

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ В РАЗВИТИИ И ВОССТАНОВЛЕНИИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ЭНДОТЕЛИЯ (ОБЗОР)

УДК 616.831–018.74–08
Поступила 25.09.2014 г.

© **А.Б. Салмина**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;
А.В. Моргун, к.м.н., ассистент кафедры педиатрии Института последипломного образования;
Н.В. Кувачева, к.фарм.н., доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;
Е.А. Пожиленкова, к.б.н., доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;
Ю.Р. Солончук, к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии;
О.Л. Лопатина, к.б.н., доцент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;
Ю.К. Комлева, к.м.н., ассистент кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии;
Т.Е. Таранушенко, д.м.н., профессор, зав. кафедрой педиатрии Института последипломного образования

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,
Красноярск, 660022, ул. Партизана Железняка, 1

Рассмотрены современные представления о роли эндотелиальных клеток в формировании и восстановлении гематоэнцефалического барьера головного мозга. Приведены основные характеристики церебральных эндотелиоцитов, входящих в нейроваскулярную единицу, и эндотелиальных прогениторных клеток, описаны их развитие и миграция в головной мозг, молекулярные механизмы барьерогенеза, в том числе в контексте модуляции межклеточных взаимодействий, а также освещены вопросы применения эндотелиальных прогениторных клеток различного происхождения в моделях гематоэнцефалического барьера *in vitro*. Обсуждаются HIF-1-зависимые механизмы регуляции функциональной активности эндотелиальных клеток, ангиогенеза, астроцит-эндотелиальных взаимодействий и метаболизма клеток нейроваскулярной единицы. Анализируются возможные механизмы участия этих процессов в формировании эндотелиальной дисфункции как одного из компонентов патогенеза нарушений развития головного мозга, его ишемического повреждения или нейродегенерации, ассоциированной с нарушением ключевых метаболических и транспортных процессов, секреции регуляторных молекул, межклеточного сопряжения в клетках церебрального эндотелия, а также с гибелью эндотелиоцитов и потерей структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера. Понимание клеточно-молекулярных механизмов барьерогенеза при развитии головного мозга, восстановлении его после повреждения обеспечит новые возможности фармакотерапии заболеваний центральной нервной системы, обусловленных эндотелиальной дисфункцией.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки; гематоэнцефалический барьер; развитие головного мозга.

English

Endothelial Progenitor Cells in Cerebral Endothelium Development and Repair (Review)

A.B. Salmina, D. Med. Sc., Professor, Head of the Department of Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry;
A.V. Morgun, PhD, Assistant Professor, the Department of Pediatrics, Institute of Postdiploma Education;
N.V. Kuvacheva, PhD, Associate Professor, the Department Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Research Associate, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry;
E.A. Pozhilenkova, PhD, Associate Professor, the Department Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Research Associate, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry;
Yu.R. Solonchuk, PhD, Assistant Professor, the Department of Clinical Immunology;
O.L. Lopatina, PhD, Associate Professor, the Department Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Research Associate, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry;

Для контактов: Салмина Алла Борисовна, e-mail: allasalmina@mail.ru

Y.K. Komleva, PhD, Assistant Professor, the Department Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Research Associate, Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry;
T.E. Taranushenko, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Pediatrics, Institute of Postdiploma Education

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky, Partizana Zheleznyaka St., 1, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660022

The review covers the current concepts on the role of endothelial cells in the blood-brain barrier development and repair. The authors have characterized cerebral endothelial cells within a neurovascular unit, and endothelial progenitor cells, their development and migration to the brain, as well as molecular mechanisms of barrierogenesis with a special focus on the modulation of intercellular communications. The review contains the analysis of application of endothelial progenitor cells of different origin in *in vitro* blood-brain barrier models. HIF-1-controlled regulation mechanisms of the regulation of functional activity of endothelial cells, angiogenesis, astrocyte-endothelial interactions, and cell metabolism within a neurovascular unit has been discussed. The authors have analyzed possible contribution mechanisms of these processes in endothelial dysfunction development as one of the pathogenetic components of neurodevelopmental disorders, ischemic brain injury, or neurodegeneration associated with alterations in key metabolic and transport processes, secretion of regulatory molecules, cell-to-cell communication in cerebral endothelial cells, as well as with endothelial cell death and the loss of structural and functional integrity of the blood-brain barrier. Deciphering the cellular and molecular mechanisms of barrierogenesis in brain development, and its recovery after damage will provide new opportunities for pharmacotherapy of central nervous system disorders due to endothelial dysfunction.

Key words: endothelial progenitor cells; blood-brain barrier; brain development.

Гетерогенность популяции клеток эндотелия в организме человека определяет особенности функционирования сосудов в разных тканях и органах. Приобретение эндотелиального фенотипа, специфичного для различных тканей, осуществляется на этапах развития эндотелиальных прогениторных клеток путем сложных процессов, определяющих их дифференцировку и миграцию, причем эти процессы достаточно пластичны и могут изменяться под действием внешних факторов [1]. Эндотелиоциты, которые входят в состав нейроваскулярной единицы (НВЕ) головного мозга, составляющей основу структуры гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), в процессе эволюции приобрели свойства, позволяющие эффективно регулировать взаимодействие между кровотоком и центральной нервной системой (ЦНС) [2]. Интересно, что эта барьерная функция не всегда ассоциировалась с клетками эндотелиальной природы: изначально ГЭБ формировался из глиальных клеток [3]. Примечательно, что последовательность событий совершенно иная в онтогенезе — ГЭБ формируется в процессе эмбриогенеза из клеток эндотелия и перicyтов, и эти события предшествуют включению астроцитов в состав нейроваскулярной единицы [4].

Свойства, определившие преимущества эндотелиоцитов перед клетками глии в контексте регуляции избирательной проницаемости ГЭБ, связаны с возможностью формирования компактного нефенестрированного монослоя, с наличием так называемых тесных контактов, экспрессией большого числа высокоспециализированных транспортных молекул и белков клеточной адгезии, с низким уровнем трансцитоза [5, 6]. Отсутствие фенестр определяет низкий уровень экспрессии гликопротеина МЕСА-32 (PVLAP) в эндотелии микрососудов головного мозга. Кроме того, эндотелий в составе нейроваскулярной единицы головного мозга является объектом регуляции со стороны других клеток НВЕ — перicyтов, астроцитов и нейронов, а также молекул внеклеточного матрикса [7, 8].

Эндотелиальная дисфункция — один из важных механизмов патогенеза нарушений развития головного мозга, его ишемического повреждения или нейродегенерации, что связано с нарушением ключевых метаболических и транспортных процессов, секреции регуляторных молекул, с нарушением межклеточного сопряжения, структурно-функциональной целостности ГЭБ и гибелью эндотелиоцитов. Известно, что целостность ГЭБ определяется многими механизмами, в числе которых Wnt-сигналинг, действие ретиноевой кислоты, контролируемая экспрессия матриксных металлопротеиназ и аквапоринов [9, 10]. Нарушения структурно-функциональной целостности и патологическая проницаемость ГЭБ развиваются практически при всех видах патологии ЦНС, что определяет не только характер течения, но и эффективность фармакотерапии. Чаще всего механизмы нарушения проницаемости ГЭБ ассоциируют с дисфункцией или повреждением зрелых эндотелиоцитов, однако не менее интересным является вклад эндотелиальных прогениторных клеток в эти события.

Эндотелиальные прогениторные клетки: развитие и миграция в головной мозг

Формирование ГЭБ, барьерогенез, — это процесс, реализуемый в эмбриональном и раннем постнатальном периодах развития, а также после перенесенного повреждения головного мозга [11, 12]. Важным компонентом барьерогенеза является ангиогенез, который во многом определяется активностью, пролиферацией и дифференцировкой эндотелиальных прогениторных клеток, в частности, сосуды микроциркуляции в головном мозге формируются из менингеальных сосудов и далее проникают в паренхиму развивающегося мозга за счет механизма ангиогенеза [13]. Кроме того, признаки активации ангиогенеза в головном мозге регистрируются при развитии феномена нейропластичности и запоминания [14].

У лабораторных животных (мышей, крыс) формирование ГЭБ начинается на 10–17-е сутки эмбрионального развития, причем уже к 12-му дню экспрессируются молекулы транспортеров и тесных контактов (у человека экспрессия маркеров ГЭБ регистрируется с 8-й недели развития, а собственно ангиогенез регистрируется в течение 2–3-й недели постнатального периода) [10]. К 21-му дню пренатального развития грызунов формируется трансэндотелиальное сопротивление, оно прогрессивно увеличивается в течение раннего постнатального периода развития, что соответствует формированию полноценных тесных контактов [12]. Этот факт в сопоставлении с данными о динамике эмбрионального нейрогенеза позволил предположить, что барьерогенез инициируется уже после формирования коммитированных нейрональных клеток-предшественников [15].

Во время внутриутробного развития эндотелиальные клетки формируются из общего предшественника и приобретают фенотипические свойства, характерные для специализированной ткани. В процессе эмбриогенеза эндотелиальные клетки заселяют регионы формирующегося мозга, содержащие нейроэпителиальные клетки, радиальную глию, нейробласты и нейроны [16]. Иммунофенотипирование эндотелиальных прогениторных клеток демонстрирует экспрессию ими некоторых ключевых антигенов (например, CD34, CD31, CD133, CD45, VEGFR2, CD144 и др.) [17], идентификация которых на резидентных клетках сосудистой стенки или прогениторных клетках костно-мозгового происхождения позволяет судить о механизмах развития и направленной миграции клеток эндотелия в ткани.

Эмбриональные стволовые клетки, коммитированные по эндотелиальному пути развития, рано начинают экспрессировать молекулы межклеточных контактов (молекулы клеточной адгезии, белки тесных и щелевых контактов) [18]. Вместе с тем, согласно экспериментальным данным [19], эндотелиальные прогениторные клетки, циркулирующие в периферической крови, способны приобретать фенотип, специфичный для ГЭБ, уже находясь в специализированных условиях культивирования *in vitro* что необходимо учитывать при разработке моделей ГЭБ.

Молекулярные механизмы направленной миграции эндотелиальных прогениторных клеток в ткань мозга изучены недостаточно. Вероятнее всего, мобилизация и рекрутинг эндотелиальных прогениторных клеток в развивающемся и зрелом мозге осуществляются благодаря продукции паракринных и эндокринных сигналов, продуцируемых клетками НВЕ в (пато)физиологических условиях.

Клетки радиальной глии и нейроэпителиальные клетки первыми взаимодействуют с эндотелиальными клетками в головном мозге в эмбриогенезе. Клетки радиальной глии экспрессируют глутамат-аспартатный транспортер GLAST, что указывает на их роль в регуляции метаболических событий на ранних этапах развития клеток головного мозга, а также коннексин 43 (Cx43), обеспечивающий эффективную па-

ракринную и аутокринную сигнализацию в участках интенсивной пролиферации клеток [20]. Именно клетки радиальной глии продуцируют ретиноевую кислоту, являющуюся одним из наиболее эффективных регуляторов формирования ГЭБ [9]. Применительно к процессам нейрогенеза полагают, что в зрелом мозге часть клеток, имеющих фенотип радиальной глии, наиболее активной в периоде эмбрионального нейрогенеза, сохраняется в нейрогенных нишах, не превращаясь в астроциты, что обеспечивает репаративный нейрогенез [21]. YKL-иммунопозитивные клетки, относящиеся к клеткам-предшественникам астроглии, обнаруживаются в головном мозге в раннем периоде развития именно в участках интенсивного ангиогенеза и формирующегося ГЭБ [22]. Интересно, что астроциты, экспрессирующие YKL-40, маркируют участки нейровоспаления или нейродегенерации в зрелом мозге [23, 24], что может свидетельствовать о роли астроглии в регуляции репаративного ангиогенеза. В периоде эмбриогенеза и в зрелом мозге эндотелиальные клетки сохраняют за собой важную функцию регуляторов нейрогенеза, что подтверждается их стимулирующим влиянием на поддержание популяции стволовых и прогениторных клеток головного мозга, а также действием факторов роста (например, VEGF, BDNF, LIF, PDGF, IGF) и других регуляторных молекул эндотелиального происхождения на клетки-участники процесса нейрогенеза [25, 26].

В постнатальном периоде неоваскулогенез, например при повреждении головного мозга, обеспечивается эндотелиальными прогениторными клетками костно-мозгового происхождения [27], и, вероятнее всего, именно этот механизм актуален для репарации ГЭБ, что объясняет зависимость клинического эффекта после повреждения головного мозга от уровня мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток в организме [28]. Пролиферация эндотелиальных клеток может индуцироваться, например, гипоксией, после чего активируются астроциты, изменяя экспрессию молекул клеточной адгезии в местах контакта с клетками эндотелия [29].

Нарушение различных этапов барьерогенеза и функционирования ГЭБ индуцируется многими факторами: 1) подавлением во время внутриутробного периода васкулогенеза и нейрогенеза; 2) влиянием патологии беременности и перинатального стресса на регуляцию развития и функционирования ГЭБ и на транспортные функции клеток эндотелия гуморальными факторами (гормонами стресса, нейропептидами, интерлейкинами); 3) повреждением нейронов, активацией астроцитов и микроглии, развитием нейровоспаления при нейроинфекциях и ишемии, что вызывает повышение проницаемости ГЭБ, особенно очевидное у недоношенных детей; 4) системным воспалением и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов в пренатальном и раннем постнатальном периодах, которые вызывают раннее повреждение ГЭБ и нарушение васкулогенеза с последующим формированием патологической проницаемости ГЭБ во взрослом периоде развития организма [30, 31].

Молекулярные механизмы барьерогенеза: роль межклеточных взаимодействий

Механизмам барьерогенеза посвящено много интересных обзоров литературы [10, 12, 32 и др.]. Согласно современным представлениям, сложные процессы барьерогенеза регулируются большим количеством факторов, в числе которых ведущая роль отводится Wnt/catenin, сиртуинам, Notch, HIF-1, NF- κ B, FOX, Rho АТФ-азе, GSK-3, а также гуморальным регуляторам (сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF), матриксные металлопротеиназы, нейротрансмиттеры, нейропептиды, нейростероиды, ФНО- α , ИЛ-1) [12, 32, 33]. На всех этапах барьерогенеза важным является формирование локального микроокружения (как правило, поддерживаемого гуморальными регуляторами), обеспечивающего разнообразные межклеточные взаимодействия, которые контролируют пролиферацию и дифференцировку клеток [34]. Существенную роль в формировании соответствующего локального микроокружения играют взаимодействия соседствующих (в пределах нейроваскулярной единицы) клеток — эндотелиоцитов, астроцитов, перицитов, нейронов. Интересно, что такие взаимодействия актуальны для всех этапов онтогенеза, и совершенно очевидно, что их характер меняется в процессе развития ГЭБ, на фоне его повреждения или репарации. Так, показано, что совместное культивирование *in vitro* эмбриональных нейрональных клеток-предшественников с эндотелиальными клетками церебральных капилляров индуцирует в последних барьерные свойства, характерные для эндотелия ГЭБ [35]. Позднее возможность воспроизведения сочетанных механизмов нейрогенеза и ангиогенеза из стволовых клеток *in vivo* была продемонстрирована M. Li с соавт. [36].

Индукция фенотипа, характерного для клеток ГЭБ, в эндотелиоцитах в период пренатального развития головного мозга обеспечивается влиянием на эндотелий стволовых нейрональных клеток [4].

Важную роль в ангиогенезе в развивающемся и зрелом мозге играют перициты. Эти клетки, участвующие в формировании ГЭБ, являются объектом регуляторного влияния большого числа гуморальных факторов эндотелиального происхождения, в частности VEGF и ангиопоэтинов [37–39]. Интересно, что разные сигнальные пути вовлечены в механизмы участия перицитов в формировании сосудов и барьерогенезе [40].

В целом в процессе барьерогенеза фактически можно наблюдать три основных направления специализации клеток-предшественников: 1) нейронализация (Wnt/Notch-регулируемые и другие ассоциированные механизмы); 2) астроглиализация (STAT3/RAR/Zac1-регулируемые и другие ассоциированные механизмы); 3) эндотелиолизация (HIF-1/SIRT1-регулируемые и другие ассоциированные механизмы).

Несмотря на то, что зрелые астроциты не принимают участия в ранних этапах формирования ГЭБ (в окружении мигрирующих в мозг клеток эндотелия преимущественно обнаруживаются клетки радиальной глии), существует точка зрения, что астроциты обеспечивают

формирование «матрицы» для ангиогенеза в процессе развития головного мозга за счет продукции VEGF, находясь в тесном взаимодействии с прогениторными клетками, формирующими сосуды [41]. Кроме того, есть данные о том, что метаболическая дисфункция астроцитов определяет характер повреждения ГЭБ [42]. Ретиноевая кислота — важный регулятор барьерогенеза [9] — является продуктом активности астроцитов [43]. Реактивные астроциты регулируют взаимодействие клеток церебрального эндотелия и эндотелиальных прогениторных клеток, высвобождая во внеклеточную среду белки группы HMGB1 (например, как результат повреждения клетки и активации инфламмосом), далее взаимодействующие с RAGE-рецепторами на клетках эндотелиальной природы [44].

HIF-1-сопряженные механизмы в астроцитах и эндотелиоцитах контролируют процессы ангиогенеза и барьерогенеза, проницаемости ГЭБ [45]; действие нейротоксических факторов, в частности амилоида, ассоциировано с повреждением астроцитов и вызывает интенсивный ангиогенез, нарушает проницаемость ГЭБ [46]. Такие пептиды астроглиального происхождения, как VEGF, стимулируют ангиогенез, тогда как тромбоспондин обладает ангиостатическим эффектом, но они оба важны для репаративного барьерогенеза и нейрогенеза [47, 48]. Интересно, что гиппокампаальные механизмы пластичности определяются особенностями продукции тромбоспондина астроцитами [49], а ангиогенный потенциал эндотелиальных прогениторных клеток подавляется тромбоспондином-1 [50]. Факторы, оказывающие влияние на биологические эффекты этих молекул (матриксные металлопротеиназы MMP и их ингибиторы TIMP, рецепторы тромбоспондинов CD47 и CD36), могут рассматриваться в качестве молекул-участников патогенеза большого спектра заболеваний [51].

Одним из самых мощных факторов стимуляции ангиогенеза, в частности при патологических состояниях, ассоциированных с необходимостью дополнительной васкуляризации ткани или восстановления поврежденных сосудов, является гипоксия. Интересно, что гипоксия повышает экспрессию PVLAP на клетках эндотелия ГЭБ, что может свидетельствовать об увеличении степени фенестрации и уровня транцитоза [4]. При гипоксии интересной является пока еще мало изученная функция представителей семейства Rho ГТФ-азы, например Rac1, под контролем которого находятся следующие события в клетках различной природы: 1) экспрессия HIF-1, определяющая характер ответа клеток на гипоксию, эффекты инсулина и метаболизм глюкозы [52]; 2) изменения белков цитоскелета, в частности необходимые для так называемой стелляции астроцитов [53]; 3) продукция свободных радикалов, секреция матриксных протеиназ (MMP-2, MMP-9), что является важным для ремоделирования внеклеточного матрикса [54]. Очевидно, что все перечисленные механизмы актуальны как для функционирования ГЭБ, так и для процессов барьерогенеза. Действительно, поддержание структурно-функциональной целостности эндотелиального барьера нуждается в активности Rac1 в различных органах и тканях [55–57]. Миграция эндоте-

лиальных клеток в специализированные ткани требует участия Rac1 в реализации эффектов SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), что актуально для ангиогенеза [58], например при повреждении ткани [59].

Многие события при межклеточных взаимодействиях определяются активностью транскрипционного фактора HIF-1, опосредующего ответ клеток на гипоксию. Известно, что HIF-1-контролируемые реакции энергетического обмена находят свое отражение в изменении процессов гликолиза, аккумуляции лактата и изменении характера нейрон-астроглиального метаболического сопряжения. Активность HIF-1 регулирует экспрессию VEGF [60] и церебральный ангиогенез. Кроме того, в числе HIF-1-контролируемых генов — гены, кодирующие SDF-1, транспортеры глюкозы и лактата, ферменты гликолиза, что необходимо для обеспечения функционирования клеток в условиях острой или хронической гипоксии. Интересно, что продукт анаэробного гликолиза — лактат (ключевой регулятор глиоваскулярного контроля, обеспечивающего увеличение локального кровотока в функционально активных регионах мозга) — способствует реализации программы ангиогенеза, действуя на клетки эндотелия [61], стимулирует циркулирующие стволовые васкулогенные клетки и увеличение экспрессии в них HIF-1-контролируемых ангиогенных факторов роста [62]. Проангиогенная активность лактата очевидна в условиях, при которых добавление лактата в матрицу для развития клеток сосудов существенно улучшает параметры ангиогенеза в зоне размещения имплантата [63].

Активация HIF-1 в клетках может быть индуцирована как гипоксией, так и негипоксическими стимулами, например продукцией активных форм кислорода митохондриями [64]. Важно отметить, что продукция лактата тесно связана с редокс-состоянием клетки [65], в частности соотношением НАД⁺/НАДН в митохондриях, поэтому негипоксические механизмы активации HIF-1 могут быть особенно актуальными в физиологических условиях функционирования ГЭБ. Насколько важны в этом контексте митохондриальные события в клетках эндотелия, сказать трудно, особенно с учетом особенностей функционирования митохондрий в клетках эндотелиальной природы по сравнению с другими клетками [66].

В пределах гематоэнцефалического барьера основными продуцентами лактата являются астроциты и клетки эндотелия. Так, показано, что продукция NO эндотелиоцитами стимулирует HIF-1 α -зависимые эффекты (в частности, активацию анаэробного гликолиза) в контактирующих астроцитах [67]. С другой стороны, пролиферация клеток эндотелия сама по себе контролируется процессами метаболизма глюкозы, а продуцируемый в ткани лактат транспортируется в клетки эндотелия, вызывая в них HIF-1 α -контролируемые события, приводящие к стимуляции ангиогенеза [68], что было продемонстрировано в опухолевой ткани. Насколько аналогичный механизм справедлив для астроцит-эндотелиальных взаимодействий в церебральных сосудах, нуждается в экспериментальной оценке, однако с учетом высокой гликолитической активности

астроцитов по сравнению с другими клетками нейроваскулярной единицы и их контролирующего влияния на процессы метаболического сопряжения клеток этот механизм представляется весьма вероятным.

Интересно, что ответ астроцитов на гипоксию, связанный с активацией HIF-1, имеет значение для патологического ангиогенеза, в свою очередь связанного с повреждением клеток центральной нервной системы, но не оказывает существенного влияния на ангиогенез в процессе развития мозга [69]. Согласно данным другой исследовательской группы, именно астроцитам принадлежит ключевая роль в формировании ангиогенного микроокружения при ангиогенезе, но HIF-1 α -опосредованные механизмы при этом локализованы преимущественно в нейронах, контактирующих с астроцитами [41].

В центральной нервной системе HIF-1 влияет на процессы транспорта и захвата глюкозы клетками, запоминания [70], а лактат выступает в качестве глиотрансммиттера, контролируя возбудимость нейронов [71], и в качестве ключевого регулятора локального кровотока в активных зонах мозга. Одновременно HIF-1 является объектом эпигенетической регуляции в клетках нейроваскулярной единицы, будучи деацетилованным сиртуином 1 [72], что может иметь отношение как к эпигенетической регуляции когнитивных функций в развивающемся мозге [73], так и к гомеостазу НАД⁺, определяющему активность НАД⁺-зависимых ферментов (АДФ-рибозилполимераза, АДФ-рибозилциклаза/CD38/CD157, сиртуины) [74]. Интересно, что лактат как продукт гликолитической активности подавляет активность деацетилаз (сиртуинов), вызывая долгосрочные изменения экспрессии генов [75]. Существует взаимосвязь между интенсивностью гликолиза и синаптогенеза, а также экспрессией генов, характерных для ранних этапов развития мозга [76]; между экспрессией генов, кодирующих белки, вовлеченные в нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение, и состояниями, связанными с нарушением клиренса метаболитов через гематоэнцефалический барьер [77].

Разработка современных фармакотерапевтических стратегий, направленных на регуляцию HIF-1-регулируемых механизмов ангиогенеза, является перспективным направлением в повышении эффективности лечения ишемических повреждений и дегенерации тканей, контроля опухолевой прогрессии [78], однако к настоящему времени есть лишь единичные доказательства того, что такие стратегии оправдают себя при коррекции нарушений барьерогенеза или повреждения ГЭБ [79–81].

Применение эндотелиальных прогениторных клеток в моделях гематоэнцефалического барьера *in vitro*

Одна из ключевых задач при моделировании ГЭБ *in vitro* — получение клеток-компонентов системы, наиболее близких по фенотипическим свойствам к клеткам ГЭБ *in vivo* (межклеточные контакты, метаболизм, активность белков-транспортеров, процессы эндо- и экзоцитоза), а также воспроизведение с максимальной

точностью естественных межклеточных взаимодействий, составляющих основу барьера [82]. Наиболее критическим моментом является использование максимально релевантных по отношению к ситуации *in vivo* (в контексте реализации собственно барьерной функции) клеток эндотелия. Другой критический момент — воспроизведение адекватной секреторной активности клеток-компонентов ГЭБ, обеспечивающих межклеточные взаимодействия и поддержание целостности барьера. Так, значительное число гуморальных факторов эндотелиальной природы и белков базальной мембраны ГЭБ влияет на состояние астроцитов, входящих в состав НВЕ [83].

Для решения этих задач предложены несколько подходов (см. таблицу). Наиболее часто используют метод, базирующийся на получении зрелых нейронов, астроцитов, эндотелиоцитов, выделенных из капилляров мозга, перицитов. Вместе с тем в течение последних трех лет сделаны попытки получения клеток-компонентов ГЭБ и их полной характеристики (в том числе с применением методов метабомики, протеомики) из клеток-предшественников (прогениторные клетки головного мозга) [84]. Такой подход интересен тем, что возможны и воспроизведение естественных механизмов так называемого барьерогенеза *in vitro*, представляющего по своей сути сочетание нейрогенеза и ангиогенеза, и идентификация ключевых клеточных событий, определяющих функциональную компетентность ГЭБ. В частности, анализ секрета эндотелиальных прогениторных клеток позволил идентифицировать молекулярные механизмы их влияния на ангиогенную активность церебрального эндотелия [27].

В настоящее время в качестве источника получения нейронов и астроцитов в таких протоколах применяются попытки использования нейрональных прогениторных клеток (NPCs) [85], а для получения клеток эндотелия — дифференцирующиеся человеческие плюрипотентные стволовые клетки (hPSCs). Интересно, что около 6% нейрональных стволовых клеток, культивируемых в присутствии эндотелия, могут конвертироваться в клетки эндотелиальной природы [86], что открывает возможности направленной дифференцировки нейрональных стволовых клеток *in vitro* во все основные клеточные компоненты ГЭБ (нейроны, астроциты,

эндотелиоциты). Вместе с тем с учетом выраженной гетерогенности популяции нейрональных стволовых клеток подбор адекватных условий культивирования для достижения указанного результата представляет собой серьезную методологическую проблему.

Получение клеток эндотелия, имеющего характеристики церебрального эндотелия, из hPSCs поможет осуществить настоящий прорыв в моделировании ГЭБ для решения задач персонафицированного скрининга нейротропных лекарственных препаратов, коль скоро все существующие на сегодняшний день модели ГЭБ утилизируют либо эндотелиоциты, выделенные из капилляров мозга (и это делает практически невозможным создание абсолютно адекватной модели ГЭБ, характерной для конкретного пациента), либо эндотелиоциты клеточных линий немозгового происхождения, например HUVEC (что ставит под сомнение возможность полной экстраполяции полученных данных на барьерные структуры центральной нервной системы).

Применение в среде культивирования гуморальных факторов, актуальных для барьерогенеза *in vivo*, например ретиноевой кислоты [87], позволяет существенно улучшить результаты получения клеток эндотелия, максимально приближенных по своим свойствам к церебральному фенотипу.

Еще один методический подход заключается в получении эндотелиальных клеток-компонентов ГЭБ из гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, которые в соответствующих условиях начинают экспрессировать белки тесных контактов и транспортеры, характерные для клеток церебрального эндотелия в составе ГЭБ [88].

Использование hPSCs в качестве источника получения так называемого примитивного эндотелия (эндотелия, характерного для ранних этапов онтогенеза) ставит дополнительную задачу по поиску оптимальных условий сокультивирования нейронов, астроцитов (полученных из плюрипотентных или прогениторных клеток) и эндотелиальных клеток для достижения последними максимально зрелого фенотипа (характерного для зрелого мозга) [16].

Разработка протоколов получения индуцированных человеческих плюрипотентных клеток (iPSCs) открыла новую эру в экспериментальной неврологии и ней-

Источники эндотелиальных клеток в моделях ГЭБ *in vitro*

Наименование	Источник получения	Достоинства	Недостатки
Зрелые эндотелиоциты	Капилляры взрослого мозга	Идентичность клеткам ГЭБ <i>in vivo</i>	Сложность процесса выделения и культивирования (ограниченная пролиферативная активность), невозможность оценить процессы барьерогенеза
Эмбриональные прогениторные эндотелиальные клетки	Эмбриональный мозг	Возможность оценки барьерогенеза, миграции клеток	Сложность направленной дифференцировки клеток
Плюрипотентные стволовые клетки (hPSCs, iPSCs)	Соматические генетически перепрограммированные взрослые клетки	Возможность оценки барьерогенеза, миграции клеток, персонафикации модели	Техническая сложность методики получения hPSCs и iPSCs, сложность направленной дифференцировки клеток

рофармакологии [89–91]. Применение iPSCs для моделирования *in vitro* структур мозга, в том числе ГЭБ, открывает новые возможности в разработке технологий персонализированного скрининга лекарственных веществ, а также в изучении индивидуальных особенностей патогенеза заболеваний центральной нервной системы.

Клеточно-молекулярные механизмы барьерогенеза и поддержания целостности ГЭБ в пре- и постнатальном периодах развития головного мозга отличаются друг от друга, что определяется не только особенностями функционирования эндотелиальных прогениторных клеток, но и их взаимодействиями с другими клетками НВЕ. Прогресс в изучении этих механизмов позволит разработать новые фармакотерапевтические подходы к направленной регуляции проницаемости ГЭБ.

Финансирование исследования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00054).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Atkins G.B., Jain M.K., Hamik A. Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(7): 1476–1484, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.228999>.
- Кувачева Н.В., Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Малиновская Н.А., Моргун А.В., Пожиленкова Е.А., Замай Г.С., Язуина Н.А., Петрова М.М. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2013; 113(4): 80–85. Kuvacheva N.V., Salmina A.B., Komleva Yu.K., Malinovskaia N.A., Morgun A.V., Pozhilenkova E.A., Zamai G.S., Iauzina N.A., Petrova M.M. Permeability of the hematoencephalic barrier in normalcy, brain development pathology and neurodegeneration. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* 2013; 113(4): 80–85.
- Bundgaard M., Abbott N.J. All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago. *Glia* 2008; 56(7): 699–708, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20642>.
- Daneman R., Zhou L., Kebede A.A., Barres B.A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010; 468(7323): 562–566, <http://dx.doi.org/10.1038/nature09513>.
- Luissint A.C., Artus C., Glacial F., Ganeshamoorthy K., Couraud P.O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9(1): 23, <http://dx.doi.org/10.1186/2045-8118-9-23>.
- Ronaldson P.T., Davis T.P. Blood-brain barrier integrity and glial support: mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Curr Pharm Des* 2012; 18(25): 3624–3644, <http://dx.doi.org/10.2174/138161212802002625>.
- Моргун А.В., Кувачева Н.В., Таранушенко Т.Е., Хилажева Е.Д., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Пожиленкова Е.А., Фролова О.В., Салмина А.Б. Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции. *Вестник РАМН* 2013; 12: 26–35. Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Taranushenko T.E., Khilazheva E.D., Malinovskaya N.A., Gorina Ya.V., Pozhilenkova E.A., Frolova O.V., Salmina A.B. Current concepts of perinatal ischemic injury in the brain neurovascular unit: molecular targets for neuroprotection. *Vestnik RAMN* 2013; 12: 26–35.
- Nico B., Ribatti D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab* 2012; 13(1): 50–60, <http://dx.doi.org/10.2174/138920012798356970>.
- Mizee M.R., Wooldrik D., Lakeman K.A., van het Hof B., Drexhage J.A., Geerts D., Bugiani M., Aronica E., Mebius R.E., Prat A., de Vries H.E., Reijerkerk A. Retinoic acid induces blood-brain barrier development. *J Neurosci* 2013; 33(4): 1660–1671, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1338-12.2013>.
- Engelhardt B., Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 2014; 355(3): 687–699, <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-1811-2>.
- Салмина А.Б., Моргун А.В., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Кутищева И.А., Труфанова Л.В., Таранушенко Т.Е., Мартынова Г.П. Межклеточные взаимодействия в развивающемся гематоэнцефалическом барьере. *Педиатрия* 2013; 2: 155–159. Salmina A.B., Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Kutishcheva I.A., Trufanova L.V., Taranushenko T.E., Martynova G.P. Cell-cell interactions in the developing blood-brain barrier. *Pediatriya* 2013; 2: 155–159.
- Siegenthaler J.A., Sohet F., Daneman R. ‘Sealing off the CNS’: cellular and molecular regulation of blood-brain barrierogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2013; 23(6): 1057–1064, <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2013.06.006>.
- Risau W., Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 1990; 13: 174–178, [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90043-A](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(90)90043-A).
- Wallace C.S., Withers G.S., Farnand A., Lobingier B.T., McCleery E.J. Evidence that angiogenesis lags behind neuron and astrocyte growth in experience-dependent plasticity. *Dev Psychobiol* 2011; 53(5): 435–442, <http://dx.doi.org/10.1002/dev.20559>.
- Lu J. A novel hypothesis of blood-brain barrier (BBB) development and in vitro BBB model: neural stem cell is the driver of BBB formation and maintenance. *J Exp Integr Med* 2012; 2(1): 39–43, <http://dx.doi.org/10.5455/jeim.041211.hp.002>.
- Lippmann E.S., Azarin S.M., Kay J.E., Nessler R.A., Wilson H.K., Al-Ahmad A., Palecek S.P., Shusta E.V. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2012; 30(8): 783–791, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2247>.
- Timmermans F., Plum J., Yöder M.C., Ingram D.A., Vandekerckhove B., Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 2009; 13(1): 87–102, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x>.
- Stankovich B.L., Aguayo E., Barragan F., Sharma A., Pallavicini M.G. Differential adhesion molecule expression during murine embryonic stem cell commitment to the hematopoietic and endothelial lineages. *PLoS One* 2011; 6(9): e23810, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023810>.
- Boyer-Di Ponio J., El-Ayoubi F., Glacial F., Ganeshamoorthy K., Driancourt C., Godet M., Perrière N.,

- Guillevic O., Couraud P.O., Uzan G. Instruction of circulating endothelial progenitors in vitro towards specialized blood-brain barrier and arterial phenotypes. *PLoS One* 2014; 9(1): e84179, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084179>.
20. Salmina A.B., Morgun A.V., Kuvacheva N.V., Lopatina O.L., Komleva Y.K., Malinovskaya N.A., Pozhilenkova E.A. Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story. *Rev Neurosci* 2014; 25(1): 97–111, <http://dx.doi.org/10.1515/revneuro-2013-0044>.
21. Gubert F., Zaverucha-do-Valle C., Pimentel-Coelho P.M., Mendez-Otero R., Santiago M.F. Radial glia-like cells persist in the adult rat brain. *Brain Res* 2009; 1258: 43–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.021>.
22. Bjørnbak C., Brøchner C.B., Larsen L.A., Johansen J.S., Møllgård K. Brain barriers and a subpopulation of astroglial progenitors of developing human forebrain are immunostained for the glycoprotein YKL-40. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(5): 369–388, <http://dx.doi.org/10.1369/0022155414528514>.
23. Craig-Schapiro R., Perrin R.J., Roe C.M., Xiong C., Carter D., Cairns N.J., Mintun M.A., Peskind E.R., Li G., Galasko D.R., Clark C.M., Quinn J.F., D'Angelo G., Malone J.P., Townsend R.R., Morris J.C., Fagan A.M., Holtzman D.M. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010; 68(10): 903–912, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.08.025>.
24. Bonne-Barkay D., Wang G., Starkey A., Hamilton R.L., Wiley C.A. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 34, <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-7-34>.
25. Goldberg J.S., Hirschi K.K. Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche. *Regen Med* 2009; 4(6): 879–897, <http://dx.doi.org/10.2217/rme.09.61>.
26. Tavazoie M., Van der Veken L., Silva-Vargas V., Louissaint M., Colonna L., Zaidi B., Garcia-Verdugo J.M., Doetsch F. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 279–288, <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.025>.
27. Di Santo S., Seiler S., Fuchs A.L., Staudigl J., Widmer H.R. The secretome of endothelial progenitor cells promotes brain endothelial cell activity through PI3-kinase and MAP-kinase. *PLoS One* 2014; 9(4): e95731, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095731>.
28. Liu L., Wei H., Chen F., Wang J., Dong J.F., Zhang J. Endothelial progenitor cells correlate with clinical outcome of traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2011; 39 (7): 1760–1765, <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182186cee>.
29. Li L., Welser J.V., Dore-Duffy P., del Zoppo G.J., Lamanna J.C., Milner R. In the hypoxic central nervous system, endothelial cell proliferation is followed by astrocyte activation, proliferation, and increased expression of the alpha 6 beta 4 integrin and dystroglycan. *Glia* 2010; 58(10): 1157–1167, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20995>.
30. Gómez-González B., Escobar A. Altered functional development of the blood-brain barrier after early life stress in the rat. *Brain Res Bull* 2009; 79(6): 376–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.05.012>.
31. Ek C.J., Dziegielewska K.M., Habgood M.D., Saunders N.R. Barriers in the developing brain and neurotoxicology. *Neurotoxicology* 2012; 33(3): 586–604, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2011.12.009>.
32. Lee H.S., Han J., Bai H.J., Kim K.W. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *FEBS J* 2009; 276(17): 4622–4635, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07174.x>.
33. Stanimirovic D.B., Friedman A. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32(7): 1207–1221, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2012.25>.
34. Abbott N.J., Rönnebeck L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(1): 41–53, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1824>.
35. Weidenfeller C., Svendsen C.N., Shusta E.V. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem* 2007; 101(2): 555–565, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04394.x>.
36. Li M., Nishimura H., Sekiguchi H., Kamei N., Yokoyama A., Horii M., Asahara T. Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells. *Circ Res* 2009; 105(9): 860–868, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199299>.
37. Ribatti D., Nico B., Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011; 55(3): 261–268, <http://dx.doi.org/10.1387/ijdb.103167dr>.
38. Gaengel K., Genové G., Armulik A., Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(5): 630–638, <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521>.
39. Greenberg J.I., Shields D.J., Barillas S.G., Acevedo L.M., Murphy E., Huang J., Schepke L., Stockmann C., Johnson R.S., Angle N., Cheres D.A. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 2008; 456(7223): 809–813, <http://dx.doi.org/10.1038/nature07424>.
40. Siegenthaler J.A., Choe Y., Patterson K.P., Hsieh I., Li D., Jaminet S.C., Daneman R., Kume T., Huang E.J., Pleasure S.J. Foxc1 is required by pericytes during fetal brain angiogenesis. *Biol Open* 2013; 2(7): 647–659, <http://dx.doi.org/10.1242/bio.20135009>.
41. Nakamura-Ishizu A., Kurihara T., Okuno Y., Ozawa Y., Kishi K., Goda N., Tsubota K., Okano H., Suda T., Kubota Y. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. *Dev Biol* 2012; 363(1): 106–114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.027>.
42. Yan L.J., Xiao M., Chen R., Cai Z. Metabolic dysfunction of astrocyte: an initiating factor in beta-amyloid pathology? *Aging Neurodegener* 2013; 1(1): 7–14.
43. Shearer K.D., Fragoso Y.D., Clagett-Dame M., McCaffery P.J. Astrocytes as a regulated source of retinoic acid for the brain. *Glia* 2012; 60(12): 1964–1976, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22412>.
44. Hayakawa K., Pham L.D., Arai K., Lo E.H. Reactive astrocytes promote adhesive interactions between brain endothelium and endothelial progenitor cells via HMGB1 and beta-2 integrin signaling. *Stem Cell Res* 2014; 12(2): 531–538, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2013.12.008>.
45. Fan X., Heijnen C.J., van der Kooij M.A., Groenendaal F., van Bel F. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res Rev* 2009; 62(1): 99–108, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.09.006>.
46. Biron K.E., Dickstein D.L., Gopaul R., Jefferies W.A. Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing

blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011; 6(8): e23789, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023789>.

47. Lu Z., Kipnis J. Thrombospondin 1 — a key astrocyte-derived neurogenic factor. *FASEB J* 2010; 24(6): 1925–1934, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-150573>.

48. Tian W., Sawyer A., Kocaoglu F.B., Kyriakides T.R. Astrocyte-derived thrombospondin-2 is critical for the repair of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 2011; 179(2): 860–868, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.002>.

49. Crawford D.C., Jiang X., Taylor A., Mennerick S. Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity in vitro. *J Neurosci* 2012; 32(38): 13100–13110, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2604-12.2012>.

50. Qin Q., Qian J., Ge L., Shen L., Jia J., Jin J., Ge J. Effect and mechanism of thrombospondin-1 on the angiogenesis potential in human endothelial progenitor cells: an in vitro study. *PLoS One* 2014; 9(2): e88213, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088213>.

51. Lawler P.R., Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(5): a006627, <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006627>.

52. Hirota K., Semenza G.L. Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 2001; 276(24): 21166–21172, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100677200>.

53. Racchetti G., D'Alessandro R., Meldolesi J. Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes. *Glia* 2012; 60(3): 465–475, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22280>.

54. Murthy S., Ryan A., He C., Mallampalli R.K., Carter A.B. Rac1-mediated mitochondrial H₂O₂ generation regulates MMP-9 gene expression in macrophages via inhibition of SP-1 and AP-1. *J Biol Chem* 2010; 285(32): 25062–25073, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.099655>.

55. Aslam M., Schluter K.D., Rohrbach S., Rafiq A., Nazli S., Piper H.M., Noll T., Schulz R., Gündüz D. Hypoxia-reoxygenation-induced endothelial barrier failure: role of RhoA, Rac1 and myosin light chain kinase. *J Physiol* 2013; 591(Pt 2): 461–473, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2012.237834>.

56. Wojciak-Stothard B., Tsang L.Y., Paleolog E., Hall S.M., Haworth S.G. Rac1 and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290(6): 1173–1182, <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00309.2005>.

57. Sawada N., Kim H.H., Moskowitz M.A., Liao J.K. Rac1 is a critical mediator of endothelium-derived neurotrophic activity. *Sci Signal* 2009; 2(61): ra10, <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2000162>.

58. Shen L., Gao Y., Qian J., Wu Y., Zhou M., Sun A., Zou Y., Ge J. The role of SDF-1 α /Rac pathway in the regulation of endothelial progenitor cell polarity; homing and expression of Rac1, Rac2 during endothelial repair. *Mol Cell Biochem* 2012; 365(1-2): 1–7, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-011-1083-z>.

59. Shen L., Gao Y., Qian J., Sun A., Ge J. A novel mechanism for endothelial progenitor cells homing: the SDF-1/CXCR4-Rac pathway may regulate endothelial progenitor cells homing through cellular polarization. *Med Hypotheses* 2011; 76(2): 256–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2010.10.014>.

60. Sun X., Tsipis C.P., Benderro G.F., Xu K., Lamanna J.C. Defining the role of HIF and its downstream mediators in hypoxic-induced cerebral angiogenesis. *Methods Mol Biol* 2014; 1135: 251–260, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_21.

61. Ruan G.X., Kazlauskas A. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis. *J Biol Chem* 2013; 288(29): 21161–21172, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.474619>.

62. Milovanova T.N., Bhopale V.M., Sorokina E.M., Moore J.S., Hunt T.K., Hauer-Jensen M., Velazquez O.C., Thom S.R. Lactate stimulates vasculogenic stem cells via the thioredoxin system and engages an autocrine activation loop involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6248–6261, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00795-08>.

63. Hunt T.K., Aslam R., Hussain Z., Beckert S. Lactate, with oxygen, incites angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2008; 614: 73–80, http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-74911-2_9.

64. Patten D.A., Lafleur V.N., Robitaille G.A., Chan D.A., Giaccia A.J., Richard D.E. Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 2010; 30(18): 3247–3257, <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0025>.

65. Bergersen L.H., Gjedde A. Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Front Neuroenergetics* 2012; 4: 5, <http://dx.doi.org/10.3389/fnene.2012.00005>.

66. Groschner L.N., Waldeck-Weiermair M., Malli R., Graier W.F. Endothelial mitochondria — less respiration, more integration. *Pflugers Arch* 2012; 464(1): 63–76, <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1085-z>.

67. Brix B., Mesters J.R., Pellerin L., Jöhren O. Endothelial cell-derived nitric oxide enhances aerobic glycolysis in astrocytes via HIF-1 α -mediated target gene activation. *J Neurosci* 2012; 32(28): 9727–9735, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0879-12.2012>.

68. Polet F., Feron O. Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force. *J Intern Med* 2013; 273(2): 156–165, <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12016>.

69. 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. Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *Glia* 2010; 58(10): 1177–1185, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20997>.

70. Huang Y., Lei L., Liu D., Jovin I., Russell R., Johnson R.S., Di Lorenzo A., Giordano F.J. Normal glucose uptake in the brain and heart requires an endothelial cell-specific HIF-1 α -dependent function. *PNAS USA* 2012; 109(43): 17478–17483, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1209281109>.

71. Tang F., Lane S., Korsak A., Paton J.F., Gourine A.V., Kasparov S., Teschemacher A.G. Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat Commun* 2014; 5: 3284, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4284>.

72. Lim J.H., Lee Y.M., Chun Y.S., Chen J., Kim J.E., Park J.W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell* 2010; 38(6): 864–878, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.023>.

73. Gräff J., Rei D., Guan J.S., Wang W.Y., Seo J., Hennig K.M., Nieland T.J., Fass D.M., Kao P.F., Kahn M., Su S.C., Samiei A., Joseph N., Haggarty S.J., Delalle I.,

- Tsai L.H. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 2012; 483(7388): 222–226, <http://dx.doi.org/10.1038/nature10849>.
74. Салмина А.Б., Инжуртова А.И., Моргунов А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., Лопатина О.Л., Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. НАД⁺-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции. Вестник РАМН 2012; 10: 29–37. Salmina A.B., Inzhutova A.I., Morgun A.V., Okuneva O.S., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L., Petrova M.M., Taranushenko T.E., Fursov A.A., Kuvacheva N.V. NAD⁺-converting Enzymes in Neuronal and Glial Cells: CD38 as a Novel Target for Neuroprotection. *Vestnik RAMN* 2012; 10: 29–37.
75. Latham T., Mackay L., Sproul D., Karim M., Culley J., Harrison D.J., Hayward L., Langridge-Smith P., Gilbert N., Ramsahoye B.H. Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(11): 4794–4803, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks066>.
76. Goyal M.S., Hawrylycz M., Miller J.A., Snyder A.Z., Raichle M.E. Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenuous gene expression. *Cell Metab* 2014; 19(1): 49–57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.020>.
77. Petit J.M., Gyger J., Bulet-Godinot S., Fiumelli H., Martin J.L., Magistretti P.J. Genes involved in the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) are specifically regulated in cortical astrocytes following sleep deprivation in mice. *Sleep* 2013; 36(10): 1445–1458, <http://dx.doi.org/10.5665/sleep.3034>.
78. Rey S., Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2010; 86(2): 236–242, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq045>.
79. Chen W., Jadhav V., Tang J., Zhang J.H. HIF-1 α inhibition ameliorates neonatal brain injury in a rat pup hypoxic-ischemic model. *Neurobiol Dis* 2008; 31(3): 433–441, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.020>.
80. Yan J., Zhou B., Taheri S., Shi H. Differential effects of HIF-1 inhibition by YC-1 on the overall outcome and blood-brain barrier damage in a rat model of ischemic stroke. *PLoS One* 2011; 6(11): e27798, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027798>.
81. Reischl S., Li L., Walkinshaw G., Flippin L.A., Marti H.H., Kunze R. Inhibition of HIF prolyl-4-hydroxylases by FG-4497 reduces brain tissue injury and edema formation during ischemic stroke. *PLoS One* 2014; 9(1): e84767, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084767>.
82. Liebner S., Czupalla C.J., Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* 2011; 55(4–5): 467–476, <http://dx.doi.org/10.1387/ijdb.103224sl>.
83. Levy A.F., Zayats M., Guerrero-Cazares H., Quiñones-Hinojosa A., Searson P.C. Influence of basement membrane proteins and endothelial cell-derived factors on the morphology of human fetal-derived astrocytes in 2D. *PLoS One* 2014; 9(3): e92165, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092165>.
84. Lippmann E.S., Al-Ahmad A., Palecek S.P., Shusta E.V. Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources. *Fluids Barriers CNS* 2013; 10(1): 2, <http://dx.doi.org/10.1186/2045-8118-10-2>.
85. Lippmann E.S., Weidenfeller C., Svendsen C.N., Shusta E.V. Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons. *J Neurochem* 2011; 119(3): 507–520, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07434.x>.
86. Wurmser A.E., Nakashima K., Summers R.G., Toni N., D'Amour K.A., Lie D.C., Gage F.H. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004; 430(6997): 350–356, <http://dx.doi.org/10.1038/nature02604>.
87. Lippmann E.S., Al-Ahmad A., Azarin S.M., Palecek S.P., Shusta E.V. A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci Rep* 2014; 4: 4160, <http://dx.doi.org/10.1038/srep04160>.
88. Cecchelli R., Aday S., Sevin E., Almeida C., Culot M., Dehouck L., Coisne C., Engelhardt B., Dehouck M.P., Ferreira L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 2014; 9(6): e99733, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099733>.
89. Yamanaka S., Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2006; 51(15): 2346–2351.
90. Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2007; 2(12): 3081–3089, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.418>.
91. Yagi T., Kosakai A., Ito D., Okada Y., Akamatsu W., Nihei Y., Nabetani A., Ishikawa F., Arai Y., Hirose N., Okano H., Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS One* 2012; 7(7): e41572, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041572>.