

В.П. Чехонин<sup>1,2</sup>, В.П. Баклаушев<sup>1,2</sup>, Г.М. Юсубалиева<sup>1,2</sup>, Н.Е. Волгина<sup>1,2</sup>, О.И. Гурина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» МЗ РФ

## Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера

*Работа обобщает фундаментальные и прикладные исследования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), проведенные коллективом авторов в течение последних 20 лет. Приводятся данные, полученные при изучении молекулярной анатомии барьерных микрососудов; анализируются специфические маркеры церебрального эндотелия и белки клеток нервной ткани, ассоциированные с формированием и функционированием ГЭБ. В экспериментах по культивированию церебральных эндотелиоцитов характеризуются условия, необходимые для формирования адекватной модели ГЭБ in vitro. Анализируются результаты исследования проницаемости ГЭБ для макромолекул в норме и при различных патологических условиях (повреждение ионизирующим излучением, осмотический шок, ишемия нервной ткани). Отдельный раздел посвящен морфологическим и функциональным изменениям эндотелиоцитов церебральных микрососудов, происходящим при опухолевом неангиогенезе. Приводятся экспериментальные данные, подтверждающие нарушение проницаемости микрососудов интрацеребральных опухолей для пероксидазы, альбумина и моноклональных антител. Обосновывается применение моноклональных антител к опухоли-ассоциированным белкам-мишеням для адресной доставки диагностических и лекарственных препаратов в головной мозг.*

**Ключевые слова:** гематоэнцефалический барьер, церебральные эндотелиоциты, астроциты, моноклональные антитела, адресная доставка.

66

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) — высокоорганизованная морфофункциональная система, включающая церебральные эндотелиоциты и комплекс поддерживающих структур: базальную мембрану, перициты и астроциты. За редким исключением ГЭБ хорошо развит во всех сосудах церебрального микроциркуляторного русла диаметром менее 100 мкм. Эти сосуды, включающие в себя собственно капилляры, а также пре- и посткапилляры, объединяются в понятие микрососуды. ГЭБ выполняет барьерную, метаболическую, транспортную, иммунную и нейросекреторную функции, без которых невозможно нормальное функционирование ЦНС. Первичной и важнейшей структурой ГЭБ являются эндотелиоциты церебральных микрососудов (ЭЦМ). Вследствие своей уникальной локализации на границе

раздела ЦНС и сосудистого русла они имеют специфические морфофункциональные характеристики, обеспечивающие барьерные функции и транспорт веществ через ГЭБ. Уникальными структурными характеристиками ЭЦМ являются: наличие плотных контактов, соединяющих мембраны соседних клеток, как замок «молния», высокое содержание митохондрий, низкий уровень пиноцитоза и отсутствие фенестр [1–4]. Данные барьерные свойства эндотелия обуславливают очень высокое трансэндотелиальное сопротивление (от 4000 до 8000 W/cm<sup>2</sup> in vivo [5] и до 800 W/cm<sup>2</sup> [6, 7] в кокультурах эндотелиоцитов с астроцитами in vitro) и практически полную непроницаемость монослоя барьерного эндотелия для гидрофильных веществ. Необходимые ЦНС питательные вещества (глюкоза, аминокислоты, витамины и пр.),

V.P. Chehonin<sup>1,2</sup>, V.P. Baklaushev<sup>1,2</sup>, G.M. Yusubaliyeva<sup>1,2</sup>, N.E. Volgina<sup>1,2</sup>, O.I. Gurina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Medical Research University Ministry of Healthcare and Social Development of Russia, Moscow

<sup>2</sup> Federal State Institution «Serbsky State scientific centre of social and forensic psychiatry» Ministry of Healthcare and Social development, Moscow

## Fundamental and applied aspects of the blood-brain barrier research

*The results of fundamental and applied studies of blood-brain barrier had been conducted by authors during the last 10 years are summarized in the publication. The molecular anatomy of barrier microvessels, as well as promising markers of BBB and other proteins involved in barrier functions are discussed. Via in vitro experiments with endothelial cells of cerebral microvessels we characterized the basic conditions required for adequate BBB modeling. The in vivo data of BBB permeability for macromolecules in normal and different pathological processes including radiation injury, hyperosmotic shock, and nervous tissue ischemia are properly described. A particular attention was focused upon the experimental studies of the permeability and functional reorganization of barrier endothelium during tumor neoangiogenesis. We detected a dramatically increased permeability of neoplastic microvessels both for horseradish peroxidase/serum albumin and labeled monoclonal antibodies. The increased tumor permeability for IgG and the overexpression of target antigens in tumor tissue and peritumoral zone make possible the targeted delivery of diagnostics and therapeutic agents into the tumor by means of monoclonal antibodies.*

**Key words:** blood-brain barrier, cerebral endotheliocytes, astrocytes, monoclonal antibodies, targeted delivery.

а также все белки транспортируются через ГЭБ только активно (т.е. с затратой АТФ): либо путем рецепторопосредованного эндоцитоза, либо с помощью специфических транспортеров [2].

Трудно переоценить роль ГЭБ в нормальном функционировании центральной нервной системы. В то же время наличие ГЭБ является ключевым фактором, ограничивающим возможности фармакотерапии нейропсихических заболеваний. В данной работе суммированы результаты исследований ГЭБ, проведенных нами в течение более 20 лет, посвященные как фундаментальным аспектам функционирования церебрального эндотелия и экспрессии необходимых для этого специфических белков, так и прикладным аспектам адресной доставки в мозг высокомолекулярных веществ.

### Молекулярная анатомия ГЭБ

Исследования молекулярной анатомии ГЭБ были сфокусированы на селективных маркерах церебрального эндотелия, маркерах патологии ГЭБ и белках астроцитов, модулирующих функцию ЭЦМ и имеющих большое значение при развитии патологии ГЭБ.

В качестве специфического маркера ЭЦМ мы исследовали эндотелиальный барьерный антиген (*EBA*, от англ. *endothelial barrier antigen*), который в настоящее время является единственным строго специфическим маркером барьерного церебрального эндотелия и, пожалуй, самым загадочным нейроспецифическим антигеном. Этот антиген впервые описан в работе L. Sternberger et al. в 1987 г. [8]. Моноклональные анти-*EBA* IgM, названные SMI 71, были получены при иммунизации мышей гомогенатом гипоталамуса крысы. При иммуноблоте препарата мембран ЭЦМ данные антитела визуализировали три бэнда с молекулярной массой 23, 25 и 30 кДа. Как выяснилось в результате аминокислотного сиквенса, эти полосы соответствовали гистонам, неспецифически взаимодействующим с IgM (L. Sternberger, личное сообщение). Отсутствие в литературе с 1987 г. данных о получении очищенного препарата *EBA*, вероятно, объясняется тем, что и дальнейшие попытки выделения этого белка не увенчались успехом. Вследствие этого, несмотря на более чем 15-летнюю историю, как функции, так и физико-химические свойства *EBA* на сегодняшний день неизвестны. Выдвигаемые гипотезы о том, что *EBA* является мембран-ассоциированным рецептором [9] или участвует в образовании плотных контактов, не получили обоснованного подтверждения.

Антитела SMI 71 являются не только органо-, но и видоспецифическими. При иммуногистохимическом окрашивании с помощью этих антител визуализируются исключительно микрососуды головного мозга крысы (рис. 1), причем в областях, содержащих фенестрированный эндотелий, где гематоэнцефалический барьер выражен слабо (*area postrema*, эпифиз, срединное возвышение), и в хориоидном сплетении экспрессия *EBA* значительно снижена [10]. Сосуды твердой мозговой оболочки практически не окрашиваются с помощью моноклональных антител к *EBA* [11].

В микрососудах других паренхиматозных органов (кишечник, почки, печень, щитовидная железа, поджелудочная железа) экспрессия данного антигена не выявляется. Кроме эндотелиоцитов, формирующих ГЭБ и гематоневральный барьер в периферической нервной системе, *EBA* частично экспрессируется в пиллярных микрососудах, структурах гематоретинального и гематотестикулярного



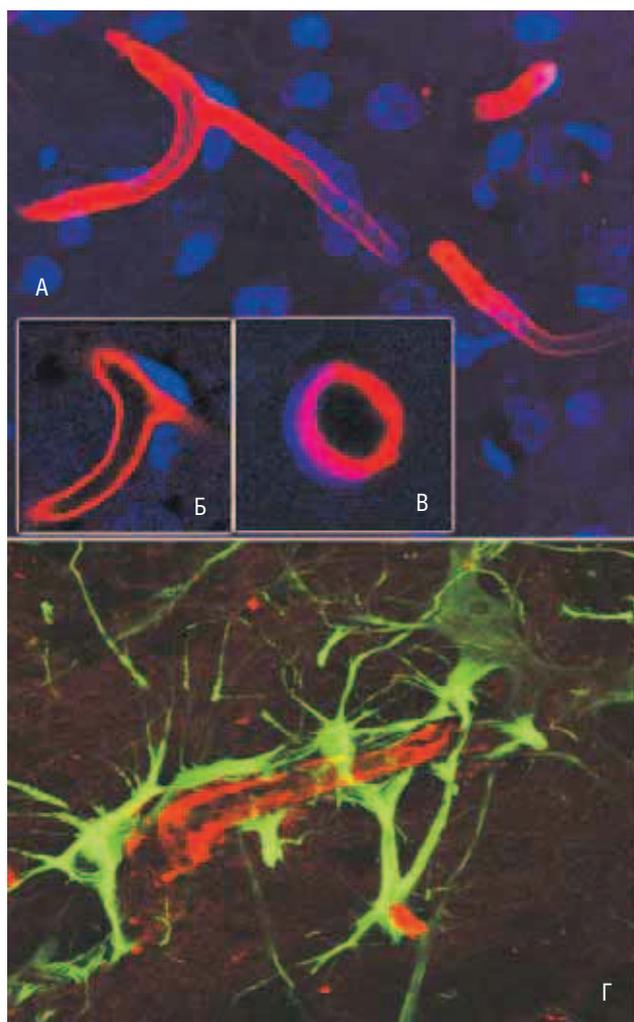
Рис. 1. Иммунопероксидазное окрашивание срезов мозга крысы с помощью моноклональных антител SMI 71 (ув.  $\times 200$ ). Вторичные антитела: BA-2000 (биотинилированные, Vector Lab, USA). Проявление иммунопероксидазной реакции с помощью ABC-комплекта (Vector Lab, USA).

барьера, а также в некоторых клетках селезенки (предположительно, в клетках Лангерганса) [8].

Мы исследовали субклеточную локализацию *EBA* методом сканирующей лазерной конфокальной микроскопии на микроскопе Nikon A1 с помощью антител SMI 71 (*Sternberger Inc.*), вторичных антител против иммуноглобулинов мыши, меченых Alexa 594 и маркера ДНК DAPI (Invitrogen). В результате этого исследования было обнаружено, что иммунофлуоресценция *EBA* локализуется исключительно на внутренней по отношению к ядру, т.е. на люминальной мембране (рис. 2 А–В).

Двойная иммунофлуоресцентная визуализация *EBA* и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) с помощью моноклональных антител SMI 71 (*Sternberger Inc.*) и поликлональных антител к рекомбинантному GFAP крысы, полученных в нашей лаборатории, показала, что все *EBA*-позитивные капилляры головного мозга оплетены плотной сетью отростков GFAP-позитивных астроцитов (рис. 2 Г).

В попытке повторить исследование L. Sternberger et al. мы выделяли церебральные эндотелиоциты из мозга крысы по методу Lidinsky et al. [12] и иммунизировали мышей препаратами мембранных фракций ЭЦМ [13]. В результате этой работы были получены моноклональные антитела 2mB6, специфически визуализирующие антиген микрососудов головного мозга (*AMVBI*). Аналогично *EBA*, этот антиген терял иммунохимическую активность при попытке солиubilизации из мембран ЭЦМ различными детергентами. Однако дальнейшее детальное исследование антител 2mB6 показало, что *AMVBI* и *EBA* — два разных антигена. *AMVBI*, в отличие от второго, преимущественно визуализировался в микрососудах мозжечка и гораздо в меньшей степени — в микрососудах больших полушарий (рис. 3). Также в отличие от *EBA* *AMVBI* помимо микрососудов мозжечка экспрессирован в сосудах селезенки. Исследование субклеточной локализации *AMVBI* показало, что этот антиген в эндотелиоцитах локализован на внешней, по отношению к ядру, т.е. на аблюминальной мембране (рис. 4). Экспрессия *AMVBI* в небарьерных эндотелиоцитах микрососудов селезенки и локализация этого антигена на аблюми-



**Рис. 2.** Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия *EBA* и *GFAP* на срезах мозга крысы: А — общий вид *EBA*-позитивных церебральных микрососудов (ув.  $\times 400$ ); Б, В — увеличенное ( $\times 640$ ) изображение церебральных капилляров в различных плоскостях: визуализируется люминальная (внешняя по отношению к ядрам) мембрана эндотелиоцитов; Г — двойная иммунофлуоресценция *EBA* (красная флуоресценция) и *GFAP* (зеленая флуоресценция).

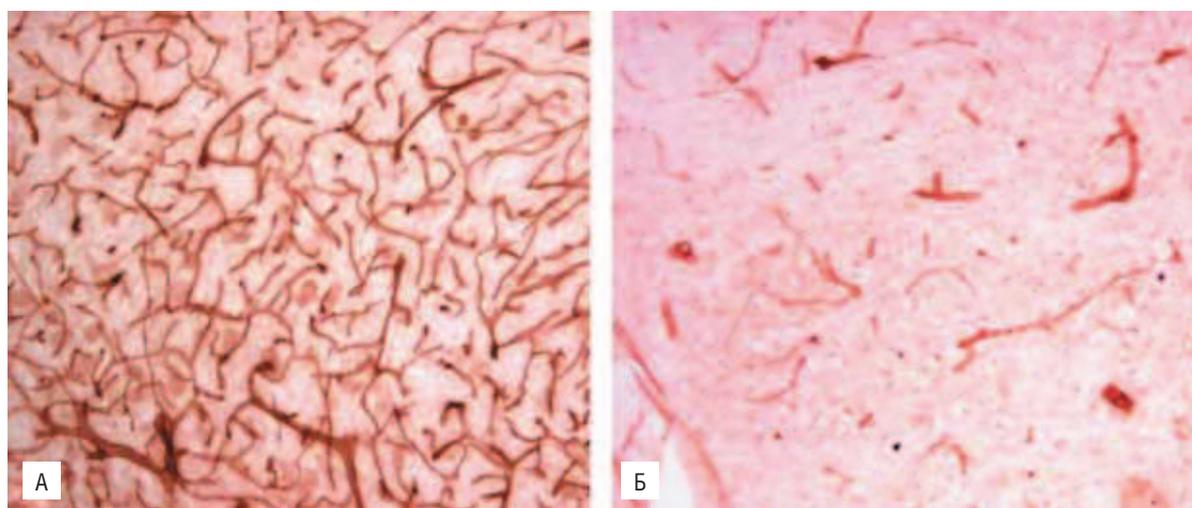
нальной мембране позволила нам сделать вывод, что, несмотря на его присутствие в церебральном эндотелии, он не ассоциирован напрямую с функциями ГЭБ.

Исследование специфических маркеров ЭЦМ наряду с иммуногистохимическим анализом белков плотных контактов сделало возможным фенотипирование дефинитивного церебрального эндотелия как на срезах головного мозга, так и в культуре, в частности при моделировании ГЭБ.

### Моделирование ГЭБ *in vitro*

Проведение широкого ряда исследований, в том числе скрининг-потенциальных нейро- и психотропных препаратов, требует адекватной и воспроизводимой модели ГЭБ *in vitro*. Основное требование, предъявляемой к такой модели, — наличие объективных признаков барьерного эндотелия: высокого трансэндотелиального сопротивления и низкой проницаемости для гидрофильных низкомолекулярных трейсеров. Как уже было сказано, в церебральном эндотелии, формирующем ГЭБ, ключевым морфофункциональным элементом, определяющим барьерные, транспортные и сигнальные функции, являются межклеточные плотные контакты, образованные трансмембранными и цитоплазматическими белками [14]. Синтез этих белков, формирование и поддержание функции плотных контактов напрямую зависит от микроокружения церебрального эндотелия. Воссоздание этого микроокружения *in vitro* может способствовать развитию барьерных свойств у изначально небарьерного эндотелия [15].

Селективная проницаемость эндотелия регулируется плотными межклеточными контактами, представляющими собой комплекс структур, сформированных трансмембранными адгезивными молекулами, сочлененными с сетью внутриклеточных сигнальных партнеров и связанных с цитоскелетом белков. Данные электронной микроскопии свидетельствуют [16], что межэндотелиальные плотные контакты присутствуют в сосудистом русле в разной степени комплексности в зависимости от фенотипа эндотелия, определяемого локальным микроокружением. Так, в образующих ГЭБ эндотелиоцитах мозговых капилляров, где особенно необходим контроль



**Рис. 3.** Иммуногистохимический анализ эндотелиального антигена *AMVBI* с помощью моноклональных антител 2mB6 на срезах мозга крысы (ув.  $\times 100$ ): А — кора мозжечка; Б — кора больших полушарий. Вторичные биотинилированные антитела BA-2000 (Vector Lab, USA); проявление с помощью комплекса авидин-биотин-пероксидаза (Vector Lab, USA).

проницаемости, плотные контакты развиты значительно лучше, чем в других микрососудах [15, 17]. Мобильность контактов, способность быстро изменять архитектурную организацию позволяют в короткие сроки регулировать клеточную адгезию, межклеточный транспорт, запускать сигнальные каскады.

Как функционально-активная единица каждый плотный контакт сформирован трансмембранными и цитоплазматическими белками, объединяющими белки цитоскелета и плотных контактов в жесткий клеточный каркас. Основные трансмембранные белки плотного контакта — окклюдин и клаудин-5 — экспрессируются исключительно в эндотелии и участвуют в регуляции барьерных свойств через сигнальные белки путем адапторных взаимодействий с цитоплазматическими белками ZO-1, ZO-2, ZO-3 [18].

Неизбежная проблема при работе с первичными культурами эндотелиальных клеток *in vitro* — быстрая утрата характеристик, обеспечивающих их барьерную функцию. Дедифференцировка является результатом изъятия клеток из их естественного микроокружения, необходимого для формирования барьерного фенотипа. При этом даже кокультивирование эндотелиальных клеток с теми или иными клеточными компонентами микроокружения не всегда приводит к формированию полноценного барьерного фенотипа [19, 20].

Общепринятой моделью гематоэнцефалического барьера считается кокультура церебральных эндотелиоцитов и астроцитов [21, 22] с добавлением циклического аденозинмонофосфата (сАМФ) [23], гидрокортизона, дексаметазона [24]. Данная культура при кокультивировании с астроцитами в большом количестве экспрессирует белки плотных контактов (рис. 5 А, Б). Однако на практике церебральные эндотелиоциты человека и животных являются очень труднодоступным материалом, требующим сложных методических приемов по диссоциации, делипидизации и очистке. Гораздо более доступным источником эндотелиальных клеток человека является большая вена пуповины. Несмотря на отсутствие ряда свойств, характерных для барьерного фенотипа, эндотелиальные клетки пуповинного происхождения применимы для моделирования гематоэнцефалического барьера *in vitro* при условии, что правильно подбирается микроокружение, формирующее комплексные плотные контакты [18, 23].

Для создания доступной и воспроизводимой скрининговой модели гематоэнцефалического барьера мы использовали культуру клеток пуповинной вены человека (HUVES). Этот материал является легко доступным, и получение его не связано с решением этических проблем. Культуру HUVES мы получали по методике Eric A. Jaffe [25] с некоторыми нашими модификациями.

Эндотелиоциты в первичной культуре клеток из пуповины человека HUVES идентифицировали иммуноцитохимически с помощью антител к фактору фон Виллебранда и по поглощению ацелированного липопротеина низкой плотности [26]. Почти 100% пула выделенных эндотелиоцитов характеризовались высоким уровнем экспрессии рецептора Ас-LDL, и наличием специфических органелл — телец Вейбеля—Паладе — депо для хранения фактора фон Виллебранда (рис. 6 Б, В). Морфологию клеток оценивали посредством фазово-контрастной микроскопии, на ранних пассажах монослой эндотелиальных клеток выглядит как «булыжная мостовая» (рис. 6 А).

Культура астроцитов, полученных из биоптатов головного мозга человека, была охарактеризована по

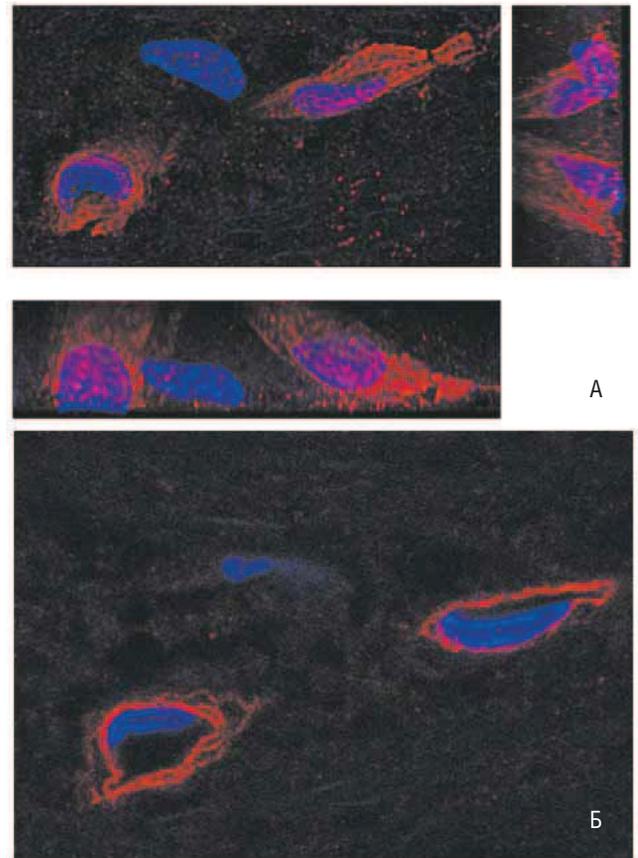


Рис. 4. Субклеточная локализация эндотелиального антигена *AMVBI* (сканирующая лазерная конфокальная микроскопия): А — максимальная проекция по оси Z; Б — поперечный срез мозгового капилляра. Вторичные антитела, меченные Texas Red (Chemicon); ядра клеток докрашены DAPI (Invitrogen).

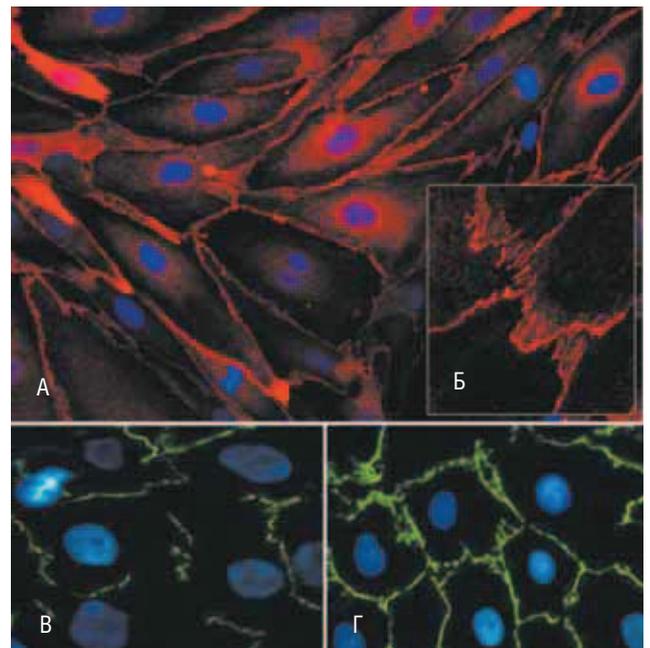
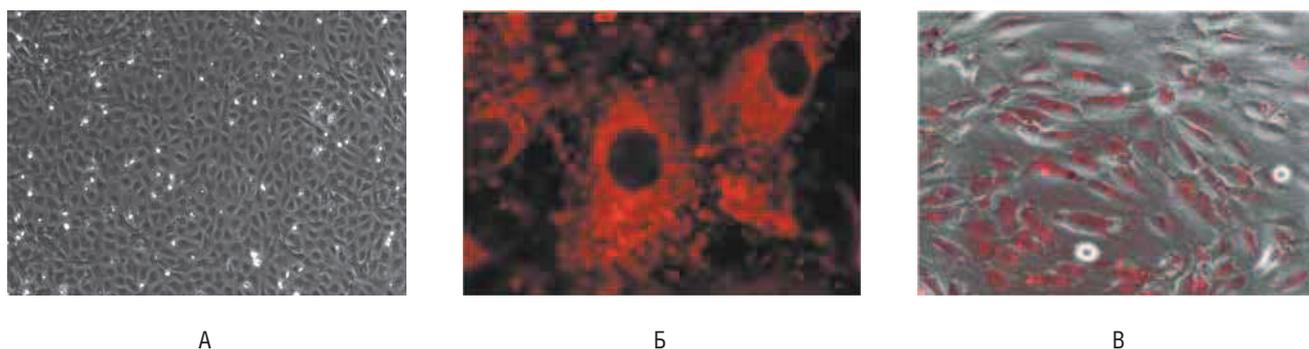


Рис. 5. Моделирование гематоэнцефалического барьера *in vitro*: А — культура ЕВА-позитивных эндотелиоцитов церебральных микрососудов крысы, окрашенных с помощью антител к ZO-1. Вторичные антитела Goat anti-rabbit Alexa Fluor 633 (ув.  $\times 400$ ); Б — увеличенный фрагмент ( $\times 1000$ ); В — монокультура HUVES; Г — кокультура HUVES и астроцитов человека. Иммунопроявление антителами к клаудину-5.



**Рис. 6.** Культура HUVEC: А — монослой эндотелиальных клеток на 7-й день культивирования (ув.  $\times 10$ ); Б — окрашивание с помощью антител к фактору фон Виллебранда (ув.  $\times 100$ ); В — захват клетками Dil-Ac-LDL (ув.  $\times 40$ ).

экспрессии GFAP (антитела получены О.И. Гуриной [27]) и нестина (Invitrogen). Большая часть астроцитов (85%) экспрессировала GFAP; доля нестин-положительных астроцитов в монослое составила 15%, при этом в 7% случаев наблюдалась колокализация нестина и GFAP, свидетельствующая о созревании этих клеток. Таким образом, иммунофенотипирование показало, что культура представлена в основном дифференцированными GFAP-положительными астроцитами (рис. 7).

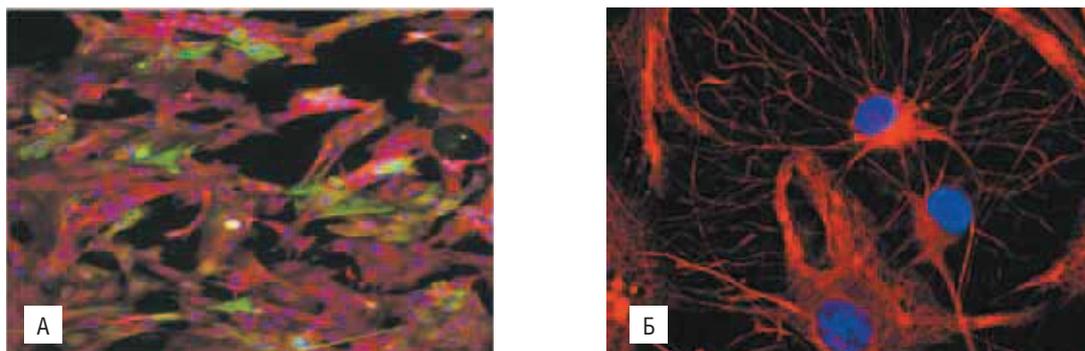
Используя технику двойного окрашивания, исследовали уровень экспрессии белков плотных контактов: окклюдина, клаудина-5, ZO-1 в эндотелиальных клетках, культивировавшихся в условиях ростовой среды, подвергавшихся влиянию факторов, продуцируемых астроцитами, а также воздействию производного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Известно, что окклюдин, клаудин-5 — интегральные мембранные белки, основные компоненты плотных контактов, характеризующие барьерный фенотип эндотелиальных клеток. Как и ожидалось, клетки, культивировавшиеся в ростовой среде без воздействия дополнительных экзогенных стимулов, показали очень низкий уровень экспрессии клаудина-5 (рис. 5 В), диффузное прерывистое распределение ZO-1 на границе базолатеральной плазмолеммы. При этом преимущественно наблюдалась точечная локализация окклюдина вдоль мембраны, характерная для дефосфорилированной формы белка, не принимающей участия в образовании контактов.

Иная картина наблюдалась при исследовании белков плотных контактов культур эндотелиоцитов, подвергавшихся влиянию кондиционированной среды от астро-

цитов и производного цАМФ. С помощью антител к окклюдину визуализировались фрагменты в области взаимодействия плазмолемм соседних клеток. Интенсивное окрашивание антителами к ZO-1 и клаудину-5 наблюдалось по всей периферии клеточной мембраны (рис. 5 Г).

На следующем этапе была проведена количественная оценка экспрессии исследуемых белков методом иммуноблоттинга. Результаты анализа (рис. 8) свидетельствуют, что при кокультивировании эндотелиальных клеток с астроцитами уровень окклюдина в лизатах увеличился в 1,8 раза, ZO-1 — в 2 раза, клаудина-5 — в 3,4 раза. Показано значительное повышение синтеза белков плотных контактов клетками, стимулированными производным цАМФ: в 1,4 раза для окклюдина, в 2,6 раза для клаудина-5, количество цитоплазматического ZO-1 возрастает в 1,9 раз.

Одним из способов оценки функциональной целостности плотных контактов является измерение трансэндотелиального сопротивления ( $\text{Ом} \times \text{см}^2$ ). В наших экспериментах максимальное значение сопротивления было детектировано на 7-й день совместного культивирования клеток культуры HUVEC и аллогенных астроцитов. В дальнейшем, вероятно, вследствие «старения» культуры показатели трансэндотелиального сопротивления снижались, однако все равно были достоверно выше аналогичных значений в контрольной монокультуре, не подвергшейся воздействию кондиционированной астроцитами среды. Наиболее пролонгированный и стабильный эффект повышения трансэндотелиального сопротивления достигался при совместном культивировании HUVEC с астро-



**Рис. 7.** Иммуноцитохимический анализ культуры астроцитов человека: А — соотношение дифференцированных GFAP-положительных (красная флуоресценция) и незрелых нестин-положительных (зеленая флуоресценция) астроцитов в культуре (ув.  $\times 200$ ); Б — двуядерный GFAP-положительный астроцит, визуализация промежуточных филаментов (ув.  $\times 1000$ ). Ядра клеток — DAPI (Invitrogen).

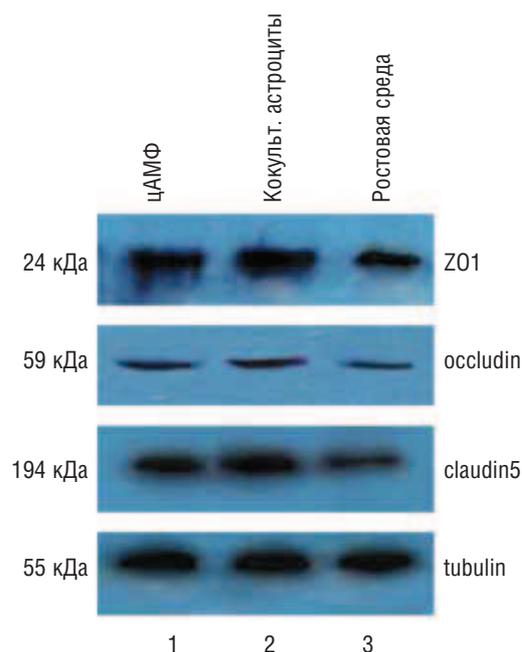
цитами. Специфичность влияния GFAP-положительных астроцитов на повышение трансэндотелиального сопротивления была подтверждена при измерении данного параметра у эндотелиальных клеток, кокультивированных с мышинными фибробластами, значения которого оказались близкими к значениям монослоя эндотелиальных клеток. Количественный анализ проницаемости эндотелиального монослоя клеток для низкомолекулярного натрий-флуоресцеина показал, что при совместном культивировании эндотелиоцитов и астроцитов, проницаемость достоверно ниже аналогичного показателя в контрольной монокультуре.

Таким образом, нам удалось количественно и качественно показать потенцирующее действие аллогенных астроцитов на приобретение барьерных свойств эндотелием нецеребрального происхождения, проявляющееся в виде усиления экспрессии белков плотных контактов: окклюдина, клаудина-5 и ZO 1, повышение трансэндотелиального сопротивления и снижения проницаемости для низкомолекулярных гидрофильных веществ. Эффект, оказываемый астроцитами, оказался более выраженным и пролонгированным по сравнению с воздействием цАМФ, известного вторичного мессенджера (посредника) в сигнальной передаче. То, что эндотелиальные клетки нецеребрального происхождения оказались восприимчивыми к влиянию аллогенных астроцитов, говорит в пользу общности происхождения эндотелия и достаточной гибкости изменения экспрессии белков, обеспечивающих скорее сохранение определенного фенотипа, нежели чем его изменение.

Показано, что в монокультуре HUVEC наблюдается базальная экспрессия исследуемых белков плотных контактов, которая, однако, не приводит к формированию в монослое HUVEC барьерных характеристик. Повышение уровня экспрессии интегральных белков плотных контактов в базолатеральной области плазмолеммы оказалась необходимым условием для увеличения трансэндотелиального сопротивления, значения которого, однако, не достигли уровня, характерного для церебрального эндотелия (до  $800 \text{ W/cm}^2$ ) [7]. Наблюдаемое в случае кокультивирования HUVEC с аллогенными астроцитами снижение проницаемости для низкомолекулярного трейсера, тем не менее, позволяет рассматривать данную систему как модель для исследования различных физиологически активных веществ, влияющих на проницаемость эндотелиального барьера, организацию плотных контактов и трансэндотелиальный транспорт. Преимуществами ее является относительная доступность и простота получения монокультур эндотелиальных клеток из пуповины по сравнению с церебральным эндотелием, что делает ее применимой в качестве скринингового теста по исследованию трансэндотелиальной проницаемости ксенобиотиков и новых биологически активных веществ. Кроме того, данная модель применима при исследовании функциональной перестройки барьерного эндотелия, происходящей под воздействием различных патологических факторов.

#### Молекулярные и клеточные механизмы патологии ГЭБ

Как в фундаментальном аспекте — для выяснения функциональной роли различных белков ЭЦМ и астроцитов, так и в прикладном отношении — для разработки систем направленного транспорта, актуальным является исследование морфофункциональных перестроек ГЭБ



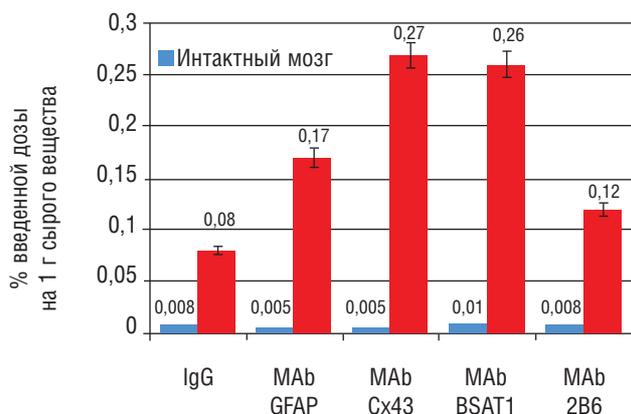
**Рис. 8.** Экспрессия белков плотных контактов в лизатах эндотелиальных клеток: 1 — эндотелиальные клетки, стимулированные воздействием цАМФ; 2 — кокультивированные с астроцитами; 3 — эндотелиальные клетки в условиях ростовой среды.

при различной патологии, обуславливающих изменение его проницаемости.

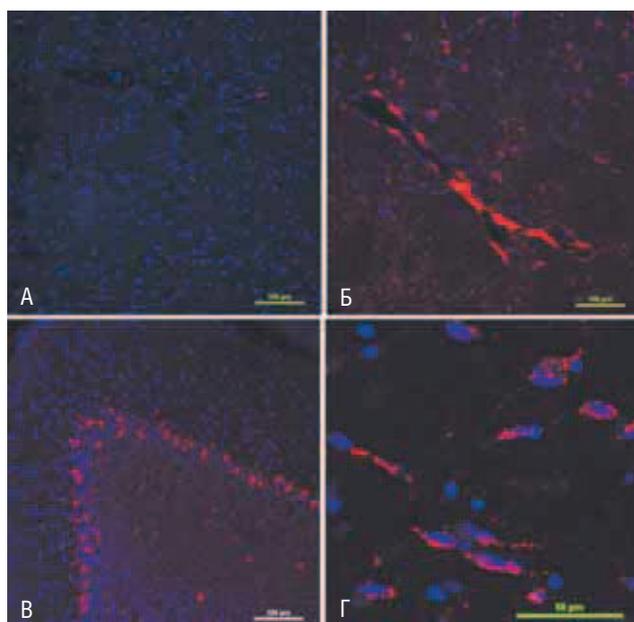
Различные альтерирующие воздействия, такие как травмы [28], ишемия [29, 30], нейроинфекции [31], воздействие физических факторов (ионизирующее излучение, осмотический шок и пр.) [32] приводят к нарушению целостности ГЭБ. Данный феномен, с одной стороны, способствует выходу забарьерных нейроспецифических антигенов в системных кровотоков, что позволяет проводить их детекцию [33], с другой стороны, это делает возможным проникновение высокомолекулярных веществ, в том числе и антител, из системного кровотока в интерстициальную жидкость мозга [30, 34–36]. На этом феномене базируются многочисленные попытки адресной доставки как собственно антител, так и различных наночастиц, векторизованных антителами в очаг с патологически повышенной проницаемостью ГЭБ.

#### Проницаемость ГЭБ после альтерации физическими факторами

Мы исследовали проницаемость ГЭБ в норме и при патологии, вводя внутривенно как высокомолекулярные трейсеры (пероксидаза хрена, краситель Еванса), так и меченые флуоресцентными и радиоактивными метками моноклональные антитела. Эксперименты по введению моноклональных антител здоровым крысам мы выполняли как в качестве отрицательных контролей при изучении различных альтерирующих воздействий и опухолевого неангиогенеза, так и, в частности, для того, чтобы подтвердить или опровергнуть поддерживаемую некоторыми исследователями гипотезу о регуляторной роли аутоантител к нейроспецифическим белкам в нормальной центральной нервной системе (ЦНС).

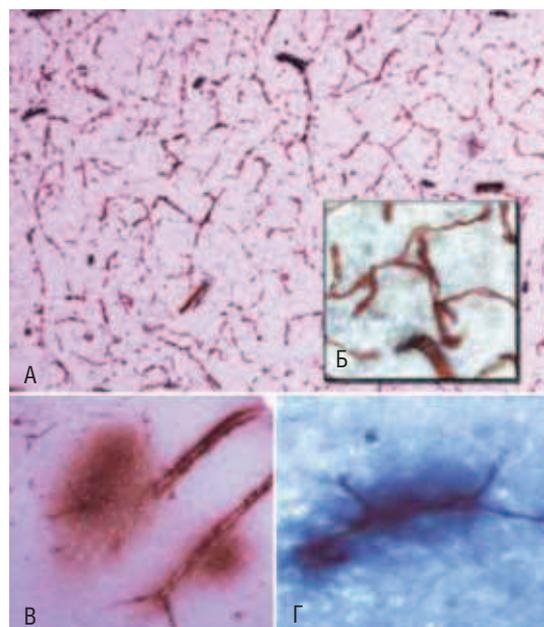


**Рис. 9.** Суммарные результаты оценки накопления радиоактивно меченых антител, вводимых внутривенно крысам с глиомой. Пояснения в тексте.



**Рис. 11.** Детекция меченных Alexa Fluor 660 антител к VEGF в коре мозга (Б, Г) и мозжечке (В) после внутривенного введения крысам на 14-е сутки после радиотерапии в суммарной дозе 36 Гр (сканирующая лазерная конфокальная микроскопия): А — кора мозга интактной крысы после внутривенного введения эквивалентного количества антител к VEGF. Меченные антитела определяются как в эндотелиоцитах церебральных капилляров (Б), так и в клетках нервной ткани, в частности в клетках Пуркинье (В). Г — увеличенный фрагмент коры головного мозга (отрезок 50 мкм).

Резюмируя многолетние исследования, посвященные анализу биораспределения антител различной специфичности, можно сделать вывод, что нормальный ГЭБ практически непроницаем для антител. При внутривенном введении широкого диапазона доз (20–250 мкг/кг) радиоактивно меченых иммуноглобулинов различной специфичности накопление их в паренхиме мозга никогда не превышало 0,01% введенной дозы (рис. 9, левые столбцы). Эти показатели накопления сопоставимы



**Рис. 10.** Исследование проницаемости ГЭБ на фоне осмотического шока, вызванного внутривенным введением маннитола: А — внутривенное введение пероксидазы хрена интактной крысе (ув.  $\times 100$ ); Б — увеличенный фрагмент этого же изображения ( $\times 400$ ); В, Г — экстравазация пероксидазы в состоянии осмотического шока ( $\times 400$ ). Проявление диаминобензидином с  $H_2O_2$ ; Г — усиление  $NiCl_2$ .

со значениями ошибки, обусловленной остаточной радиоактивностью крови после биораспределения антител.

Альтерирующие воздействия, такие как осмотический шок, ионизирующее излучение, токсические агенты и др., вызывают повреждение ГЭБ, по выраженности и длительности коррелирующее с интенсивностью повреждения. Так, внутривенное введение 10% маннитола в суммарной дозе, обуславливающей осмотический шок (2,5–5 г/кг), вызывает преходящее нарушение проницаемости ГЭБ, длящееся в течение 2–12 ч после введения. Внутривенное введение в этот период времени пероксидазы хрена (55 кДа) позволяет детектировать ее экстравазацию в паренхиме головного мозга (рис. 10).

Наиболее выраженное и продолжительное нарушение проницаемости ГЭБ вызывает локальная радиотерапия в суммарной дозе от 36 Гр и выше. Нарушение проницаемости ГЭБ для иммуноглобулинов в этом случае наблюдается в течение не менее 2 нед после окончания курса радиотерапии (рис. 11). Этот феномен делает вероятной выдвинутую ранее гипотезу о возможности аутоантительной агрессии по отношению к забарьерным церебральным антигенам при дефекте ГЭБ, обусловленном ионизирующим излучением [33].

#### Исследование экспрессии маркеров ГЭБ в неопластических микрососудах

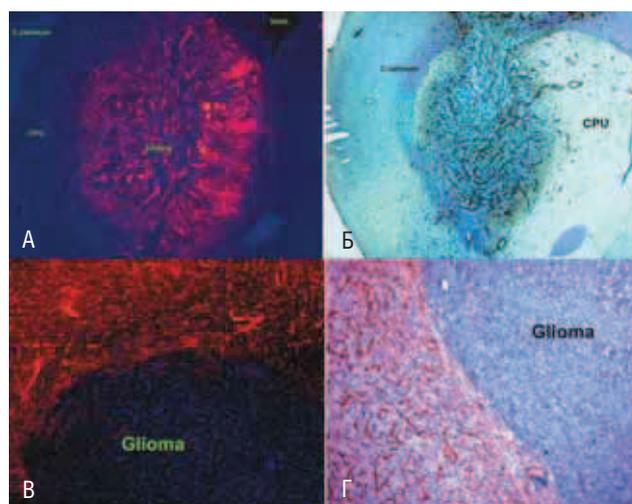
Среди заболеваний ЦНС, сопровождающихся наиболее выраженным и пролонгированным нарушением проницаемости ГЭБ, лидирующее место, безусловно, занимают низкодифференцированные опухоли головного мозга. Интенсивный неопластический ангиогенез в интрацеребральных опухолях приводит почти к полной перестройке барьерного эндотелия, вследствие чего кардинально

меняется профиль экспрессии как самих неопластических эндотелиоцитов, так и поддерживающих их клеток. В частности, неоангиогенез сопровождается повышенным синтезом рецепторов к тирозинкиназе (TKRs), факторам роста (VEGF, FGF, PDGF, ангиопоэтин-1 и 2), интегринам ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ) [37]. При этом в эндотелии появляются некоторые патологические белки, отсутствующие в нормальных условиях: PV-1 (Plasmalemmal vesicle associated protein-1) [38], PAL-E (Pathologische Anatomie Leiden-Endothelium) [39, 40], MECA 32 [41] и коннексин Cx43 [42]. Изменения, затрагивающие глиальные клетки, характеризуются, в частности, усиленной пролиферацией фибриллярных астроцитов, принимающих непосредственное участие в модулировании проницаемости гематоопухолевого барьера [43], однако феномен реактивного астроглиоза, обусловленного первичной опухолью мозга, до настоящего времени детально не изучен [43].

Одной из задач, которые мы решали при моделировании внутримозговой глиомы С6 на крысах [44], был иммуногистохимический анализ белков-маркеров, ассоциированных с ГЭБ: GFAP (кислый белок промежуточных филаментов фибриллярных астроцитов) и двух эндотелиальных антигенов: *EBA* и *AMVB1* в процессе развития глиомы. Антиген *EBA*, распознающийся моноклональными антителами SMI-71 (*Sternberger Inc.*), является специфическим маркером барьерного эндотелия церебральных микрососудов [45]. Как отмечалось выше, экспрессия *EBA* в высокой степени коррелирует с функциональной целостностью ГЭБ и нарушается при заболеваниях, сопровождающихся его повреждением [11, 46]. Выбор указанных белков (GFAP, *EBA* и *AMVB1*) позволяет, с одной стороны, охарактеризовать реактивный астроглиоз, сопровождающий патологию ГЭБ, а с другой, оценить молекулярные изменения в неопластических эндотелиоцитах, которые могли бы быть использованы для разработки систем направленного транспорта в микроциркуляторное русло глиомы.

Экспрессия исследуемых эндотелиальных антигенов в быстро растущих опухолевых микрососудах претерпела существенные изменения. С самых ранних сроков после имплантации в них наблюдалось практически полное отсутствие экспрессии *EBA*, выявляемое антителами SMI-71 (рис. 12 В, Г). В здоровой ткани вокруг опухоли иммунореактивность *EBA* сохранялась, но интенсивность его уменьшалась по мере приближения к опухолевому очагу. Отсутствие *EBA* в эндотелиоцитах неопластических микрососудов свидетельствовало о нарушении экспрессии белков, участвующих в образовании и поддержании функций ГЭБ.

Помимо отсутствия *EBA*, с 8-х суток после имплантации в опухолевых микрососудах была обнаружена повышенная экспрессия эндотелиального антигена, распознающегося MAb 2mB6 (рис. 12 А, Б). С помощью этих антител визуализировалась разветвленная сосудистая сеть опухоли, в то время как в нормальной паренхиме мозга в области каудопутамена — лишь отдельные положительные микрососуды. В дальнейшем (на 21-е и 28-е сутки), когда в опухоли возникали очаги центрального некроза, наблюдалось некоторое снижение интенсивности окрашивания с помощью MAb 2mB6 (как в опухолевой ткани, так и в сохранившейся интактной паренхиме); но так же, как и GFAP<sup>+</sup>-астроглиальный вал, 2mB6-положительные микрососуды в опухоли наблюдались на всем протяжении эксперимента. Повышение синтеза *AMVB1* может свидетельствовать о функциональных перестройках базальной мембраны и эндотелия в неопластических микрососудах.

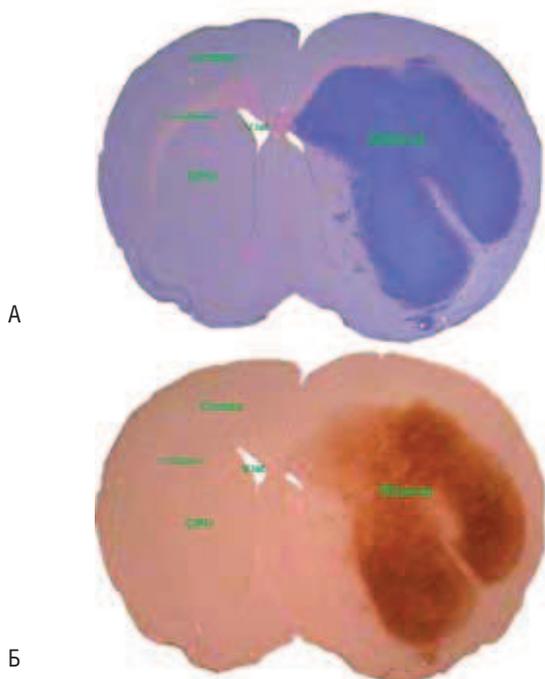


**Рис. 12.** Иммунофлуоресцентный анализ эндотелиальных маркеров при экспериментальной глиоме С6: А, Б — иммунофлуоресцентная и иммунопероксидазная визуализация *AMVB1* с помощью моноклональных антител MAb 2mB6; В, Г — аналогичное окрашивание эндотелиального барьерного антигена (*EBA*) с помощью антител SMI-71; А, В — вторые антитела — Texas Red; ядра клеток докрашены DAPI; Б, Г — биотинилированные вторые антитела и АВС-комплект (Vector Lab, USA). *Ventr.* — боковой желудочек; *C. callosum* — мозолистое тело; *CPU* — каудопутамен.

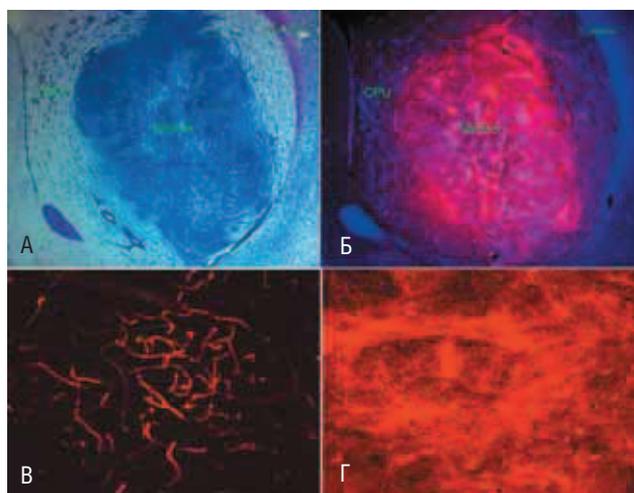
#### Исследование проницаемости эндотелиального барьера в микрососудах глиомы

Столь выраженные морфофункциональные перестройки, наблюдаемые в эндотелии опухолевых микрососудов, позволяют нам утверждать, что термин «гематоэнцефалический барьер» не вполне употребим в отношении сосудистой системы глиомы. Помимо исчезновения *EBA*, в эндотелиоцитах неопластических капилляров в значительной степени снижена экспрессия интегральных белков плотных контактов (окклюдин, клаудины, ZO-1, ZO-2) и других белков, участвующих в поддержании структурно-функциональной целостности барьера [47]. Несмотря на это, накоплению лекарственного препарата в мозге могут препятствовать эффлюксные системы мультилекарственной резистентности, в большом количестве продуцирующиеся в опухоли [48, 49]. Немаловажным фактором, влияющим на эффективность адресной доставки лекарственных препаратов в опухоль, является направление гидродинамического градиента. Показано, что на поздних стадиях заболевания давление в интерстициальной жидкости опухоли может быть сопоставимо или даже несколько выше, чем давление в микроциркуляторном русле, вследствие чего возникает обратный ток жидкости в капилляры и пассивная диффузия даже через небарьерный эндотелий становится невозможной [Banks et al., 2008]. Совокупность этих факторов позволяет говорить о гематоглиомном барьере, отличающемся от ГЭБ паттерном экспрессируемых белков и конкретными механизмами, препятствующими проникновению в опухоль высокомолекулярных веществ из кровотока.

Для качественной и количественной оценки проницаемости ГЭБ в опухоли мы применили известный еще со времен Пауля Эрлиха подход с внутривенным введением красителей или других хорошо детектируемых высокомолекулярных веществ. Примером таких веществ являются краситель Эванса (*Evans blue*, *EB*;



**74** **Рис. 13.** Срезы мозга крысы с экспериментальной глиомой после введения HRP, окрашенных по Нисслию (А) и проявленные диаминобензидином (Б). CPU — каудопутамен; Cortex — кора больших полушарий; C. callosum — мозолистое тело; V. lat. — боковой желудочек.



**Рис. 14.** Проницаемость гематоопухолевого барьера для комплексов красителя Эванса-альбумин: А — срез мозга с экспериментальной глиомой, окрашенный по Нисслию (ув.  $\times 20$ ); Б — флуоресцентная микроскопия этого же среза (красная флуоресценция — EV; синяя флуоресценция — DAPI, увеличение  $\times 20$ ); В — флуоресценция EV в пределах микроциркуляторного русла в интактной нервной ткани (ув.  $\times 200$ ); Г — экстравазация EV и визуализация опухолевых клеток в очаге глиомы (ув.  $\times 200$ ). Обозначения те же, что на рис. 7.

молекулярный вес в комплексе с сывороточным альбумином — 64 кДа), пероксидаза хрена (молекулярный вес — 55 кДа), а также меченные радиоизотопом рекомбинантные белки различной молекулярной массы [50]. Перечисленные макромолекулы практически не прони-

кают через нормальный ГЭБ, и поэтому могут служить маркерами его структурно-функциональной целостности. Преимуществом красителя Эванса является то, что он обладает флуоресцентными свойствами, что позволяет с высокой чувствительностью регистрировать его диффузию в направлении кровь—мозг с помощью флуоресцентной микроскопии [51]. При внутривенном введении в дозе 10–25 мг/кг краситель Эванса образует прочные комплексы с сывороточным альбумином. Возникновение красной флуоресценции в паренхиме мозга после введения красителя Эванса свидетельствует о патологической проницаемости гематоэнцефалического барьера.

С помощью этих двух методов нами было продемонстрировано критическое повышение эндотелиального монослоя неопластических микрососудов для высокомолекулярных веществ, приводящее к накоплению в опухоли как пероксидазы хрена, так и флуоресцирующих комплексов красителя Эванса с альбумином (рис. 13, 14). Эти исследования стали предпосылкой для применения моноклональных антител для адресной доставки диагностических и лекарственных препаратов в очаг глиомы.

#### Адресная доставка моноклональных антител в клетки глиальной опухоли

Моноклональные антитела (MAb) в настоящее время рассматриваются как наиболее перспективное средство адресной доставки лекарств к клеткам интрацеребральных опухолей. MAb, пригодные для этой цели, должны специфически распознавать антиген-мишень и не терять иммунохимическую активность *in vivo*. Для создания направленности MAb антиген-мишень должен присутствовать в опухоли в концентрации, намного превышающей его уровень в нормальных тканях, и при этом быть доступным для антител, циркулирующих в кровотоке. Помимо описанных выше антител к *AMVB1*, гиперэкспрессированного в неопластических микрососудах, потенциальными кандидатами для адресной доставки диагностических и лекарственных препаратов в глиальные опухоли являются антитела к GFAP, коннексину 43 (Cx43) и церебральному анионному транспортеру BSAT1.

Факторами, которые могут обеспечить адресную доставку с помощью антител к GFAP, являются избыточная экспрессия антигена-мишени астроцитами в перитуморальной зоне и критическое повышение проницаемости ГЭБ в неопластических микрососудах. BSAT1, описанный первоначально как мембранный белок ЭЦМ [52], был обнаружен нами в реактивных астроцитах и клетках низкодифференцированных глиом. Мембранная локализация BSAT1, отсутствие этого белка в эндотелиоцитах микрососудов других органов и тканей позволяет предполагать эффективную адресную доставку в очаг опухоли с помощью этих антител.

Еще одной перспективной молекулярной мишенью для адресной доставки наносистем в мозг является коннексин-43. Этот белок — основной структурный компонент щелевых контактов (*gap-junction*) между астроцитами, участвующими в функциях ГЭБ [53]. С помощью четырех трансмембранных доменов Cx43 образует гексамеры — коннексоны, формирующие пору в клеточной мембране. Посредством двух экстраклеточных фрагментов Cx43 (E1 и E2) гемиканалы соседних клеток формируют полноценный щелевой контакт, объе-

диняющий цитоплазмы этих клеток. С помощью таких каналов осуществляется поддержание ионного гомеостаза и клеточного объема, а также передача различных межклеточных сигналов, в том числе регулирующих пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и миграцию эмбриональных клеток в онтогенезе.

Большой интерес вызывает участие Cx43 в развитии инвазивных опухолей глиального происхождения. Существуют экспериментальные данные, показывающие активирующее влияние Cx43 на процессы инвазии мультиформной глиобластомы человека и ее аналога у крыс — экспериментальной глиомы С6 [54]. В частности, было продемонстрировано, что Cx43-положительные клетки С6-глиомы обладают более высокой способностью к миграции, чем Cx43-негативные, а также то, что они более устойчивы к оксидативному стрессу и различным другим повреждающим факторам [55]. Последний феномен делает интересным исследование Cx43 в рамках концепции резистентных к химио- и радиотерапии популяций глиомных клеток.

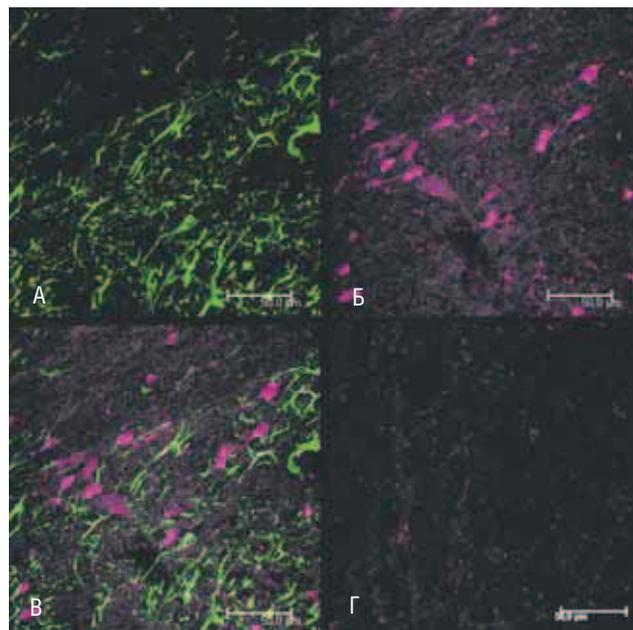
Нами были получены моноклональные антитела к рекомбинантному экстраклеточному домену E2 Cx43, взаимодействующие с Cx43 в нативной конформации [56]. Эти антитела визуализировали плакоидные структуры коннексонов на живых нефиксированных клетках глиомы С6 крысы и глиобластомы U251.

Для исследования селективности антител к E2 Cx43 по отношению к опухолевому очагу *in vivo* их метили флуоресцентной меткой Alexa Fluor 660 с пиком эмиссии в инфракрасной области и вводили внутривенно крысам с экспериментальной глиомой. Спустя 48 ч после введения нам удалось детектировать антитела к E2 Cx43 в патологическом очаге в мозге. Наиболее интенсивное их накопление наблюдалось в клетках перитуморальной зоны. Применение меченых антител *in vivo* с последующим иммуногистохимическим анализом GFAP позволило детектировать клетки, в которых происходит накопление антител к Cx43. Среди таких клеток выявляются как GFAP- и Cx43-положительные реактивные астроциты, так и достаточно большой пул GFAP-негативных клеток, также локализованных в перитуморальной зоне (рис. 15).

Мы предположили, что GFAP-негативными клетками, захватывающими антитела к Cx43 из кровотока, могут быть Cx43-положительные клетки глиомы, активно мигрирующие в нормальную нервную ткань. Для проверки этого предположения, мы поместили глиомные клетки перед имплантацией в мозг с помощью флуоресцентного мембранного маркера DiI.

Предварительно было показано, что клетки глиомы С6, обработанные 10  $\mu\text{M}$  DiI, не теряют опухолевые свойства и в течение как минимум 18 сут, несмотря на неизбежное разведение трейсера в процессе пролиферации, сохраняют достаточное количество флюорофора для их достоверной идентификации.

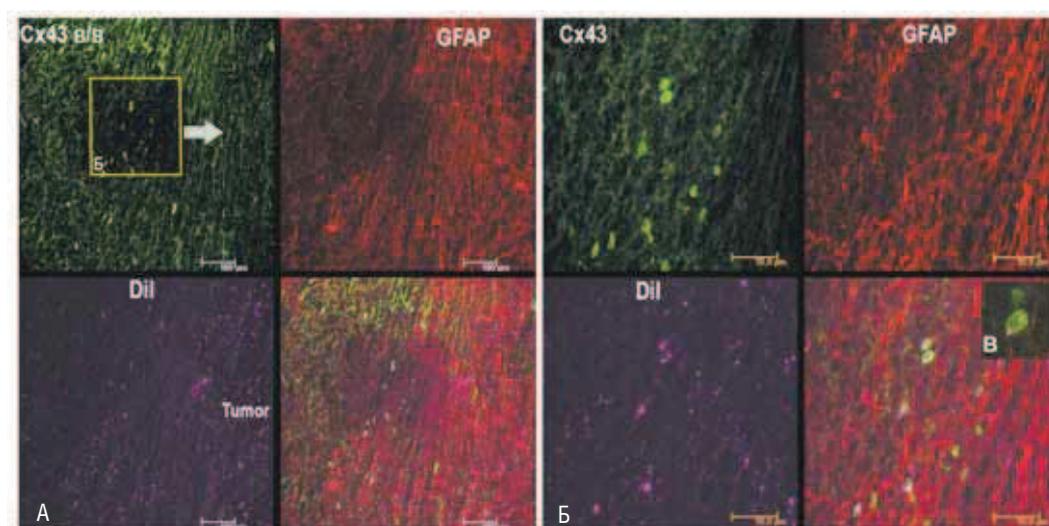
Антитела к Cx43 были помечены сукцинимидным эфиром Alexa Fluor 488 (Invitrogen) и введены внутривенно на 14-е сутки после имплантации меченых DiI клеток глиомы С6. Флуоресцентный анализ на свежеприготовленных замороженных срезах головного мозга с глиомой через 48 ч после введения показал, что Alexa 488 и DiI достоверно колокализуются в клетках, расположенных в перитуморальной зоне и даже в нормальной ткани за пределами астроглиального перитуморального вала (рис. 16). Это доказывает, что введенные внутривенно антитела к Cx43 распознают именно Cx43-положительные глиомные клетки, мигрирующие из периферии глиомы.



**Рис. 15.** Визуализация Cx43-положительных клеток в области перитуморального астроглиального вала при внутривенном введении антител к Cx43, меченных Alexa Fluor 660 (Invitrogen): А — иммунофлуоресценция с помощью антител к GFAP; Б — прижизненно визуализированные с помощью антител к Cx43-Alexa Fluor 660 клетки; В — объединенное изображение; Г — отрицательный контроль (внутривенное введение меченных Alexa Fluor 660 неспецифических антител).

Разрабатывая системы адресной доставки на основе моноклональных антител, мы исследовали биораспределение меченных  $^{125}\text{I}$  антител к *AMVB1*, GFAP, BSAT1 и Cx43 после внутривенного введения крысам с экспериментальной глиомой [30, 32, 34–36, 57, 58]. Суммируя эти данные, можно заключить, что все из исследованных антител селективно накапливались в очаге глиомы (см. рис. 9). Наиболее высокие значения накопления были обнаружены для антител к Cx43 и BSAT1 ( $0,27 \pm 0,01$  и  $0,261 \pm 0,064\%$  введенной дозы/г, соответственно). В этой связи их практическое применение для адресной доставки в глиомы представляется наиболее интересным.

Адресная доставка в перитуморальную область диагностических и терапевтических агентов с помощью моноклональных антител имеет несколько очевидных перспектив. Во-первых, крайне важно, например, при хирургической резекции опухоли правильно определить ее границы с учетом всех имеющихся участков перивазальной и периневральной инвазии. Поскольку реактивные астроциты сопровождают все такие участки, их визуализация позволит четко отграничить область инвазии глиомы от нормальной ткани. Во-вторых, в последних исследованиях показано, что именно в перитуморальной области идет наиболее активная инвазия глиомы. В этой области локализуются так называемые стволовые опухолевые клетки, поддерживающие пул активно мигрирующих радио- и химиорезистентных клеток глиомы. Таким образом, есть основания полагать [59], что полученные нами антитела могут быть весьма эффективными векторами при доставке диагностических и терапевтических средств в клетки-мишени головного мозга.



**Рис. 16.** Иммунофлуоресцентный анализ перитуморальной зоны с помощью введенных внутривенно меченых антител к Cx43: А — перитуморальная зона под малым увеличением (отрезок 100 мкм). В квадрате показана область, просканированная под большим увеличением (Б) (отрезок 50 мкм). Стрелками показана колокализация Dil (первично меченные клетки глиомы) и Alexa 488 (антитела к Cx43, введенные внутривенно); В — увеличенный в 2 раза фрагмент, показывающий Dil-позитивную клетку глиомы, захватившую антитела к Cx43.

### Заключение

Исследования ГЭБ, проведенные нами, позволили охарактеризовать основные маркеры функциональной зрелости эндотелиоцитов церебральных микрососудов, которые могут применяться в исследованиях *in vitro* и *in vivo* для иммунофенотипирования барьерного эндотелия. Детально охарактеризованы изменения проницаемости ГЭБ при различных патологических воздействиях. Показана целесообразность и эффективность приме-

нения моноклональных антител к мембранным белкам, ассоциированным с эндотелиоцитами церебральных микрососудов и астроцитами для доставки диагностических и терапевтических средств к клеткам головного мозга в условиях патологически повышенной проницаемости ГЭБ. Понимание основных механизмов реализации барьерных свойств и регуляции проницаемости ГЭБ для макромолекул может способствовать созданию новых высокоэффективных средств для диагностики и терапии заболеваний ЦНС.

### REFERENCES

1. Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U. et al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of Cell Science*. 1994; 107: 1347–1357.
2. Joo F. Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences. *Prog Neurobiol*. 1996; 48: 255–273.
3. Weiss N., Miller F., Cazaubon S., Couraud P.O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788 (4): 842–857.
4. Banks W.A., Erickson M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol. Dis*. 2010; 37 (1): 26–32.
5. Crone C., and Olesen S.P. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res*. 1982; 241: 49–55.
6. Rubin L.L., Hall D.E., Porter S. et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol*. 1991; 115: 1725–1735.
7. Ribeiro M.M., Castanho M.A., Serano I. In vitro blood-brain barrier models – latest advantages and therapeutic applications in a chronological perspective. *Medical chemistry*. 2010; 10: 263–271.
8. Lawrenson J.G., Ghabriel M.N., Reid A.R. et al. Differential expression of an endothelial barrier antigen between the CNS and the PNS. *J. Anat*. 1995; 186: 217–221.
9. Sternberger N.H., Sternberger L.A. Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1987; 84: 8169–8173.
10. Sternberger N.H., Sternberger L.A., Kies M.W., Shear C.R. Cell surface endothelial proteins altered in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol*. 1989; 21 (2–3): 241–248.
11. Rosenstein J.M., Krum J.M., Sternberger L.A. et al. Immunocytochemical expression of the endothelial barrier antigen (EBA) during brain angiogenesis. *Dev. Brain Res*. 1992; 66: 47–54.
12. Lidinsky W.A., and Drewes L.R. Characterization of the blood-brain barrier: protein composition of the capillary endothelial cell membrane. *J. Neurochem*. 1983; 41 (5): 1341–1348.
13. Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M., Gurina O.I., Chekhonin V.P. Combined immunoperoxidase analysis for visualization of cells of the blood-brain barrier. *Bull Exp Biol Med*. 2006; 142 (4): 507–510.
14. Aird W.C. Endothelial cell heterogeneity: a case for nature and nurture. *Blood*. 2004; 103 (11): 3394–3995.
15. Wolburg H., and Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vasc. Pharmacol*. 2002; 38: 323–337.
16. Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U. Krauß B., Schmid E.-M., Ocalan M., Farrell C., Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier

- er endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 1994; 107: 1347–1357.
17. Rubin L.L., and Staddon J.M. The cell biology of the blood-brain barrier. *Ann. Rev. Neurosci.* 1999; 22: 11–28.
  18. Bazzoni G., Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 869–901.
  19. Ribeiro M.M., Castanho M.A., Serrano I. In vitro blood-brain barrier models – latest advances and therapeutic applications in a chronological perspective. *Medicinal Chemistry*. 2010; 10: 263–271.
  20. Wilhelm I., Fazakas C., Krizbai I.A. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp.* 2011; 71: 113–128.
  21. Arthur F.E., Shivers R.R., Bowman P.D. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Developmental Brain Research*. 1987; 36: 155–159.
  22. Abbott N.J. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J. Anat.* 2002; 200: 629–638.
  23. Beese M., Wyss K., Haubitz M., Kirsch T. Effect of cAMP derivatives on assembly and maintenance of tight junctions in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Cell Biology*. 2010; 11: 68.
  24. Forster C., Waschke J., Burek M., Leers J., Drenckhahn D. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J. Physiol.* 2006; 573: 413–425.
  25. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., & Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973; 52: 2745–2756.
  26. Voyta J.C., Via D.P., Butterfield C.E., Zetter B.R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *The Journal of cell biology*. 1984; 99: 2034–2040.
  27. Gurina O.I. Monoklonal'nye antitela k neirospetsificheskim antigenam. Poluchenie, immunokhimicheskii analiz, issledovanie pronitsaemosti gematoentsefalicheskogo bar'era. *Diss. ... d-ra med. nauk. M.*, 2005: 319.
  28. Nag S., Kapadia A., Stewart D.J. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol Appl. Neurobiol.* 2011; 37 (1): 3–23.
  29. Yang Y., Rosenberg G.A. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2011; 42 (11): 3323–3328. Epub 2011 Sep 22.
  30. Chekhonin V.P., Lebedev S.V., Ryabukhin I.A. i dr. Selektivnoe nakoplenie monoklonal'nykh antitel k neirospetsificheskoi enolaze v tkani mozga krysa s okklyuziei srednei mozgovoii arterii. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* 2004; 10: 388–392.
  31. Coisne C., Engelhardt B. Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation. *Antioxid. Redox. Signal.* 2011; 15 (5): 1285–1303.
  32. Chekhonin V.P., Gurina O.I., Dmitrieva T.B. Monoklonal'nye antitela k neirospetsificheskim belkam. *M.: Meditsina*, 2007: 344.
  33. Chekhonin V.P. Spetsificheskie belki nervnoi tkani cheloveka i zhivotnykh (identifikatsiya, vydelenie, fiziko-khimicheskaya kharakteristika i kliniko-laboratornye issledovaniya): *Dis. ... d-ra med. nauk; M.*, 1989.
  34. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M., Gurina O.I., Dmitrieva T.B. A targeted transport of 125I-labeled monoclonal antibodies to target proteins in experimental glioma focus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008; 418: 40–43.
  35. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M. Gurina O.I. Targeted transport of 125I-labeled antibody to GFAP and AMVB1 in an experimental rat model of C6 glioma. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009; 4 (1): 28–34.
  36. Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M., Tsitrin E.B. et al. Visualization of Connexin 43-positive cells of glioma and the periglioma zone by means of intravenously injected monoclonal antibodies. *Drug Deliv.* 2011; 18 (5): 331–337.
  37. Sorial J.-C., Fayette J., Armand J.-P. Molecular targeting: Targeting angiogenesis in solid tumors. *Ann. Oncol.* 2004; 15: iv223–iv227.
  38. Carson-Walter E.B., Hampton J., Shue E. et al. Plasmalemmal vesicle associated protein-1 is a novel marker implicated in brain tumor angiogenesis. *Clin. Cancer. Res.* 2005; 11: 7643–7650.
  39. Grobden B., De Deyn P.P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 2002; 310: 257–270.
  40. Schlingemann R.O., Hofman P., Vrensen G.F. et al. Increased expression of endothelial antigen PAL-E in human diabetic retinopathy correlates with microvascular leakage. *Diabetologia*. 1999; 42: 596–602.
  41. Hallmann R., Mayer D.N., Berg E.L. et al. Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev. Dyn.* 1995; 202: 325–332.
  42. Errede M., Benagiano V., Girolamo F. et al. Differential expression of connexin43 in foetal, adult and tumour-associated human brain endothelial cells. *Histochem. J.* 2002; 34: 265–271.
  43. Leenstra S., Troost D., Das P.K. et al. Endothelial cell marker PAL-E reactivity in brain tumor, developing brain, and brain disease. *Cancer*. 1993; 72: 3061–3067.
  44. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M. et al. Modeling and immunohistochemical analysis of C6 glioma in vivo. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; 143 (4): 501–509.
  45. Nagano N., Sasaki H., Aoyagi M., Hirakawa K. Invasion of experimental rat brain tumor: Early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta. Neuropathol.* 1993; 86: 117–125.
  46. Sternberger N.H., Sternberger L.A., Kies M.W., Shear C.R. Cell surface endothelial proteins altered in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 1989; 21: 241–248.
  47. Zhu C., Ghabriel M.N., Blumbergs P.C. et al. Clostridium perfringens prototoxin-induced alteration of endothelial barrier antigen immunoreactivity at the blood-brain barrier. *Exp. Neurol.* 2001; 169: 72–82.
  48. Wolburg H., Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vasc. Pharmacol.* 2002; 38: 323–337.
  49. Stewart L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomized trials. *Lancet.* 2002; 359: 1011–1018.
  50. Zalutsky M.R. Current status of therapy of solid tumors: Brain tumor therapy. *J. Nucl. Med.* 2005; 46: 151S–156S.
  51. Bhattacharjee A.K., Nagashima T., Kondoh T., Tamaki N. Quantification of early blood–brain barrier disruption by in situ brain perfusion technique. *Brain Research Protocols*. 2001; 8: 126–131.
  52. Hawkins B.T., Egleton R.D. Fluorescence imaging of blood–brain barrier disruption. *J. Neurosci. Meth.* 2006; 151: 262–267.
  53. Bates D.C., Sin W.C., Aftab Q., Naus C.C. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism

- involving the carboxy terminus. *Glia*. 2007; 55 (15): 1554–1564.
54. Prochnow N., Dermietzel R. Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130 (1): 71–77.
55. Li J.Y., Boado R.J., Pardridge W.M. Blood-brain barrier genomics. *J.Cereb. Blood Flow Metab*. 2001; 21: 61–68.
56. Oliveira R., Christov C., Guillamo J.S. et al. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biology*. 2005; 6: 7.
57. Baklaushev V.P., Gurina O.I., Yusubalieva G.M. et al. Immunofluorescent analysis of connexin-43 using monoclonal antibodies to its extracellular domain. *Bull Exp. Biol. Med*. 2009; 148 (4): 725–730.
58. Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M., Tsitrin E.B. et al. Visualization of connexin 43-positive cells of glioma and the periglioma zone by means of intravenously injected monoclonal antibodies. *Drug Deliv*. 2011; 18 (5): 331–337.
59. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M. et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43. *Nanomedicine*. 2012; 8 (1): 63–70.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Чехонин Владимир Павлович**, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, академик-секретарь РАМН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦССП им. В.П. Сербского, руководитель отдела медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова

**Адрес:** 119991, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

**Тел.:** (495) 695-02-62, **факс:** (495) 637-50-55

**E-mail:** chekhoninnew@yandex.ru

**Баклаушев Владимир Павлович**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова, в.н.с. отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦССП им. В.П. Сербского

**Адрес:** 119991, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

**Тел.:** (495)695-02-62, факс (495)637-50-55

**E-mail:** serpoff@mail.ru

**Юсубалиева Гаухар Маратовна**, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова, с.н.с. отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦССП им. В.П. Сербского

**Адрес:** 119991, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

**Тел.:** (495)695-02-62, факс (495)637-50-55

**E-mail:** kakonya@gmail.com

**Волгина Надежда Евгеньевна**, аспирант кафедры медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова

**Адрес:** 119991, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

**Тел.:** (495)695-02-62, факс (495)637-50-55

**E-mail:** volginadi@gmail.com

**Гурина Ольга Ивановна**, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории нейрхимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦССП им. В.П. Сербского.

**Адрес:** 119991, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

**Тел.:** (495)695-02-62, факс (495)637-50-55.

**E-mail:** olga672@yandex.ru