

УДК 616-092.19

©Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ HIF В КЛЕТКАХ АСТРОГЛИАЛЬНОЙ И НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ *IN VITRO*

В.А. Рузаева*, А.В. Моргун, Е.Д. Хилажева, Н.В. Кувачева, Е.А. Пожиленкова, Е.Б. Бойцова, Г.П. Мартынова, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина

Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, 660022, Красноярск, Партизана Железняка, д. 1; тел.: (391) 228-07-69; эл. почта: Veronikaruz@mail.ru

Барьерогенез – это процесс созревания первичной сосудистой сети головного мозга, при котором происходит становление гематоэнцефалического барьера. Он представляет собой сочетание факторов, которые, с одной стороны, способствуют процессу миграции и тубулогенезу эндотелиальных клеток (ангиогенез), с другой стороны, способствуют формированию новых связей между эндотелиоцитами и другими элементами нейроваскулярной единицы. Периваскулярные астроциты вносят значительный вклад в барьерогенез, однако механизмы этого участия мало изучены. В работе исследовано действие модуляторов HIF-1 в клетках неэндотелиальной природы (нейроны и астроглия) на формирование гематоэнцефалического барьера *in vitro*. Применение FM19G11, регулирующего экспрессию HIF-1, и GSI-I, подавляющего активность гамма-секретазы и/или протеасом, приводит к увеличению экспрессии тромбоспондинов и матриксных металлопротеиназ в развивающемся гематоэнцефалическом барьере, но оказывает разнонаправленный эффект в отношении продукции VEGF, что, в целом, способствует созреванию барьера *in vitro*.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, барьерогенез, нейроваскулярная единица, ангиогенез, модуляторы HIF-1

DOI 10.18097/PBMC20166206664

ВВЕДЕНИЕ

Функционирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) обеспечивается сложным комплексом межклеточных взаимодействий. Известно, что в состав нейроваскулярной единицы (частным примером которой является ГЭБ), входят клетки церебрального эндотелия, астроглии, перicytes и нейроны [1]. ГЭБ формируется внутриутробно и в раннем постнатальном периоде, что сопряжено с активностью нейрогенеза и синаптогенеза. К ключевым регуляторам барьерогенеза относят рецепторы DR6, TROY, компоненты Wnt-сигнального каскада, хемокины, протеазы, компоненты внеклеточного матрикса, молекулы клеточной адгезии, разнообразные факторы роста [2]. Физиологическая проницаемость ГЭБ уступает место патологической при различной патологии центральной нервной системы (ишемия, гипоксия, травмы и опухоли головного мозга, воспалительные и нейродегенеративные заболевания, нарушения развития мозга), причём изменения проницаемости носят избирательный характер и зачастую являются причиной неэффективной фармакотерапии [3].

Нейрохимические механизмы, обеспечивающие такие взаимодействия, расшифрованы неполно. Существенный эффект на развитие и поддержание целостности ГЭБ оказывают астроциты, локализованные в непосредственной близости от церебральных эндотелиоцитов и продуцирующие широкий спектр молекул, которые регулируют проницаемость и развитие ГЭБ. Например, установлено, что метаболическая дисфункция астроцитов определяет характер повреждения ГЭБ [4],

а механизмы, опосредующие в астроцитах и эндотелиоцитах действие индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1), контролируют процессы ангиогенеза и барьерогенеза, проницаемости ГЭБ [5]. Действие нейротоксических факторов, в частности, амилоида, ассоциировано с повреждением астроцитов и вызывает интенсивный ангиогенез и нарушает проницаемость ГЭБ [6]. Такие продуцируемые астроцитами пептиды как сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF), стимулируют ангиогенез, тогда как тромбоспондины (TS) астроглиального происхождения обладают ангиостатическим эффектом, но важны для репаративного барьерогенеза [7].

HIF-белки являются факторами транскрипции, стабилизация которых при гипоксии способствует запуску механизмов, способствующих гликолитической продукции (HIF-1 α) или проангиогенному эффекту даже в условиях нормоксии (HIF-2 α) [8]. Установлено, что в нормоксических условиях HIF-1 α гидроксилируется и разрушается за счёт убиквитин-протеасомного механизма, тогда как гипоксия подавляет эти события, способствует стабилизации молекул HIF-1 α , их транслокации в ядро и формированию гетеродимеров с HIF-1 β [9]. Основные эффекты стабилизации HIF-1 обеспечивают адаптацию клеток к гипоксии и ишемии, что актуально не только в условиях патологии, но и при тех событиях, которые сопряжены с развитием гипоксического микроокружения (например, в участках активной пролиферации клеток).

Под контролем HIF-1 находится несколько десятков генов, в том числе контролирующих процессы активации клеток нейрональной и глиальной

природы, а также клеток микрососудов головного мозга; однако сообщения о эффектах его активации в клетках головного мозга, в целом, и в ГЭБ, в частности, достаточно противоречивы [10]. Например, контролируемые HIF-1 реакции энергетического обмена приводят к изменению процессов гликолиза, аккумуляции лактата и изменению функциональной активности гликолитически активных астроцитов, что, как мы предположили ранее, может являться одним из важных регуляторных процессов в пределах ГЭБ [11]. С одной стороны, активация HIF-1 в клетках астроглии способствует стимуляции гликолиза и увеличению продукции лактата, который, несомненно, оказывает влияние на функциональную активность клеток церебрального эндотелия и/или транспортируется ими из ткани мозга в кровь. С другой стороны, увеличение активности HIF-1 имеет своим результатом увеличение экспрессии VEGF и активацию Notch-сигнального пути [12], которые регулируют эффективность ангиогенного спрутинга и фенотип так называемых концевых клеток и клеток ствола (tip and stalk cells), формирующих сосуд [13].

Применение модуляторов активности HIF-1 – одно из перспективных направлений в фармакологии: применение хелаторов железа, приводящее к снижению активности гидроксилазы HIF-1 α , ингибирование активности GSK-3 β киназы, либо подавление активности протеасом способствуют проявлению биологических эффектов HIF-1 α , тогда как снижение активности деацетилаз, MAPK киназ редуцирует эффекты HIF-1 α в клетках различной природы [10]. Например, соединение FM19G11 ингибирует экспрессию и транскрипционную активность изоформ HIF при гипоксии [14] или, напротив, увеличивает экспрессию HIF-1 при нормоксии [15]. Множественность эффектов модуляторов HIF-1 усугубляется разнообразием сигнальных путей, контролируемых этим белком в (пато)физиологических условиях.

Эффекты модуляции активности HIF-1 в клетках развивающегося или зрелого головного мозга практически не изучены, что ограничивает существующие представления о новых потенциальных молекулах-мишенях для фармакологического контроля процессов нейрогенеза, синаптогенеза, формирования и регуляции проницаемости ГЭБ. Поэтому целью настоящего исследования стало определение вклада метаболической активности клеток астроглиальной природы в процесс барьерогенеза в модели ГЭБ *in vitro*.

МЕТОДИКА

Формирование трёхклеточной модели нейроваскулярной единицы/ГЭБ in vitro

Формирование трёхклеточной модели нейроваскулярной единицы/ГЭБ *in vitro* осуществляли по оригинальному протоколу [16]. Источником астроцитов, нейронов и эндотелиоцитов головного мозга являлись 17-19 дневные эмбрионы крыс линии Wistar (n= 30). Из головного мозга выделяли

прогениторные клетки, и в дальнейшем культивировали нейросферы с последующей дифференцировкой в астроциты и нейроны. Эндотелиоциты выделяли по модифицированному протоколу [17]. В основную культуральную среду для нейронов и астроцитов NeuroCult NS-A Proliferation Kit (rat) (“StemCell”, Канада, № в каталоге 05771), добавляли гепарин (“StemCell”, № в каталоге 07980), основной фактор роста фибробластов (bFGF, “Stemcell”, № в каталоге 02634) и эпидермальный фактор роста (EGF, “StemCell”, № в каталоге 02633). Культуральной средой для эндотелиоцитов служила Endothelial Cell Medium (“ScienCell”, США, № в каталоге 1001), с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS, “ScienCell”, № в каталоге 0025), и раствора антибиотика/антимикотика (“Thermo Scientific HyClone”, США, № в каталоге SV3007901).

Из эмбрионов извлекали головной мозг, измельчали в 2% растворе глюкозы в PBS, удаляли супернатант и проводили ресуспензирование в 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation. Через 2 мин собирали супернатант и центрифугировали 5 мин при 150 g с последующим тритурированием осадка в 1 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation. Подсчёт количества клеток осуществляли с помощью цитометра Scepter Cell Counter (“Millipore”, США). Клетки в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток/мл засеивали в культуральные флаконы T-25 см² в 10 мл среды NeuroCult® NS-A Proliferation. Инкубация осуществлялась в инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C.

В дальнейшем проводили дифференцировку нейросфер в астроциты и нейроны в культуральной среде NeuroCult® NS-A Differentiation Kit (“StemCell”, каталожный номер №05772).

Для выделения и культивирования эндотелиоцитов изолировали передний мозг эмбрионов крыс и помещали в пробирку с 2% раствором глюкозы в PBS (“Thermo Scientific”, № в каталоге SH30256.FS) для диссоциации ткани и центрифугирования при 800 g, 5 мин. Осадок ресуспендировали в растворе коллагеназы и диспазы в DMEM (“StemCell”, № в каталоге 36253) (1 мг/мл) и центрифугировали при 800 g, 5 мин.

К осадку добавляли DMEM/DNAse I (0,001 мг/мл) (“StemCell”, № в каталоге 07900), центрифугировали при 800 g, 5 мин и отмывали в DMEM (центрифугирование при 300 g, 10 мин). Полученные клетки засеивали в количестве $1,7 \times 10^6$ клеток/мл на вставку для культуральных планшетов.

Дальнейшее культивирование смеси нейронов и астроцитов осуществляли в основной среде состава DMEM с FBS, глутамином, смесью антибиотиков при 37°C с 5% CO₂. На третьи сутки после дифференцировки проводили смену культуральной среды.

Сформировали три группы: 1) Контрольная – микс-культуры клеток находились в физиологических условиях; 2) Опытная №1 – астроциты и нейроны культивировали в основной среде с добавлением ингибитора HIF-1 – FM19G11 (300 нМ). 3) Опытная №2 – астроциты и нейроны

культивировали в основной среде с добавлением ингибитора гамма-секретазы – GSI-I (100 нМ). После достижения микс-культурой нейронов и астроцитов из экспериментальных групп конfluence 90% произвели внесение вставки с эндотелиоцитами в лунки планшета с астроцитами и нейронами. Все экспериментальные серии выполнены в 5 повторностях.

Оценка структурно-функциональной целостности ГЭБ *in vitro*

В течение трёх суток регистрировали трансэндотелиальное сопротивление. Использовали вольтметр EVOM2 (“World Precision Instruments, Sarasota”, США) с электродами STX2. Перед проведением эксперимента электроды стерилизовали 70% этанолом и помещали в ультрафиолетовую камеру на 15 мин. Величина сопротивления регистрировалась в Ом/см². Из полученного результата вычиталась величина сопротивления мембраны без клеток.

Иммуногистохимическая оценка экспрессии молекул-маркеров

Оценку экспрессии антигенов в культивируемых моделях ГЭБ проводили по стандартной методике последовательного комбинированного окрашивания препарата. Пермеабилзация проводилась с использованием протеиназы К. Первичные антитела в рабочем разведении (1:100) добавляли к микс-культурам клеток инкубировали в течение часа при 37°C во влажной камере (ZO-1 ab187012, VEGF – ab1316, TS1 – ab1823, TS2 – ab84469, MMP2 – ab7033, MMP9 – ab58803, NEUN – MAB377). Затем, после отмывки, в темноте вносили вторичные антитела в рабочем разведении (1:200) (Alexa Fluor 488 (“Abcam”, США, ab150117), Alexa Fluor 647 (“Abcam”, ab150171), Alexa Fluor 555 (“Abcam”, ab150078)) и осуществляли получасовую инкубацию при 37°C во влажной камере. На всех этапах осуществляли 2-кратную промывку образцов инкубацией (2-5 мин) в фосфатно-солевом буфере.

Конфокальную микроскопию проводили с помощью автоматизированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа с водной иммерсией Olympus FV10i-W (“Olympus”, Япония). При анализе фотоснимков использовали программу Olympus FLUOVIEW Viewer 4.0 (“Olympus”).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием методов непараметрической статистики. Для оценки различий показателей трансэндотелиального сопротивления между группами применяли критерий Манна–Уитни, для оценки различий коэкспрессии антигенов – критерий хи-квадрат. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего; результаты коэкспрессии антигенов также представлены в виде $M \pm m$, где M – процентное содержание от количества маркер-положительных клеток, m – ошибка доли. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе, предшествующем “сборке” трёхклеточной модели *in vitro*, мы инкубировали астроциты и нейроны, дифференцированные из эмбриональных нейросфер, с ингибитором HIF-1 (FM19G11) в концентрации 300 нМ, что соответствует эффективной концентрации этого модулятора *in vitro* [14] в течение 24 ч, после чего к ним добавляли интактные церебральные эндотелиоциты (в соотношении 2:1:1, соответственно) и инкубировали в течение 3 суток для формирования ГЭБ *in vitro*. При оценке экспрессии VEGF, тромбоспондинов 1 и 2, а также матриксных металлопротеиназ 2 и 9 (MMP-2, MMP-9) по окончании общего периода развития модели ГЭБ *in vitro* мы обнаружили, что подавление активности HIF-1 в астроцитах и нейронах достоверно увеличивает экспрессию всех перечисленных факторов, регулирующих ангиогенез (рис. 1А), а также увеличивает продукцию лактата по сравнению с контрольной серией экспериментов (контроль – 12,01 нмоль/мкл, FM19G11 – 48,38 нмоль/мкл). Увеличение экспрессии VEGF при подавлении активности HIF-1 соответствует данным о том, что в клетках астроглии экспрессия VEGF находится под частичным контролем этого транскрипционного фактора [18].

Одним из объектов регуляции HIF-1 является гамма-секретаза: увеличение активности HIF-1 соответствует стимуляции активности этого фермента и опосредованного им Notch-сигнальной трансдукции [19]. При предварительной инкубации микс-культуры нейронов и астроцитов с GSI-I

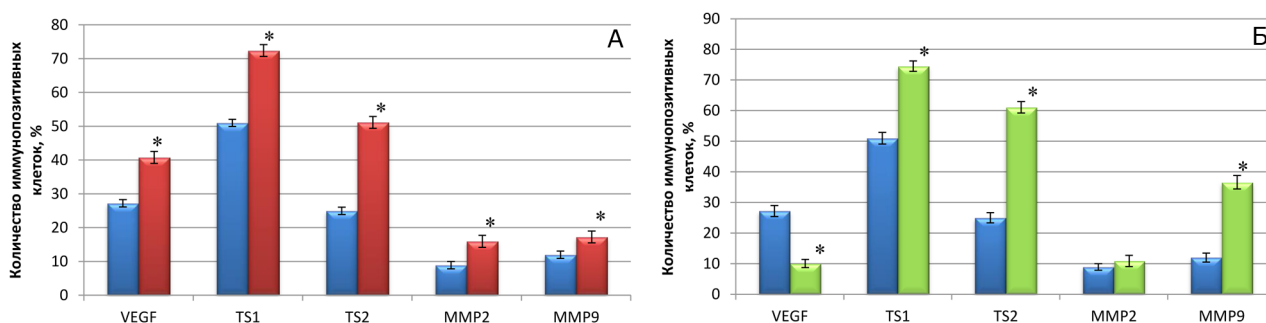


Рисунок 1. Экспрессия маркеров ангиогенеза в клетках ГЭБ *in vitro* при использовании FM19G11 (А) и GSI-I (Б). * - статистическая значимость между контрольной и опытной группами ($p < 0,05$).

в концентрации 100 нМ, что соответствует эффективной концентрации, не вызывающей значительного снижения жизнеспособности клеток [20], к третьим суткам мы обнаружили статистически значимое увеличение экспрессии TS1, TS2 и, в значительно большей степени, чем при действии ингибитора HIF-1 – MMP-9, на фоне уменьшения экспрессии VEGF (рис. 1Б). Однако, с учётом того, что GSI-I способен подавлять убиквитин-протеасомный путь деградации белков [20], стимулирующий эффект этого модулятора на стабилизацию HIF-1 в клетках, находящихся в условиях нормоксии, не может быть исключён. С учётом однонаправленности изменений в экспрессии тромбоспондинов и матриксных металлопротеиназ при применении FM19G11 и GSI-I, логично предположить, что в клетках нейрональной и астроглиальной природы в модели формирующегося ГЭБ в условиях нормоксии FM19G11 может оказывать стимулирующее действие на экспрессию HIF-1 (по аналогии с данными [15]), и к такому же эффекту приводит применение GSI-I, вероятнее всего, за счёт подавления протеасомной деградации HIF-1. Молекулярный механизм действия указанных модуляторов на формирующийся ГЭБ требует дальнейшего уточнения.

Интересно, что применение обоих типов модуляторов не имело своим результатом изменение экспрессии ZO1 белков, маркирующих формирование плотных контактов между церебральными эндотелиоцитами *in vitro* (контроль – 29,02%, ингибитор HIF-1 – 30,22%, ингибитор гамма-секретазы – 26,38% ZO1-иммунопозитивных клеток). Примечательно, что применение FM19G11 или GSI-I привело к увеличению конверсии прогениторных клеток по нейрональному пути, о чём свидетельствует статистически значимое увеличение NeuN-иммунопозитивных клеток, то есть оба модулятора способствуют увеличению дифференцировки клеток-предшественников в нейроны в микс-культуре (рис. 2).

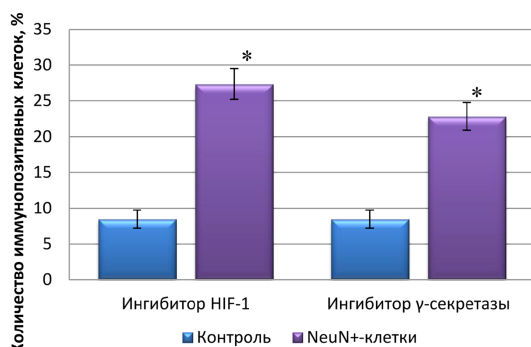


Рисунок 2. Экспрессия NeuN в клетках ГЭБ *in vitro* при использовании FM19G11 и GSI-I. * - статистическая значимость между контрольной и опытной группами ($p < 0,05$).

Таким образом, модуляция активности HIF-1, достигаемая за счёт применения FM19G11 и GSI-I, в клетках неэндотелиальной природы имела своим результатом увеличение продукции тромбоспондинов и матриксной металлопротеиназы 9 в развивающемся ГЭБ *in vitro*, в то время как изменение продукции

VEGF носило разнонаправленный характер. Указанные изменения должны соответствовать торможению ангиогенной активности и способствовать формированию зрелого ГЭБ *in vitro*. Действительно, при “сборке” ГЭБ из клеток, преобразованных FM19G11 или GSI-I, мы зарегистрировали достоверное увеличение трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) к 3-м суткам формирования барьера по сравнению с контрольной серией экспериментов (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что повышения проницаемости ГЭБ при увеличении экспрессии VEGF или MMP-9 при модуляции активности HIF-1 или гамма-секретазы, соответственно, не происходит.

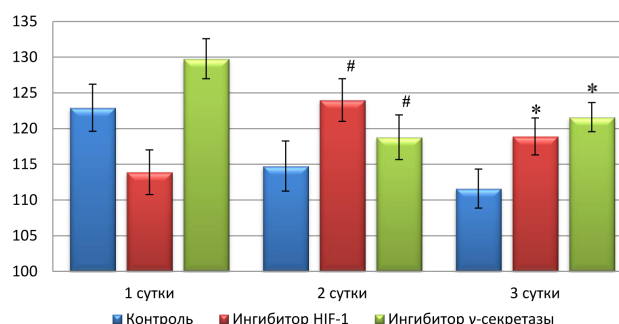


Рисунок 3. Изменение трансэндотелиального сопротивления (ТЭС) при использовании FM19G11 и GSI-I в модели ГЭБ *in vitro*. * - отличие от контроля; # - отличие между первыми и вторыми сутками развития барьера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Согласно литературным данным, применённый нами модулятор HIF-1 – FM19G11 – предотвращает аккумуляцию HIF-1α и HIF-2α белков в условиях гипоксии, однако может стабилизировать HIF в нормоксических условиях, действуя mTOR-зависимым механизмом, что обеспечивает стимуляцию метаболизма глюкозы [14]. Мы обнаружили, что реализация этого эффекта в астроцитах и нейронах, полученных из эмбриональных нейросфер, способствует формированию ГЭБ *in vitro* при дальнейшем сокультивировании этих клеток с клетками церебрального эндотелия. Обнаруженное нами увеличение экспрессии VEGF при действии FM19G11 может свидетельствовать о том, что в клетках развивающейся нейроваскулярной единицы экспрессия VEGF преимущественно дифференцированно регулируется HIF-опосредованными механизмами, что косвенно подтверждается данными об относительной независимости продукции VEGF в астроцитах от активности HIF-2α [21], а также данными об отсутствии прямого стимулирующего эффекта VEGF астроцитарного происхождения на ангиогенез [22].

Мы обнаружили, что при применении модуляторов HIF-1 при развитии нейронов и астроцитов, формирующих в последующем ГЭБ *in vitro*, эффективность барьерогенеза увеличивается, а проницаемость барьера не меняется, несмотря на возрастание экспрессии факторов, способствующих её увеличению (VEGF, MMP-9). Функциональная

связь HIF-1 с гамма-секретазой и механизмами сигнального пути Notch [19] позволяет предполагать, что применение FM19G11 и GSI-I имеет однонаправленные эффекты в отношении барьерогенеза *in vitro* за счёт стимуляции гамма-секретазы и сигнального пути Notch в условиях нормоксии. Ранее было показано, что прямое взаимодействие протеолитически отщеплённого внутриклеточного домена Notch ICD с HIF-1 транскрипционным фактором способствует поддержанию недифференцированного состояния клеток [23]. В то же время, подавление активности HIF-1 ингибитором FM19G11 в наномолярных концентрациях способствует дифференцировке стволовых клеток [14]. Интересно, что в условиях гипоксии HIF-1α может выступать в качестве субъединицы гамма-секретазы, способствуя проявлению её активности [19], однако насколько такой механизм актуален в клетках в состоянии нормоксии, остаётся не выясненным. Мы полагаем, что наиболее вероятной причиной того, что применение FM19G11 в отношении клеток-предшественников нейронов и астроцитов в модели развивающегося ГЭБ *in vitro* способствует эффективному барьерогенезу, является интенсификация процессов дифференцировки клеток-компонентов нейроваскулярной единицы неэндоцелиального происхождения. В целом, это определяет значимость астроглиального и нейронального окружения в формировании ГЭБ на самых ранних этапах онтогенеза в развивающемся головном мозге.

Мы установили, что применение GSI-I в развивающихся клетках неэндоцелиальной природы закономерно приводит к снижению экспрессии VEGF, что, на фоне увеличения продукции факторов с антиангиогенной активностью (тромбоспондины), способствует стабилизации формирующегося барьера. Известно, что VEGF-опосредованная регуляция Notch-сигнальной трансдукции в клетках эндотелия определяет характер активации концевых клеток и клеток ствола (tip and stalk cells) и обуславливает про- или антиангиогенную активность, что эффективно контролируется путём применения ингибиторов гамма-секретазы в клетках эндотелия [13]. В целом, в нашей экспериментальной модели мы продемонстрировали, что HIF-1-сопряжённые механизмы регуляции активности клеток астроглиальной и нейрональной природы в развивающемся ГЭБ способствует эффективному барьерогенезу *in vitro*.

Принимая во внимание то, что расшифровка механизмов регуляции проницаемости ГЭБ – одна из актуальных задач нейробиологии и нейрофармакологии, в том числе в контексте разработки новых моделей ГЭБ *in vitro* [24], поиск новых подходов к управлению барьерогенезом будет способствовать решению проблемы направленной доставки препаратов с нейротропной активностью и фармакотерапии заболеваний головного мозга, связанных с развитием патологической проницаемости барьера.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 14-25-00054).

ЛИТЕРАТУРА

- Hawkins B.T., Davis T.P. (2005) Pharmacol. Rev., **57**(2), 173-185.
- Obermeier B., Daneman R., Ransohoff R.M. (2013) Nat. Med., **19**(12), 1584-1596.
- Alyautdin R., Khalin I., Nafeeza M.I., Haron M.H., Kuznetsov D. (2014) Int. J. Nanomedicine, **9**, 795-811.
- Yan L.-J., Xiao M., Chen R., Cai Z. (2013) Aging. Neurodegener., **1**(1), 714.
- Fan X., Liu T., Liu Y., Ma X., Cui Z. (2009) Biotechnol. Prog., **25**(2), 499-507.
- Biron K.E., Dickstein D.L., Gopaul R., Jefferies W.A. (2011) PLoS One, **6**(8), e23789.
- Tian W., Sawyer A., Kocaoglu F.B., Kyriakides T.R. (2011) Am. J. Pathol., **179**(2), 860-868.
- Duan L.-J., Takeda K., Fong G.-H. (2014) PLoS One, **9**(1), e84736.
- Liu W., Shen S.-M., Zhao X.-Y., Chen G.-Q. (2012) Int. J. Biochem. Mol. Biol., **3**(2), 165-178.
- Zhang Z., Yan J., Chang Y., Honglian Shi H. (2011) Curr. Med. Chem., **18**(28), 4335-4343.
- Salmina A.B., Kuvacheva N.V., Morgun A.V., Komleva Y.K., Pozhilenkova E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Taranushenko T.E., Petrova L.L. (2015) Int. J. Biochem. Cell Biol., **64**, 174-184.
- Qiang L., Wu T., Zhang H.-W., Lu N., Hu R., Wang Y.-J., Zhao L., Chen F.-H., Wang X.-T., You Q.-D., Guo Q.-L. (2012) Cell Death and Differentiation, **19**, 284-294.
- Blanco R., Gerhardt H. (2013) Cold. Spring. Harb. Perspect. Med., **3**(1), a006569.
- Moreno-Manzano V., Rodriguez-Jiménez F.J., Aceña-Bonilla J.L., Fustero-Lardies S., Erceg S., Dopazo J., Montaner D., Stojkovic M., Sánchez-Puelles J.M. (2010) J. Biol. Chem., **285**(2), 1333-1342.
- Assar M. El., Sánchez-Puelles J.M., Royo I., López-Hernández E., Sánchez-Ferrer A., Aceña J.L., Rodríguez-Mañas L., Angulo J. (2015) Br. J. Pharmacol., **172**(5), 1277-1291.
- Хилажеева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.П., Салмина А.Б. (2015) Цитология, **57**(10), 710-713.
- Plane J.M., Andjelkovic A.V., Keep R.F., Parent J.M. (2010) Neurobiol. Dis., **37**(1), 218-227.
- Zhu Y., Lee C., Shen F., Du R., Young W.L., Yang G.Y. (2005) Stroke., **36**(7), 1533-1537.
- Villa J.C., Chiu D., Brandes A.H., Escorcía F.E., Villa C.H., Maguire W.F., Hu C.J., de Stanchina E., Simon M.C., Sisodia S.S., Scheinberg D.A., Li Y.M. (2014) Cell Rep., **8**(4), 1077-1092.
- Meng X., Matlawska-Wasowska K., Girodon F., Mazel T., Willman C.L., Atlas S., Chen I.M., Harvey R.C., Hunger S.P., Ness S.A., Winter S.S., Wilson B.S. (2011) Leukemia., **25**(7), 1135-1146.
- Chavez J.C., Baranova O., Lin J., Pichiule P. (2006) J. Neurosci., **26**(37), 9471-9481.
- Weidemann A., Krohne T.U., Aguilar E., Kurihara T., Takeda N., Dorrell M.I., Simon M.C., Haase V.H., Friedlander M., Johnson R.S. (2010) Glia, **58**(10), 1177-1185.
- Gustafsson M.V., Zheng X., Pereira T., Gradin K., Jin S., Lundkvist J., Ruas J.L., Poellinger L., Lendahl U., Bondesson M. (2005) Dev. Cell, **9**(5), 617-628.
- Ряевский О.А., Солодова С.Л., Лагунин А.А., Порошков В.В. (2014) Биомед. химия, **60**(2), 161-181. DOI: 10.18097/PBMC20146002161

Поступила: 06. 07. 2016.
Принята к печати: 11. 10. 2016.

**DEVELOPMENT OF BLOOD-BRAIN BARRIER UNDER THE MODULATION OF HIF ACTIVITY
IN ASTROGLIAL AND NEURONAL CELLS *IN VITRO***

*V.A. Ruzaeva, A.V. Morgun, E.D. Khilazheva, N.V. Kuvacheva, E.A. Pozhilenkova, E.B. Boitsova,
G.P. Martynova, T.E. Taranushenko, A.B. Salmina*

Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University,
1 Partizana Zheleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022 Russia; tel: (391) 228-07-69; e-mail: Veronikaruz@mail.ru

Barrierogenesis is the process of maturation of the primary vascular network of the brain responsible for the establishment of the blood-brain barrier. It represents a combination of factors that, on the one hand, contribute to the process of migration and tubulogenesis of endothelial cells (angiogenesis), on the other hand, contribute to the formation of new connections between endothelial cells and other elements of the neurovascular unit. Astrocytes play a key role in barrierogenesis, however, mechanisms of their action are still poorly examined. We have studied the effects of HIF-1 modulators acting on the cells of non-endothelial origin (neurons and astrocytes) on the development of the blood-brain barrier *in vitro*. Application of FM19G11 regulating expression of HIF-1 activity and GSI-1 suppressing gamma-secretase and/or proteasomal activity resulted in the elevated expression of thrombospondins and matrix metalloproteinases in the developing blood-brain barrier. However, it caused the opposite effect on VEGF expression thus promoting barrier maturation *in vitro*.

Key words: blood-brain barrier, barrierogenesis, neurovascular unit, angiogenesis, HIF-1 modulators