

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

HUN-REN SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
BIOFIZIKAI INTÉZET

**Egy új, humán őssejteken alapuló vér-agy gát és agyi organoid
lab-on-a-chip modell jellemzése**

Kocsis Anna

Molekuláris Biológia MSc

II. évfolyam

Témavezetők:

Prof. Deli Mária, kutatóprofesszor

Dr. Walter Fruzsina, tudományos főmunkatárs

HUN-REN SZBK, Biofizikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Perei Katalin, egyetemi adjunktus

SZTE TTIK, Biológia Intézet,

Biotechnológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. A vér-agy gát jellemzése	3
1.2. A vér-agy gát <i>in vitro</i> modellezése	5
1.3. Mikrofluidikai <i>in vitro</i> vér-agy gát vizsgálati módszerek	7
1.4. Az agyi organoidok jelentősége a kutatásokban	8
2. Célkitűzés	10
3. Anyagok és módszerek	11
3.1. Vegyszerek	11
3.2. Sejtenyésztés	11
3.2.1. Humán vér-agy gát modell tenyésztése	11
3.2.2. Középagyi organoidok fenntartása	11
3.3. A biochip felépítése	12
3.4. Dinamikus vér-agy gát modell és agyi organoid ko-kultúra létrehozása	13
3.5. Gátműködés vizsgálata	15
3.5.1. Elektromos impedancia spektroszkópia	15
3.5.2. Permeabilitás	16
3.6. Immunfestés	17
3.7. Polipeptid nanohordozó átjutásának és felvételének vizsgálata	18
3.8. Oxidatív stressz vizsgálata	19
3.9. Statisztikai analízis	19
4. Eredmények	20
4.1. Középagyi organoidok integrálására alkalmas barrier chip létrehozása	20
4.2. A vér-agy gát modell gát tulajdonságainak vizsgálata az organoidok jelenlétében	21
4.3. Agyi organoidok jellemzése a lab-on-a-chip rendszerben	22
4.4. Nanohordozók átjutásának tesztelése	23
4.5. Kontrasztanyag hatása az agyi organoidokra	24
5. Megbeszélés	26
6. Összefoglalás	30
Irodalomjegyzék	31
Köszönetnyilvánítás	37

Rövidítések jegyzéke

BBB: vér-agy gát

BDNF: agyi eredetű idegsejt növekedési faktor

BSA: borjú szérum albumin

cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát

DCFDA: diklorodihidrofluoreszcein

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12

EBA: Evans-kékkel jelölt albumin

FBS: borjúsavó

FD4: fluoreszcein izotiocianáttal jelölt 4,4kDa méretű dextrán

GDNF: glia eredetű idegsejt növekedési faktor

GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje

ITS: inzulin-transzferrin-szelenium kiegészítő

iPSC: indukált pluripotens őssejt

MAP-2: mikrotubulus asszociált fehérje 2

PBS: foszfát pufferelt sóoldat

PDMS: polidimetil-sziloxán

PFA: paraformaldehid

ROS: reaktív oxigéngyök

TEER: transzendenteliális elektromos ellenállás

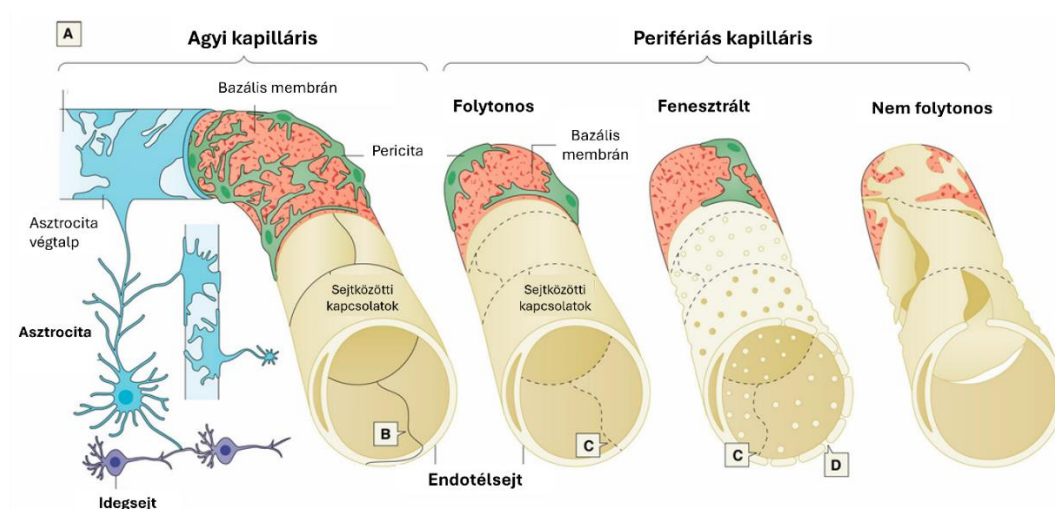
TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β

TX: Triton X-100 detergens

1. Bevezetés

1.1. A vér-agy gát jellemzése

A vér-agy gát a keringés és a központi idegrendszer közötti dinamikus határfelület. Elsődleges szerepe az idegi mikrokörnyezet szabályozása, a megfelelő működéshez történő homeosztázis fenntartása. A vér-agy gát tápanyagokkal és oxigénnel látja el az agyat, védelmezi a káros anyagokkal és kórokozókkal szemben, kommunikációs felületet biztosít a periféria és a központi idegrendszer között. A gát funkcionális alapját a kapilláris agyi endotélsejtek alkotják. Ezek az őket körülvevő pericitákkal, asztrocita végtalpakkal és neuronokkal együtt hozzák létre a neurovaszkuláris egységet (1. ábra, Campos-Bedolla és mtsai., 2014; Profaci és mtsai., 2020). A periciták segítik a mikroerek szerkezetének stabilizálását, hozzájárulnak a vér-agy gát fejlődéséhez és szabályozásához (Abbott és mtsai., 2010; Deli, 2011). Az asztroglia végtalpak a mikroerek felszínét beborítva segítik a sejtek közötti kommunikációt és a szisztémás keringés és az idegrendszer közötti anyagátvitelt (Abbott és mtsai., 2006).



1. ábra. Agyi és perifériás kapillárisok összehasonlítása (Profaci és mtsai., 2020, módosítva). **A)** központi idegrendszeri és perifériás kapillárisok összehasonlítása. **B)** Sejtközi kapcsolatok a vér-agy gát endotélsejtjei között. **C)** Lazább sejtközi kapcsolatok perifériás endotélsejtjei között. **D)** Fenesztrált perifériás endotélsejtjei.

Az agyi endotélsejtek által létrehozott kapillárisok számos tulajdonságban különböznek a perifériás mikroerektől (1. ábra). A perifériás kapillárisokban jelentős a transzcelluláris vezikuláris transzport, lazábbak a sejtközi kapcsolatok, amelyek akár teljesen átjárhatóak, fenesztráltak, tehát a sejtek között hézagok lehetnek. Ezek a tulajdonságok hatékony, de kevésbé szabályozott anyagáramlást tesznek lehetővé. A központi idegrendszeri kapillárisok ezzel szemben szoros kapcsolatokkal fűződnek össze, a sejtek nem fenesztráltak, a transzcitózis

nagyon kismértékű (Campos-Bedolla és mtsai., 2014; Profaci és mtsai., 2020). Az agyi endotélsejteken számos speciális transzporter figyelhető meg, amely hozzájárul az adott tápanyag vagy egyéb molekula szabályozott átjutásához. A központi idegrendszer szempontjából káros anyagok távoltartása pedig efflux pumpák segítségével történik (Abbott és mtsai., 2010; Campos-Bedolla és mtsai., 2014).

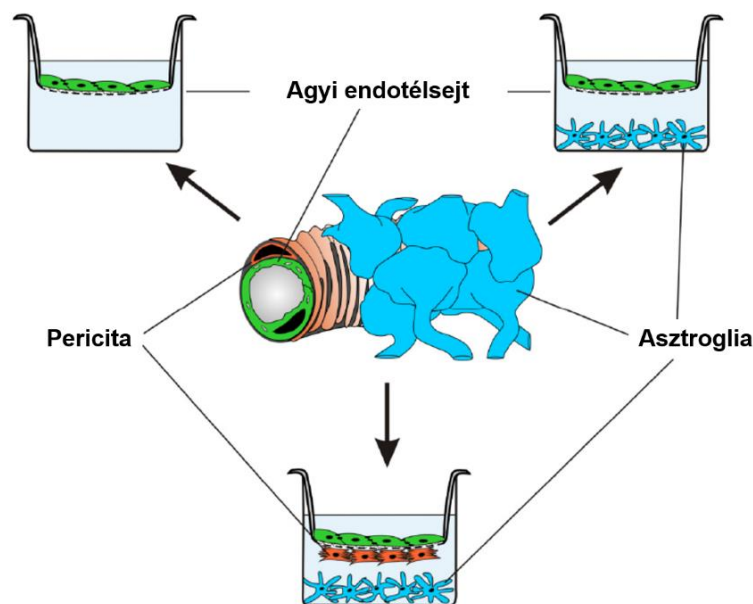
Az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok fizikai gátat képeznek, ezzel korlátozzák a vízdékony anyagok és ionok sejtek közötti (paracelluláris) átjutását. A szoros kapcsolatokat integráns transzmembrán fehérjék alakítják ki, mint a klaudin, az okkludin és más adhéziós molekulák (JAM, ESAM). Ezeket az aktin sejtvázhhoz zonula occludens-1 (ZO-1) kapcsoló fehérjék kötik, amely hálózat dinamikus átalakulásra képes. A szoros kapcsolatok kialakításában és fenntartásában fontos szerepe van az adherens junctionoknak is. Az adherens kapcsolatokat felépítő PECAM (vérlemezske és endotélsejt adhéziós molekula), kadherin fehérjék és azok kapcsoló fehérjéi, mint a β -katenin jelentős szerepet játszanak jelátviteli utakban a sejtek közötti kapcsolódás szabályozása mellett (Deli, 2009).

A vér-agy gátat kialakító agyi endotélsejtek vér felőli és agy felőli oldalán speciális szállítófehérjék találhatóak, amelyek szigorúan szabályozzák az anyagáramlást az agy felé és az agy felől a szisztémás keringés felé. Az endotélsejtek lumenális, vér felőli oldalán található efflux pumpák megakadályozzák az agy számára káros anyagok bejutását. Azonban ezek azok a transzporterek, amelyek a központi idegrendszeri betegségek kezelésére kifejlesztett gyógyszer hatóanyagok nagy részének a bejutását is megakadályozzák az agyba. Az agyi mikroerek legjellemzőbb efflux pumpái az ABC transzporter család tagjai, mint a P-glikoprotein (ABCB1), az ABCG2 (BCRP) és a multidrog rezisztens fehérje család (ABCC, MRP) (Deli, 2011). A paracelluláris anyagáramlás korlátozása, az alacsony szintű transzcelluláris vezikuláris transzport, a specializált tápanyagszállító fehérjék és az aktív efflux pumpák közösen járulnak hozzá a vér-agy gát tulajdonságok kialakulásához (Deli, 2009).

Az agyi endotélsejtek felszíni töltése negatívabb a perifériás mikroerekhez képest, mivel a sejtmembránban nagyobb számban fordulnak elő a negatív töltésű foszfatidilszerin és foszfatidilinozitol molekulák. A glikokalix az agyi endotélsejtek lumenális felszínén levő cukorfehérje köpeny, ami főként proteoglikánokból, glikoproteinekből és glükózaminoglikánokból áll, amelyhez számos negatív töltésű szulfát és szíalsav molekula kapcsolódik. Egyedülálló elhelyezkedése, összetétele és szerkezete negatív töltésű fizikai gátként szolgál, mely szabályozza a különböző töltöttségű biomolekulák agyba való bejutását, emellett a véráramlás hatására kialakuló nyírófeszültséggel szemben mechanoszenzorként viselkedik (Ando és mtsai., 2018; Walter és mtsai., 2021).

1.2. A vér-agy gát *in vitro* modellezése

A vér-agy gáttal kapcsolatos kutatások már több mint 100 évvel ezelőtt elkezdődtek. A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban laborunk megalapítója, Joó Ferenc és munkatársai voltak az elsők, akik rácsálókból izolált agyi mikroereken vizsgálták a vér-agy gátat (Joó és Karnushina, 1973), ezzel megtették az első lépést az *in vitro* modellek megalkotásához (Joó, 1993). A sejtenyészetes vér-agy gát modellek fontossá váltak a gát tulajdonságok tanulmányozásában, működésének megismerésében, és különböző fajtáit jelenleg is széles körben alkalmazzák gyógyszerhatóanyagok átjutásának és hatásának vizsgálatára (Deli és mtsai., 2005; Deli, 2011).



2. ábra. Az első háromsejtes primer izolált sejtenyészetes vér-agy gát modell sejtenyészítő betéten (Nakagawa és mtsai., 2007; 2009). Középen a vér-agy gát anatómiai rajza, ahol a funkcionális alapot az agyi endotélsejtek alkotják (zöld), őket a periciták borítják be (narancssárga) és kívülről a rendszert asztroglia végtalpak (kék) burkolják. Bal felső sarokban az agyi endotélsejt monokultúra, jobb felső sarokban a kétsejtes asztroglia-endotél ko-kultúra rajza látható sejtenyészítő betéten. Lent középen pedig az anatómiai felépítésnek megfelelő háromsejtes vér-agy gát ko-kultúra helyezkedik el (Veszélka és mtsai., 2011, módosítva).

A sejtenyészetes vér-agy gát modellek egy részét napjainkban is állati eredetű primer sejtek felhasználásával hozzák létre (2. ábra; Veszélka és mtsai., 2011; Helms és mtsai., 2016). A primer patkány sejtekből álló ko-kultúra modellek széles körben alkalmazott, megbízható, az *in vivo* állatkísérletek (gyógyszer)molekula transzport eredményeivel jól összevethető rendszerek (Avdeef és mtsai., 2015). Kimutatták, hogy az endotélsejteket pericitákkal vagy asztrocitákkal együtt tenyésztve erősödnek a vér-agy gát tulajdonságok, a sejtközi szoros kapcsolatokat alkotó fehérjék kifejeződése megemelkedik, a sejtréteg transzendenteliális

elektromos ellenállása (TEER) megnő, permeabilitása csökken. A legerősebb gát tulajdonságokat akkor érték el, amikor a három sejttípust az anatómiai elhelyezkedésnek megfelelően tenyésztették (2. ábra, Nakagawa és mtsai., 2007; Nakagawa és mtsai., 2009). Humán primer sejtvonalak is léteznek, azonban ezek a sejtvonalak nehezen elérhetőek, drágák és felhasználásuk etikai engedélyhez kötött (Bernas és mtsai., 2010).

A primer sejtek kinyerése, a ko-kultúra rendszerek összeállítása és fenntartása anyag- és időigényes, valamint komoly szakértelmet, gyakorlatot igényel. A preklinikai gyógyszereszteléshez pedig egyre jobban szükségessé váltak olyan sejtenyészetes modellek, melyek könnyebben és egyszerűbben kezelhetőek (Weksler és mtsai., 2013; Helms és mtsai., 2016). Az első, széleskörben alkalmazott humán sejtvonalhoz az agyi endotélsejteket epilepsziás betegekből műtéti úton eltávolított agyszövetből izolálták és immortalizálták. (Weksler és mtsai., 2005). A hCMEC/D3 humán agyi endotél sejtvonal alkalmas patológias folyamatok vizsgálatára (Weksler és mtsai., 2013). Azonban a szoros kapcsolat fehérjék (klaudin-5, okkludin) alacsony szinten fejeződnek ki, emiatt a sejtek gyenge paracelluláris gátat képeznek. Így ez a modell csak kevésbé alkalmas endotélsejt rétegen történő permeabilitási vizsgálatokra (Helms és mtsai., 2016).

Az elmúlt 10-15 évben az *in vitro* vér-agy gát modellek kifejlesztésének legújabb iránya az indukált pluripotens őssejtek (iPSC) használata. Humán iPSC-ből agyi endotélsejtek is differenciálthatók, melyek rendelkeznek a speciális vér-agy gátra jellemző tulajdonságokkal, így alkalmasak gyógyszerhatóanyagok, valamint patológias folyamatok vizsgálatára (Lippmann és mtsai., 2012). Kétlépcsős differenciációs folyamat során olyan őssejtekből létrehozott endotélsejteket is tenyésztettek, melyek magas szinten fejeznek ki adhéziós molekulákat, ezzel segítve az immunsejtek migrációját (Nishihara és mtsai., 2020). Az őssejt-alapú modellek esetén eddig nagyon nehéz volt elérni, hogy az endotélsejtek egyszerre képezzenek erős gátat és emellett megtartsák az agyi endotélsejtekre jellemző speciális tulajdonságokat. Csoportunk legújabb kísérleteiben összeállított és tesztelt egy kismolekula koktélt, mely a Wnt szignalizációs útvonal aktivációjával erősíti a gát tulajdonságok kifejeződését, miközben a sejtek megtartják endotél jellegeiket (Porkoláb és mtsai., 2024).

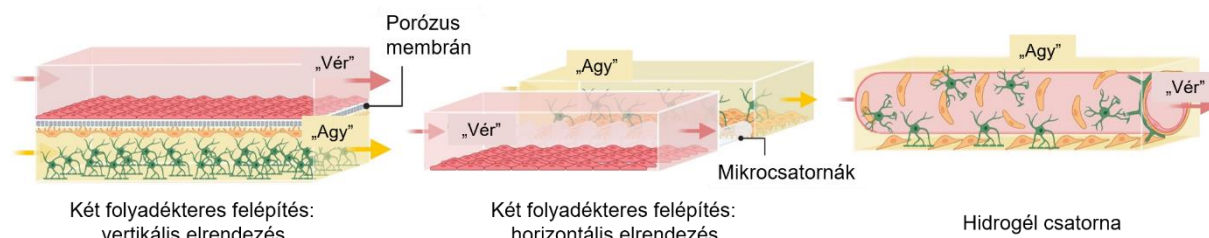
Jelenleg az egyik legmodernebb, sokak által alkalmazott humán endotél modell olyan vaszkuláris endotélsejteken alapul, amelyeket humán köldökzsinór vérből izolált CD34⁺ hemopoetikus őssejtekből hoznak létre (Cecchelli és mtsai., 2014). Ez a sejtvonal könnyebben kezelhető, mint a primer humán sejtek. Felhasználásukkal az eredmények jól reprodukálhatóak, és agyi pericitákkal együtt tenyésztve erősebb barriert képeznek, mint a hCMEC/D3 sejtvonal.

Kísérleteinkhez ezért ezt a ko-kultúra modellt alkalmaztuk. A modellt kutatócsoportunk korábban mikrofluidikai chip-eszközben is vizsgálta (Santa-Maria és mtsai., 2021).

1.3. Mikrofluidikai *in vitro* vér-agy gát vizsgálati módszerek

A lab-on-a-chip mikrofluidikai és mikroelektronikai eszközök egyre népszerűbbek a biológiai gátrendszerek modellezésében. Az eszközt felépítő csatornák és a különböző beépített szenzorok jó lehetőséget adnak a fizioiógias körülmények *in vitro* modellezésére (3. ábra). Kis méretüknek köszönhetően könnyen mozgathatók a mérőberendezésekhez, de a mérések akár az inkubátorban is elvégezhetők (Kincses és mtsai., 2023; Deli és mtsai., 2024).

Felépítés szerint a barrier lab-on-a-chip rendszereknek három általános típusa van (3. ábra). Az elsőnél a csatornákat porózus műanyag membrán választja el, ami biztosítja a tenyésztő felületet. Ez az elrendezés a sejtenyésztő betétek két folyadékteres felépítésére hasonlít (Griep és mtsai., 2013; Walter és mtsai., 2016). Ehhez hasonló, amikor a két folyadéktér párhuzamosan fut egymással (Deosarkar és mtsai., 2015). Egy harmadik típusban a csatornát hidrogél formálja, amelyet az endotélsejtek körbenőnek és a hidrogélbe ágyazott pericitákkal és asztrogliaikkal közvetlenül tudnak érintkezni (Herland és mtsai., 2016; Campisi és mtsai., 2018). Mindhárom esetben előny, hogy megvalósítható a folyadékáramlás, ezáltal a fizioiógias véráramláshoz hasonló nyírófeszültség érheti az agyi endotélsejteket.



3. ábra. Vér-agy gát lab-on-a-chip modellek típusai. Bal oldal: két folyadékteres rendszer, a csatornák egymás felett futnak és porózus tenyésztő membránnal vannak elválasztva. Középen: Két folyadékteres rendszer, a csatornák egymás mellett futnak, van közöttük átjárás. Jobb oldal: Hidrogél formálta csatorna (Kincses és mtsai., 2023, módosítva).

Csoportunk első, különböző biológiai barrierék modellezésére alkalmas, saját fejlesztésű mikrofluidikai eszközét 2016-ban publikálta (Walter és mtsai., 2016). A kétcsatornás, vertikális elrendezésű, membránnal elválasztott barrier chipben több sejtípus együttes tenyésztésével ko-kultúra modellek is létrehozhatóak. A rendszer arany elektródákkal rendelkezik, amely alkalmassá teszi a sejtréteg ellenállásának vizsgálatára. Az elektródák bár lefedik a biochip

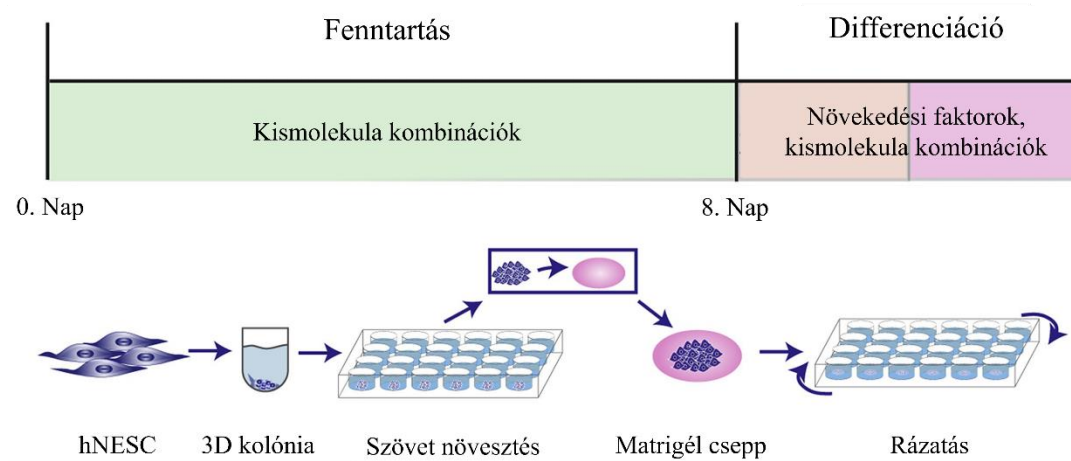
felületét, de nagyon vékony, 25 nm vastag réteget képeznek, ezáltal nem akadályozzák a sejtek láthatóságát: a sejtek morfológiáját a sejtenyésző felület teljes hosszában mikroszkóppal vizsgálhatjuk. A chip segítségével csoportunk primer patkány hármas ko-kultúra modellen, és humán agyi endotélsejteken is vizsgálta a vér-agy gát tulajdonságokat (Walter és mtsai., 2016). Ez az eszköz ötvözte az összes olyan lab-on-a-chip követelményt, amely széleskörű gát integritás vizsgálatokat tesz lehetővé: a teljes sejtréteg mikroszkópozható (fáziskontraszt és fluoreszcens), mérhető az elektromos ellenállás, permeabilitási vizsgálatok végezhetőek és többféle sejttípus együtt tenyésztése is megvalósítható (Walter és mtsai., 2016). Lab-on-a-chip rendszerünkön humán hematopoetikus őssejtekből származó agyi endotélsejtek felhasználásával kimutattuk, hogy folyadékáramlás hatására megemelkedett a glikokalix alkotóelemeinek génkifejeződése és a sejtek felszíni töltése még negatívabbá vált (Santa-Maria és mtsai., 2021). A meglévő impedancia mérés mellett elsőként mértük meg egybefüggő agyi endotél egysejtréteg áramlási potenciálját, ezáltal a sejtfelszíni töltésben *in situ* bekövetkezett változások követését is el tudjuk végezni (Kincses és mtsai., 2020).

Az lab-on-a-chip modellezés következő szintje a szerv-a-chipen (organ-on-a-chip) rendszerek létrehozása, tehát a szövet vagy szerv szintű eszközök összeállítása. Ezeknek a mikroelektronikai chipeknek a célja, hogy humán őssejtek felhasználásával komplex és megbízható modellek jöjjenek létre. A humán iPSC eredetű, egészséges, vagy betegekből származó sejttípusok, vagy összetettebb sejtszisztemek, mint az organoidok relevánsabbak a gyógyszeresztelés során, kórfolyamatok vizsgálatában és csökkenthetik az állatkísérletek számát is (Ingber, 2022).

1.4. Az agyi organoidok jelentősége a kutatásokban

Az idegrendszeri betegségek *in vitro* modellezése elsősorban kétdimenziós neuronális sejtenyészetekkel történik. Ezek hiányossága, hogy nem tudják leképzeni az emberi agy sejt-hálózatának térbeli komplexitását, a sejtek közötti kapcsolatokat és kommunikációt (Smits és mtsai., 2019; Chiaradia és Lancaster, 2020). Az összetettebb, akár genetikai módosítással létrehozott rágszáló modellek is elterjedtek, azonban az egér és az emberi agy közötti fejlődési, méretbeli és összetettségbeli különbségek limitálhatják a vizsgálati lehetőségeket (Chiaradia és Lancaster, 2020). Az iPSC-alapú technikák fejlődésével lehetőség nyílt a központi idegrendszeri betegségek pontosabb *in vitro* modellezésére. Az agyi organoidokkal való munka új szintre emelte a gyógyszerhatóanyagok bejutásának és hatásulásának vizsgálatát, és lehetővé vált számos kórélettani modell létrehozása is (Lancaster és mtsai., 2013; Choudhury és mtsai., 2020).

Az agyi organoidok többfajta sejtből álló, összetett, önszerveződő, háromdimenziós struktúrák, amelyek jól összehasonlíthatók az emberi agy sejtszerveződéséhez. Ezekben az *in vitro* modellekben az emberi agy számos szerkezeti és élettani jellemzője megfigyelhető, ami a kétdimenziós sejttenyészetekből hiányzik. A komplex sejt-sejt kapcsolatok megléte nagyon fontos a klinikai vizsgálatok során tesztelt gyógyszerhatóanyagok hatásosságának előrejelzésében (Smits és Schwamborn, 2020; Chiaradia és Lancaster, 2020). A humán iPSC alapú *in vitro* rendszerek alkalmazása számos új információval szolgálhat az emberi agyban lejátszódó folyamatok megértéséhez, kiegészítve az állatmodelleket. Fejlesztésük elengedhetetlen az idegrendszeri betegségek megfelelő leképezéséhez, a kórfolyamatok megértéséhez (Monzel és mtsai., 2017; Nickels és mtsai., 2020).



4. ábra. Humán közepagyai organoidok létrehozása (Monzel és mtsai., 2017, módosítva). hNESC: humán neuroepiteliális őssejtek.

Laboratóriumunkban a kísérleteink komplexitásának növeléséhez az *in vitro* vér-agy gát modellrendszert agyi organoidok együtt tenyésztésével először statikus, sejttenyésztő betéteken létrehozott modellen kezdtük el kiegészíteni (Mészáros és mtsai., 2023). Munkánkhoz a közepagyai organoidokat luxemburgi együttműködő partnereink szolgáltatják (Smits és mtsai., 2019; Nickels és mtsai., 2020). Vizsgálataink során egészséges donorokból származó közepagyai organoidokkal és Parkinson kóros betegekből származó őssejtekből differenciáltatott közepagyai organoidokkal is dolgoztunk, de a dolgozatban csak az egészséges sejtekkel történő kísérletek eredményeit mutatjuk be. Az organoidok létrehozásának lépéseit a 4. ábra mutatja. Elsőként humán neuroepiteliális őssejteket szélesztenek speciális letapadást gátló lemezre. A háromdimenziós struktúra azáltal alakul ki, hogy a sejtek nem tudnak letapadni a sejttenyésztő

lemez alá. A sejtpopulációt 8 napon keresztül növesztik a WNT és a Sonic hedgehog jelátviteli útvonalakat serkentve (4. ábra, fenntartás). A folyamat során a neuroepiteliális őssejtek középagy-specifikus dopaminerg neuronokká differenciálódnak (Nickels és mtsai., 2020). Ezután a kialakult sejtsomókat extracelluláris mátrixba ágyazzák, és a sejteket növekedési faktorokat és kismolekulákat tartalmazó tápfolyadékban neuronokká és asztrocitákká differenciáltatják (4. ábra, differenciáció; Monzel és mtsai., 2017; Nickels és mtsai., 2020). Az így létrehozott középagy organoidok 30 napos differenciáltatás után alkalmasak kísérleti felhasználásra (Nickels és mtsai., 2020). Kísérleteinkben 60-120 napos organoidokat használtunk.

2. Célkitűzés

Korábbi TDK munkámban összefoglaltam, hogy sikerrel hoztunk létre egy humán sejteken alapuló, *in vitro* vér-agy gát és középagy organoid ko-kultúra modellt statikus sejtenyésző-betéteken. Optimalizáltuk az organoidok fenntartását a laborkörülményeink között, beállítottuk a vér-agy gát modell és az organoidok tenyésztéséhez szükséges tápfolyadékok arányát, a megfelelő agyi endotélsejt – organoid arányt és az együtt tenyésztés időzítését is.

Jelen pályamunka célja, hogy a meglévő tudás ötvözésével elsőként hozzunk létre egy emberi őssejteken alapuló *in vitro* lab-on-a-chip vér-agy gát és agyi organoid ko-kultúra modellt. Tervünk, hogy a korábban kifejlesztett, biológiai gátak modellezésére alkalmas mikroelektronikai és mikrofluidikai eszközünket továbbfejlesszük középagy organoidok rendszerbe építésével. Így a vér-agy gáton végbemenő folyamatok megfigyelésekor nem csak az agyi endotélén bekövetkező változásokat, de az agyszövetet modellező organoidokat érő hatásokat is leírhatjuk. A modellben korszerű megközelítéssel folyadékáramlás alatt vizsgálhatjuk az agyi endotélsejteket, míg az agyi organoidok és a vér-agy gát modell egymásra hatását is tesztelhetjük. Célunk:

1. Egy új típusú, humán őssejteken alapuló vér-agy gát és organoid szerv-a-chipen (organ-on-a-chip) ko-kultúra modell összeállítása és jellemzése: morfológia, permeabilitási és impedancia mérések, a gát tulajdonságok meghatározása.
2. A rendszeren nanohordozóhoz kötött fluoreszcens vendégmolekulák a vér-agy gáton történő átjutásának és agyi organoidba történő bejutásának vizsgálata.
3. A klinikumban releváns, az idegsebészetben használt jódtartalmú kontrasztanyag hatásának agyi organoidokon történő tesztelése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vegyszerek

A kísérleteinkhez használt reagensek forgalmazója és gyártója a Sigma-Aldrich/Merck Kft., Magyarország, hacsak másképp nem jelöltük.

3.2. Sejttenyésztés

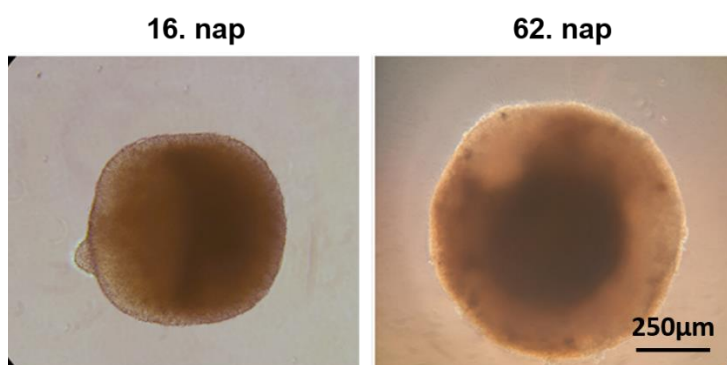
3.2.1. Humán vér-agy gát modell tenyésztése

Kísérleteinkhez humán köldökszinór vérből izolált CD34⁺ hemopoetikus őssejtekből differenciáltatott endotélsejteket használtunk (Cecchelli és mtsai., 2014). Csoportunk korábban jellemezte ezt a modellt agyi pericitákkal való ko-kultúrában lab-on-a-chip eszközben (Santa-Maria és mtsai., 2021). A humán endotél- és a agyi pericita sejteket csoportunk francia együttműködő partnere, Prof. Fabien Gosselet csoportja biztosítja számunkra (University of Artois, Franciaország; etikai engedély: Béthune Maternity Hospital, Béthune, Franciaország, protokoll száma DC2011-1321). A humán vaszkuláris endotélsejteket a CD34⁺ őssejtekből differenciáltatták, majd fagyasztva tárolták és szállították. Laboratóriumunkban az endotélsejteket felolvasztást követően először I-es típusú kollagénnel bevont Petri csészékben (Corning Costar, USA) növesztettük. A tápfolyadék alapja az endotélsejt tenyésztő médium (ECM, Sciencell, USA), melyhez 5% borjúsavót (FBS, Sciencell), 1% endotélsejt növekedési faktort (ECGS, Sciencell) és 50 µg/ml gentamicint adtunk. Az agyi pericitákat szintén I-es típusú kollagénnel bevont Petri-csészében (Corning Costar) növesztettük. A tápfolyadék összetétele DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Thermo Fisher Scientific, USA), 20% FBS (Pan Biotech, Németország), 1% GlutaMAX (stabil glutamin, Thermo Fisher Scientific), és 50 µg/ml gentamicin volt. A humán endotélsejteket a pericitákkal történő együtt tenyésztés serkenti a vér-agy gát agyi endotélsejtté történő differenciálódásra. Az endotélsejteket maximum 7., a pericitákat pedig maximum 12. passzálási számig használtuk.

3.2.2. Középagyi organoidok fenntartása

A középagyi organoidokat a nemzetközi együttműködés keretén belül luxemburgi partnerünk, Prof. Jens C. Schwamborn csoportja biztosította számunkra (Nickels és mtsai., 2020). Az organoidokat neuronális progenitor őssejtekből állítják elő egészséges és Parkinson-kóros betegek őssejtjeinek felhasználásával. A jelenlegi munkában az egészséges középagyi organoidokkal végzett kísérleteinket foglaljuk össze. Az organoidokat 96-lyukú letapadást gátló lemezben (Corning Costar) hozták létre 9×10^3 sejt/lyuk kiindulási sejtszámmal. A sejteket egy hétig fenntartó tápfolyadékban tartották, majd a differenciációt következő két

lépésben speciális faktorok segítségével. Ezt követően az organoidokat érést segítő tápfolyadékba helyezték át, amelyben kézhez kaptuk őket. Az érést segítő tápfolyadék alapját a DMEM/F12 és a Neurobasal sejtenyésző médiumok (Thermo Fisher Scientific) 1:1 arányú keveréke adta. Ezt a tápfolyadékot egészítettük ki az alábbi anyagokkal: L-glutamin (2 mM, Thermo Fisher Scientific), B27 kiegészítő (100x, Thermo Fisher Scientific), N2 kiegészítő (200x, Thermo Fisher Scientific), dibutiril-cAMP (500 μ M), BDNF (10 ng/ml agyi eredetű idegsejt növekedési faktor, Peprotech, USA), GDNF (10 ng/ml, glia eredetű idegsejt növekedési faktor, Peprotech), TGF- β 3 (1 ng/ml, transzformáló növekedési faktor- β 3, Peprotech), activin A (2,5 ng/ml, Peprotech), L-aszkorbinsav (200 μ M) és DAPT (10 μ M (2S) N-[(3,5-difluorfenil)-acetyl]-L-alanil-2-fenil]-glicin-1,1-dimetil-etil-észter, Tocris Bioscience, UK), gentamicin (50 μ g/ml). Az agyi organoidokon heti három alkalommal cseréltünk tápfolyadékot (Nickels és mtsai., 2020, Veszélka és mtsai., 2021), növekedésükről rendszeresen készítettünk fáziskontraszt mikroszkópos képeket (5. ábra, Motic AE2000 fáziskontraszt mikroszkóp, Motic Microscopy, Kína).

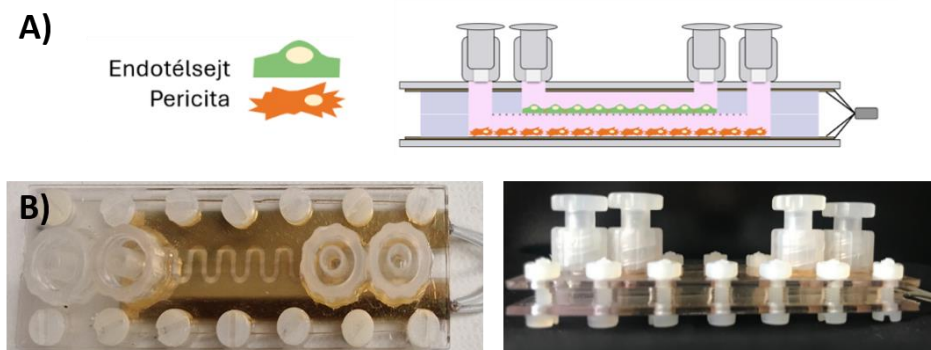


5. ábra. Egészséges donorból származó összejtekből differenciáltatott középagyi organoidokról készített fáziskontraszt felvételek. Mércé: 250 μ m.

3.3. A biochip felépítése

Kísérleteinkhez a csoportunk által kifejlesztett és szabadalmaztatott mikrofluidikai eszköz továbbfejlesztett változatát hoztuk létre (6. ábra, Walter és mtsai., 2016; Santa-Maria és mtsai., 2021). A biochip 5 fő rétegből tevődik össze szendvics-szerűen: a külső borítást két műanyag tárgylemez hozza létre, közöttük egy magasabb alsó (2 mm), és egy vékonyabb felső (0,2 mm) PDMS (dimetil-polisziloxán, Dow Inc., USA) réteg található, amelyen belül a két csatorna húzódik. A PDMS rétegek közé porózus membránt illesztünk (It4ip, Belgium; PET, vastagság 23 μ m, pórus átmérő 0.45 μ m, pórus sűrűség $2 \times 10^6/\text{cm}^2$). A csatornák szélessége

2 mm, hosszúsága 35 mm/40 mm (felső/alsó). A chip-szendvicset műanyag csavarok fogják össze.



6.ábra. Biológiai barrierék modellezésére alkalmas mikrofluidikai eszköz. **A)** Sematikus ábra, a korábban jellemzett biochip oldalnézeti rajza és a tenyésztett sejtek elhelyezkedése (Santa-Maria és mtsai., 2021, módosítva). **B)** Az eredeti, még organoid nélküli biochip modell felülnézeti és oldalnézeti fotója.

Az organoidok integrálásához a biochip alsó oldalára három lyukat fúrtunk, melyekbe PCR csövek kupakja helyezhető. Ezekben az organoidok könnyen elférnek. A korábban használt elektródák felületét csökkentettük, hogy a mérés szempontjából fontos elektróda szimmetriát megtartsuk az organoidok integrálásával egyidejűleg. A modellhez egy új, impedancia mérésre alkalmas kétrétegű arany-platina elektróda párt fejlesztettünk, amelyet a tárgylemezek felületére vákuumporlasztással vittünk fel. Ehhez vezetőképes epoxy ragasztóval (CW2400, ITW Chemtornics, USA) rögzítettük a réz drótokat, melyekkel az impedancia spektroszkóphoz tudjuk kapcsolni a biochipket. A csatornák Luer kompatibilis bevezetéseit (inlet, Carl Roth, Németország) UV fényre szilárduló Norland ragasztóval (Norland Products Inc., USA) rögzítettük.

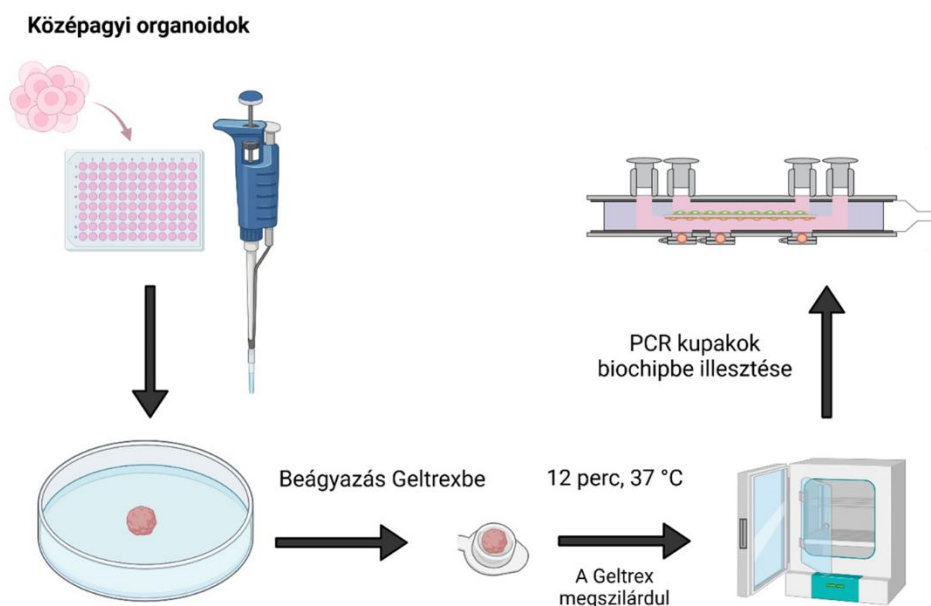
3.4. Dinamikus vér-agy gát modell és agyi organoid ko-kultúra létrehozása

A biochipeket lezárt zacskóban Malatec ózon tisztító segítségével sterilizáltuk 30 percig. Ezt követően az eszközök 10 percre plazmatisztítóba (PDC-002, Harrick Plasma, USA) helyeztük. Az oxigén plazma hatására hidrofillé válik a PDMS és a sejtenyésző membrán felszíne, így a vékony csatornákat sokkal könnyebben fel tudjuk tölteni folyadékkal. Utolsó lépésként a csatornákat 1 órára feltöltöttük 70% etanollal, majd ötször átmostuk steril desztillált vízzel.

A csatornákat elválasztó porózus membrán mindkét oldalát bevontuk extracelluláris mátrix fehérjékkel. Az endotélsejtek tenyésztéséhez a felső csatornát IV-es típusú kollagénnel

és fibronektinnel, az agyi pericitáknak az alsó csatornát I-es típusú kollagénnel vontuk be egy éjszakán át 4°C-on. A következő nap a bevonót kipipettáztuk, és a chipeket 20 percig UV fényben hagytuk. Ezután a csatornákat feltöltöttük humán endotélsejt tápfolyadékkal, lezártuk, és 37°C-os inkubátorba helyeztük őket 1 órára. Ezt követően a sejt nélküli chipeken megmértük az impedanciát, ez az érték adja a sejtek nélküli háttérét.

Először a membrán alsó oldalára pericitákat szélesztettünk endotélsejt tápfolyadékban ($1,5 \times 10^4$ sejt/chip). Ehhez a lezárt chipeket fejjel lefelé fordítottuk, és 2 órára inkubátorba helyeztük a sejtek letapadásához. Ezt követően a chipeket visszafordítottuk, és az endotélsejteket a membrán felső oldalára szélesztettük (6×10^4 sejt/chip), ezután vártunk újabb 2 órát. A felső csatornán 8 óránként fecskendőpumpa segítségével frissre cseréltük a tenyésztő tápfolyadékot (500 µl/perc, 4 perc). Ehhez a biochipek felső csatornáit szilikon csövekkel hármasával vagy négyesével egymáshoz kapcsoltuk. Az elsőhöz minden csoportban endotélsejt tápfolyadékkal feltöltött 20 ml-es fecskendőt kötöttünk, amelyet fecskendő pumpába helyeztünk. Az utolsó chip után pedig 100 ml-es tápfolyadéktartóba vezettük bele a rendszert, ami az elhasznált médiumot gyűjtötte. Az alsó csatornában a tápfolyadékot naponta manuálisan cseréltük.



7. ábra. Agyi organoidok mosása, beágyazása extracelluláris mátrix gélbe a PCR kupakokba (Geltrex), és a kupakok biochipbe illesztése. A képet Biorender segítségével készítettem.

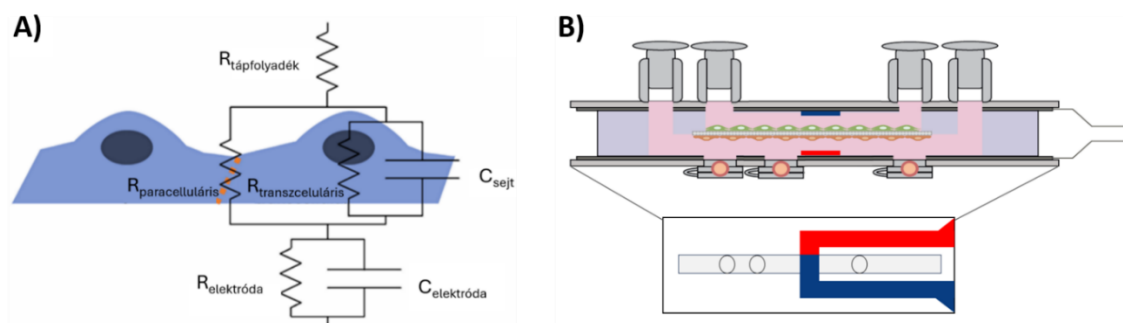
Korábbi munkám során optimalizáltam a vér-agy gát modell és az agyi organoidok együtt tenyésztésének időzítését. A lab-on-a-chip kísérletekben is ezt a menetrendet használtuk. A vér-

agy gát modell biochipben történő összeállítása után két nappal később az agyi organoidokat a rendszerbe illesztettük (7. ábra). A 60-120 napos középagyú organoidokat DMEM/F12 tápfolyadékkal megmostuk, majd beágyaztuk a PCR csövek kupakjába csökkentett növekedési faktor tartalmú extracelluláris mátrixba (Geltrex, Thermo Fisher Scientific). A kupakokat steril Petri csészében 12 percre a 37°C-os inkubátorba helyeztük, hogy a Geltrex megszilárduljon. Ezután a kupakokat feltöltöttük tápfolyadékkal, és a biochipekbe pattintottuk őket (7. ábra). Innentől kezdve az alsó csatornában humán endotélsejt tápfolyadék és az agyi organoidok érését segítő tápfolyadék 1:1 arányú elegyét tettük. A kísérletet megelőző napon a felső csatornában 1 ml/perc ($0,4 \text{ dyne/cm}^2$) folyadékáramlást hoztunk létre perisztaltikus pumpával, hogy modellezzük a véráramlást, és ezzel erősítsük az agyi endotélsejtekre jellemző speciális tulajdonságokat (Santa-Maria és mtsai., 2021).

3.5. Gátműködés vizsgálata

3.5.1. Elektromos impedancia spektroszkópia

A vér-agy gát modellek szorossága vizsgálatának elterjedt módja a transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése, mely a sejtréteg ionokkal szembeni paracelluláris ellenállását adja meg. A TEER valós idejű, gyors és nem invazív mérést tesz lehetővé.



8. ábra. A) Az egysejtréteg helyettesítő áramköre, elektródák sematikus rajza (Vigh és mtsai., 2021, módosítva). **B)** Az új, csökkentett felületű platina/arany elektródák oldalnézeti és felülnézeti rajza az organoidokat is tartalmazó biochipen (Santa-Maria és mtsai., 2021, módosítva)

Az elektromos impedancia spektroszkópia (EIS) többletinformációt ad a gátfunkcióról a hagyományos ellenállásos mérésekhez képest, ugyanis az ellenállás mellett a rendszer kapacitív tulajdonságait is jellemzi és információt ad a sejtek morfológiai változásáról. Az impedancia a váltakozó áramú rendszerben fellépő ellenállás. Az elektromos tér hatására a mobilis ionok az elektromos tér irányának megfelelően mozdulnak el. Az alacsony amplitúdójú váltakozó

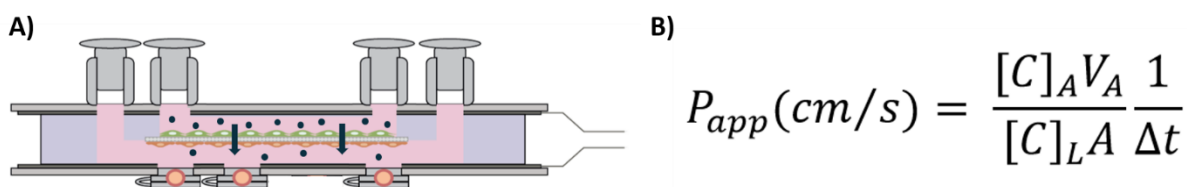
elektromos gerjesztés hatására a rendszer polarizálódik, mérhető az ennek hatására bekövetkező amplitúdó és fázis válasz. Az impedancia frekvenciafüggő mennyiség, az adott rendszernek megfelelő frekvenciatartományban kell végezzük a mérést (Vigh és mtsai., 2021).

A gátfunkció vizsgálatához a 10 Hz – 10 kHz tartomány a legmegfelelőbb, amely a paracelluláris, sejtek közötti ionáramlást mutatja. A méréshez a chipet fűtőkamrába (37°C) helyeztük, ugyanis a hőmérséklet változása az impedancia fluktuációját okozhatja. A mért adatokat Nyquist vagy Bode diagramon ábrázoltuk. A Nyquist diagram az impedancia valós és képzetes részét, a Bode diagram pedig a frekvenciaspektrumon mért impedancia amplitúdóját és fáziseltolódását mutatja. Az impedancia értékét az EC-LAB (BioLogic, Franciaország) program segítségével jelenítjük meg.

3.5.2. Permeabilitás

Az agyi endotélsejtréteg gát funkciójára vonatkozó permeabilitási méréseket az adott kísérlet végén vizsgáltuk (Deli és mtsai., 2005; Walter és mtsai., 2016). Ezekhez fluoreszcein izotiocianáttal jelölt 4,4 kDa méretű dextránt (FD4) és Evans-kékkel jelölt albumint (EBA, 67 kDa) használtunk. Az FD4 és EBA törzsoldatot 1% borjú szérum albumint (BSA) és 1% inzulin-transzferrin-szelenium kiegészítőt (ITS) tartalmazó Ringer-Hepes pufferben hígítottuk 100 µg/ml ill. 167 µg/ml végkoncentrációban. A Ringer-Hepes oldat összetétele: 150 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 2,2 mM CaCl₂·2H₂O, 0,2 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM D-glükóz, 6 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes, pH 7,4.

A kísérlet kezdetén a felső (luminális) folyadéktérben lecseréltük a tápfolyadékot az FD4-et tartalmazó permeabilitási oldatra (150 µl), míg az alsó (abluminális) folyadéktér jelzőanyag nélküli permeabilitási puffert tartalmazott (400 µl, 9. ábra). A kísérlet alatt a chipet 37°C-on, CO₂ inkubátorban, síkrázó készüléken tartottuk (150 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország).



9. ábra. A) Permeabilitás mérés sematikus ábrája az organoidokat is tartalmazó biochipen. **B)** Látszólagos permeabilitási együttható (P_{app}) egyenlete az agyi endotélsejten való anyagátjutás meghatározására.

Az átjutott jelzőanyag mennyiségét spektrofotométer (Horiba Fluorolog 3, Japán) segítségével határoztuk meg (FD4 gerjesztés: 490 nm, elnyelés: 516 nm hullámhossz; EBA gerjesztés: 582 nm, elnyelés: 662 nm hullámhossz). A jelzőanyag sejtrétegen való átjutását a látszólagos permeabilitási együtthatóval (P_{app}) jellemeztük (9. ábra, Hellinger és mtsai., 2012). Az egyenletben a $[C]_A$ a jelzőanyag abluminális koncentrációja, V_A az abluminális térfogat, A a membrán felszíne, és $[C]_L$ a jelzőanyag luminális koncentrációja. Minél alacsonyabb a P_{app} érték, annál szorosabbak a sejtközi kapcsolatok, jobb a modell gátműködése, és kifejezettebbek a vér-agy gát tulajdonságok.

3.6. Immunfestés

A chipeket a kísérlet végén 2 percig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os aceton metanol 1:1 arányú elegyével fixáltuk, majd 1% FBS-foszfát pufferrel (PBS) mostuk, hogy rehidratáljuk a membránon a sejtréteget. A PBS oldat összetétele: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 6,5 mM $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Ezt követően 3% BSA-PBS oldattal blokkoltuk a nemspecifikus kötőhelyeket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az endotélsejteket nyúl anti-klaudin-5 (1:200) és β -katenin (1:200, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) blokkoló pufferben hígított elsődleges antitestekkel egy éjszakán át, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. Másnap a sejteket háromszor megmostuk PBS oldattal, majd PBS-ben hígított Cy3-jelölt anti-nyúl másodlagos antitesttel (1:400) és Hoechst 33342 magfestéssel (1:1000) inkubáltuk a sejteket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az immunfestés befejeztével a mintákat háromszor megmostuk PBS-sel, majd egyszer desztillált vízzel. A biochipeket ezt követően szétcsavaroztuk, és kivettük a membránokat a két PDMS réteg közül, majd tárgylemezre helyeztük és lefedtük őket (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA). A festéseket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH, Németország).

A középagyi organoidokat 3% paraformaldehiddel (PFA) 75 percig fixáltuk szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át 30%-os szacharóz oldattal telítettük. Ezt követte a fagyasztva metszés, amelyhez az organoidokat beágyaztuk (Optimal Cutting Temperature oldat, Tissue-Tek, USA). Kriosztát segítségével (Leica Microsystems GmbH) $20\text{ }\mu\text{m}$ vastag metszeteket készítettünk, melyeket speciális, töltéssel rendelkező tárgylemezre helyeztünk (Super Frost, Thermo Fisher Scientific). A metszeteket egyszer mostuk PBS oldattal, majd 15 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 0,2% Triton X-100-PBS oldattal feltártuk az antigénkötő helyeket. Az aspecifikus kötőhelyeket 2% normál ló szérumot és 0,3% BSA-t tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk 1 óráig szobahőmérsékleten. A metszeteket csirke anti-MAP-2 (1:2000), egér anti-

β III-tubulin (1:500) és kecske anti-GFAP (1:500) elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Másnap, háromszori mosást követően PBS-ben hígított anti-csírke, -egér és -kecske Alexa Fluor A488, A555 és A594 festékekkel jelölt másodlagos antitestekkel (1:400) és Hoechst 33342 magfestékekkel (1:500) inkubáltuk a mintákat 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően háromszor mostuk a metszeteket PBS-el, majd egyszer desztillált vízzel. Végezetül az agyi endotélsejtekhez hasonlóan lefedtük a metszeteket (Fluoromount-G, Southern Biotech) és konfokális mikroszkóppal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH) vizsgáltuk a mintákat.

3.7. Polipeptid nanohordozó átjutásának és felvételének vizsgálata

A biochip rendszerben az agyi endotélsejt réteg adott anyag átjutására való tesztelését, valamint az anyag organoidokba történő bejutását is elvégeztük az általános gát funkciókat mérő permeabilitási vizsgálatok mellett. Ehhez egy polipeptid, dopamint szállító nanohordozót választottunk, amelyet a csoportunk statikus rendszeren tesztelt (14. ábra, Mészáros és mtsai., 2024, kézirat bírálat alatt). A polipeptid nanohordozó felszínére az agyi endotélsejteken megtalálható transzporterekhez tervezett molekulák, alanin és glutation vannak rákötve. Ezáltal a nanopartikulumok hatékonyabban, célzottan jutnak át a vér-agy gáton, a vendégmolekulát hatékonyabban juttathatják be az agyi organoidba (Mészáros és mtsai., 2023; 2024). Emellett a polipeptid nanopartikulumon Rodamin-6-G jelölés is található, így az átjutást spektrofлуорiméterrel (Fluorolog 3, Horiba Jobin Yvon) vizsgálhattuk. Az agyi endotélsejteken való átjutás mellett a nanohordozó közepagyi organoidokba történő bejutását is teszteltük.

A nanopartikulumokat 5% FBS-t tartalmazó fenolvörösmentes médiumban (ECM, Sciencell) vettük fel 100 μ g/ml koncentrációban. Ezt az oldatot a felső kompartmentben 4 órán keresztül, 500 μ l/perc sebességgel keringettük az agyi endotélsejtek felett. Az alsó kompartment 5% FBS + ECM-et tartalmazott. A kezelési idő után a felső és alsó kompartmenteket összegyűjtöttük és a Rodamin-6-G fluoreszcens jelét (gerjesztés: 525 nm; elnyelés: 551 nm) detektáltuk spektrofлуорiméterrel. Ezt követően még rövid, fél órás, a barrier integritás meghatározására alkalmas FD4/EBA átjutást is vizsgáltunk. A korábban leírt permeabilitási kísérletekhez hasonlóan itt is meghatároztuk a modellek P_{app} értékét (9. ábra).

A fluoreszcens vendégmolekula organoidba történő bejutását is spektrofлуорiméterrel vizsgáltuk. Az organoidokat a mérést követően 1% TX-desztillált vízben oldottuk fel. A mért értékeket fehérjemennyiségre normalizáltuk, amelynek meghatározása BCA kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific) segítségével történt a gyártó leírásának megfelelően.

3.8. Oxidatív stressz vizsgálata

Az oxidatív stressz mértékének megállapítására kísérleteink során a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését vizsgáltuk. Ehhez 2'-7'-dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát reagenst alkalmaztunk (H₂DCF-DA, Molecular Probes, Life Technologies, USA), mely a sejtmembránon diffúzióval átjut, majd a citoplazmában észterázokkal kölcsönhatva aktiválódik, 2'-7' dikloro-dihidro-fluoreszcein képződik belőle az acetil-csoportok lehasításával. Az aktív forma töltéssel rendelkezik, nehezen jut ki a sejtből, így felhalmozódik a citoplazmában és kölcsönhatásba lép a reaktív oxigéngyökökkel. A reakció közben fluoreszcens dikloro-fluoreszceinné (DCF) oxidálódik. A DCF zöld fluoreszcenciát bocsát ki 485 nm gerjesztési hullámhosszon és 525-530 nm elnyelési hullámhosszon (Barna és mtsai., 2020).

Az organoidokat 50%-os hiperozmoláris kontrasztanyaggal, iopamidollal kezeltük 30 percig, majd a ROS képződést azonnal vagy 24 órát követő visszaállási fázis után vizsgáltuk. A méréshez az organoidokat kezelést követően 150 µl H₂DCF-DA-t tartalmazó Ringer-Hepes oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül 37°C-on. Az inkubáció közben soklyukú fluoreszcens spektrofotométer (BMG Fluostar Optima Multiwell Plate Reader) segítségével mértük a DCF zöld fluoreszcenciáját, ami megfelel a keletkező reaktív oxigéngyökök mennyiségének. A műszer 3 percenként végzett méréseket (gerjesztés 485 nm, elnyelés 520 nm hullámhosszon). Az organoidokról ezt követően élősejtes konfokális mikroszkópiával képeket készítettünk ugyanazokkal a beállításokkal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH). A képeken a fluoreszcencia intenzitást ImageJ programmal (NIH, USA) értékeltük ki.

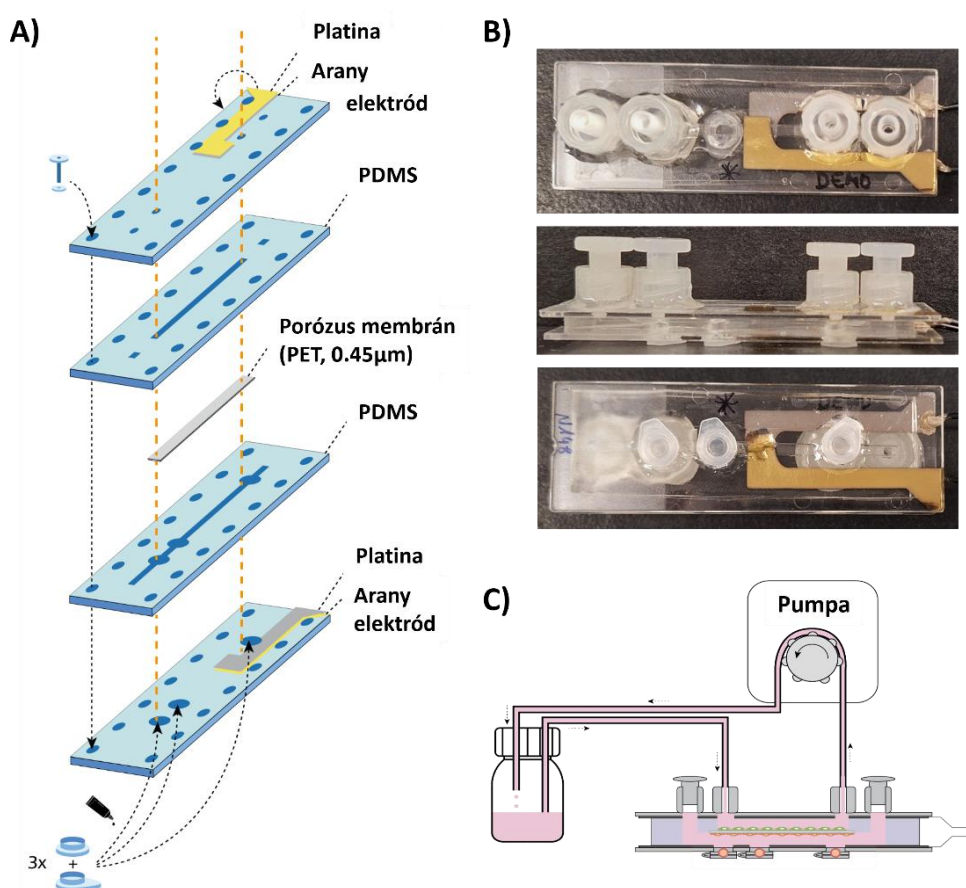
3.9. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analíziséhez a GraphPad Prism 5.0 programot használtunk (GraphPad Software, Inc., USA). Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M. vagy $\pm$ S.D. formában ábráztuk. A vizsgálatok elemzéséhez t-tesztet végeztünk. Munkánk során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A képek szerkesztését ImageJ programmal végeztük.

4. Eredmények

4.1. Középagyi organoidok integrálására alkalmas barrier chip létrehozása

Munkánk során sikerrel fejlesztettük tovább a csoportunk által korábban létrehozott biochipet (10. ábra). Az új, agyi organoidokat is magába foglaló elrendezéshez több változtatást is el kellett végeznünk az eredeti prototípushoz képest. Több elektróda típust teszteltünk, ugyanis a meglévő elektródákat nem tudtuk használni az organoidok beillesztése miatt. Megváltoztattuk az elektróda alakját és anyagát: az új elektróda kétrétegű, aranyból és platinából készül, a felülete kisebb a korábbihoz képest. Az organoidok beillesztéséhez az alsó tárgylemezre három lyukat fúrtunk, ahova PCR csövek kupakjába extracelluláris mátrixba ágyazva könnyen be tudtuk illeszteni az organoidokat (10. ábra). Az új biochip továbbra is alkalmas a vér-agy gát humán őssejtekkel történő modellezésére. Megvalósítható a felső kompartment automatikus tápfolyadék cseréje, valamint perisztaltikus pumpával a folytonos folyadékáramlás.

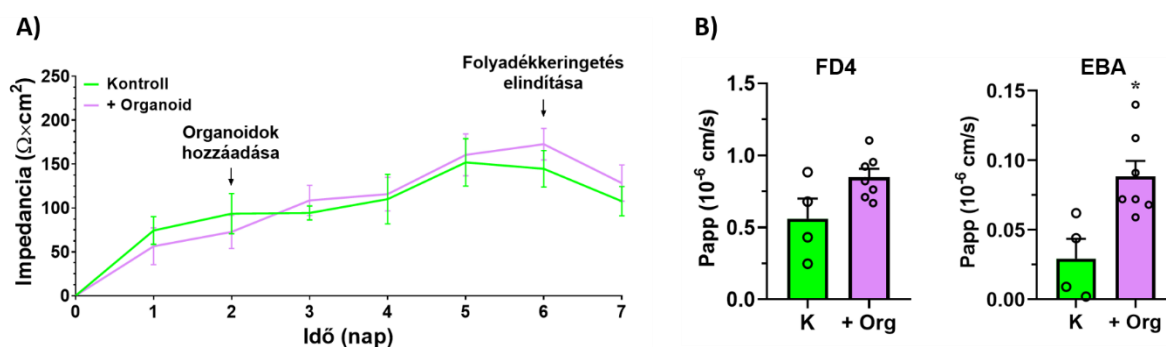


10. ábra. A) Organoid integrálására alkalmas biochip szendvicsszerű felépítése. Alul és felül tárgylemezek határolják a rendszert, amelyeken a platina-arany elektród helyezkedik el. Közöttük a csatornák PDMS lapokon belül húzódnak. Legfelül a porózus membrán található, amely az alsó és felső tenyésztési kompartmentet választja el. B) A biochip felül-, oldal- és alulnézetben fotókon. C) A szerva-chipen rendszeren megvalósuló folyamatos tápfolyadék áramlás modellezése perisztaltikus pumpával.

4.2. A vér-agy gát modell gát tulajdonságainak vizsgálata az organoidok jelenlétében

Kísérleteink során elsőként azt vizsgáltuk meg, hogy az organoidok rendszerben való jelenléte befolyásolja-e a vér-agy gát tulajdonságokat. Az agyi organoidokat a vér-agy gát modell chipbe tenyésztését követő 2. napon illesztettük a rendszerbe. Az egész modellt további 5 napig tartottuk együtt, amiből az utolsó 24 órában megvalósítottuk az agyi endotélsejtek feletti folyamatos keringetést (11. ábra).

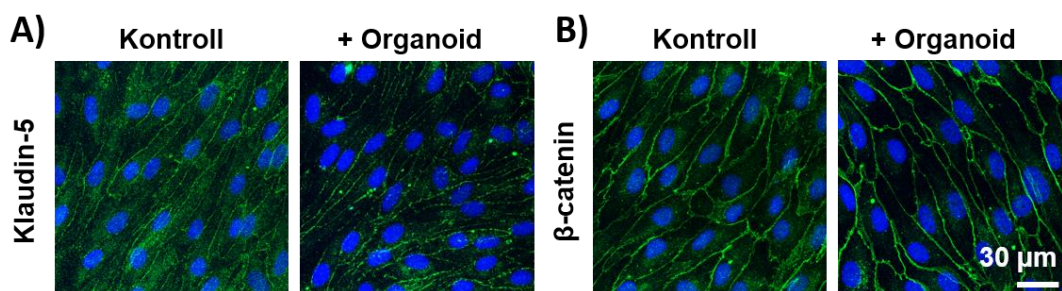
A lab-on-a-chip összeállítását követő minden nap impedancia mérést végeztünk az agyi endotél sejtréteg paracelluláris átjárhatóságának jellemzésére. Ahogy az agyi endotélsejtek kialakítják az egybefüggő réteget és fejlődnek a vér-agy gát tulajdonságok, úgy látunk folyamatos növekedést az impedanciában. A 6. napon a sejtek már biztosan összefüggő réteget alkotnak, ekkor indítottuk el a véráramlás modellezésére a folyamatos folyadékáramlást perisztaltikus pumpa segítségével a chip felső csatornájában az endotélsejt réteg felett. A folyadékáramlás hatására az impedancia kismértékben csökkent, de nem jelentősen. A kontroll csoport és az organoidokat tartalmazó csoport impedanciája hasonló, a 7. napon is $100 \Omega \times \text{cm}^2$ felett van. (11. ábra, A). A 7. napon permeabilitási vizsgálatot végeztünk: FD4 paracelluláris és EBA transzcelluláris marker molekulák átjutásával jellemeztük a gát szorosságát. A permeabilitás értékek alapján a gát szorossága jó tartományban volt az organoidok a rendszerbe illesztését követően is (11. ábra, B).



11.ábra. A) Az endotél sejtréteg impedanciája a kísérlet minden napján. **B)** Permeabilitási vizsgálatok a kísérlet 7. napján, 24 óra folyadékáramlást követően. FD4: FITC-dextrán 4,4 kDa, EBA: Evans-kék jelölt albumin, 67 kDa. n=4-7; t-teszt, átlag $\pm$ SEM, * $p < 0,05$.

Az együtt tenyésztést követően a rendszert acetone-metanol elegyével lefixáltuk, és immunfluoreszcens festést végeztünk az agyi endotélsejtek morfológiája és a sejtek közötti szoros- és adherens kapcsolatok jellemzésére. A sejtek közötti kladin-5 és β -katenin festések a humán őssejtes modellre tipikus, ép mintázatot mutatnak (12. ábra). Nem láttunk különbséget

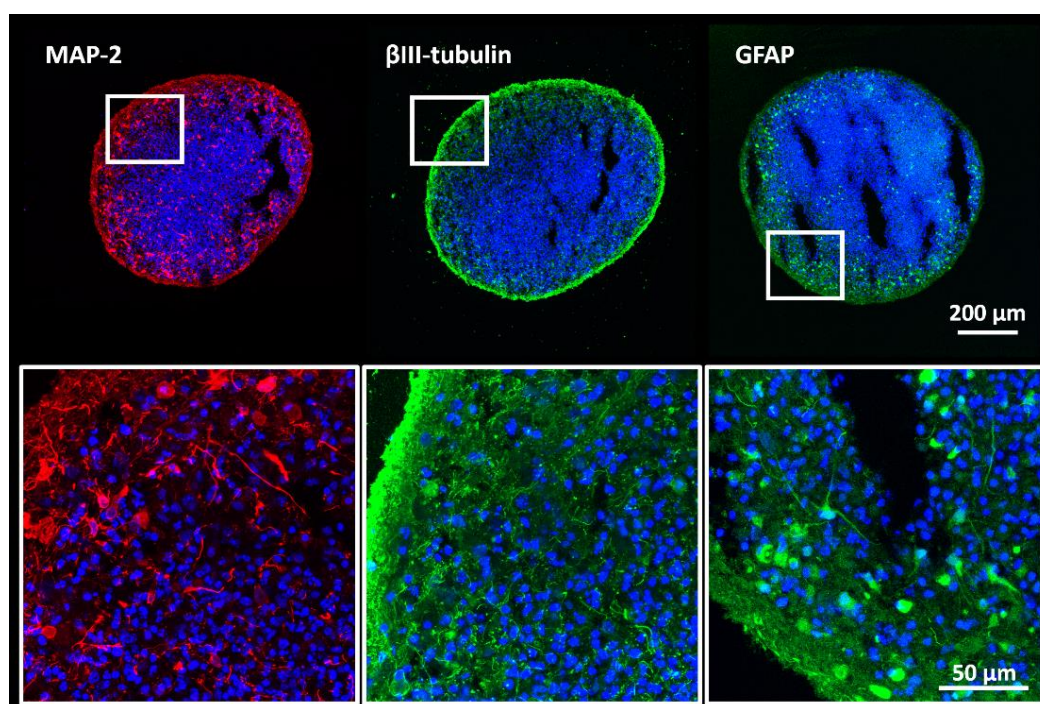
a kontroll és az organoidokat tartalmazó csoport között (12. ábra). Ez alapján elmondhatjuk, hogy az organoidok jelenléte nem befolyásolta az agyi endothel sejtek morfológiáját (12. ábra).



12.ábra. Humán agyi endothel sejtek sejtközi kapcsolatainak jellemzése organoidokkal történő együtt tenyésztést követően. **A)** Klaudin-5 szoros kapcsolat festés. **B)** β -katenin junkció asszociált molekula festés. Zöld szín: junkciós festés, kék szín: sejtmag. Mércé: 30 μ m.

4.3. Agyi organoidok jellemzése a lab-on-a-chip rendszerben

A közepagyi organoidokat felépítő sejtek és a sejtek közötti kapcsolatok jellemzéséhez az organoidokat immunhisztokémiára készítettük elő a vér-agy gát modellel történő együtt tenyésztést követően. A sejteket 75 percre, 3% PFA oldattal fixáltuk szobahőmérsékleten, PBS-ben tároltuk, majd kísérlet előtt egy éjszakán át 30%-os cukor oldatba helyeztük őket. A szacharóz oldat miatti vízelvonás következtében az organoidok tömörebbé váltak, és a fagyasztva metszés során kevésbé voltak sérülékenyek.

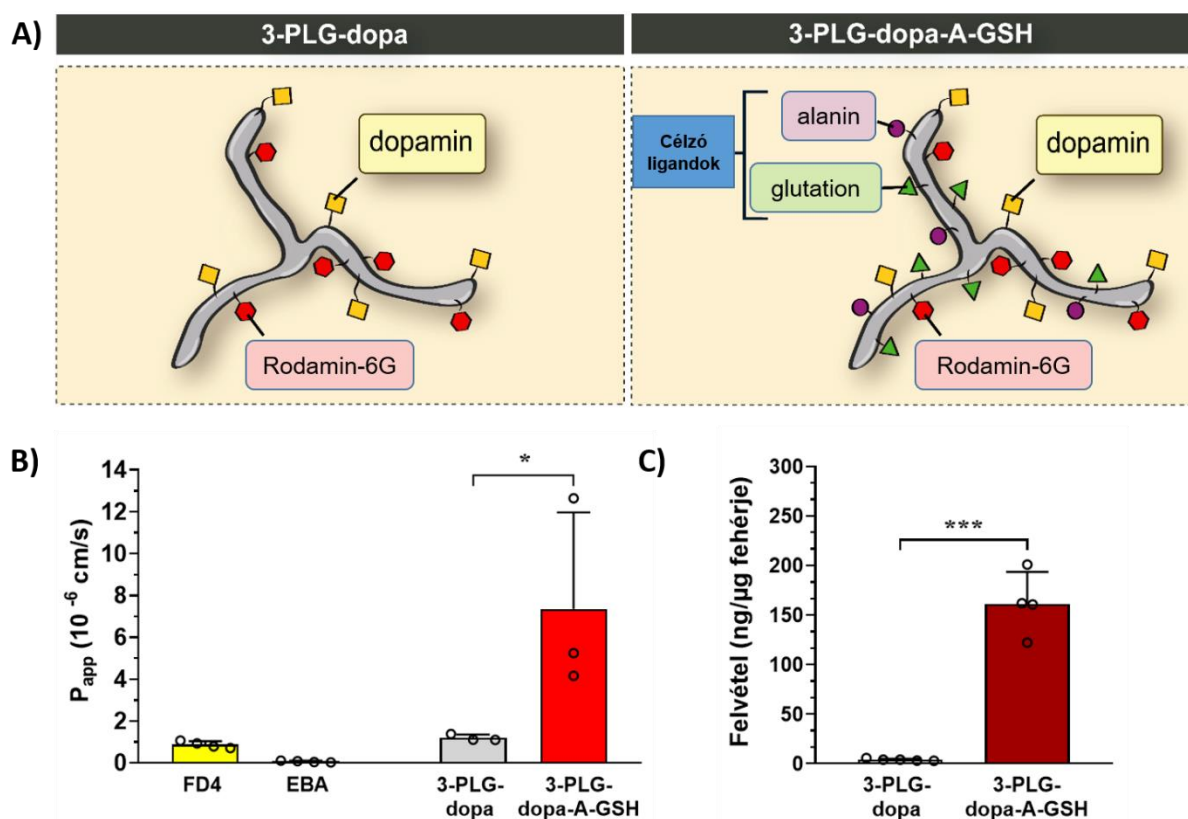


13.ábra. Agyi organoidok jellemzése immunhisztokémiai festéssel. Piros szín: mikrotubulus asszociált fehérje-2 (MAP-2); zöld szín: β -III tubulin vagy gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP); kék szín: sejtmag. Mércé: 200 μ m vagy 50 μ m.

Az organoidok immunfestéséhez 20 μm vastag metszeteket készítettük, amelyeken az idegsejteket β -III tubulinnal és mikrotubulus asszociált fehérjével (MAP-2), az asztrocitákat gliális fibrilláris savas fehérjével (GFAP) jelöltük meg (13. ábra). A β -III tubulin az organoidok körvonalát jelölte, a MAP-2 az idegsejtek nyúlványait és sejttestjeit, és egyenletesen oszlott el az organoid teljes felületén. Az asztrocitákra jellemző volt, hogy csoportokban helyezkedtek el az organoid adott széléin.

4.4. Nanohordozók átjutásának tesztelése

A létrehozott szerv-a-chipen modellünk anyagátjutásra történő alkalmazását is szeretnénk volna bizonyítani. Ezért a humán őssejtekből létrehozott vér-agy gát modellen polipeptid nanohordozó vér-agy gáton történő permeabilitását teszteltük, valamint a nanohordozó organoidba történő bejutását is kimértük.



14.ábra. Polipeptid nanohordozó agyi endotélsejteken keresztüli permeabilitása és felvétele agyi organoidokba. **A)** Háromkarú polipeptid nanohordozó dopamin hatóanyaggal és Rodamin-6-G fluoreszcens jelöléssel (3-PLG-dopa), valamint ezeken kívül alanin és glutation célzó ligandokkal (3-PLG-dopa-A-GSH); **B)** Agyi endotélsejteken keresztüli permeabilitás. FD4: FITC-dextrán 4,4 kDa, EBA: Evans-kék jelölt albumin, 67 kDa. **C)** Agyi organoidokba történő nanopartikulum felvétel. t-teszt, $n=3-4$ chip vagy organoid / csoport, t-teszt, átlag $\pm$ SD, * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

A tesztelt polipeptid nanopartikulum alapja egy háromkarú poli(γ -benzil-L-glutaminsav) (3-PLG), melyhez a követhetőség céljából Rodamin-6-G fluoreszcens molekula van kapcsolva. A nanopartikulumhoz kapcsolt hatóanyag a dopamin, melyet a Parkinson-kór kezelésében alkalmaznak. A nanohordozó két típusát teszteltük: a nem célzott (3-PLG-dopa), és az alaninnal és glutationnal célzott polipeptidet (3-PLG-dopa-A-GSH) (14. A ábra).

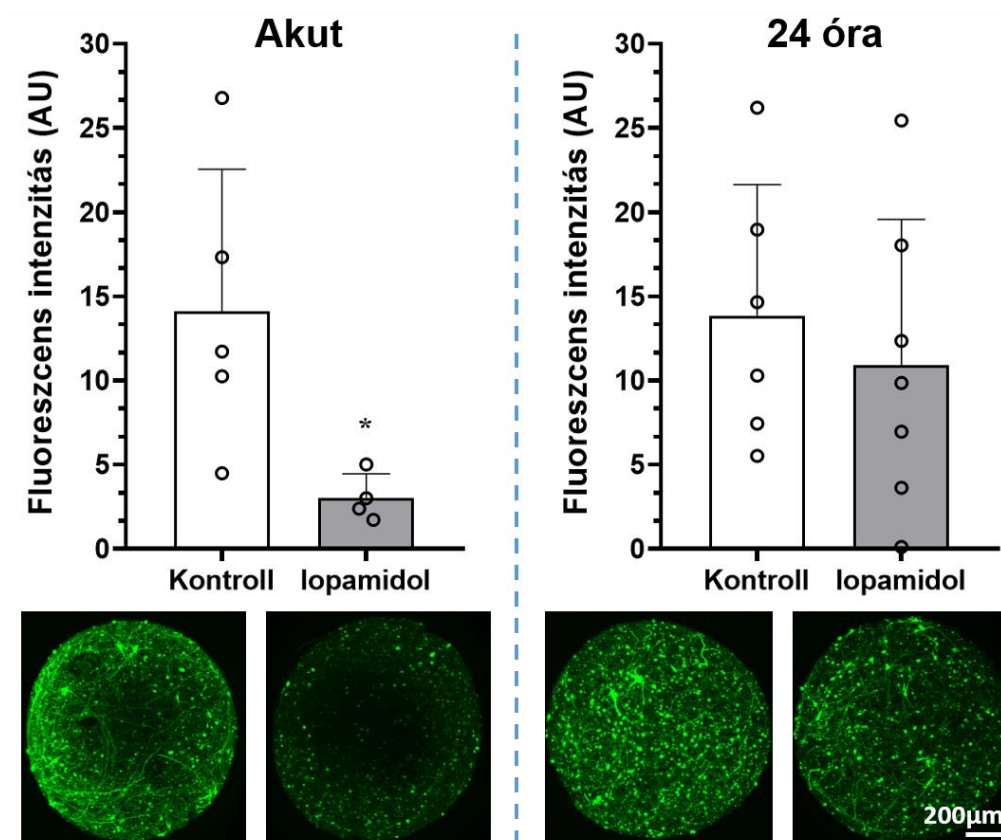
A permeabilitási vizsgálat során kimutattuk, hogy mindkét típusú nanorészecske átjutott a vér-agy gáton, de a célzott nanohordozó szignifikánsan nagyobb mértékben a targetáló ligandok nélküli nanopartikulumhoz képest (14. B ábra). A nanocarrierek agyi endotélsejteken keresztüli permeabilitását az általános, a gát tulajdonságok mérésére használt fluoreszcens molekulákkal (FD4, EBA) is összehasonlítottuk. Mind a paracelluláris, mind a transzcelluláris marker átjutása nagyon alacsony maradt. A paracelluláris FD4 molekula alacsony átjutása a célzó ligandok nélküli nanohordozóhoz volt hasonló (14. B ábra). A célzott nanorészecske sokkal nagyobb mennyiségben jutott be a közepagi organoidokba, amely megfigyelés alátámasztja az agyi endotélsejt rétegen keresztüli permeabilitási adatokat is (14. C ábra).

4.5. Kontrasztanyag hatása az agyi organoidokra

A szerv-a-chipen barrier eszközöket nemcsak anyagátjutás tanulmányozására vagy kórfolyamatok vizsgálatára használhatjuk, hanem a sejteket ért közvetlen gát funkciókat vagy életképességet befolyásoló hatások detektálására is. Korábban kimutattuk, hogy az agyi képalkotó eljárások során használt kontrasztanyagok, mint a hiperozmoláris iopamidol csökkentik az agyi endotélsejtek gát funkcióját patkány modellen (Matsunaga és mtsai., 2021). Célunk volt, hogy megvizsgáljuk az iopamidol hatását a saját lab-on-a-chip modellünkön is. A rendszerünkben ismét az agyi endotélsejteket kezeltük, azonban ezúttal a vizsgálatok középpontjában a közepagi organoidok reaktív oxigén gyök termelésére állt.

Kísérleteinkhez 300 mgI/ml iopamidolt használtunk endotélsejt médiummal felére kihígítva, 150 mgI/ml végkoncentrációban. A rendszerbe a felső kompartmentbe, az agyi endotélsejtek lumenális oldalára helyeztük a kezelőoldatot 30 percre, majd az alsó kompartmentből az organoidokat eltávolítottuk azonnal, vagy 24 órás visszaállási fázist követően. A 24 órás visszaállási fázisban a sejtek visszakapták az eredeti tenyésztő médiumokat, kontrasztanyag nélkül. A kezeléseket követően az organoidokat 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk H₂DCF-DA-t tartalmazó Ringer-Hepes oldatban. A DCF zöld fluoreszcenciáját konfokális mikroszkóp segítségével mértük. Azt tapasztaltuk, hogy a reaktív oxigén gyök termelés akut kontrasztanyag kezelést követően alacsonyabb volt, mint a kontroll esetén, aminek az oka esetleg a sejtek életképességében bekövetkezett csökkenés lehet. Érdekes

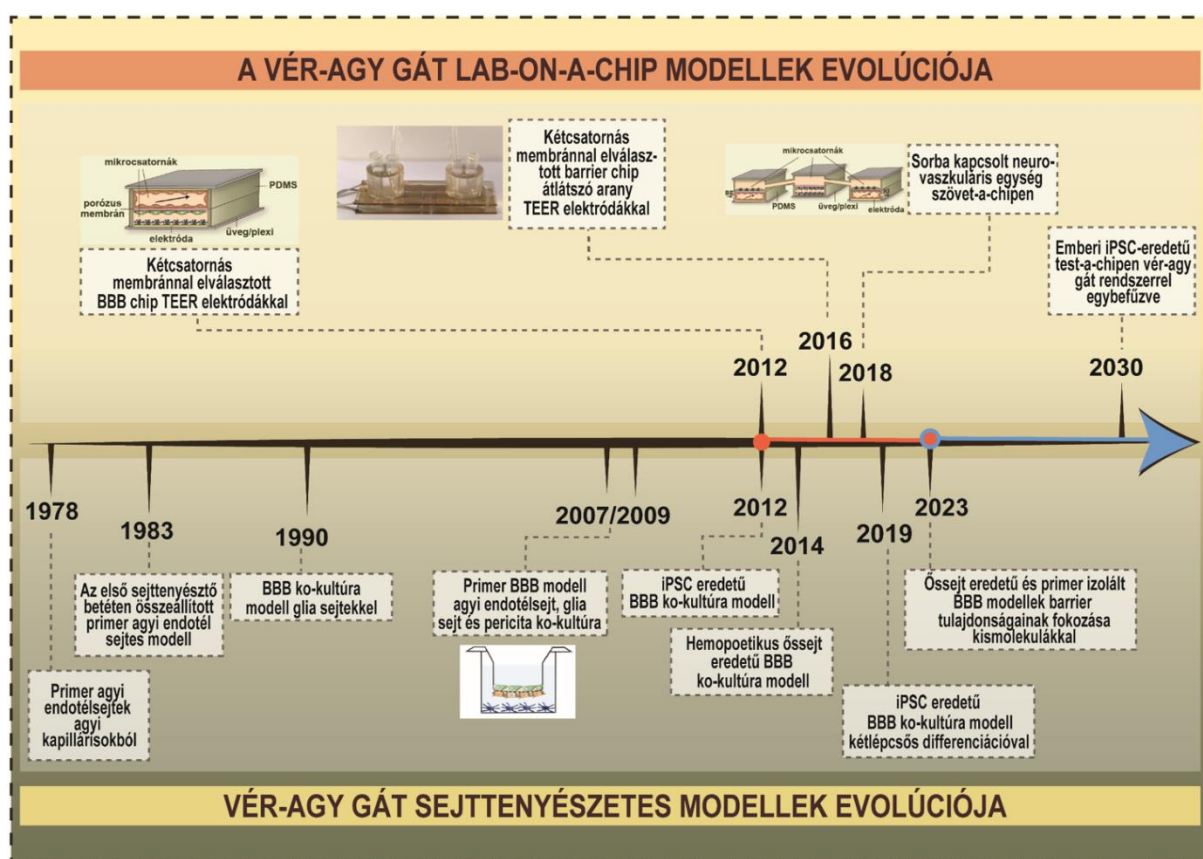
megfigyelés azonban, hogy a ROS mérésre használt reagens kirajzolta az organoidon belüli, sejtek közötti kapcsolatokat, amely a kontroll organoidban összetett hálózatot mutat, de a kezelést követően a sejtek közötti kapcsolat lecsökken (15. ábra, akut kezelés). A visszaállási időpontban, 24 órás inkubációt követően, az organoidokon belüli sejthálózat helyreállítását tapasztaljuk, aminek a mértéke és összetettsége a kontrolléhoz hasonló (15. ábra, 24 óra).



15.ábra. Hiperozmoláris kontrasztanyag (Iopamidol) hatásának megjelenítése agyi organoidokban, a ROS méréshez használt DCFDA reagenssel. Bal oldal: 30 perces akut kezelés hatása, jobb oldal: 24 órás visszaállási fázis. t-teszt, $n=4-7$, t-teszt, átlag $\pm$ SD, * $p<0,05$, *** $p<0,001$. Mércé: 200 μ m.

5. Megbeszélés

A vér-agy gát-kutatások során a sejtenyészeti rendszerek nélkülözhetetlenné váltak a hatóanyagok átjutásának, hatásának vizsgálatában, a kórfolyamatok feltérképezésében és modellezésében (16. ábra, Helms és mtsai., 2016, Deli és mtsai., 2024). A humán őssejt-alapú *in vitro* vér-agy gát modellek könnyen elérhető, jól reprodukálható rendszerek, melyeket elterjedten alkalmaznak preklinikai vizsgálatokban (Cecchelli és mtsai., 2014). A központi idegrendszeri betegségek modellezésében az indukált pluripotens őssejtek felhasználásával létrehozott agyi organoidok új kutatási irányt jelentenek, szerepük a gyógyszerkutatásban egyre fontosabb (Choudhury és mtsai., 2020). A háromdimenziós *in vitro* modellekben az emberi agyhoz hasonló komplex, önszerveződő sejthálózat alakul ki, melynek megléte fontos a gyógyszerhatóanyagok hatásosságának előrejelzésében (Smits és Schwamborn, 2020; Chiaradia és Lancaster, 2020). A kutatások a 3R elveinek megfelelően csökkentik az állatkísérletek mennyiségét és az állati sejteken alapuló sejtenyészeti felhasználását is.



16. ábra. Mikrofluidikai eszközök és *in vitro* vér-agy gát modellek evolúciója (Deli és mtsai., 2024, módosítva). BBB: vér-agy gát, TEER: transzendoteliális elektromos ellenállás, iPSC: indukált pluripotens őssejt.

A szerveket modellező biochipek a humán *in vitro* modellek új szintjét képezik. Ezek a komplex rendszerek a korábbi biochipekhez hasonlóan csatornákból állnak, bennük sejt és szövetkultúrák tarthatók fent dinamikus körülmények között. Akár több típusú szövet kapcsolata, vagy az *in vivo* környezetet modellező mechanikai rendszer is része lehet a modellnek. Többféle szövet chip összekapcsolásával létrehozhatóak teljes szervezetet modellező biochip rendszerek gyógyszermolekulák eloszlásának, felszívódásának és hatásának vizsgálatára. Az elmúlt tizenöt évben a lab-on-a-chip és organ-on-a-chip eszközök egyre népszerűbbek, segítségükkel komplex sejtenyészetes modellek állíthatók elő (16. ábra; Ingber, 2022; Deli és mtsai., 2024).

Az első szenzorral ellátott vér-agy gát biochipet 2012-ben publikálták (16. ábra, Booth és Kim, 2012). Ez az eszköz alkalmas volt folyadékáramlás alkalmazására és az endotélsejtek gát funkcióinak vizsgálatára, de nem teljeskörűen. Kutatócsoportunk a 2010-es évtől aktívan vizsgálja a biológiai gátrendszerek *in vitro* modelljeit mikroelektronikai és mikrofluidikai chip-eszközökkel. A HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet Biomolekuláris Elektronika Kutatócsoportjával közösen csoportunk kifejlesztett egy sokoldalú, biológiai gátak vizsgálatára alkalmas mikrofluidikai chip-eszközt (16. ábra, Walter és mtsai., 2016; Kincses és mtsai., 2020; Santa-Maria és mtsai., 2021). A modellünkön a luminális oldalon folyadékáramlás hozható létre a véráramlás modellezésére. A sejtenyésztő felület teljes hosszában mérhető az impedancia és a permeabilitás, a sejtek növekedése a biochip teljes hosszában monitorozható, valamint a kísérlet végén a tenyésztő felület fixálható és immunihsztokémiai festésekre használható. 2016-ban ez volt az első lab-on-a-chip rendszer, amelyben megvalósult három különböző típusú primer sejtenyészet ko-kultúrája. A biochipünkben az integrált elektródák miatt a sejtrétegen mért ellenállás értéke sokkal stabilabb, mint a tenyésztőbetéteknél általánosan alkalmazott chopstick elektródáké. A beépített elektródák csökkentik a befertőződés lehetőségét is, ugyanis nem kell az elektródát a méréskor kívülről a rendszerbe helyezni. A hatóanyagok tesztelésénél hasznos, hogy a csatorna paramétereinek köszönhetően kisebb térfogatú reagens is elegendő az adott molekula teszteléséhez (Vigh és mtsai., 2021). Nagy előny a sejtenyésztőbetéten létrehozott statikus modellekkel szemben a dinamikus körülmények létrehozása. Az eszközhöz csatlakoztatott csövekkel egyszerű a folyadékáramlás elindítása, és az automatizált tápfolyadékcsere fecskendő pumpa segítségével (Kincses és mtsai., 2023; Deli és mtsai., 2024). Az első több biochip összefűzésével létrehozott szövet-a-chipen modellt 2018-ban állították össze két, a vér-agy gátra jellemző sejteket hordozó chip és egy agyi sejteket tartalmazó chip egymáshoz kapcsolásával. A vér-agy gát modell

létrehozásához primer humán endotélsejteket és pericitákat, az agy modellezéséhez primer humán idegsejteket és asztrocitákat használtak (16. ábra, Maoz és mtsai., 2018).

Azonban jelenleg az irodalomban vagy a chipek építésére és tesztelésére fókuszáló céges termékek között még nem található olyan szerv-a-chipen rendszer, amely egy eszközön belül ötvözné a vér-agy gáton történő vizsgálatokat háromdimenziós agyi organoid-alapú modellekkel. Kísérleteink célja az volt, hogy létrehozzunk egy új, humán őssejteken alapuló, egyedülálló mikrofluidikai és mikroelektronikai biochip eszközt. Munkánk során sikeresen integráltunk agyi organoidokat a csoportunk által kifejlesztett, vér-agy gát modellezésére alkalmas lab-on-a-chip eszközbe. A vér-agy gát modell létrehozásához köldökzsinór vérből nyert hemopoetikus őssejtekből differenciáltatott humán endotélsejteket használtunk. Az endotélsejtek vér-agy gátra jellemző jellegeit agyi pericitákkal való ko-kultúra erősítette (Cecchelli és mtsai., 2014; Santa-Maria és mtsai., 2021). A biochipen az új típusú arany-platina elektródákkal sikeresen mértük a sejtréteg gát tulajdonságait, az impedancia vizsgálatok stabil eredményt adnak. Több iPSC modellben vitatott, hogy differenciáció végére a sejtek megőrzik-e endotélsejt tulajdonságaikat, vagy epitélre jellemző tulajdonságokat is kifejeznek, mint a neuroepitélialis sejtekre jellemző extrém magas ellenállás, vagy a sejthalak megváltozása (Lippmann és mtsai., 2020; Porkoláb és mtsai., 2024). Modellünkben az endotélsejtek az egész kísérlet során megtartják a vér-agy gát jellegeiket, ami számos humán iPSC-alapú modellel szemben előnyt jelent. A tenyésztett organoidok megőrzik összetett tulajdonságaikat és morfológiájukat (Nickels és mtsai., 2020). Az agyi organoidok modellbe való illesztése nem befolyásolta az agyi endotélsejtek gát integritását, vagy a permeabilitását, tehát továbbra is szoros, jól működő barrier funkciókat mértünk.

A vér-agy gát a speciális efflux transzporterek, szoros sejtközi kapcsolatok és az alacsony vezikuláris transzport miatt számos gyógyszermolekula agyba jutását korlátozza, ezért szükség van alternatív megoldások keresésére. A nanohordozók alkalmazása megoldás lehet a hatóanyagok vér-agy gáton való átjuttatására és a központi idegrendszeri betegségek kezelésére (Culkins és mtsai., 2024). Csoportunk kimutatta, hogy a nanohordozók alaninnal és glutationnal való célzása megnöveli az agyi endotélsejt rétegen történő átjutás mértékét (Mészáros és mtsai., 2018; 2023; Porkoláb és mtsai., 2020). Az alanin az agyi endotélsejteken kifejezett aminosav transzporterekhez képes kötődni. A glutation az egyik leghatékonyabb agyi endotélsejteken keresztüli célzó ligand, azonban jelenleg nem ismert, hogy melyik transzporterhez kapcsolódik. A célzó molekulák nemcsak az átjutás mértékét növelik, hanem csökkentik a nanohordozó májban és a vesében való felhalmozódását is (Porkoláb és mtsai., 2020; Mészáros és mtsai., 2023). A Parkinson-kór egyik fő jellemzője a dopaminerg neuronok számának csökkenése a

középgyban. A betegség kezelésének egyik lehetősége a dopamin szint növelése (Hayes, 2019; Nickels és mtsai., 2020). A dopamin nem képes átjutni a vér-agy gáton, előanyaga, az L-DOPA korlátozottan jut be az agyszövetbe, mivel az endotélsejtek enzimei dopaminná, majd inaktív terméké alakítják át (Deli, 2011). A 3-PLG-dopa-A-GSH nanorészecske alapja poli-glutaminsav, mely vízdéköny, biokompatibilis, nem vált ki immunválaszt. Az alanin és glutation hatékony célzómolekulák segítségével specifikusan az agyba jut, kevésbé halmozódik fel a perifériás szövetekben, emellett a permeabilitása is sokkal magasabb a nem célzott nanopartikulumhoz képest (Mészáros és mtsai., 2023). A hozzákapcsolt dopamin hatékony agyba juttatása fontos a Parkinson-kór kezelésében, így a 3-PLG-dopa-A-GSH nanorészecske hatékony terápiás kezelés lehet. Kísérleteink során is megállapíthattuk, hogy a targetált nanohordozó hatékonyabban jut át az agyi endotélsejt rétegen. Ezt követően hatékonyan jut be az agyi organoidokba is. Tehát a kísérletben sikerrel értük el, hogy nem csak a vér-agy gáton való átjutást teszteltük, hanem a vér-agy gáton történő átjutást követően a szöveti hasznosulást is azonosítani tudtuk lab-on-a-chip modellen.

A klinikumban mindennapos az agyi képalkotó eljárásokhoz használt kontrasztanyagok használata, amelyek többféle mellékhatást okozhatnak a vesekárosodástól kezdve neurológiai tünetekig (Matsunaga és mtsai., 2021). Az iopamidol hiperozmoláris, vízdéköny, nem ionos kontrasztanyagot 200-370 mgI/ml koncentrációban adják a véráramba, ami után rövid idő alatt kiürül a szervezetből. Bizonyos esetekben, mint veseelégtelenség vagy keringési probléma, a kontrasztanyag kiürülése lassabb, ekkor a vér-agy gátat alkotó agyi endotélsejtekkel hosszabban érintkezik magasabb koncentrációban. Sejttenyészetes vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a 300 mgI/ml koncentrációjú iopamidol rövid távú (30 perc) alkalmazása a vér-agy gát megnyílását eredményezi, azonban 24 óra elteltével a gátfunkciók részben helyreállnak (Matsunaga és mtsai., 2021). Abluminális (agy felőli) oldalról kezelve alacsonyabb, 5-10%-os koncentrációban az iopamidol ugyancsak csökkentette tenyésztett agyi endotélsejt rétegek ellenállását (Matsunaga és mtsai., 2021). *In vivo* patkány kísérletekben a 300 mgI/ml és a 150 mgI/ml iopamidol hatásában és a vérplazmában mért koncentrációjában nem volt jelentős különbség, ezért a szerzők a dózis felére csökkentését javasolják a klinikai alkalmazás során (Dean és mtsai., 1993). Klinikai képalkotó eljárásokkal kimutatták, hogy nem feltétlen szükséges 100%-os koncentrációban használni a jódtartalmú kontrasztanyagokat a megfelelő képminőség eléréséhez (Racadio és mtsai., 2013). Lab-on-a-chip modellünkön is kíváncsiak voltunk, hogy a luminális (vér felőli) oldalról, az agyi endotélsejtekkel röviden, 50%-os koncentrációban érintkező iopamidol hatással van-e agyi organoidok (alsó, agy felőli kompartment) reaktív oxigén gyök termelésére. Hipotézisünkkel ellentétben az agyi

organoidon alacsonyabb fluoreszcens ROS jelet detektáltunk a kontrollhoz képest, amelynek oka valószínűsíthetően a kontrasztanyag toxikus hatása össz-sejt szinten. Felmerül, hogy az iopamidol befolyásolhatja a mitokondriális funkciókat is (Baek és mtsai., 2018), amelynek tesztelését TMRM festékekkel tervezzük az életképességi tesztek mellett. A ROS méréshez felhasznált reagens jellegzetes módon megjelölte az agyi organoidokon belüli sejthálózatot. Ezért különlegesen érdekes megfigyelés volt, hogy az akut iopamidol kezelés romboló hatással volt az agyi organoidokban található sejthálózatra úgy is, hogy az organoidok csak közvetetten érintkeztek az 50%-os iopamidol oldattal. Egynapos regenerációt követően helyreállást tapasztalhattunk az organoidokon belüli sejthálózatban, annak komplexitása és jellege a kontrolléhoz hasonlóvá vált.

6. Összefoglalás

Az általunk létrehozott komplex mikrofluidikai lab-on-a-chip rendszerhez hasonló jelenleg nem található az irodalomban ezáltal a chiplaboratóriumi eszközök között újdonság. Kiválóan alkalmas a vér-agy gát tulajdonságok és az agyi organoidok széleskörű vizsgálatára egészséges körülmények között és kórállapotokban, valamint felhasználható hatóanyagok, nanohordozók átjutásának tesztelésére is. Emellett az agyi endotélsejtek és az agyi organoidokon megfigyelhető funkcionális változások is mérhetőek. A sejtenyészetes modellünk ötvözi a modern összejtés vér-agy gát modellek, és az indukált pluripotens összejt-alapú háromdimenziós humán sejt-kultúra modelleket. Ezen technológiák együttes használatával olyan egyedülálló rendszert alkottunk, amely a jelenlegi chiplaboratóriumi eszközök között előremutató, elősegíti a személyre szabott orvoslás és a szerv/szövet-a-chipen rendszerek kifejlesztését és tökéletesítését (16. ábra, Deli és mtsai., 2024).

Irodalomjegyzék

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(1):41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(1):13-25.
- Ando Y, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Tomita H, Zaikokuji R, Hotta Y, Miyazaki N, Yano H, Muraki I, Kuroda A, Fukuda H, Kawasaki Y, Okamoto H, Kawaguchi T, Watanabe T, Doi T, Yoshida T, Ushikoshi H, Yoshida S, Ogura S. Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier. *Sci Rep.* 2018; 8(1):17523.
- Avdeef A, Deli MA, Neuhaus W. In vitro assays for assessing BBB permeability: artificial membrane and cell culture models. In: Di L , Kerns EH (ed.); *Blood-brain barrier in drug discovery: optimizing brain exposure of drugs and minimizing brain side effects.* Hoboken: John Wiley and Sons, Inc., 2015. pp. 188-237.
- Baek SH, Cho Y, Lee J, Choi BY, Choi Y, Park JS, Kim H, Sul J, Kim E, Park JH, Jo DG. Intracellular and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Measurement in Primary Cultured Neurons. *Bio Protoc.* 2018; 8(11):e2871.
- Barna L, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V, Jósavay K, Zvara Á, Campos-Bedolla P, Deli MA. Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage. *Fluids Barriers CNS.* 2020; 17(1):5.
- Bernas MJ, Cardoso FL, Daley SK, Weinand ME, Campos AR, Ferreira AJ, Hoying JB, Witte MH, Brites D, Persidsky Y, Ramirez SH, Brito MA. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nat Protoc.* 2010;5(7):1265-72.
- Booth R, Kim H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab Chip.* 2012; 24;12(10):1784-92.
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszelka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res.* 2014; 45(8):610-38.
- Campisi M, Shin Y, Osaki T, Hajal C, Chiono V, Kamm RD. 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials.* 2018; 180:117-129.
- Chiaradia I, Lancaster MA. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* 2020; 23(12):1496-1508.

- Choudhury D, Ashok A, Naing MW. Commercialization of Organoids. *Trends Mol Med*. 2020; 26(3):245-249.
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck MP, Ferreira L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2014; 9(6):e99733.
- Culkins C, Adomanis R, Phan N, Robinson B, Slaton E, Lothrop E, Chen Y, Kimmel BR. Unlocking the Gates: Therapeutic Agents for Noninvasive Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Mol Pharm*. 2024; 21(11):5430-5454.
- Dean PB, Kivisaari L, Kormano M. Does dilution of contrast media affect contrast enhancement? An experimental study in rats. *Invest Radiol*. 1988; Suppl 1:S118-21.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. 2005; 25(1):59-127.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788(4):892-910.
- Deli MA. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates*, editors: Tihanyi K and Vastag M., Bentham E-books, 2011; pp. 144-165.
- Deli MA, Porkoláb G, Kincses A, Mészáros M, Szecskó A, Kocsis AE, Vigh JP, Valkai S, Veszeka S, Walter FR, Dér A. Lab-on-a-chip models of the blood-brain barrier: evolution, problems, perspectives. *Lab Chip*. 2024; 24(5):1030-1063.
- Deosarkar SP, Prabhakarpandian B, Wang B, Sheffield JB, Krynska B, Kiani MF. A Novel Dynamic Neonatal Blood-Brain Barrier on a Chip. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142725.
- Griep LM, Wolbers F, de Wagenaar B, ter Braak PM, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Vermes I, van der Meer AD, van den Berg A. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed Microdevices*. 2013; 15(1):145-50.
- Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med*. 2019; 132(7):802-807.
- Hellinger E., Veszeka S., Tóth AE., Walter F., Kittel Á., Bakk ML., Tihanyi K., Háda V., Nakagawa S., Duy TDH., Niwa M., Deli MA., Vastag M., Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB Caco-2) cell-based surrogate blood–brain barrier penetration models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82. 340–35, 2012.

- Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, Förster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, Stebbins MJ, Vandenhaute E, Weksler B, Brodin B. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; 36(5):862-90.
- Herland A, van der Meer AD, FitzGerald EA, Park TE, Sleeboom JJ, Ingber DE. Distinct Contributions of Astrocytes and Pericytes to Neuroinflammation Identified in a 3D Human Blood-Brain Barrier on a Chip. *PLoS One.* 2016; 11(3):e0150360.
- Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet.* 2022; 23(8):467-491.
- Joó F, Karnushina I. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios.* 1973; 8(29):41-8.
- Joó F. The blood-brain barrier in vitro: the second decade. *Neurochem Int.* 1993; 23(6):499-521
- Kincses A, Santa-Maria AR, Walter FR, Dér L, Horányi N, Lipka DV, Valkai S, Deli MA, Dér A. A chip device to determine surface charge properties of confluent cell monolayers by measuring streaming potential. *Lab Chip.* 2020; 20(20):3792-3805.
- Kincses A, Vigh JP, Petrovszki D, Valkai S, Kocsis AE, Walter FR, Lin HY, Jan JS, Deli MA, Dér A. The Use of Sensors in Blood-Brain Barrier-on-a-Chip Devices: Current Practice and Future Directions. *Biosensors (Basel).* 2023; 8;13(3):357.
- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013; ;501(7467):373-9.
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2012; 30(8):783-91.
- Lippmann ES, Azarin SM, Palecek SP, Shusta EV. Commentary on human pluripotent stem cell-based blood-brain barrier models. *Fluids Barriers CNS.* 2020; 17(1):64.
- Maoz BM, Herland A, FitzGerald EA, Grevesse T, Vidoudez C, Pacheco AR, Sheehy SP, Park TE, Dauth S, Mannix R, Budnik N, Shores K, Cho A, Nawroth JC, Segrè D, Budnik B, Ingber DE, Parker KK. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. *Nat Biotechnol.* 2018;36(9):865-874.

- Matsunaga Y, Nakagawa S, Morofuji Y, Dohgu S, Watanabe D, Horie N, Izumo T, Niwa M, Walter FR, Santa-Maria AR, Deli MA, Matsuo T. MAP Kinase Pathways in Brain Endothelial Cells and Crosstalk with Pericytes and Astrocytes Mediate Contrast-Induced Blood-Brain Barrier Disruption. *Pharmaceutics*. 2021; 13(8):1272.
- Mészáros M, Porkoláb G, Kiss L, Pilbat AM, Kóta Z, Kupihár Z, Kéri A, Galbács G, Siklós L, Tóth A, Fülöp L, Csete M, Sipos Á, Hülper P, Sipos P, Páli T, Rákhely G, Szabó-Révész P, Deli MA, Veszélka S. Niosomes decorated with dual ligands targeting brain endothelial transporters increase cargo penetration across the blood-brain barrier. *Eur J Pharm Sci*. 2018; 123:228-240.
- Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Páli EK, Polgár TF, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, Veszélka S. Targeting Human Endothelial Cells with Glutathione and Alanine Increases the Crossing of a Polypeptide Nanocarrier through a Blood-Brain Barrier Model and Entry to Human Brain Organoids. *Cells*. 2023; 12(3):503.
- Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Szecskó A, Páli EK, Cser NM, Polgár TF, Kecskeméti G, Walter FR, Schwamborn JC, Janáky T, Jan JS, Veszélka S, Deli MA. Alanine and glutathione targeting of dopamine- or ibuprofen-coupled polypeptide nanocarriers increases both crossing across the blood-brain barrier and protective effects. *Fluids Barriers CNS*. *manuscript under revision*.
- Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuelen T, Jarazo J, Walter J, Brüggemann I, Boussaad I, Berger E, Fleming RMT, Bolognin S, Schwamborn JC. Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017; 8(5):1144-1154.
- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, Kataoka Y, Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2007; 27(6):687-94.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*. 2009; 54(3-4):253-63.
- Nickels SL, Modamio J, Mendes-Pinheiro B, Monzel AS, Betsou F, Schwamborn JC. Reproducible generation of human midbrain organoids for in vitro modeling of Parkinson's disease. *Stem Cell Res*. 2020; 46:101870.

- Nishihara H, Gastfriend BD, Soldati S, Perriot S, Mathias A, Sano Y, Shimizu F, Gosselet F, Kanda T, Palecek SP, Du Pasquier R, Shusta EV, Engelhardt B. Advancing human induced pluripotent stem cell-derived blood-brain barrier models for studying immune cell interactions. *FASEB J.* 2020; 34(12):16693-16715
- Porkoláb G, Mészáros M, Tóth A, Szecskó A, Harazin A, Szegletes Z, Ferenc G, Blastyák A, Mátés L, Rákhely G, Deli MA, Veszélka S. Combination of Alanine and Glutathione as Targeting Ligands of Nanoparticles Enhances Cargo Delivery into the Cells of the Neurovascular Unit. *Pharmaceutics.* 2020; 12(7):635.
- Porkoláb G, Mészáros M, Szecskó A, Vigh JP, Walter FR, Figueiredo R, Kálmista I, Hoyk Z, Vizsnyiczai G, Gróf I, Jan JS, Gosselet F, Pirity MK, Vastag M, Hudson N, Campbell M, Veszélka S, Deli MA. Synergistic induction of blood-brain barrier properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024; 121(21):e2316006121.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med.* 2020; 217(4):e20190062.
- Racadio JM, Kashinkunti SR, Nachabe RA, Racadio JM, Johnson ND, Kukreja KU, Patel MN, Privitera MB, Hales JE, Abruzzo TA. Clinically useful dilution factors for iodine and gadolinium contrast material: an animal model of pediatric digital subtraction angiography using state-of-the-art flat-panel detectors. *Pediatr Radiol.* 2013; 43(11):1491-501.
- Santa-Maria AR, Walter FR, Figueiredo R, Kincses A, Vigh JP, Heymans M, Culot M, Winter P, Gosselet F, Dér A, Deli MA. Flow induces barrier and glycocalyx-related genes and negative surface charge in a lab-on-a-chip human blood-brain barrier model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2021; 41(9):2201-2215.
- Smits LM, Reinhardt L, Reinhardt P, Glatza M, Monzel AS, Stanslowsky N, Rosato-Siri MD, Zanon A, Antony PM, Bellmann J, Nicklas SM, Hemmer K, Qing X, Berger E, Kalmbach N, Ehrlich M, Bolognin S, Hicks AA, Wegner F, Sternecker JL, Schwamborn JC. Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *NPJ Parkinsons Dis.* 2019; 5:5.
- Smits LM, Schwamborn JC. Midbrain Organoids: A New Tool to Investigate Parkinson's Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:359.
- Veszélka S, Ágnes K, Deli MA. Tools of modelling blood–brain barrier penetrability. Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates, editors: Tihanyi K and Vastag M., Bentham E-books, 2011; pp. 166-188.

- Veszelka S, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Kondor N, Ferenc G, Polgár TF, Katona G, Kóta Z, Kelemen L, Páli T, Vigh JP, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA. A Triple Combination of Targeting Ligands Increases the Penetration of Nanoparticles across a Blood-Brain Barrier Culture Model. *Pharmaceutics*. 2021; 14(1):86.
- Vigh JP, Kincses A, Ozgür B, Walter FR, Santa-Maria AR, Valkai S, Vastag M, Neuhaus W, Brodin B, Dér A, Deli MA. Transendothelial Electrical Resistance Measurement across the Blood-Brain Barrier: A Critical Review of Methods. *Micromachines (Basel)*. 2021; 12(6):685.
- Walter FR, Valkai S, Kincses A, Petneházi A, Czeller T, Veszelka S, Ormos P, Deli MA, Dér A. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sens Actuators B: Chem* 2016; 222:1209-1219.
- Walter FR, Santa-Maria AR, Mészáros M, Veszelka S, Dér A, Deli MA. Surface charge, glycocalyx, and blood-brain barrier function. *Tissue Barriers*. 2021; 9(3):1904773.
- Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005; 19(13):1872-4.
- Weksler, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 2013; 10(1):16.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Deli Máriának és Dr. Walter Fruzsínának, a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet kutatóprofesszorának és tudományos főmunkatársának, munkám során nyújtott folyamatos támogatásukért és tanácsaikért.

Köszönöm Vigh Juditnak és Kucsápszky Nórának, a Biológiai Barrierék Kutatócsoport PhD hallgatójának és szakdolgozójának az elméleti és gyakorlati munkámban nyújtott rengeteg segítségét.

Köszönöm a Biológiai Barrierék Kutatócsoport minden egyes tagjának, Dr. Gróf Ilonának, Dr. Hoyk Zsófiának, Dr. Veszélka Szilviának, Dr. Kürtiné Dr. Bocsik Alexandrának, Szecskó Anikónak, Zuhao Cuinak, Cser Nárcisznak, Párdi Koppánynak, Szántó Milánnak, Lemaitre Luciennek a sok segítséget, szakmai támogatást és a kedves, baráti légkört. Valamint köszönöm Dr. Ana Raquel Pato Santa Marianak és Dr. Mészáros Máriának, csoportunk volt tagjainak a kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Perei Katalinnak, az SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék egyetemi adjunktusának, hogy elvállalta a belső konzulensi tevékenységet.

Végezetül köszönöm a HUN-REN SZBK Biofizika Intézet munkatársainak, valamint korábbi igazgatójának, Dr. Zimányi Lászlónak, és jelenlegi igazgatójának, Prof. Deli Máriának, hogy helyet kaphattam szakdolgozóként az intézet tudományos életében.