

Резюме проекта, выполняемого

в рамках ФЦП

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

по этапу № 2

Номер Соглашения Электронного бюджета: 075-02-2018-1123, Внутренний номер соглашения 14.583.21.0066

Тема: «Клеточная модель гемато-энцефалического барьера человека в микрофлюидном устройстве»

Приоритетное направление: Науки о жизни (НЖ)

Критическая технология: Клеточные технологии

Период выполнения: 18.10.2017 - 30.06.2020

Плановое финансирование проекта: 21.00 млн. руб.

Бюджетные средства 9.00 млн. руб.,

Внебюджетные средства 12.00 млн. руб.

Получатель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева"

Иностранный партнер: Institut für Labortierkunde

Ключевые слова: Микрофлюидика, транспорт лекарств через гематоэнцефалический барьер, белки-транспортёры, кинетика, экспрессия генов

I. Цель проекта

Гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) служит в качестве физического, функционального, метаболического и иммунологического барьера между кровью и тканями головного мозга. Такой барьер регулирует пассивный и активный транспорт веществ из капилляров в мозг и обратно. Использование микрофлюидной платформы позволяет создать наиболее приближенную к реальной *in vitro* модель ГЭБ, более тщательно воспроизводя геометрию ГЭБ, а также физиологическое касательное напряжение на поверхности клеток эндотелия. Кроме того, с помощью ГЭБ-на-чипе можно анализировать наличие специфических маркеров (например, белков адгезии и плотных контактов) для получения информации о структуре сформированного ГЭБ, а также изучать транспорт ксенобиотиков через ГЭБ. Таким образом, модели ГЭБ-на-чипе могут быть использованы для изучения сложных биологических процессов, совмещать в себе преимущества *in vitro* и *in vivo* моделей, обладать высокой предсказательной силой, и быть ценным исследовательским инструментом в дополнение к классическим *in vitro* и *in vivo* методам. Проект посвящен разработке клеточной модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) человека, культивируемой в микрофлюидном устройстве и предназначенной для изучения процессов транспорта химических веществ, биологически активных соединений и разработки нейротропных лекарственных средств с оптимальными параметрами фармакокинетики.

Целями проекта являются разработка микрофизиологической модели гемато-энцефалического барьера для изучения транспорта и токсичности лекарственных средств *in vitro*, разработка спектра методик работы с клеточным материалом и анализа состояния модели гемато-энцефалического барьера с помощью иммуногистохимии, спектроскопии, транскриптомики и масс-спектрометрии, а также разработка стандартных операционных процедур работы с моделью гемато-энцефалического барьера *in vitro* и их международная валидация с привлечением партнеров консорциума. На втором этапе основной целью является разработка клеточной модели ГЭБ.

В рамках второго этапа проекта были решены следующие задачи такие задачи как выбор микропористых мембран для создания модели ГЭБ, экспериментальное сравнение мембран для создания 3D культур клеток, входящих в модель ГЭБ, выбор внеклеточного матрикса для создания модели ГЭБ, экспериментальное сравнение внеклеточного матрикса для создания модели ГЭБ, разработка методик анализа состояния клеточных культур ГЭБ, разработка методики сокультивирования клеточных культур, входящих в модель ГЭБ, в выбор микрофлюидной платформы и микрочипа для создания модели ГЭБ, выбор модельных химических веществ для оценки проницаемости модели ГЭБ, разработка методик анализа модельных химических веществ, использованных для оценки проницаемости клеточного барьера в составе модели ГЭБ, культивирование клеточных культур, входящих в клеточную модель ГЭБ, в микрофлюидной системе, сравнение функциональной активности клеточных культур, входящих в ГЭБ, в статических и динамических условиях, проведение дополнительных патентных исследований, разработка экспериментального образца клеточной модели ГЭБ, сформированной на основе немодифицированных клеточных линий, валидация методики сокультивирования клеточных культур, входящих в ГЭБ, модификация клеточных культур с

использованием технологии CRISPR/Cas для создания моделей ГЭБ с заданными свойствами.

В ходе второго этапа проекта проведена экспериментальная разработка образца клеточной модели ГЭБ, сформированной на основе немодифицированных клеточных линий, клеток эндотелия, перицитов и астроцитов.

Экспериментальный образец клеточной модели ГЭБ в дальнейшем, на 3м этапе проекта, будет использован для разработки методики оценки транспорта лекарственных средств через клеточный барьер в составе модели ГЭБ и токсичности лекарственных средств в отношении клеток в составе модели ГЭБ.

Экспериментальный образец клеточной модели ГЭБ в дальнейшем, на 3м этапе проекта, будет использован для разработки методики оценки транспорта лекарственных средств через клеточный барьер в составе модели ГЭБ и токсичности лекарственных средств в отношении клеток в составе модели ГЭБ.

2. Основные результаты проекта

Разработана клеточная модель ГЭБ, 3Д культуры клеток. Осуществлено сокультивирование клеточных моделей.

В ходе второго этапа проекта были разработаны методики анализа состояния клеточных культур ГЭБ. Были использованы методы ПЦР и микроскопии для исследования характеристик клеточных культур, входящих в коллекцию. По результатам ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа, клетки, выбранные для формирования микрофлюидной клеточной модели ГЭБ, обладают ярко выраженной экспрессией всех характерных маркеров: клетки эндотелия микрососудов головного мозга iPSc-EC, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток IMR90-4, обладают ярко выраженной экспрессией vFW, CD31, ZO1, GLUT1, BCRP, MDR1; иммортализованные перициты сосудов головного мозга imHBVP - ярко выраженной экспрессией α SMA, PDGFR β ; иммортализованные астроциты hNA-hTERT - ярко выраженной экспрессией GFAP, S100 β , A2B5, O4. Была разработана методика сокультивирования клеток эндотелия iPSc-EC, перицитов и астроцитов для формирования клеточного барьера в составе модели ГЭБ.

Для сокультивирования клеток эндотелия, перицитов и астроцитов проведен выбор и экспериментальная оценка микропористых мембран и внеклеточного матрикса. Для адгезии клеток выбраны компоненты ВКМ, близкие к составу базальной мембраны микрососудов головного мозга человека: коллаген IV, агрип, энтактин, ламинин 511, ламинин 411 для адгезии клеток эндотелия и перицитов, ламинин 211 для адгезии астроцитов. Для нанесения ВКМ и адгезии клеток выбрана микропористая мембрана из полкарбоната (PC) в составе мембранных вставок Transwell, с площадью мембраны 0,143 см², толщиной мембраны 10 мкм, диаметром пор 3 мкм.

Для культивирования клеточной модели ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды был выбран микробиореактор (МБР) Nonchilus (ООО НТЦ БиоКлиникум), включающий блок управления и сменный клеточный блок (чип). Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены оптимальные параметры циркуляции питательной среды (при режиме работы насоса 1,5 Гц, ± 10 кПа), наиболее приближенные к физиологическим (к параметрам тока крови в микрососудах).

Для анализа проницаемости клеточного барьера в составе модели ГЭБ в качестве модельных веществ были выбраны [13C]сахароза, FITC-декстран 4 кДа, FITC-декстран 70 кДа. Полученные значения проницаемости [13C]Сахарозы через клеточный барьер в условиях циркуляции питательной среды близки к физиологическим значениям коэффициента проницаемости сахарозы. Наиболее плотный, малопроницаемый для FITC-декстранов в течение длительного времени клеточный барьер формируется при культивировании моделей ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды при режиме 1,5 Гц, ± 10 кПа. Проницаемость для FITC-декстранов на 1-2 порядка ниже проницаемости FITC-декстранов через клеточный барьер в составе известных микрофлюидных и статических клеточных моделей ГЭБ, а также на порядок ниже проницаемости ГЭБ для FITC-декстранов *in situ*.

Через 3, 7, 14 и 30 дней после начала культивирования клеточных моделей ГЭБ в МБР (при режиме циркуляции 1,5 Гц, ± 10 кПа) были определены следующие параметры клеточного барьера: TEER клеточного барьера; жизнеспособность клеток в составе модели ГЭБ; фенотип клеток в составе модели ГЭБ (экспрессия характерных маркеров клеток эндотелия, перицитов и астроцитов, наличие плотных контактов между клетками эндотелия); проницаемость клеточного барьера для модельных веществ. В результате проведенного экспериментального анализа установлено, что клеточный барьер в составе немодифицированной микрофизиологической клеточной модели ГЭБ обладает следующими характеристиками, сохраняющимися в течение 30 дней после начала культивирования в МБР: высокой жизнеспособностью клеток (более 80%) в составе клеточного барьера; плотными контактами (ZO1) между клетками эндотелия; TEER, приближенным к физиологическому (>2000 Ом*см²); коэффициентом проницаемости для сахарозы, приближенным к физиологическому ($3 \cdot 10^{-8}$ см/с или $0,18 \cdot 10^{-5}$ см/мин); осуществляет транспорт низкомолекулярных и высокомолекулярных веществ (модельных веществ) между апикальной и базальной стороной клеточного барьера; в клетках эндотелия, перицитах и астроцитах в составе клеточного барьера сохраняется высокая экспрессия характерных маркеров.

Проведены дополнительные патентные исследования.

За счёт внебюджетных средств проведена валидация методики сокультивирования клеточных культур, входящих в ГЭБ. В соответствии с методикой сокультивирования получали образцы клеточной модели ГЭБ. Получение образцов осуществляли в трех независимых повторах. В каждом из повторов в полученных образцах анализировали TEER и проницаемость сахарозы через клеточный барьер в составе сформированных образцов клеточной модели ГЭБ. В каждом из трех независимых повторов получены близкие значения TEER и коэффициентов проницаемости сахарозы. Результаты валидации указывают на то, что получение клеточной модели ГЭБ в соответствии с разработанной методикой сокультивирования приводит к формированию клеточного барьера со стабильно воспроизводимыми характеристиками.

Также за счёт внебюджетных средств была проведена модификация клеточных культур с использованием технологии CRISPR/Cas для создания модели ГЭБ с заданными свойствами. Для модификации были выбраны астроциты hNA-hTERT. С помощью технологии CRISPR/Cas был проведен нокаут гена GFAP в астроцитах, проведена селекция и выбран и клон, у которого отсутствует достоверная экспрессия GFAP. Клетки-потомки выбранного клона были заморожены в достаточном количестве для формирования банка модифицированных с помощью CRISPR/Cas клеточных культур, предназначенных для создания модели ГЭБ.

3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках прикладного научного

исследования и экспериментальной разработки

Методика "Методика анализа состояния клеточных культур, входящих в модель гемато-энцефалического барьера" Приказ на секреты производства (ноу-хау) №96А от 22.02.2018 г.

Программа для ЭВМ «Программа для оценки проницаемости гемато-энцефалического барьера». Свидетельство на программу ЭВМ №2018612985 от 01.03.2018 г.

4. Назначение и область применения результатов проекта

Полученные результаты могут использоваться в области биотехнологии, тканевой инженерии, медицины, например, для культивирования и/или формирования многослойных клеточных моделей со статическим и/или динамическим движением ростовой среды для изучения свойств барьерных тканей, фармакокинетики и токсичности препаратов и др. В частности, полученные результаты могут быть использованы для формирования двухслойных клеточных моделей из различных типов клеток, например, модели гемато-энцефалического барьера, с последующим изучением процессов ГЭБ in vitro. При использовании полученных результатов возможно имитировать на микроуровне структуру и функцию ГЭБ и моделировать перенос питательных веществ из кровотока в мозг. Также возможно более широкое применение для изучения миграции клеток или совместимости культивирования нескольких типов клеток, а также для исследования влияния различных химических веществ на клетки в условиях in vitro.

5. Эффекты от внедрения результатов проекта

Разработанная клеточная модель ГЭБ в микрофлюидном устройстве позволит на начальном этапе разработки лекарственных средств тестировать потенциальное проникновение веществ через ГЭБ и оценивать нейротоксичность. Внедрение клеточной модели ГЭБ в организациях разработчиков ЛС позволит сократить затраты на тестирование заведомо нейротоксичных препаратов и ускорить вывод на рынок новых безопасных для человека ЛС.

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Разработанная клеточная модель гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) человека, культивируемой в микрофлюидном устройстве предназначена для изучения процессов транспорта химических веществ, биологически активных соединений и разработки нейротропных лекарственных средств с оптимальными параметрами фармакокинетики. В дальнейшем клеточная модель ГЭБ будет использована для разработки методики оценки транспорта лекарственных средств через клеточный барьер в составе модели ГЭБ и токсичности лекарственных средств в отношении клеток в составе модели ГЭБ. После завершения проекта планируется внедрение в партнерских организациях фармацевтического блока. Предварительные оценки объема коммерциализации проекта после 2020 года - 10 млн. руб в год с ростом ежегодно на 5-10%.

7. Наличие соисполнителей

Соисполнители не привлекались

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева"

Ректор
(должность)

(подпись)

Мажуга А.Г.

(фамилия, имя, отчество)

Руководитель работ по проекту
профессор по экономике и инновациям

(должность)

(подпись)

Сахаров Д.А.

(фамилия, имя, отчество)

