough A., Taylor D.L. Fluorescent protein biosensors applied to microphysiological systems // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2015. Vol. 240. No. 6. P. 795-808.
27. Tourovskaia A., Fauver M., Kramer G., Simonson S., Neumann T. Tissue-engineered microenvironment systems for modeling human vasculature // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2014. Vol. 239. No. 9. P. 1264-1271.

28. Uzel S.G., Amadi O.C., Pearl T.M., Lee R.T., So P.T., Kamm R.D. Simultaneous or sequential orthogonal gradient formation in a 3D cell culture microfluidic platform // Small. 2016. Vol. 12. No. 5. P. 612-622.
29. Van der Helm M.W., van der Meer A.D., Eijkel J.C., van den Berg A., Segerink L.I. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research // Tissue Barriers. 2016. Vol. 4. No. 1. P. e1142493.
30. Wang J.D., Khafagy el-S., Khanafer K., Takayama S., ElSayed M.E. Organization of endothelial cells, pericytes, and astrocytes into a 3D microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier // Mol. Pharm. 2016. Vol. 13. No. 3. P. 895-906.
31. Wang Y.I., Abaci H.E., Shuler M.L. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening // Biotechnol. Bioeng. 2016. doi: 10.1002/bit.26045.
32. Westein E., van der Meer A.D., Kuijpers M.J.E., Frimat J.P., van den Berg A., Heemskerk J.W.M. Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Vol. 110. P. 1357-1362.
33. Wong I.Y., Bhatia S.N., Toner M. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine // Genes Dev. 2013. Vol. 27. No. 22. P. 397-408.
34. Yeon J.H., Na D., Choi K., Ryu S.W., Choi C., Park J.K. Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures // Biomed. Microdevices. 2012. Vol. 14. P. 1141-1148.
35. Zanutelli M.R., Ardalani H., Zhang J., Hou Z., Nguyen E.H., Swanson S., Nguyen B.K., Bolin J., Elwell A., Bischel L.L., Xie A.W., Stewart R., Beebe D.J., Thomson J.A., Schwartz M.P., Murphy W.L. Stable engineered vascular networks from human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells cultured in synthetic hydrogels // Acta Biomater. 2016. Vol. 35. P. 32-41.

Microfluidic technologies in studying and modelling the blood-brain barrier

A.V. Morgun, V.V. Salmin, Y.A. Uspenskaya, E.A. Teplyashina,
A.B. Salmina

Development of the blood-brain barrier model in vitro is one of the main points in modern Neurobiology and Neuropharmacology. Application of microfluidic approach to the blood-brain barrier modeling allows studying and reconstructing the key events in cerebral angiogenesis, barrierogenesis, regulation of structural and functional integrity of the barrier, and testing the drug candidates targeting brain tissue. Here we review the current achievements in the development of blood-brain barrier microfluidic models as well as the most promising technological solutions to get novel opportunities in the development and application of these models *in vitro*.

Key words: blood-brain barrier, microfluidics, model *in vitro*.