

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
BIOFIZIKAI INTÉZET

**Sejttenyészetes vér-agy gát vizsgálatok új humán modelljének
optimalizálása: endotélsejtek, periciták és agyi organoidok
együttes tenyésztése**

Kocsis Anna

Molekuláris Bionika Mérnöki BSc

IV. évfolyam

Témavezetők:

Prof. Deli Mária, kutatóprofesszor

Dr. Walter Fruzsina, tudományos munkatárs

ELKH SZBK, Biofizikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Perei Katalin, egyetemi adjunktus

SZTE TTIK, Biológia Intézet,

Biotechnológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
1.1. Vér-agy gát jellemzése	4
1.2. Vér-agy gát tenyésztetes modellek.....	6
1.3. Az agyi organoidok jelentősége kutatásokban	8
2. Célkitűzés.....	10
3. Anyagok és módszerek.....	10
3.1. Reagensek.....	10
3.2. Sejttenyésztés	10
3.2.1. Humán középagyi organoidok fenntartása	10
3.2.2. A vér-agy gát modell létrehozása.....	11
3.2.3. Vér-agy gát és agyi organoid ko-kultúra létrehozása.....	12
3.3. Gátműködés mérése a vér-agy gát modellen.....	13
3.3.1. Valósídejű sejtanalízis.....	13
3.3.2. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése	14
3.3.3. Permeabilitási vizsgálatok.....	15
3.4. Immunfestés humán agyi endotélsejteken és középagyi organoidokon.....	16
3.5. Képek készítése és szerkesztése	17
3.6. Statisztikai analízis	17
4. Eredmények.....	17
4.1. A középagyi organoidok fenntartása és jellemzése laboratóriumunkban	17
4.1.1. A középagyi organoidok fenntartása.....	17
4.1.2 A középagyi organoidok jellemzése	18
4.2. Vér-agy gát és agyi organoid ko-kultúra létrehozása.....	19
4.2.1. Az organoidok extracelluláris mátrixba való beágyazása	19
4.2.2. Az organoid érést segítő tápfolyadék hatása humán endotélsejtek életképességére	20
4.2.3. A megfelelő számú organoid arány meghatározása.....	21
4.2.3. Az együtt tenyésztés időzítése.....	21
4.2.4. A megfelelő médium arány kiválasztása.....	25
5. Megbeszélés	26
6. Összefoglalás.....	29
Irodalomjegyzék.....	30
Köszönetnyilvánítás	33

Rövidítések jegyzéke

BBB: vér-agy gát

BDNF: agyi eredetű idegsejt növekedési faktor

BSA: borjú szérum albumin

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

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

FBS: borjúsavó

FD4: fluoreszcein izotiocianáttal jelölt 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

PFA: paraformaldehid

TEER: transzendoteliális elektromos ellenállás

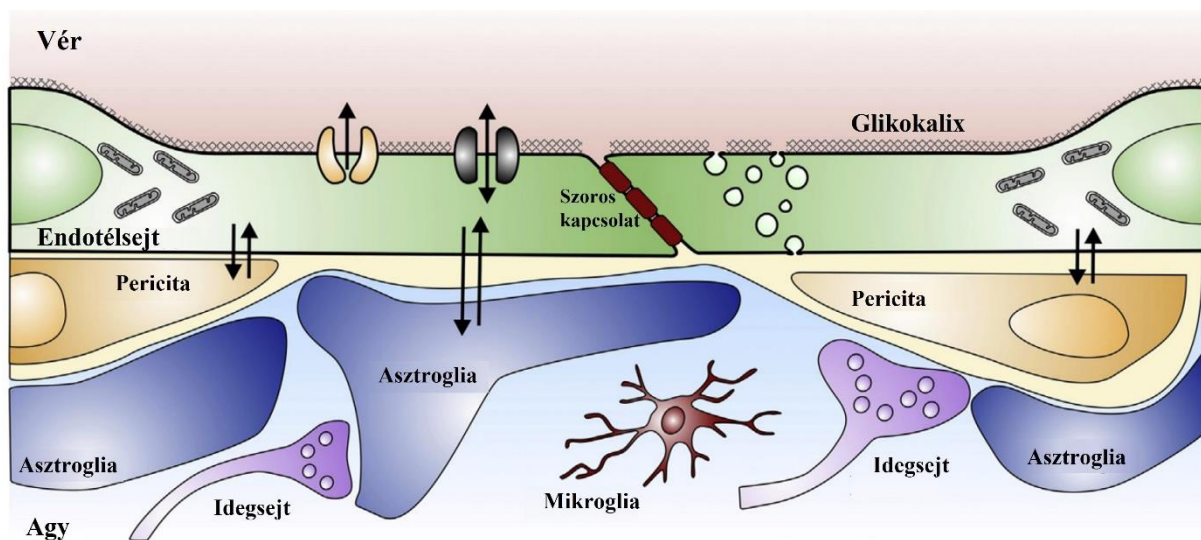
TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β

TX: TritonX 100

1. Bevezetés

1.1. Vér-agy gát jellemzése

A vér-agy gát egy dinamikus határfelület a vér és a központi idegrendszer között. Elsődleges feladata az agyi mikrokörnyezet szabályozása a megfelelő idegi működés fenntartásához. Szerepe kettős, egyrészt tápanyagokkal és oxigénnel látja el az agyszövetet, másrészt védelmet nyújt a káros anyagok és kórokozók bejutása ellen (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). A vér-agy gátat az agyi mikroerek endotélsejtjei és az azokat körülvevő periciták és asztroglia végtalpak alakítják ki (1. ábra). Ezen felül a szomszédos mikroglia- és idegsejtekkel, valamint a vér sejtjes elemeivel funkcionális egységet alakítanak ki, melyet neurovaszkuláris egységnek hívunk (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Az agyi endotélsejtek folyamatosan kommunikálnak a környező sejtekkel. A periciták az agyi hajszálereket szorosan körülvéve az endotélsejtekkel közös bazális membránnal rendelkeznek (1. ábra). Segítik a kapillárisok szerkezetének fenntartását, emellett fontos szerepük van a vér-agy gát fejlődésében és szabályozásában. Az asztroglia végtalpak beborítja az agyi hajszálerek felszínét, ezzel segítve a sejtek közötti kommunikációt és a vér és az idegrendszer közötti anyagátjutást (Deli, 2011).



1. ábra. A vér-agy gát felépítése sematikus rajzon (Campos-Bedolla és mtsai., 2014, módosítva).

Az agyi endotélsejtek vér-agy gátra jellemző tulajdonságainak kialakítása a mikroereket körülvevő sejtek: az asztrociták (Abbott, 2002) és a periciták (Nakagawa és mtsai., 2007) hatására következik be. A vér-agy gát anatómiai alapját alkotó endotélsejtek egyik legfontosabb jellemzője, hogy a sejtek szoros kapcsolatokkal illeszkednek egymáshoz, akadályozva ezzel a sejtek közötti térben a sejt- és anyagátjutást. A szoros kapcsolatokat (*zonula occludens*)

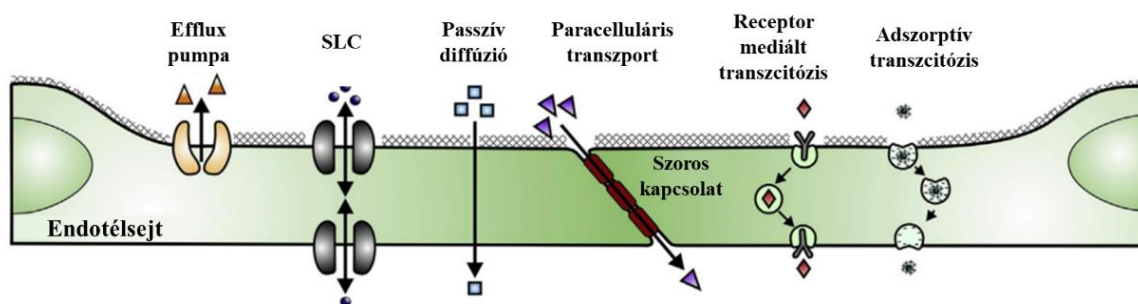
transzmembrán fehérjék: okkludin, klaudinok és az immunglobulin szupercsaládba tartozó membrán fehérjék (JAM) alakítják ki. Ezeket az integráns membránfehérjéket linker és szabályozó fehérjék, mint a *zonula occludens* fehérje 1 (ZO-1) kapcsolják az aktin sejtvázhoz (Deli, 2009). A szoros kapcsolatok mellett az adherens kapcsolatok és azok linker fehérjéi, mint a β -katenin jelentős szerepet játszanak jelátviteli utakban a sejtek közötti kapcsolódás szabályozása mellett (Deli, 2009). További fontos, agyi endotélsejtekre jellemző tulajdonság, hogy a sejtek nem fenesztráltak, alacsony a pinocitotikus vezikulák száma, ezáltal a nem specifikus transzcitózis, és a vérfehérjék agyba jutása korlátozott. A specializált szállítófehérjék mellett magas az efflux pumpa aktivitás, amely a toxikus anyagokkal szembeni védelmet biztosítja (Campos-Bedolla és mtsai., 2014).

A vér-agy gát számos mechanizmussal védelmezi az agyat. Az endotélsejtek szoros kapcsolatai fizikai gátat alkotnak, ezzel akadályozzák a sejtek, vízdékony anyagok és ionok sejtek közötti (paracelluláris) átjutását (Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Az efflux pumpák és az agyi endotélsejtek metabolikus enzimek kémiai védelmet nyújtanak az agy számára. Az ABC transzporter család tagjai, mint a P-glikoprotein (ABCB1), az ABCG2 és a multidrog rezisztens fehérje család (ABCC) tagjai nagy mennyiségben megtalálhatók az agyi hajszálerekben. A vér felőli, úgynevezett lumenális membránon található aktív efflux fehérjék a vérből a sejtbe jutó zsírdékony molekulákat a vérbe pumpálják vissza. A glikokalix az agyi endotélsejtek lumenális és agyszövet felőli, ablumenális felszínén levő cukor-fehérje réteg, ami főként proteoglikánokból, glikoproteinekből és glükózaminoglikánokból áll (Walter és mtsai., 2021). Egyedülálló elhelyezkedése, összetétele és szerkezete negatív töltésű fizikai gátként szolgál, mely korlátozza a biomolekulák agyba való bejutását (Santa-Maria és mtsai., 2021; Walter és mtsai., 2021). A vér-agy gát ezeknek a védelmi mechanizmusoknak köszönhetően nemcsak a káros anyagok, de a gyógyszermolekulák agyba való bejutását is akadályozza: a lehetséges új idegrendszeri hatóanyagok legnagyobb része nem jut be a központi idegrendszerbe (Deli, 2011; Walter és mtsai., 2021).

A tápanyagok több transzport útvonalon át juthatnak a vér-agy gáton keresztül az agyba (2. ábra). Ezek közé tartozik a paracelluláris és a membránon keresztüli passzív diffúzió, a receptor-mediált és adszorptív transzcitózis, az SLC szállítófehérjék és az efflux transzport (Campos-Bedolla és mtsai., 2014).

A gázok, mint az oxigén és a szén-dioxid, és a kis zsírdékony molekulák, mint az alkohol, koffein vagy nikotin szabadon, passzív diffúzióval jutnak át az agyi endotélsejt membránján (2. ábra). A passzív paracelluláris transzportot a sejtek közötti szoros kapcsolatok korlátozzák. A legtöbb vízdékony kis és nagy biomolekula (pl. metabolit, fehérje és

poliszacharid) emiatt korlátozottan jut át a vér-agy gáton. A központi idegrendszer betegségeit gyógyító hatóanyagok gyakran hidrofílok, emiatt alacsony a permeabilitásuk. Az SLC (solute carrier) fehérjecsalád tagjai kétirányú transzporttal juttatják a vér-agy gáton keresztül az agy számára szükséges kis poláris anyagokat, mint a tápanyagokat, vitaminokat és ásványi anyagokat (Deli, 2011; Campos-Bedolla és mtsai., 2014). Az agyi endotélsejtek luminális membránján található efflux pumpák jelentősen korlátozzák a hatóanyagok bejutását a központi idegrendszerbe, ezzel megnehezítve például az agyvérzés, az epilepszia, vagy az agytumороk kezelését. A receptor-mediált transzcitózis a fehérjék transzportját teszi lehetővé (2. ábra). Olyan, a szabályozásban fontos szerepet játszó fehérjék és hormonok jutnak az agyba így, mint a leptin és az inzulin. Az adszorptív transzcitózis az agyi endotélsejtekben rendkívül kis aktivitású transzport útvonal.



2. ábra. A vér-agy gát transzport mechanizmusai (Campos-Bedolla és mtsai., 2014, módosítva).

Az agyszövet számára káros szérumfehérjék központi idegrendszerbe jutását a szoros kapcsolatok, a fenesztráltság hiánya és az alacsony pinocitotikus vezikuláris transzport gátolják élettani körülmények között. Ezek a védelmi rendszerek kóros körülmények között kevésbé működnek és lehetővé teszik olyan anyagok bejutását, amelyek az agyat károsítják, ezzel pedig hozzájárulnak az idegrendszeri betegségek súlyosbodásához (Deli, 2011).

1.2. Vér-agy gát tenyészetes modellek

A vér-agy gát kutatás kezdetét általában Paul Ehrlich több mint 100 évvel ezelőtti rágcslókon leírt megfigyelésére vezetik vissza. Egészen az 1970-es évekig elsősorban állatkísérletes modelleken vizsgálták az idegrendszeri gátakat. Elsőként Joó Ferenc és munkatársai alkalmaztak rágcslókból izolált agyi mikroereket (Joó és Karnushina, 1973), ezzel megteremtve a vér-agy gát *in vitro* modellezésének lehetőségét (Joó, 1993). Napjainkban a sejtenyészetes vér-agy gát modellek fontos szerepet játszanak a vér-agy gát szerkezetének és működésének vizsgálatában élettani és patológias körülmények között, valamint széles körben

alkalmazhatók hatóanyagok átjutásának és hatásának vizsgálatára (Deli és mtsai., 2005). Az *in vitro* vér-agy gát modellezés legelterjedtebb módszere a sejtek tenyésztőbetéten történő növesztése, mellyel lehetőség van ko-kultúrák létrehozására és permeabilitási vizsgálatok elvégzésére (Deli és mtsai., 2005; Veszélka és mtsai., 2011 és 2018; Helms és mtsai., 2016).

A tenyésztetes vér-agy gát modellek jelentős részét állati eredetű primer sejtekből állítják elő (Veszélka és mtsai., 2011; Helms és mtsai., 2016). Kutatócsoportunkban a primer sejt ko-kultúra modellek létrehozásához a különböző sejt típusokat frissen izoláljuk patkány (Nakagawa és mtsai., 2009) és egér agyból (Lénárt és mtsai., 2015; Walter és mtsai., 2020). Az agyi endotélsejtek az izolálást követően puromicin kezelést kapnak, hogy más szennyező sejt típusoktól mentes, tiszta sejt kultúrát kapjunk (Perrière és mtsai., 2005). A periciták és asztrociták növelik az endotélsejtek kapcsolatainak szorosságát, erősítik a gátműködést, ezért a három sejt típusból álló primer patkány ko-kultúra, az endotélsejtek pericitákkal és asztrocitákkal való együttes tenyésztése, magasabb ellenállást és alacsonyabb permeabilitást eredményez a magasabb szinten kifejeződő szoros kapcsolat fehérjék miatt (Nakagawa és mtsai., 2009). Az *in vitro* primer patkány vér-agy gát sejttenyészetek előnye, hogy az eredmények könnyen összehasonlíthatók az *in vivo* kísérletek eredményeivel (Avdeef és mtsai., 2015). Hátrányuk, hogy a tiszta, homogén sejttenyészetek létrehozása nehéz, időigényes és költséges módszer (Deli és mtsai., 2005).

Az állati sejteket használó modellek segítségével rengeteget tudtunk meg a vér-agy gát működéséről. Azonban a preklinikai gyógyszervizsgálatokhoz a legmegfelelőbb modellek a humán sejt alapú modellek lennének (Helms és mtsai., 2016). A hCMEC/D3 humán agyi endotélsejtvonal az első széles körben használt humán immortalizált sejtvonal, amelynek kiindulási sejtjeit epilepsziában szenvedő betegek műtét során eltávolított agyszövet mintája adta (Weksler és mtsai., 2013). Ez a humán modell alkalmas a vér-agy gát egyes transzportfolyamatainak és kóros körülmények hatására bekövetkező változásainak vizsgálatára, ezért elterjedten alkalmazzák neurodegeneratív betegségek vizsgálatában. Előnye, hogy könnyen tenyésztethető sejtvonal, amely stabilan megtart bizonyos vér-agy gát jellegeket. (Weksler és mtsai., 2005; 2013) A hCMEC/D3 sejtvonalat egyes transzportfehérjék és receptorok mechanikai vizsgálataihoz alkalmazzák. Legnagyobb hátránya, hogy gyenge paracelluláris gátat képez a sejt kapcsoló fehérjék, elsősorban az okkludin és a kladin-5 alacsony kifejeződése miatt, így ez a sejt vonal kismolekulák permeabilitási vizsgálatára nem alkalmas (Helms és mtsai., 2016; Veszélka és mtsai., 2018).

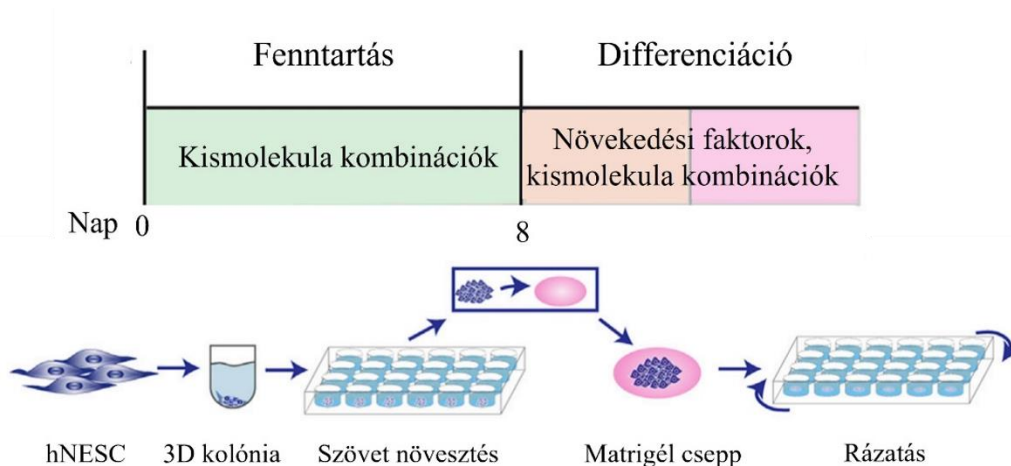
Kísérletes célokra humán primer agyi endotélsejtek és immortalizált sejt vonalak hozzáférhetőek, azonban ezek a sejtek korlátozottan szaporíthatóak, illetve az immortalizálás

során elvesztik az agyi endotélsejtekre jellemző tulajdonságokat. A humán őssejt alapú endotélsejt kultúrák új lehetőséget biztosítanak humán vér-agy gát modellek létrehozására (Helms és mtsai., 2016). Az indukált pluripotens őssejtek (iPSC) felhasználásával sikeresen differenciálthatók különböző sejttypusok, az egy lépésben nyert humán agyi endotélsejtek például patkány primer asztrocitákkal is együtt tenyésztethetők (Lippmann és mtsai., 2012). Az egyik legújabb és széles körben használt modell olyan vaszkuláris endotélsejteken alapul, amelyeket humán köldökszinór vérből izolált CD34⁺ őssejtekből hoznak létre (Cecchelli és mtsai., 2014). A módszer két fő lépése a következő: először az őssejteket endotélsejteké differenciáltatják, ezt követően hozzák létre az agyi endotélsejtekre jellemző tulajdonságokat agyi mikroér pericitákkal történő együtt tenyésztés segítségével. Ez a humán modell jól reprodukálható, amit különböző donorok sejtjeiből, különböző laboratóriumokban előállított, hasonló tulajdonságú modellek létrehozásával igazoltak. A modell akár 20 napig is képes megtartani a vér-agy gát tulajdonságokat, és hasonló eredményeket adott gyógyszer átjutási vizsgálatokban, mint az *in vivo* kísérletek (Cecchelli és mtsai., 2014). A modellt kutatócsoportunk beállította, sőt mikrofluidikai chip-eszközben is vizsgálta (Santa-Maria és mtsai., 2021). Kísérleteink során mi is ezt a modellt alkalmaztuk.

1.3. Az agyi organoidok jelentősége kutatásokban

Az iPSC-alapú technikák elterjedése tette lehetővé az agyi szferoidokon és organoidokon történő vizsgálatokat: ez a 2019 óta robbanásszerűen terjedő, új kutatási irány a gyógyszerkutatásban forradalmasította a betegségek és hatóanyagok tanulmányozását (Choudhury és mtsai., 2020). Jelenleg az idegrendszeri betegségek *in vitro* modellezése, hatóanyagok vizsgálata főként kétdimenziós neuronális sejt kultúrákkal történik, azonban ezeket a rendszereket homogenitás és kis komplexitás jellemzi (Chiaradia és mtsai., 2020). A hagyományos idegrendszeri tenyészetes modellek hiányossága, hogy nem modellezhetők jól olyan fontos élettani jellemzők, mint a sejt-sejt kommunikáció és a sejtek térbeli elhelyezkedése (Smits és mtsai., 2019). Az agyi organoidok az emberi agy számos szerkezeti és élettani tulajdonságát tükrözik, ezáltal hozzájárulnak egy összetettebb szövet *in vitro* elemzéséhez (Chiaradia és Lancaster, 2020). Ahogy korábban a vér-agy gát modelleknél említésre került, az iPSC alapú eljárások kifejlesztése lehetővé teszi különböző sejttypusok előállítását, így humán agyszövet modellek létrehozását is. A háromdimenziós (3D) kultúrák segítségével jobb lehetőség nyílik a komplex biológiai folyamatok mélyebb megértésére. Az őssejt alapú 3D kultúrák létrehozása nagy előrelépés a betegségek *in vitro* modellezésében (Monzel és mtsai., 2017; Smits és Schwamborn, 2020).

Az organoidok önszerveződő sejtsztruktúrák, amelyek mind élettani, mind molekuláris szinten jól leképezik az emberi agy sejt-sejt kapcsolatait, és az eddigi modellek közül a legjobban hasonlítanak az agyszövethez. Az organoidon belül a neuronok hálózatot alkotnak, melyet az idegsejtek egymással és más sejtípusokkal alkotott kapcsolatai hoznak létre. A neurodegeneratív betegségek kutatásában nélkülözhetetlen, hogy háromdimenzióban jöjjön létre ez a hálózat, hiszen így lehet megfelelően modellezni a sejtek közötti interakciókat (Smits és mtsai., 2019). A leggyakoribb öregedéssel összefüggésbe hozható közepagi betegség a Parkinson-kór. A Parkinson-kór jellemzője, hogy a dopaminerg neuronok száma a *substantia nigra* közepagi magban visszafordíthatatlanul lecsökken. A betegség modellezésére a legkorszerűbb modellt az agyi organoidok jelentik (Nickels és mtsai., 2020).



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

A kísérleteinkben is használt közepagi organoidok létrehozásához a kutatócsoportunk luxemburgi együttműködő partnerei humán neuroepiteliális őssejteket szélesztenek speciális letapadást gátló lemezre (3. ábra). Mivel a sejtek nem tudnak letapadni, létrejön egy önszerveződő 3D sejt kultúra. Ezt a kultúrát első lépésben 8 napig növesztik úgy, hogy serkentik a WNT és a Sonic hedgehog jelátviteli útvonalakat (3. ábra, fenntartás). Ebben a lépésben képződnek a közepagi-specifikus dopaminerg neuronok (Smits és Schwamborn, 2020). Ezt követően Matrigel cseppbe ágyazzák a létrejött sejtcsoportot, hogy erősebb legyen a felépítése, majd az organoidokat differenciáltatják növekedési faktorok és kismolekulák kombinációjával (3. ábra, differenciáció; Monzel és mtsai., 2017). Az így létrehozott közepagi organoidok 30 napos differenciáltatás után alkalmasak kísérleti felhasználásra.

2. Célkitűzés

Az elmúlt évtizedben a vér-agy gát modellezése jelentős fejlődésen ment keresztül, amelyet az összejt alapú technikák elterjedése tett lehetővé. Az új humán modellek kifejlesztéséhez összejtekből létrehozott endotélsejteket használnak, amelyeket a neurovaszkuláris egység más sejttypusaival, főképpen agyi pericitákkal tartanak ko-kultúrában, hogy a vér-agy gát tulajdonságokat létrehozzák (Cecchelli és mtsai., 2014). Az emberi iPSC eredetű agyi organoidok tenyésztése és tökéletesítése szintén az elmúlt tíz évben került előtérbe, és felhasználásuk a kutatás különböző területein robbanásszerű trendet mutat az elmúlt 4-5 évben. Ez a technikai fejlődés lehetővé teszi az állatból származó primer sejttenyészetek helyett új, humán sejt alapú, az eddigieknél komplexebb modellek létrehozását.

Munkánk során célunk az volt, hogy létrehozzunk és optimalizáljunk egy olyan új, komplex sejttenyészetes modellt, amiben az általunk gyakorlotta használt humán *in vitro* vér-agy gát modellt együtt tenyésztjük közepagyi organoidokkal. Ehhez az alábbi részcélokat tűztük ki:

- közepagyi organoidok fenntartása és jellemzése laboratóriumunkban
- a vér-agy gát modell és az organoid ko-kultúra paramétereinek meghatározása: tápfolyadék aránya, megfelelő agyi endotélsejt–organoid arány, az együtt tenyésztés időzítése
- az így létrehozott komplex modell jellemzése: a gátműködés mérése

3. Anyagok és módszerek

3.1. Reagensek

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

3.2. Sejttenyésztés

3.2.1. Humán közepagyi organoidok fenntartása

A közepagyi organoidokat a nanoPD M-ERA.NET2 nemzetközi együttműködés keretén belül luxemburgi partnerünk, Prof. Jens Schwamborn csoportja, biztosította számunkra (Nickels és mtsai, 2020). Az organoidokat neuronális progenitor összejtekből állítják elő egészséges és Parkinson-kóros betegek összejtjeinek felhasználásával. A Parkinson-kórt modellező (PD) organoidok az α -szinuklein gén háromszoros kópiáját hordozzák (Modamio és

mtsai., 2022). 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 két lépésben speciális faktorok segítségével 8 napon keresztül differenciáltatták (3. ábra). Az organoidokat érést segítő tápfolyadékba helyezték át DMEM/F12 tápfolyadékkal történő mosást követően, amelyet mi is használtunk a kísérleteink során. Ennek alapját a DMEM/F12 és a Neurobasal sejttenyésztő médiumok (Thermo Fisher Scientific, USA) 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/ 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)-acetil]-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 pedig rendszeresen készítettünk fáziskontraszt képeket (Motic AE2000 fáziskontraszt mikroszkóp, Motic Microscopy, Kína).

3.2.2. A vér-agy gát modell létrehozása

Kísérleteinkhez a Bevezetésben leírt humán vaszkuláris endotél- és agyi pericita sejteken alapuló vér-agy gát ko-kultúra modell (Cecchelli és mtsai., 2014) használtuk, amelyet csoportunk már jól jellemzett egy korábbi munka során (Santa-Maria és mtsai., 2021). A humán endotél- és a borjú agyi pericita sejteket a csoport francia együttműködő partnere, Prof. Fabien Gosselet csoportja bocsájtotta rendelkezésre (University of Artois, BtRAIN MSCA ITN közös pályázat). A CD34⁺ őssejteket humán köldökzsinór vérből izolálták (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 0,2% zselatinnal bevont Petri csészékben (Corning Costar, USA) növesztettük. A tápfolyadék alapját endotélsejt tenyésztő médium (ECM, Sciencell, USA) adta, melyhez 5% borjúsavót (FBS), 1% endotélsejt növekedési faktort (ECGS, Sciencell) és 50 μ g/ml gentamicint adtunk. Az agyi pericitákat szintén 0,2% zselatinnal bevont Petri-csészében (Corning Costar) növesztettük. A tápfolyadék összetétele DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies,

USA), 20% FBS, 1% GlutaMAX (stabil glutamin, Life Technologies, USA), és 50 µg/ml gentamicin volt.

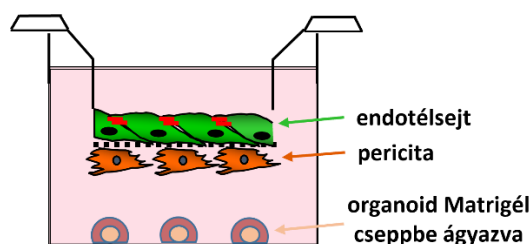
A ko-kultúra modell létrehozásához sejtenyészítő betéteket (poliészter membrán, 0,4 µm pórus méret, 0,33 cm² felszín, Corning Costar) használtunk, melyeket 24-lyukú tenyésztőlemezbe helyeztünk. A sejteket a tenyésztőbetétben lévő porózus membrán két oldalára szélesztettük. Először a membrán mindkét oldalát bevontuk, hogy a sejtek tapadását elősegítsük: a humán endotélsejtek számára a membrán felső oldalát Matrigellel (Corning), a periciták számára az alsó alsó oldalát pedig 0,2% zselatinnal vontuk be. A bevonás során a membránt az oldatokat egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a tenyésztőbetét alsó oldalára pericitákat szélesztettünk (5×10^3 sejt/tenyésztőbetét). Ehhez a tenyésztőbetéteket fejjel lefelé fordítottuk, majd a sejtek szélesztését követően a letapadáshoz 3 órára inkubátorba helyeztük. Ezután a betéteket visszafordítottuk a 24-lyukú lemezekbe előkészített tápfolyadékba, és a betét membránjának felső oldalára humán endotélsejteket pipettáztunk ($1,3 \times 10^4$ sejt/tenyésztőbetét). A tápfolyadékot a kísérlet során kétnaponta cseréltük. A kísérleteink során sejt nélküli tenyésztőbetéteket is használtunk, melyeket a kísérlet befejezéséig a vér-agy gát modellel azonos körülmények között tartottuk. Az így létrehozott vér-agy gát ko-kultúra modellt 2, 4 vagy 6 napig tartottuk fenn az adott kísérletnek megfelelően, mielőtt az agyi organoidokkal együtt tenyésztettük. Ezalatt az endotélsejtek teljesen benőtték a membránfelszínt, a sejtek között kialakultak a szoros kapcsolatok és megjelentek a vér-agy gátra jellemző tulajdonságok.

3.2.3. Vér-agy gát és agyi organoid ko-kultúra létrehozása

A 60-120 napos középagyi organoidokat először DMEM/F12 tápfolyadékkal megmostuk, majd 24-lyukú lemezekben (Corning Costar) egyenként csökkentett növekedési faktor tartalmú Matrigel cseppbe (10 µl, Corning) ágyasztuk őket. A lemezt minden 10. beágyasztott organoid után 12 percre behelyeztük a 37 °C-os inkubátorba, hogy a Matrigel megszilárduljon, majd feltöltöttük a lyukakat 500 µl érest segítő tápfolyadékkal (4. ábra; Veszélka és mtsai., 2021).

A korábban létrehozott sejtenyészetes humán vér-agy gát ko-kultúra modellt az agyi organoidokkal a kísérleti tervtől függően a vér-agy gát modell összeállítását követő 2., 4. vagy 6. naptól tenyésztettük együtt, ekkor a betéteket az organoidok fölé helyeztük (4. ábra). Az organoidokat mindig a velük való ko-kultúra előtt egy nappal ágyasztuk be. A felső folyadéktérben továbbra is a humán endotélsejtek tenyésztésénél használt tápfolyadék volt, az

alsó folyadéktérben pedig a humán endotélsejt tápfolyadék és az agyi organoidok érését segítő tápfolyadék elegyét tettük.



4. ábra. Vér-agy gát és agyi organoid ko-kultúra sematikus rajza.

3.3. Gátműködés mérése a vér-agy gát modellen

3.3.1. Valósídejű sejtanalízis

A valósídejű sejtanalízis egy impedancia mérésen alapuló eljárás. Ez a módszer élő sejtek folyamatos megfigyelésére alkalmas hozzáadott jelzőanyag nélkül. Segítségével valós időben kapunk információt a sejtek letapadásáról, növekedéséről, életképességéről, vagy az adott kísérletben alkalmazott kezelésekre adott válaszáról. A kísérlet során a sejteket egy speciális 96-lyukú lemezre szélesztettük (E-plate, Agilent, USA), melynek alján arany elektródák találhatók (5. ábra). Az RTCA-SP műszerrel (Agilent) minden 10. percben mértük az impedanciát (5. ábra). A gép minden mérési időponthoz automatikusan kiszámolja a sejtindexet az $(R_n - R_b)/10$ képlet alapján. Az R_n a sejtek és az elektróda között mért impedancia, az R_b pedig a sejtmentes tápfolyadék háttérimpedanciája (Barna és mtsai., 2020; Harazin és mtsai., 2018).



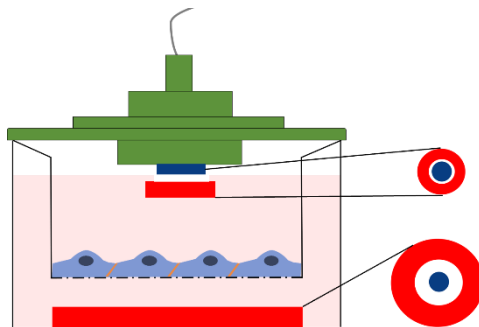
5. ábra. A műszer és a méréshez szükséges elektródákat tartalmazó 96-lyukú steril lemez.

A humán endotélsejtek szélesztéséhez a 96 lyukú lemezt 0,2% zselatinnal (20 perc, 37 °C) vontuk be. Ezt követően a lyukakat feltöltöttük tápfolyadékkal és lemértük a háttérét. Az

endotélsejteket 5×10^3 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük ki. Tápfolyadékot kétnaponta cseréltünk, amíg a sejtek benőtték a rendelkezésre álló felszínt és elérték a plató fázist. Ezt követően a sejtekhez az endotélsejtek és az agyi organoidok tápfolyadékának adott arányú keverékeit adtuk. A kezelésre adott sejtválaszt 48 órán keresztül követtük nyomon.

3.3.2. Transzendoteliális elektromos ellenállás mérése

Az *in vitro* vér-agy gát modellben az agyi endotélsejtek között szoros kapcsolatok alakulnak ki, amelyek gátolják a sejtek közötti transzport útvonal szabad átjárhatóságát még ionok számára is. A transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) kísérletes körülmények között számszerűen mutatja meg a gát szorosságát (Deli és mtsai., 2005). A sejtenyészítő betétek membránja által létrehozott két folyadékteres elrendezés lehetővé teszi, hogy megmérjük az agyi endotélsejtréteg áteresztőképességét a tápfolyadékban legnagyobb mennyiségben található nátrium ionra (150 mM). Az ellenállás mérése az EVOM-2 készülékkel (WPI, USA) történt kamraelektrodával (6. ábra). A kamra előnye, hogy az elektródák és a tenyésztő betétek egymáshoz képest minden mérésnél rögzített pozícióban vannak. Emellett nagyobb az elektróda felszíne, amely segítségével egységesebb képet kaphatunk a teljes sejtfelszín ellenállásáról (Vigh és mtsai., 2021; Santa-Maria és mtsai., 2022). A kapott rezisztencia értékekből (Ω) kivontuk a sejtek nélküli tenyésztőbetéteken mért értékek átlagát ($\sim 60 \Omega$) és normalizáltuk a tenyésztőbetétek felszínére ($\Omega \text{ cm}^2$).



6. ábra. Ellenállás mérése sejtenyészítőbetéten növesztett sejtréteken: a kamraelektrodában elhelyezett modell és az elektródák sematikus rajza (Vigh és mtsai., 2021). Piros szín: áram elektródák, kék szín: feszültség elektródák.

Kísérleteink során a TEER mérésekhez a tenyésztőbetéteket tartalmazó lemezeket az inkubátorból kivéve fűtőpadra helyeztük, hogy a tápfolyadék hőmérsékletét 37°C -on tartsuk. Ez ugyanis nemcsak a sejtek életképessége és a gát szorossága szempontjából fontos, de befolyásolja az ionok mobilitását is, ennek következtében az ellenállás értékét is módosíthatja. A méréseket minden esetben a tápfolyadék cseréje előtt végeztük (Vigh és mtsai., 2021).

3.3.3. Permeabilitási vizsgálatok

Kísérleteink végén az agyi endotélsejtréteg szorosságát permeabilitási vizsgálatok segítségével is megvizsgáltuk (Deli és mtsai., 2005; Hülper és mtsai., 2013). A permeabilitási vizsgálatokhoz fluoreszcein izotiocianáttal jelölt 4,4 kDa dextránt (FD4) használtunk. Az FD4 törzsoldatot 1% BSA és 1% ITS-t tartalmazó Ringer-Hepes pufferben hígítottuk 100 µg/ml végkoncentrációban. A kísérlet kezdetén a felső (luminális) folyadéktérben lecseréltük a tápfolyadékot az FD4-et tartalmazó permeabilitási pufferre (200 µl), míg az alsó (abluminális) folyadéktér jelzőanyag nélküli permeabilitási puffert tartalmazott (900 µl). A kísérlet alatt a lemezeket 37 °C-on CO₂ inkubátorban, síkrázó készüléken tartottuk (150 fordulat/perc, OS10 orbital shaker, BioSan, Lettország). A lemezekben 20 percenként a modellt tartalmazó tenyésztőbetéteket új puffert tartalmazó lyukakba helyeztük át. A 60 percig tartó permeabilitási vizsgálat végén az alsó kompartmentekből mintákat gyűjtöttünk, ezek tartalmazták a sejtrétegeken átjutott jelzőanyagot. A sejtek nélküli tenyésztőbetéteken is megmértük az FD4 átjutást. Az átjutott jelzőanyag mennyiségét spektrofotométer (Horiba Fluorolog 3, Japán) segítségével határoztuk meg (gerjesztés: 490 nm, elnyelés: 516 nm hullámhossz). A jelzőanyag sejtrétegen való átjutását az endotéliális permeabilitási együtthatóval (P_e) jellemeztük (Hülper és mtsai., 2013). Az alábbi egyenlettel először kiszámoltuk a clearance értékeket, amelyek azt a luminális folyadéktér térfogatot (µl) jelentik, amiből a jelzőanyag egységnyi idő alatt teljesen átjut az abluminális folyadéktérbe.

$$\text{Clearance (}\mu\text{l)} = C_A \times V_A / C_L$$

Az egyenletben a V_A az abluminális kompartment térfogata, a C_L a felső kompartmentbe adott FD4 koncentrációja és a C_A az alsó kompartmentbe átjutott FD4 koncentrációja. Ezt követően az összesített clearance-t az idő függvényében ábrázoltuk, hogy megkapjuk az endotélsejtréteg permeabilitását (PS_e). Ehhez a sejtek nélküli tenyésztőbetétek permeabilitását (PS_i) kivontuk a modell permeabilitásából (PS_t):

$$1/PS_e = 1/PS_t - 1/PS_i$$

Végül az endotéliális permeabilitási együttható (P_e) kiszámolásához az endotélsejtréteg permeabilitását elosztottuk a sejtenyésztőbetét membránjának felszínével (A).

$$P_e = PS_e/A$$

Minél alacsonyabb a P_e érték, annál szorosabb az agyi endotélsejtréteg, jobb a modell gátműködése, és kifejezettebbek a vér-agy gát tulajdonságok.

3.4. Immunfestés humán agyi endotélsejteken és középagyi organoidokon

A sejtenyésző betéteket 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. Ezt követően 1% BSA-PBS oldattal blokkoltuk a nonspecifikus kötőhelyeket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az endotélsejteket poliklonális nyúl anti-klaudin-5 (1:200), β -katenin (1:200) és ZO-1 (1:200; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) 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, 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 cukor oldattal telítettük. Ezt követte a fagyasztva metszés, amelyhez az organoidokat beágyaztuk (Optimal Cutting Temperature oldat, Tissue-Tek, USA). Kriosztát segítségével (Leica) $20\text{ }\mu\text{m}$ vastag metszetek készítettünk, melyeket speciális, töltéssel rendelkező tárgylemezre helyeztünk (Super Frost, Thermo Fisher). A metszeteket egyszer mostuk PBS oldattal, majd 0,2% Triton-X-PBS oldattal feltártuk az antigénkötő helyeket 15 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. 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, abcam), egér anti- β III-tubulin (1:500) és kecske anti-GFAP (1:500, abcam) elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Másnap háromszori mosást követően PBS-ben hígított anti-csirke A594 (Jackson ImmunoResearch), anti-egér A555 és anti-kecske A488 (Thermo Fisher Scientific) festékekkel jelölt másodlagos antitestekkel (1:400) és Hoechst 33342 magfestéssel (1:1000) 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 és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat.

3.5. Képek készítése és szerkesztése

Az organoidok érése során készített fáziskontraszt felvételekhez Moticam 1080 kamerát használtunk. A fluoreszcens képeket konfokális mikroszkóppal készítettük (Leica Microsystems GmbH, Németország). A képek szerkesztését ImageJ programmal (NIH, USA) végeztük.

3.6. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analíziséhez a GraphPad Prism 5.0 programot használtunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában ábráztuk. A vizsgálatok elemzéséhez egyutas és kétutas Anova tesztet és Bonferroni poszt-tesztet végeztünk. Munkánk során a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

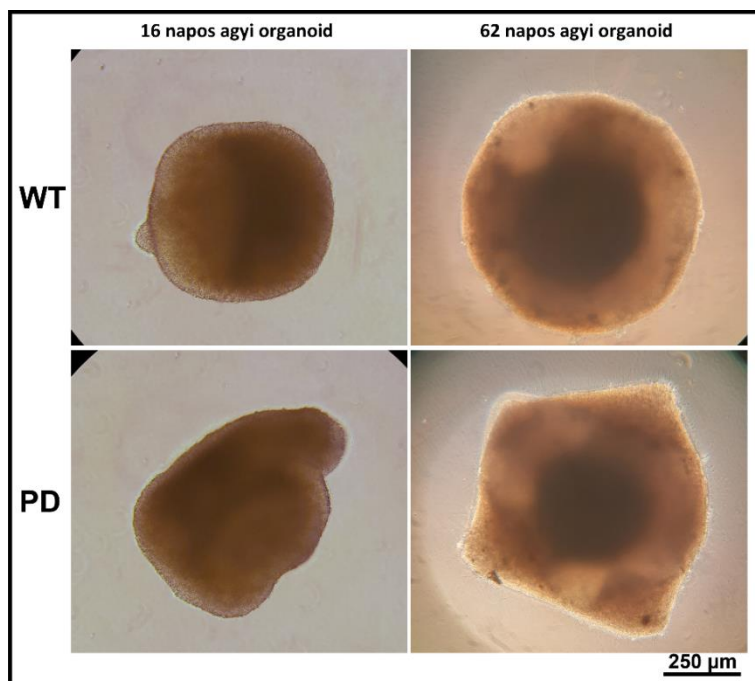
4.1. A középagyi organoidok fenntartása és jellemzése laboratóriumunkban

4.1.1. A középagyi organoidok fenntartása

A középagyi organoidokat luxemburgi együttműködő partnereink hozták létre, laborunkba letapadást gátló lemezekben a kezdeti differenciáló lépéseket követően az érést elősegítő tápfolyadékban érkeztek.

A felnevelésük során készített fáziskontraszt képeken látható, hogy a 16 napos agyi organoidok körülbelül 0,5 mm átmérőjűek, érésük során tovább növekednek, közel 1 mm átmérőjű gömbbé. Ahogy a 7. ábrán is látható, a középagyi organoidok jellemzően szabályos szferoidok, ettől ritkán térnek el. Szélükön keskeny sávban kevésbé tömörek és több esetben kisebb sejtcsoportosulások láthatóak, amik a növekedést és a folyamatos sejt-átrendeződést mutatják.

A Parkinson-kóros, az α -szinuklein gén háromszoros kópiáját hordozó organoidok általában kisebbek voltak az egészséges, vad típusú sejtekből differenciáltatott organoidokhoz képest. Alakjuk kevésbé szabályos volt (7. ábra), és az organoidok érzékenyebben reagáltak a mosási és tápfolyadék csere folyamatokra.



7. ábra. Középagyi organoidok fáziskontraszt képei. Bal oldali kép 16 napos, a jobb oldali 62 napos differenciáltsági állapotot mutat. Mércé 250 μm . WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

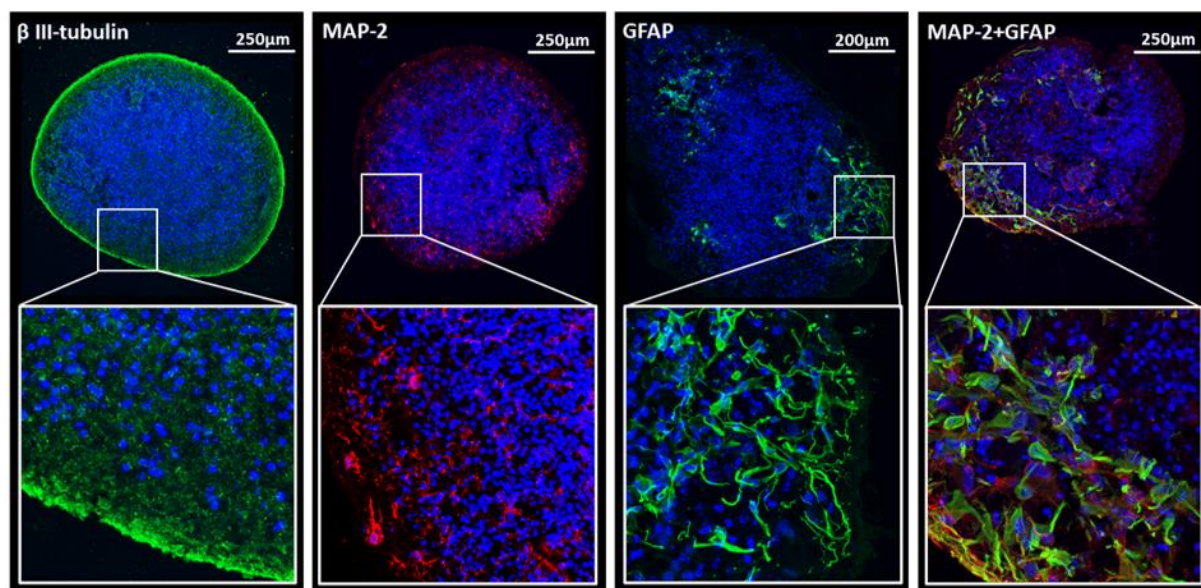
Leghamarabb 30 napos differenciáltsági állapottól használhatóak az organoidok (Nickels és mtsai., 2020). Kísérleteinkben 60-120 napos organoidokat használtunk.

4.1.2 A középagyi organoidok jellemzése

Az organoidok érését követően a szerkezet és az organoidokat alkotó sejtek feltárása érdekében előkészítettük őket immunhisztokémiára. Többlépcsős folyamatban optimalizáltuk a fixálás, metszés és az immunfluoreszcens festés folyamatát. A paraformaldehiddel történő fixálást több időtartammal és koncentrációval is elvégeztük. Kipróbáltunk 3 és 4% PFA oldattal történő fixálást egy éjszakán át, majd 3%-os rövidebb idejű kezeléseket is. A legjobbnak a 75 perces 3% PFA fixálás bizonyult, a későbbiekben ezt a módszert alkalmaztuk. Az agyi organoidok metszése előtt 30%-os cukor oldatot alkalmaztunk krioprotektív eljárásként: a vízelvonás során az organoidok tömörebbé váltak, és a fagyasztva metszés során kevésbé voltak sérülékenyek.

Az agyi organoidok jellemzésekor az idegsejteket β -III tubulinnal és mikrotubulus asszociált fehérjével (MAP-2), az asztrocitákat gliális fibrilláris savas fehérjével (GFAP) jelöltük meg (8. ábra). A kisebb nagyítású képeken (8. ábra, felső sor) látható, hogy a β -III tubulin az organoid körvonalát jelölte. A MAP-2 az idegsejtek nyúlványait és sejttestjeit jelölte,

és egyenletesen oszlott el az organoid teljes felületén. Az asztrocitákra jellemző volt, hogy csoportokban helyezkedtek el az organoid adott szélein.



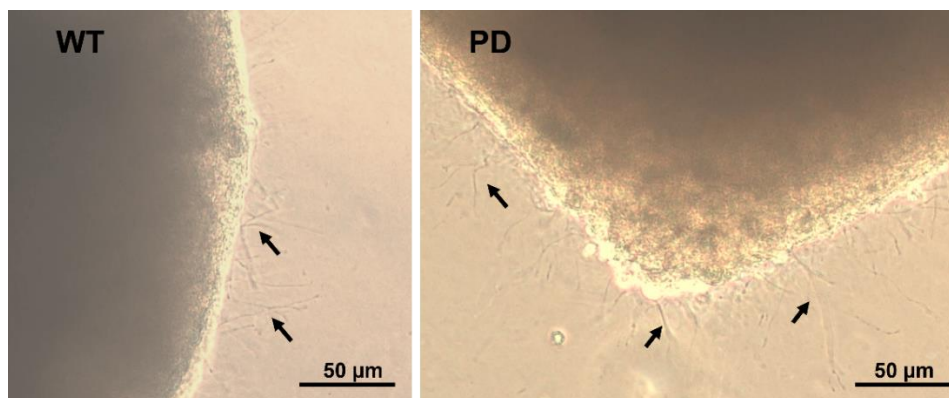
8. ábra. Organoidok jellemzése immunhisztokémiai festéssel. Zöld szín: β -III tubulin vagy gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP); piros szín: mikrotubulus asszociált fehérje-2 (MAP-2); kék szín: sejtmag. Mérce: 200 vagy 250 μ m.

4.2. Vér-agy gát és agyi organoid ko-kultúra létrehozása

4.2.1. Az organoidok extracelluláris mátrixba való beágyazása

A vér-agy gáttal való együtt tenyésztéshez elsőként a középagyi organoidokat extracelluláris mátrixba (Matrigel) ágyasztuk be. A Matrigel egy széles körben alkalmazott, 37 °C-on gél állagúvá szilárduló, csökkentett növekedési faktor tartalmú mátrix fehérjét tartalmazó oldat. A beágyazásra azért volt szükség, hogy az agyi organoidok adott pozícióban a sejtenyésztő lemez aljában maradjanak, és létre tudjuk hozni a ko-kultúrát a sejtenyésztő betéten elhelyezkedő vér-agy gát modellel.

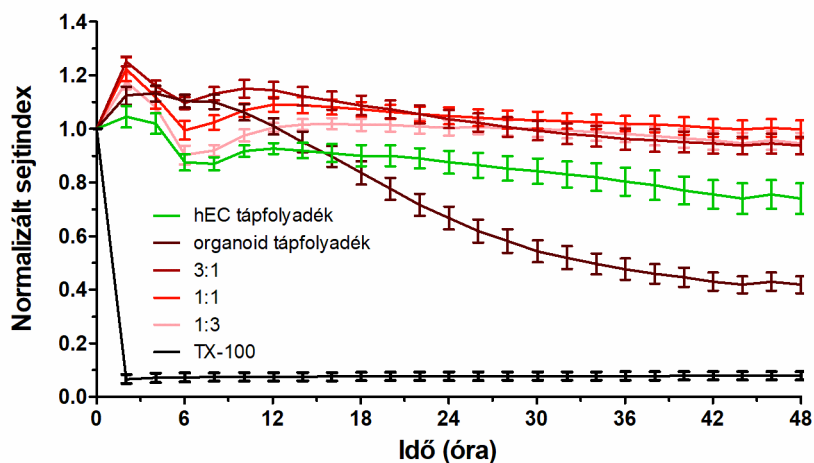
A 9. ábrán látható, hogy a mátrixba való beágyazást követően megjelennek az organoidokból kinövő idegsejt nyúlványok, ami azt mutatja, hogy az organoidokban a sejtek életképesek és egymással kommunikálnak (9. ábra, nyíl).



9. ábra. Fáziskontraszt képek közepagyi organoidokról Matrigelbe történő beágyazást követően. Nyíl: neuronális nyúlványok. Mércé: 50 µm. WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

4.2.2. Az organoid érést segítő tápfolyadék hatása humán endotélsejtek életképességére

A vér-agy gát és az agyi organoid ko-kultúra létrehozásához először valószerű sejtanalízis segítségével megvizsgáltuk az organoidok érését segítő tápfolyadék hatásait a humán endotélsejtek impedanciájára (10. ábra). A tápfolyadékok különböző elegyeit teszteltük. Kontrollként 100% humán endotélsejt tápfolyadékot (hEC tápfolyadék) alkalmaztunk. Megmértük továbbá az organoidok érését segítő tápfolyadék (organoid tápfolyadék), valamint a hEC:organoid 3:1, 1:1, és 1:3 arányú elegyének hatásait. Egy csoporton Triton X-100 detergens kezelést alkalmaztunk, mely sejthalált idéz elő.



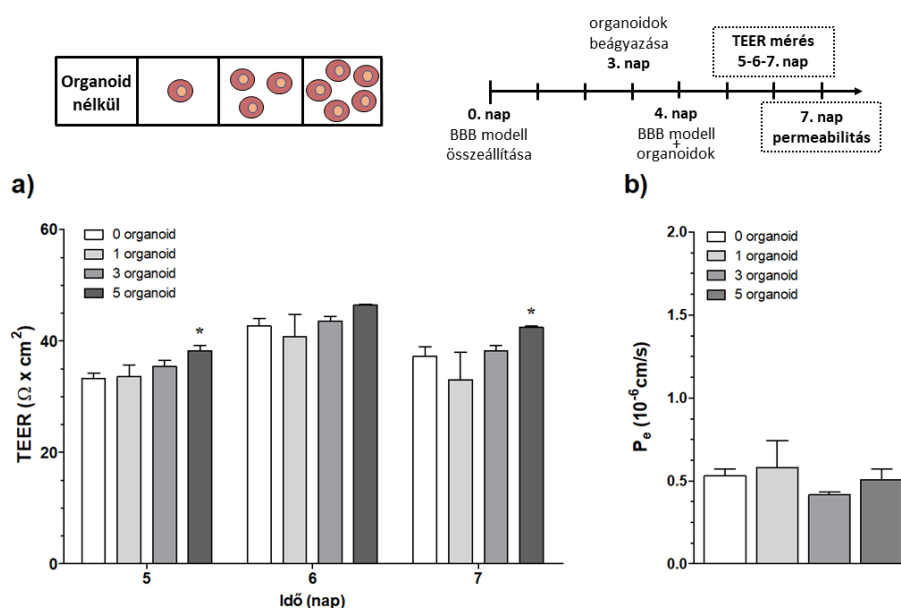
10. ábra. Organoidok érését segítő tápfolyadék hatása humán endotélsejtek impedanciájára. 3:1 = 75% organoid tápfolyadék + 25% humán endotélsejt tápfolyadék, 1:1 = 50% organoid tápfolyadék + 50% humán endotélsejt tápfolyadék, 1:3 = 25% organoid tápfolyadék + 75% humán endotélsejt tápfolyadék. TX-100: Triton X-100 detergens. n = 3-10.

Megállapítottuk, hogy a 100% organoid érést segítő tápfolyadék csökkenti az endotélsejtek impedanciáját, ami arra utal, hogy a sejtek közötti kapcsolatok szorossága és/vagy a sejtek életképessége csökken. A 3:1, 1:1, és 1:3 arányú tápfolyadékokkal kezelt csoportok

esetében látható, hogy kezelés a kísérlet végéig a kontroll csoportnál magasabb sejttindexet eredményezett (10. ábra). További kísérleteinkben az 1:1 arányú médiumot alkalmaztuk.

4.2.3. A megfelelő számú organoid arány meghatározása

Először megvizsgáltuk, hogy a vér-agy gát modell alá, a sejttenyésztő lemez lyukaiba elhelyezett organoidok száma befolyásolja-e a vér-agy gát modell barrier funkcióit (11. ábra).



11. ábra. Az agyi organoidok számának hatása a vér-agy gát modell gátműködésére. Sematikus rajz mutatja az agyi organoidok elhelyezkedését a sejttenyésztő lemezben. a) transzendentális elektromos ellenállás (TEER), b) FD4 permeabilitás. Átlag $\pm$ SD, $n = 2-4$, * $p < 0,05$. BBB: vér-agy gát.

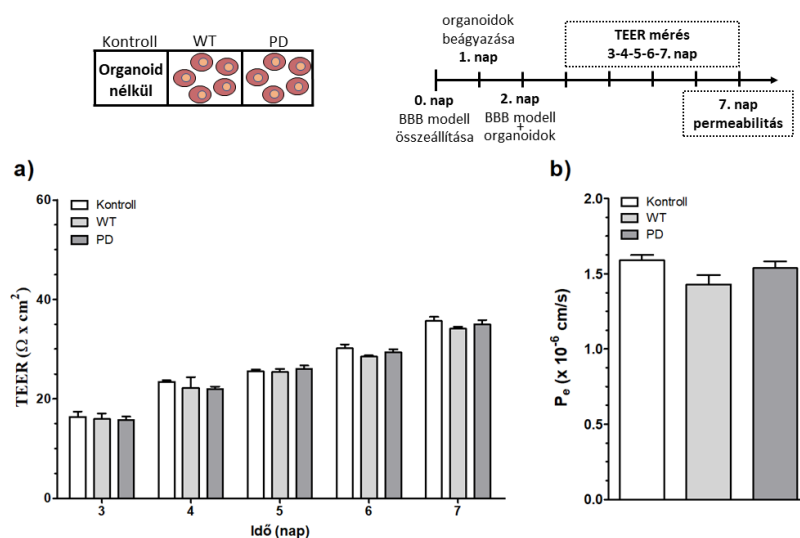
Ebben a kísérleti elrendezésben 1, 3, vagy 5 WT organoidot helyeztünk a 4 napos vér-agy gát modell alá. Ezt követően folyamatosan mértük az agyi endotélsejtréteg ellenállását és az utolsó napon permeabilitási vizsgálatot végeztünk. Megvizsgáltuk a vér-agy gát integritását organoid nélküli modellben is (11. ábra, 0 organoid kontroll csoport). A modell ellenállását az 5 organoid/lyuk elrendezés növelte a legjobban (11. a) ábra), míg az agyi endotélsejtrétegek FD4 permeabilitásában nem láttunk szignifikáns különbséget (11. b) ábra). További kísérleteinkben ezért az 5 organoidos elrendezést alkalmaztuk.

4.2.3. Az együtt tenyésztés időzítése

Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az organoidok jelenléte a humán agyi endotélsejtek barrier funkcióit, ha a vér-agy gát modell különböző érettségi állapotaiban kezdjük el együtt tenyészteni őket. A ko-kultúra kezdetétől, mindegyik kísérleti elrendezésben 5 napig vizsgáltuk a modellt.

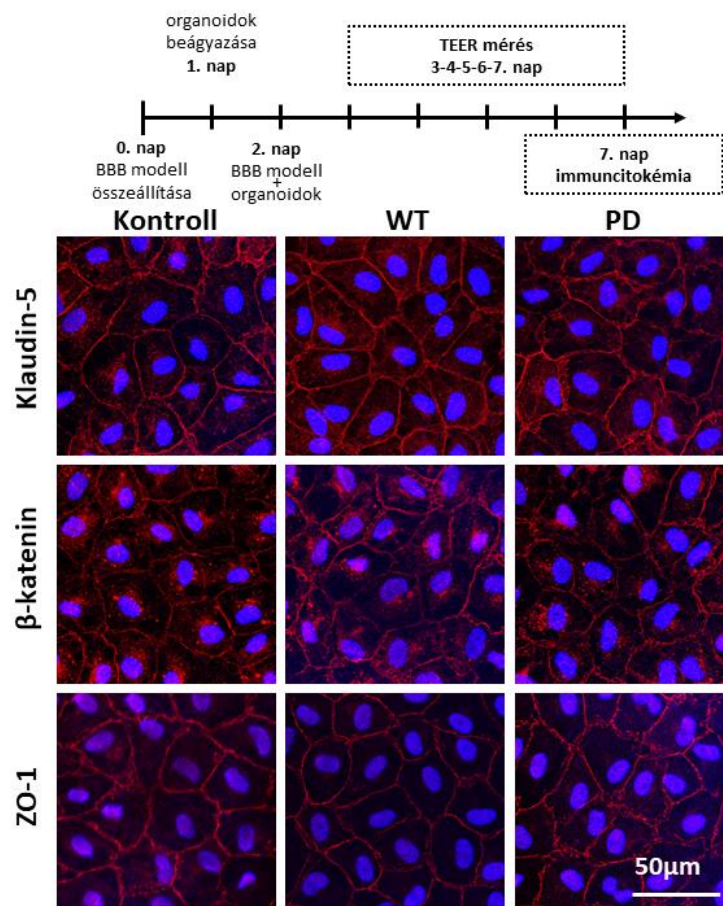
4.2.3.1. Kétnapos vér-agy gát modell agyi organoidokkal való együtt tenyésztése

Elsőként a kétnapos, még nem összefüggő sejtréteg alá helyeztünk organoidokat. A TEER a napok előre haladtával folyamatosan nőtt mind az organoidot tartalmazó (WT, PD), mind az organoidot nem tartalmazó (kontroll) csoportok esetében. A TEER a 7. napon $35,6 \Omega\text{cm}^2$ volt (12. a) ábra). A kísérlet 7. napján FD4 permeabilitási vizsgálatot végeztünk (12. b) ábra). A csoportok között sem az ellenállásban, sem a permeabilitásban nem találtunk különbséget. A permeabilitási koefficiens mindegyik csoportban $1,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ körüli érték volt, amely egy jól záródó, jól működő agyi endotélsejt réteg kialakulására utal.



12. ábra. Középagyi organoidok és 2 napos vér-agy gát modell együtt tenyésztése. a) transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER), b) FD4 permeabilitás. Átlag $\pm$ SD, $n = 3$. WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

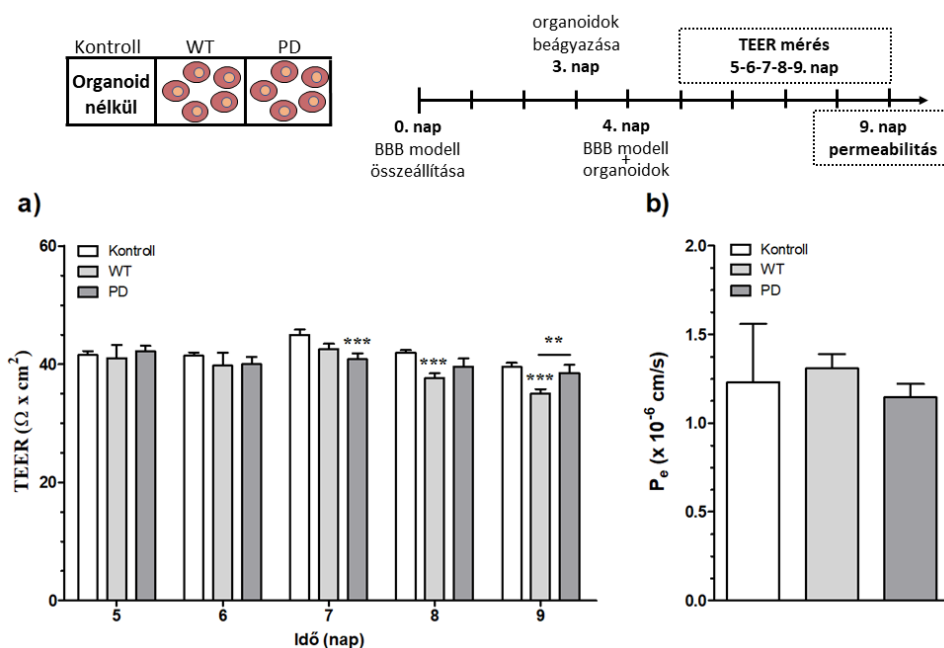
Ezt követően a sejteket lefixáltuk, és immunfluoreszcens festést végeztünk az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak jellemzésére (13. ábra). A szoros sejtkapcsoló struktúrák hasonló festődést mutattak mind a kontroll, mind az organoidot tartalmazó csoportokban.



13. ábra. Humán agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak jellemzése. Piros szín: klaudin-5, β-katenin és ZO-1 sejtkapcsoló fehérjék, kék szín: sejtmag. Mércé: 50 μm. WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

4.2.3.2. Négynapos vér-agy gát modell agyi organoiddal való együtt tenyésztése

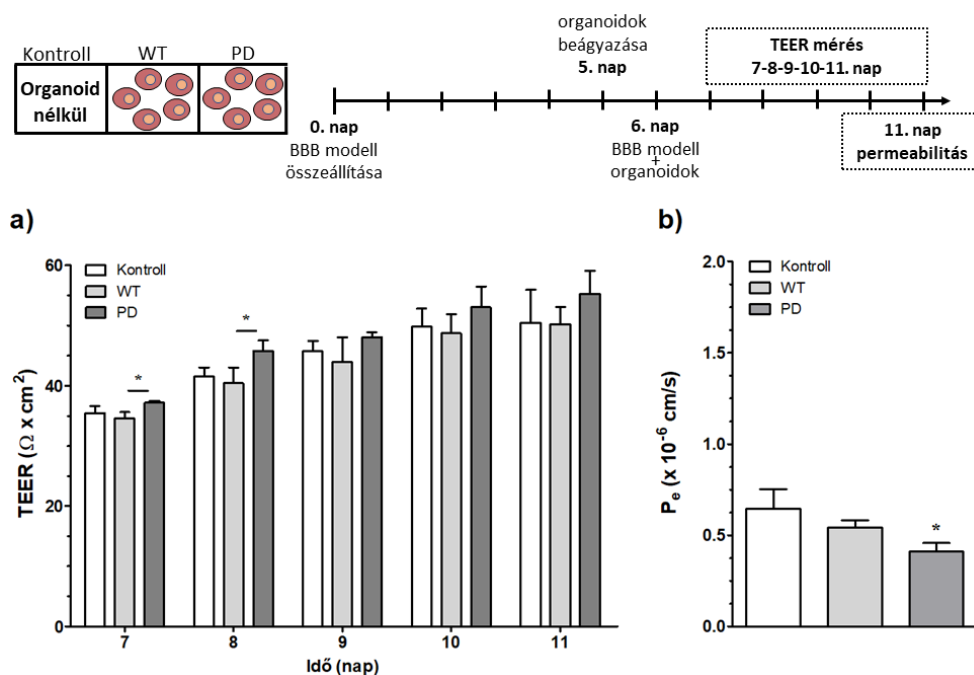
Ezután az organoidokat 4 napos, konfluens, azaz teljesen egybefüggő agyi endotélsejtréteg alá helyeztük. Ebben a kísérleti elrendezésben a kísérlet 5. napján (az együtt tenyésztés 1. napja) a konfluens sejtréteg ellenállása $40 \Omega \text{ cm}^2$ volt (14. a) ábra). A kontroll csoporthoz képest, amelynek TEER értékei $40 \Omega \text{ cm}^2$ körüliek voltak a 7. napon alacsonyabb ellenállást mértünk a PD, a 8. és 9. napon pedig a WT csoportban (14. ábra a). A 9. napon elvégzett FD4 permeabilitásban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között (14. b) ábra). A modellen az előző kísérleti elrendezéshez hasonló (12. ábra) permeabilitási értékeket figyeltünk meg ($1,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$).



14. ábra. Agyi organoidok és 4 napos vér-agy gát modell együtt tenyésztése. a) transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER), b) FD4 permeabilitás. Átlag $\pm$ SD, $n = 4-13$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

4.2.3.3. Hatnapos vér-agy gát modell agyi organoiddal való együtt tenyésztése

Végül hatnapos vér-agy gát modell alá helyeztük az organoidokat, és összesen 11 napig tartott az együtt tenyésztés (15. ábra).

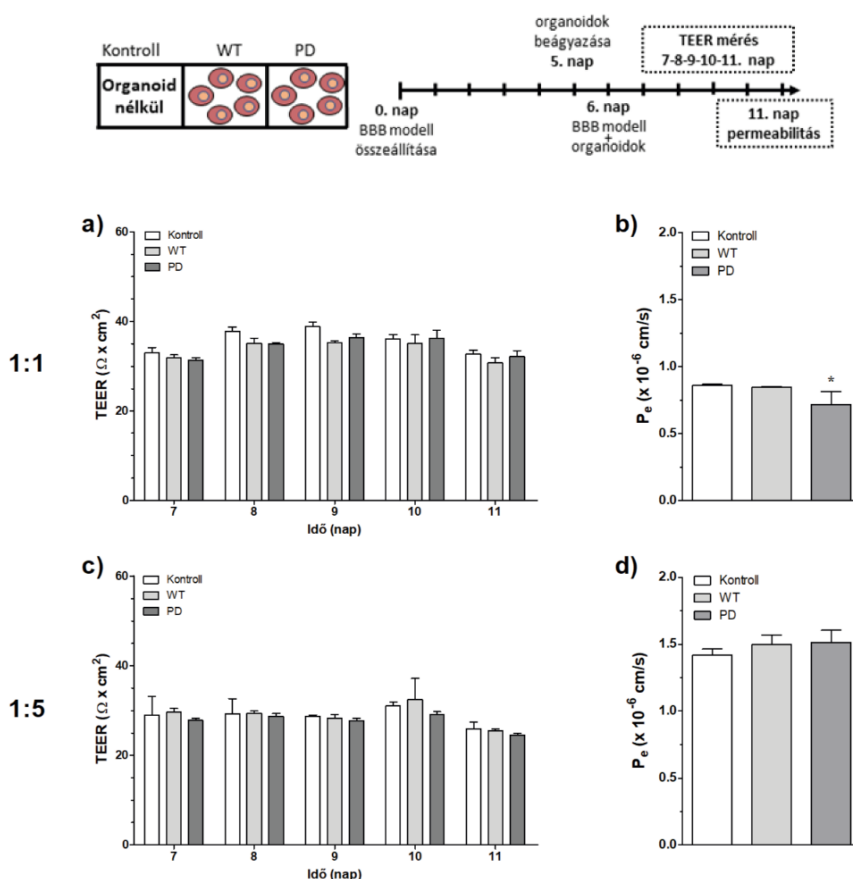


15. ábra. Agyi organoidok és 6 napos vér-agy gát modell együtt tenyésztése. a) transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER), b) FD4 permeabilitás. Átlag $\pm$ SD, $n = 3$, * $p < 0,05$. WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

Az ellenállás minden csoportnál folyamatosan emelkedett a kísérlet végéig (15. a) ábra). A kontroll csoportban a TEER a 11. napon elérte az $50 \Omega \text{ cm}^2$ értéket, ez magasabb az előző két elrendezés eredményénél (12. és 14. ábra). A legmagasabb ellenállást a PD csoportnál mértük a kísérlet 11. napján ($55 \Omega \text{ cm}^2$). A kontroll vér-agy gát modellben az FD4 permeabilitás $0,6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ volt (15. ábra b), ami 40%-a a másik két elrendezésben mért P_e értékeknek (12. és 14. ábra), ami szorosabb gátműködést jelez. Az organoidot nem tartalmazó csoporthoz képest a PD csoportnál még kisebb volt a permeabilitási együttható ($0,4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$).

4.2.4. A megfelelő médium arány kiválasztása

Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az endotélsejt és az organoid érést segítő tápfolyadékok aránya (ezzel a növekedési faktorok mennyisége) hogyan befolyásolja a vér-agy gát-organoid ko-kultúra gát funkcióit (16. ábra).



16. ábra. Tápfolyadék arányok (1:1 és 1:5) hatása a vér-agy gát modell gát funkcióira organoidok jelenlétében. 1:1 = 50% organoid érést segítő tápfolyadék, 50% endotélsejt tápfolyadék; 1:5 = 16,67% organoid érést segítő tápfolyadék, 83,33% endotélsejt tápfolyadék. a) 1:1 arányú tápfolyadékban tartott modell transzendenteliális elektromos ellenállása (TEER), b) 1:1 arányú tápfolyadékban tartott modell FD4 permeabilitása. c) 1:5 arányú tápfolyadékban tartott modell transzendenteliális elektromos ellenállása (TEER), d) 1:5 arányú tápfolyadékban tartott modell FD4 permeabilitása. Átlag $\pm$ SD, $n = 3-4$, * $p < 0,05$. WT: egészséges sejtekből származó organoid; PD: Parkinson-kóros sejtekből származó organoid.

A korábban leírt optimalizálási kísérleteinkben (12.-15. ábra) az endotélsejt tápfolyadék és organoid érést segítő tápfolyadék 1:1 arányát (50% organoid érést segítő tápfolyadék, 50% endotélsejt tápfolyadék) alkalmaztuk. Ebben a kísérletben a tápfolyadékok 1:1 és 1:5 arányú keverékét hasonlítottuk össze úgy, hogy az organoidokat 6 napos vér-agy gát modellel tenyésztettük együtt (16. ábra).

Nem volt megfigyelhető különbség az organoidot nem tartalmazó (kontroll) és a tartalmazó (WT, PD) csoportok között a vér-agy gát paraméterekben egyik kezelési csoportban sem. Az abluminális folyadéktérben 1:1 arányú tápfolyadékban tartott vér-agy gát modell a kontroll csoportban eredményezte a legmagasabb ellenállást (16. a) ábra, 9. nap, $38 \Omega \text{ cm}^2$), ez magasabb volt, mint az 1:5 arányú tápfolyadékban tartott modell kontroll csoportjának ellenállás értéke (16. c) ábra, 9. nap, $28 \Omega \text{ cm}^2$). Ezzel összhangban az 1:1 tápfolyadék arány alacsonyabb permeabilitási értékeket eredményezett (16. b) ábra, 11. nap, kontroll csoport: $0,9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$), mint az 1:5 arányú tápfolyadék összetétel (16. d) ábra, 11. nap, kontroll csoport: $1,4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$).

5. Megbeszélés

Az elmúlt tíz évben az őssejtekből származtatott, különböző szerveket és szervrendszereket modellező önrendeződő sejtcsoportosulások, szferoidok és organoidok jelentősége megnőtt. Legyen szó kórfolyamatok modellezéséről, toxicitási és hatóanyag vizsgálatokról, vagy egyéb sejt-sejt interakció tanulmányozásáról, az agyi organoidok szerepe a gyógyszerkutatásban is egyre fontosabb (Choudhury és mtsai., 2020). Az agyi erekkel kapcsolatos betegségek tanulmányozásában és gyógyszerátjutási kísérletekben pedig a vér-agy gát sejtenyészeti modellezése kulcsfontosságú (Helms és mtsai., 2016). Célunk az volt, hogy létrehozzunk egy modellrendszert, ami ezt a két nagyon fontos *in vitro* technológiát ötvözi, és amely lehetővé teszi a korábbinál összetettebb vizsgálatok végrehajtását. Munkánk során létrehoztunk egy ko-kultúra modellt, amiben a vér-agy gátat alkotó humán agyi endotélsejtek és periciták középagyi organoidokkal vannak egy folyadéktérben tenyésztve. Optimalizáltuk az új rendszer tenyésztési körülményeit és meghatároztuk a legkedvezőbb médium-összetételeket, a tenyésztés hosszát és a sejtszám-arányokat. Ez a kutatásunk a 3R elveinek is megfelel, mivel állatból származó primer sejtenyészeteket helyett humán őssejt alapú technológia felhasználásával kombináltuk a sejtenyészeti vér-agy gát modellezést és az iPSC eredetű agyi organoidokkal történő munkát.

Kísérleteink során köldökszinór vérből nyert hemopoetikus őssejtekből differenciáltatott humán endotélsejteket használtunk. Vér-agy gát modellünkben ezeknek a

vaszkuláris endotélsejteknek agyi pericitákkal történő együtt tenyésztése segítette az agyi endotélsejtekre jellemző tulajdonságok kialakulását (Cecchelli és mtsai., 2014; Santa-Maria és mtsai., 2021). Ezeknek az agyi endotélsejt-rétegeknek a rezisztenciája alacsonyabb, permeabilitása pedig magasabb, mint egy más fajta iPSC technológiával létrehozott humán vér-agy gát modell sejtrétegének (Lippmann és mtsai., 2012; Helms és mtsai., 2016). Ennek ellenére vizsgálatainkban megbízhatóbbnak tartottuk a Cecchelli és mtsai. által létrehozott humán összejtes vér-agy gát modellt, mivel a humán iPSC rendszerek esetén vitatott, hogy a (az általában egy lépéses) differenciálódás végére a sejtek megőrzik-e endotélsejt tulajdonságaikat. Felmerült több esetben, hogy az extrém magas ($>5000 \Omega$) rezisztencia inkább neuroepiteliális jelleg, amelyet a sejtek jellegzetes utcaő morfológiája és számos epitélre jellemző tulajdonság is alátámaszt (Lu és mtsai., 2021; Lippmann és mtsai., 2020).

Az új típusú organoid modellek esetén is felléphetnek kísérleti problémák, mint például a sejtsomó közepén megjelenő nekrotikus mag, valamint nagy lehet a különbség a különböző betegekből vagy egészséges donorokból származó sejtekből létrehozott organoidok között (Nickels és mtsai., 2020). Ezek miatt volt szükséges, hogy a luxemburgi kutatócsoport optimalizálja az organoidok létrehozását, hogy azok megtartsák a középagy fejlődésének kulcsfontosságú lépéseit és jellemzőit, mint például a dopaminerg neuronok és az asztrogliák differenciálódását (Nickels és mtsai., 2020). Az általunk használt középagy organoidokat egy soklépcsős eljárással tökéletesítették (Nickels és mtsai., 2020). Először megállapították a megfelelő kezdeti sejtszámot, majd a fenntartás és differenciáció folyamatait állították be (3. ábra). Az így kapott agyi organoidok közepén az elhalt rész (nekrotikus mag) elhanyagolható nagyságú volt, jobb lett a sejtek életképessége, és nagyobb mennyiségben voltak jelen asztroglia sejtek. A laboratóriumunkban fenntartott középagy organoidok β -III tubulin immunfestése (8. ábra) hasonló mintázatot mutatott, mint az együttműködő partnerünk által készített festés (Nickels és mtsai., 2020). Az agyi organoidok mérete is azonos volt, valamint az általunk fenntartott organoidok esetében is megjelentek az idegsejt nyúlványok a Matrigel cseppbe ágyazást követően (9. ábra). Partnereink Western blot módszerrel megvizsgálták az organoidokban található idegsejtek dopaminerg funkcióját, és megállapították, hogy az agyi endotélsejtek tenyésztéséhez szükséges médium (1:1, 1:3, 1:5 arányban), és a ko-kultúrában tartás nem változtatta meg a neuronok tirozin-hidroxiláz aktivitását.

Eredményeink azt mutatták, hogy ha 5 WT organoidot helyeztünk a vér-agy gát modellt tartalmazó tenyésztőbetét alá (1:1 tápfolyadék aránynál), akkor jobb lett az endotélsejtréteg gátműködése (11. ábra). A modell alkalmas lehet a későbbiekben iPSC eredetű organoidok vér-agy gát hatásának vizsgálatára is. Ehhez azonban jelentősen növelni kellene az organoidok

számát a vér-agy gát modell sejtjeinek arányához képest, hiszen jól ismert, hogy a vér-agy gátat alkotó agyi hajszálerek összömege az agyszövetnek mindössze 0,1%-a (Harik, 1992). Ennek a sejtaránynak a beállítása a jelenlegi technikai körülmények között nem lehetséges, azonban további terveink között szerepel az organoid szám növelése a modellben.

Az együtt tenyésztés idejének optimalizálása során azt állapítottuk meg, hogy az organoidok jelenléte nem befolyásolta a vér-agy gát modell kialakulását (két- és négynapos modellek, 12. és 14. ábra), illetve a kísérlet 11 napjáig (5 nap együtt tenyésztés) jelentősen nem változtatta meg a már kialakult barrier szorosságát (hatnapos modellek, 15. és 16. ábra).

Az organoid érést segítő tápfolyadék (100%) csökkentette az agyi endotélsejtrétegek impedanciáját, ami a sejtközi kapcsolatok gyengülését jelezheti (10. ábra). Ebben a tápfolyadékban egyaránt megtalálhatóak a vér-agy gát modellek szorosságát csökkentő (TGF- β út vonal aktivátorok) és növelő (BDNF, GDNF, cAMP analóg) kismolekulák és fehérjék (Deli és mtsai., 2005; Watanabe és mtsai., 2021). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy ezeknek a hatásoknak az eredője a hígítatlan tápfolyadék esetében a gátműködés csökkenése, míg alacsonyabb (1:1, 1:3) arányoknál a növekedési faktorok hatása érvényesülhet. Ezt a hatást megvizsgáltuk a vér-agy gát-organoid ko-kultúra modellen is. Megfigyeléseink alapján arra következtetünk, hogy az 1:1 arányban alkalmazott organoid érést segítő tápfolyadék hatására a vér-agy gát modellen nő az ellenállás és csökken a permeabilitás (16. ábra), ez azonban az organoid érést segítő tápfolyadék növekedési faktorainak hatására történhet. Adataink alapján az 1:5 médium arány megfelelőbb, mivel összetétele fiziológias szempontból valósabb a vér-agy gát számára, ugyanakkor a permeabilitás értékek az $1-1,5 \times 10^{-6}$ cm/s sávban találhatóak, ami kellően szoros réteget jelent és korábbi adatainknak (Petrovski és mtsai., 2022) és a szakirodalmi értékeknek is megfelel (Santa-Maria és mtsai., 2022).

Célunk egy olyan modell kialakítása volt, ami alkalmas nanohordozók, vagy terápiás molekulák vizsgálatára egyidejű vér-agy gát és organoid penetrációs mérésekkel. Az általunk létrehozott humán vér-agy gát-organoid ko-kultúra modellt sikerrel alkalmaztuk célzott nanorészecske átjutási kísérletekben (Veszeka és mtsai., 2021). A csoportunk legfrissebb kutatásaiban igazoltuk kettősen célzott polipeptid nanohordozók átjutását a vér-agy gát modellen és ezt követő bejutását középagyi organoidokba (Mészáros és mtsai., 2022). További terveink között szerepel hatóanyag tartalmú nanorészecskék vizsgálata a létrehozott új modellrendszeren.

Az elmúlt 12 évben a kutatócsoport aktívan vizsgálja a biológiai gátak *in vitro* modelljeit mikroelektronikai és mikrofluidikai chip-eszközökkel. Az SZBK Biofizikai Intézet Biomolekuláris Elektronika Kutatócsoportjával közösen a munkacsoport korábban kifejlesztett

egy sokoldalú, biológiai gátak vizsgálatára alkalmas integrált chip-eszközt (Walter és mtsai., 2016). A sejtenyésztő betéteken létrehozott modellekhez képest a lab-on-a-chip eszközben a véráramlás valósághű modellezésével, nyírófeszültség létrehozásával az endotélsejt-rétegen még erősebb gát működést értünk el, és a vér-agy gát tulajdonságok fokozódását (Santa-Maria és mtsai., 2021). További célunk a komplex modellrendszer vizsgálata a chip-eszköznek egy organoidok befogadására alkalmas új változatában.

6. Összefoglalás

Munkánk során sikerrel hoztunk létre egy humán sejteken alapuló, *in vitro* vér-agy gát és közepagi organoid ko-kultúra modellt. Optimalizáltuk az organoidok fenntartását laborkörülményeink között, a vér-agy gát modell és az organoidok tenyésztéséhez szükséges tápfolyadékok arányát, a megfelelő agyi endotélsejt – organoid arányt és az együtt tenyésztés időzítését is. Transzendoteliális elektromos ellenállás méréssel és permeabilitási vizsgálatokkal megvizsgáltuk, hogy az organoidok jelenléte nem befolyásolja a vér-agy gát modell agyi endotélsejtjeinek barrier integritását. Az agyi endotélsejtek sejtközi kapcsolatai szabályosak és épek maradtak a modellben. Kísérleteinkkel sikeresen optimalizáltuk a humán vér-agy gát modell és a közepagi organoidok együttes tenyésztési körülményeit. Az új ko-kultúra modellt párhuzamos kutatásainkban sikeresen használtuk nanohordozó rendszerek átjutásának vizsgálatára. Tervünk, hogy a modellt adaptáljuk mikrofluidikai chipen történő, dinamikus körülmények közötti vizsgálatokra is. Emellett további célunk betegekből származó őssejtekből létrehozott vér-agy gát modellek és organoidok együttes vizsgálata. A kutatás hosszútávú jelentősége a preklinikai vizsgálatok komplexitásának és transzlációs potenciáljának növelése és a személyre szabott orvoslás lehetővé tétele.

Irodalomjegyzék

- Abbott NJ Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat* 2002; 200: 629–638.
- 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.
- Barna L, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V, Jós vay 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.
- Campos-Bedolla P, Walter FR, Vesz elka 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Vá radi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyés M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ*. 2018; 6:e4774.
- Harik SI. Changes in the glucose transporter of brain capillaries. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992;70 Suppl:S113-7.
- 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.
- Hülper P, Vesz elka S, Walter FR, Wolburg H, Fallier-Becker P, Piontek J, Blasig IE, Lakomek M, Kugler W, Deli MA. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2013; 169(7):1561-73.
- 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
- Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vígh L, Puskás LG, Sántha M, Deli MA. Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS*. 2015; 12:17.

- 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.
- Lu TM, Houghton S, Magdeldin T, Durán JGB, Minotti AP, Snead A, Sproul A, Nguyen DT, Xiang J, Fine HA, Rosenwaks Z, Studer L, Rafii S, Agalliu D, Redmond D, Lis R. Pluripotent stem cell-derived epithelium misidentified as brain microvascular endothelium requires ETS factors to acquire vascular fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021; 118(8):e2016950118.
- Mészáros M, Phan THM, Vigh JP, Porkoláb G, Kocsis A, Páli EK, Walter FR, Bolognin S, Schwamborn JC, Jan JS, Deli MA, Veszélka Sz. 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 2022, a kézirat beküldve a Cells folyóiratba.
- Modamio J, Saraiva C, Gomez Giro G, Nickels SL, Jarazo J, Antony P, Barbuti P, Hadler R, Jäger C, Krüger R, Glaab E, Schwamborn JC. Synaptic decline precedes dopaminergic neuronal loss in human midbrain organoids harboring a triplication of the SNCA gene *bioRxiv* 2021; 452499
- Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuellen 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, 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.
- Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Scherrmann JM, Temsamani J, Couraud PO, Deli MA, Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem.* 2005; 93(2):279-89
- Petrovszki D, Walter FR, Vigh JP, Kocsis A, Valkai S, Deli MA, Dér A. Penetration of the SARS-CoV-2 Spike Protein across the Blood-Brain Barrier, as Revealed by a Combination of a Human Cell Culture Model System and Optical Biosensing. *Biomedicines.* 2022; 10(1):188.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med.* 2020; 6;217(4):e20190062.
- 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.
- Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, Culot M, Gosselet F, Deli MA, Neuhaus W. Transport Studies Using Blood-Brain Barrier In Vitro Models: A Critical Review and Guidelines. *Handb Exp Pharmacol.* 2022; 273:187-204.
- 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.
- Veszelka S, Ágnes K, Deli MA. Tools of modelling blood–brain barrier penetrability. Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates, Bentham Science Publishers, Washington 2011: 166-188.
- Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci.* 2018; 11:166.
- 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, Gilpin TE, Herbath M, Deli MA, Sandor M, Fabry Z. A Novel In Vitro Mouse Model to Study Mycobacterium tuberculosis Dissemination Across Brain Vessels: A Combination Granuloma and Blood-Brain Barrier Mouse Model. *Curr Protoc Immunol.* 2020; 130(1):e101.
- 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.
- Watanabe D, Nakagawa S, Morofuji Y, Tóth AE, Vastag M, Aruga J, Niwa M, Deli MA. Characterization of a Primate Blood-Brain Barrier Co-Culture Model Prepared from Primary Brain Endothelial Cells, Pericytes and Astrocytes. *Pharmaceutics.* 2021; 13(9):1484.
- 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 Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet kutatóprofesszorának és tudományos munkatársának, munkám során nyújtott folyamatos támogatásukért és tanácsaikért.

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

Köszönöm a Biológiai Barrierék Kutatócsoport minden egyes tagjának, Dr. Hoyk Zsófiának, Dr. Veszélka Szilviának, Dr. Kürtiné Dr. Bocsik Alexandrának, Dr. Mészáros Máriának, Dr. Gróf Ilonának, Barna Lillának, Barabási Beátának, Porkoláb Gergőnek, Szecskó Anikónak a sok segítséget, szakmai támogatást és a kedves, baráti légkört. Valamint köszönöm Dr. Ana Raquel Pato Santa Marianak, csoportunk volt tagjának a kísérletekben nyújtott segítségét.

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

Végezetül köszönöm az SZBK Biofizika Intézet munkatársainak és vezetőjének, Dr. Zimányi Lászlónak, hogy helyet kaphattam szakdolgozóként az intézet tudományos életében.