

ПЕРИЦИТЫ КАК НЕОБХОДИМЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ЭЛЕМЕНТ В TRANSWELL-МОДЕЛИ ГЭБ *IN VITRO*

© 2023 г. А. И. Мосягина¹, *, Е. Д. Хилажева¹, А. В. Моргун¹

¹Научно-исследовательский институт молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022 Россия

*E-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 24.11.2022 г.

Цель настоящей работы заключалась в демонстрации преимуществ четырехклеточной модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro* в сравнении с традиционной трехклеточной моделью, а также влияния перицитов на фенотип эндотелиальных клеток. В работе описан способ сокультивирования первичных эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, перицитов, астроцитов и нейронов в Transwell-модели ГЭБ *in vitro*. Проведен количественный анализ между показателями трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС), а также между содержанием маркеров плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной Transwell-моделях ГЭБ. Согласно полученным данным, присутствие перицитов сопровождается более высокими показателями ТЭС и более высоким содержанием белков плотных контактов. Представленные результаты согласуются с мировой научной литературой и подтверждают гипотезу о том, что перициты выполняют не только опорную функцию для эндотелиальных клеток, но и являются важным метаболическим звеном, регулирующим барьерные функции ГЭБ. Таким образом, сокультивирование клеток нейроваскулярной единицы (НВЕ) головного мозга с перицитами необходимо для формирования у эндотелиальных клеток фенотипа, приближенного к условиям в микроокружении НВЕ *in vivo*.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, Transwell, перициты, нейроваскулярная единица, плотные контакты

DOI: 10.31857/S0041377123020050, **EDN:** LWQJAN

Нейроваскулярная единица (НВЕ) представляет собой морфофункциональную единицу гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и является совокупностью клеток, обеспечивающих взаимодействие нейронов и церебральных микрокапилляров для обеспечения энергетических потребностей головного мозга. К ключевым компонентам НВЕ относят перициты, а их дисфункция является одним из звеньев патогенеза при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера (Nortley et al., 2019) и ишемический инсульт (Yang et al., 2017), поэтому все больше исследований направлено на определение роли перицитов в функционировании НВЕ головного мозга. Так, в ряде работ было показано, что перициты выполняют не только опорную функцию, но и регулируют проницаемость, сократимость и пролиферативную активность эндотелиального слоя, ангиогенез, а также могут выполнять роль периваскулярных тканевых макрофагов (Sweeney et al., 2016).

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; НВЕ – нейроваскулярная единица; ТЭС – трансэндотелиальное электрическое сопротивление.

В настоящее время наиболее распространенными моделями ГЭБ *in vitro* являются трехклеточные Transwell-модели, однако они не отражают в должной степени клеточный состав НВЕ и характеризуются относительно низкими значениями трансэндотелиального электрического сопротивления (ТЭС) и высокой проницаемостью (Hatherell et al., 2011; Srinivasan, Kolli, 2019). Сфероидные модели ГЭБ *in vitro* (Nzou et al., 2018) и микрофлюидные системы (Shin et al., 2019) также находят широкое применение, однако хотя и обладают приближенными к микроокружению *in vivo* характеристиками, но вместе с тем являются более сложными в воспроизведении. Таким образом, несмотря на всю простоту, Transwell-модели могут предложить ряд значительных преимуществ: они просты в реализации и управлении, экономически доступны, а также позволяют использовать широкий спектр методов исследования.

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы продемонстрировать преимущества использования четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* относительно традиционной трехклеточной модели, а также показать значение перицитов в функционировании НВЕ

и формировании у эндотелиальных клеток фенотипа, наиболее близкого к условиям в микроокружении *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали первичные культуры эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, астроцитов, нейронов и перицитов, полученные из крыс линии Wistar в возрасте P4–P10 ($n = 10$).

Выделение и культивирование церебральных эндотелиоцитов. Церебральные эндотелиоциты получали согласно известному протоколу (Liu et al., 2013) с модификациями. Животных декапитировали после охлаждения на льду с последующим забором головного мозга и удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов методом роллинга на фильтровальной бумаге. Далее выделяли кору головного мозга в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), измельчали до размеров 1 мм^3 и центрифугировали в течение 3 мин при 150 g и комнатной температуре. Далее к осадку добавляли 25%-ную сыворотку FBS (HyClone, США) в PBS (ПанЭко, Россия) в двукратном объеме относительно объема осадка, тритурировали и центрифугировали гомогенат в течение 10 мин при 600 g . Нижний слой переносили в новую пробирку 15 мл и трижды повторяли этапы тритурирования и центрифугирования. Далее производили ферментативную обработку осадка в двукратном объеме 0.1%-ной коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин в условиях инкубатора (37°C , 5% CO_2), после чего осадок ресуспензировали и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Фрагменты и отдельные эндотелиальные клетки культивировали в культуральных флаконах T-75, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0.1%; Biological Industries, США), в условиях CO_2 -инкубатора с использованием культуральной среды следующего состава: DMEM (ПанЭко, Россия), 20% FBS (ПанЭко, Россия), 3 мг/мл глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 0.58 мг/мл глутамина (Sigma-Aldrich, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, США). Смену питательной среды производили каждые 3 сут.

Выделение и культивирование нейросфер. Головной мозг забирали, выделяли гиппокамп в холодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия), измельчали до размеров 1 мм^3 и переносили для осаждения в пробирку 15 мл со свежим раствором 2%-ной глюкозы (Sigma-Aldrich, США) в PBS (ПанЭко, Россия) на 1 мин. Далее удаляли супернатант, ресуспензировали осадок в 1 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США) и тритурировали до получения однородной суспензии клеток. К полученной суспензии добавляли 1 мл свежей среды. После осаждения неразделенных кусочков ткани переносили супернатант в новую пробирку и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин, после чего удаляли суперна-

тант и ресуспензировали осадок в 1 мл свежей среды. Клетки культивировали в культуральных флаконах T-75 в условиях CO_2 -инкубатора с использованием культуральной среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США). Через 24–48 ч наблюдали образование нейросфер.

Получение астроцитов и нейронов. Культуру астроцитов и нейронов получали из нейросфер путем направленной дифференцировки. Дифференцировку нейросфер в астроциты проводили в среде Astrocyte Medium (ScienCell, США): базальная среда (Basal Medium; ScienCell, США), 10% FBS (HyClone, США), 5 мл AGS (astrocyte growth supplement; ScienCell, США), раствор пенициллина и стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 Ед./мл. Через 7–9 сут культивирования в среде Astrocyte Medium наблюдали образование монослоя астроцитов. Дифференцировку нейросфер в нейроны проводили в среде Neuronal Medium (ScienCell, США): базальная среда (Basal Medium; ScienCell, США), 10% FBS (HyClone, США), 5 мл NGS (neuronal growth supplement; ScienCell, США), раствор пенициллина-стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 Ед./мл. Через 7–9 сут культивирования в среде Neuronal Medium наблюдали образование нейронов.

Выделение и культивирование перицитов. Перициты получали согласно известному протоколу (Crouch, Doetsch, 2018) с модификациями. После извлечения головного мозг помещали в чашку Петри с холодным раствором PBS (ПанЭко, Россия). Лезвием бритвы производили 4 корональных среза и далее в каждом срезе выделяли кору и вентрикулярно-субвентрикулярную зону (V-SVZ). Выделенную ткань измельчали до размера 1 мм^3 и центрифугировали при 300 g и комнатной температуре в течение 5 мин, после чего супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в 0.25 мл раствора коллагеназы и диспазы (ПанЭко, Россия) и 7.25 мл 2%-ной сыворотки FBS (HyClone, США) в PBS (ПанЭко, Россия). Ферментативную обработку осадка производили в течение 30 мин в условиях CO_2 -инкубатора, далее осадок центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, ресуспензировали содержимое пробирки в растворе для тритурации, содержащем 50 мкл ДНКазы (Invitrogen, США) и 1 мл 2%-ной сыворотки FBS (HyClone, США) в PBS (ПанЭко, Россия), и тритурировали.

После этого содержимое пробирки аккуратно добавляли поверх перколла в пробирку 15 мл , содержащую 8 мл 22%-ного перколла (GE, США). Пробирку центрифугировали при 560 g в течение 10 мин, удаляли супернатант с облаком миеллина, ресуспензировали клеточный осадок в 1 мл раствора Хенкса (HyClone, США) и центрифугировали при 300 g и комнатной температуре в течение 5 мин. Снова удаляли супернатант, осадок ресуспензировали в среде следующего состава: базальная среда (Basal Medium;

ScienCell, США), 2% FBS (HyClone, США), 5 мл PGS (Pericyte Growth Supplement; ScienCell, США), раствор пенициллина и стрептомицина (ScienCell, США) в конечной концентрации 50 Ед./мл. Клетки культивировали в культуральных флаконах в условиях CO₂-инкубатора. Через 7–9 сут наблюдали образование монослоя пероцитов.

Получение трехклеточной модели ГЭБ *in vitro*. Трехклеточную модель ГЭБ *in vitro* получали согласно изложенному ранее протоколу Хилажевой и соавторов (2015). Для оценки показателей ТЭС смесь астроцитов и нейронов в соотношении 1 : 1 помещали на дно лунок культурального 24-луночного планшета, затем устанавливали культуральные вставки (Corning-Costar, США), на которые помещали эндотелиальные клетки. Для оценки содержания молекул-маркеров во вставки помещали астроциты и нейроны, а эндотелиоциты засевали на дно лунок. Смесь клеток культивировали в среде, состоящей из DMEM с FBS, глутамином и смесью антибиотиков, в условиях CO₂-инкубатора.

Получение четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro*. Четырехклеточную модель ГЭБ *in vitro* получали согласно протоколу (Stone et al., 2019) с модификациями. Дно лунок культурального планшета и базолатеральную сторону культуральных вставок покрывали желатином (Gelatin Solution 0.1%; Biological Industries, США). Для этого в планшет с помещенными в него вставками добавляли 100 мкл желатина, после чего желатин убирали путем аспирации. Далее планшет инвертировали и на базолатеральную сторону культуральных вставок засевали первичную культуру пероцитов в объеме среды 50 мкл. Дно планшета аккуратно помещали на крышку так, чтобы не повредить нанесенный на инвертированные вставки клеточный слой, после чего планшет помещали в CO₂-инкубатор. Через 2–3 ч планшет переворачивали и культивировали пероциты последующие 48 ч в среде из DMEM с FBS, PGS и смесью антибиотиков. Через 48 ч культивирования пероцитов в планшеты засевали астроциты, нейроны и эндотелиоциты в двух модификациях: для оценки показателей ТЭС на дно лунок засевали смесь астроцитов и нейронов, а на дно вставок помещали эндотелиальные клетки; для оценки содержания молекул-маркеров во вставки помещали астроциты и нейроны, а эндотелиальные клетки засевали на дно лунок. Производили смену среды на среду DMEM с FBS, глутамином и смесью антибиотиков. Культивирование смеси клеток осуществлялось в условиях CO₂-инкубатора.

Иммуноцитохимическое определение маркеров плотных контактов эндотелиальных клеток. Регистрацию маркеров белков плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro* проводили с использованием первичных антител к ZO1 (sc-8147; Santa Cruz, США) и JAM1 (ab52647; Abcam, Великобритания). Первичные антитела разводили 1 : 300, время инкубации составля-

ло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела Alexa Fluor 488 (ab150129; Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 555 (ab150078; Abcam, Великобритания) использовали в рабочем разведении 1 : 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C. Визуализацию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Оценивали относительную интенсивность флуоресценции эндотелиоцитов, экспрессирующих целевые маркеры.

Регистрация трансэндотелиального сопротивления (ТЭС). Регистрацию ТЭС в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro* проводили через 24, 48 и 72 ч после сокультивирования клеток. ТЭС непосредственно измеряли с помощью эпителиального вольтметра EVOM2 с использованием электрода STX2 (World Precision Instruments, США).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программного обеспечения GraphPad Prism version 9.3.0 (GraphPad Software, Inc., США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Так как распределение соответствовало критериям нормальности, применяли *t*-критерий Стьюдента при сравнении в независимых выборках. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$. Результаты представлены в виде среднего значения и его ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение содержания маркеров плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro*. При сравнении уровней ZO1 и JAM1 эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro* было выявлено, что содержание белков плотных контактов статистически значимо выше в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro*, т.е. в присутствии пероцитов (рис. 1). Так, относительная интенсивность флуоресценции ZO1-иммунопозитивных эндотелиоцитов в трехклеточной модели составила 7.3 ± 2.3 , а в четырехклеточной – 12.4 ± 4.7 усл. ед. Относительная интенсивность флуоресценции JAM1-иммунопозитивных эндотелиоцитов в трехклеточной модели составила 1.3 ± 0.3 , а в четырехклеточной – 3.5 ± 1.3 усл. ед. (рис. 2).

Сравнение ТЭС в трех- и четырехклеточной моделях ГЭБ *in vitro*. Во всех временных точках зарегистрированные показатели ТЭС в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* были статистически значимо выше показателей ТЭС в модели ГЭБ без пероцитов и через 72 ч сокультивирования клеток составили 161.7 ± 5.4 и 125.7 ± 7 Ом см² соответственно (рис. 3). Кроме того, прирост значений ТЭС на сроке 72 ч сокультивирования относительно срока 24 ч составил 16% для четырехклеточной модели и 9% для трехклеточной.

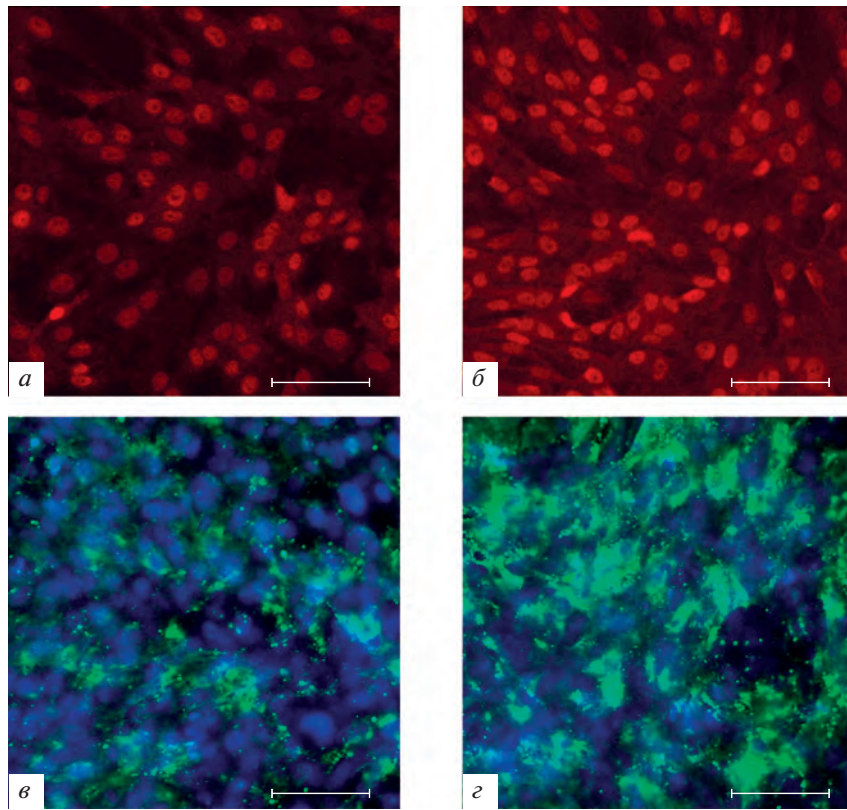


Рис. 1. Микрофотографии, демонстрирующие белки плотных контактов (JAM1 и ZO1) в эндотелиальных клетках в трех- (а, в) и четырехклеточной (б, г) Transwell-моделях гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) *in vitro*. Иммунофлуоресценция с использованием специфических антител к JAM1 (красный) и ZO1 (зеленый), голубым цветом показаны ядра клеток (краситель DAPI). Масштабная линейка: 100 мкм.

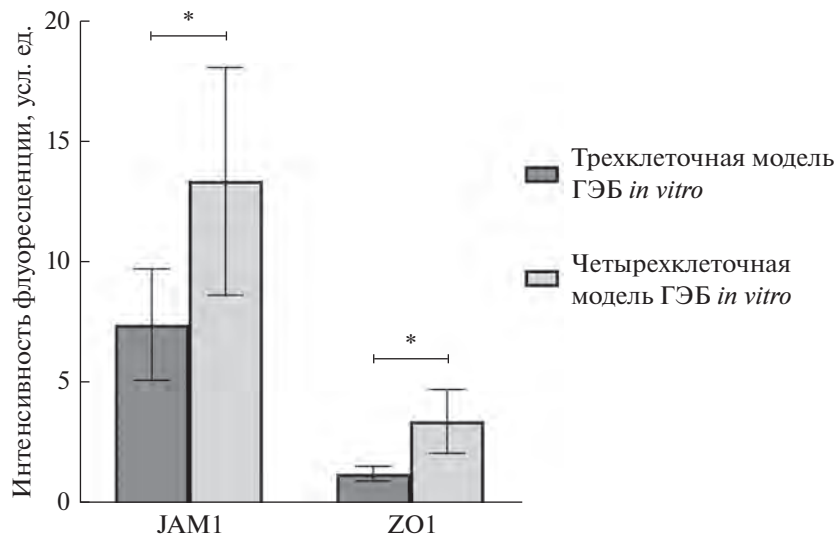


Рис. 2. Уровни белков плотных контактов эндотелиальных клеток в трех- и четырехклеточной Transwell-модели ГЭБ *in vitro*. * Различия достоверны при $p \leq 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки уровней белков плотных контактов демонстрируют, что эндотелиальные клетки в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* в результате присутствия перицитов и их влияния приобретают экспрессионный профиль, более приближенный к условиям *in vivo*, а значит, формируют более компетентный и менее проницаемый монослой.

Кроме того, опираясь на данные иммуноцитохимического анализа, можно заключить, что зарегистрированные нами более высокие значения ТЭС в четырехклеточной модели ГЭБ *in vitro* обусловлены не только наличием дополнительного слоя клеток на культуральной вставке, что логично приводило бы к более высоким показателям, но также более высокими уровнями белков плотных контактов эндотелиальных клеток.

На основании этого стоит отметить, что присутствие всех клеточных типов НВЕ/ГЭБ необходимо для формирования у них фенотипа, приближенного к реальным условиям, поскольку только во взаимодействии друг с другом у клеток формируется необходимый экспрессионный профиль. Кроме того, полученные данные подчеркивают значимую роль перицитов как метаболического звена, участвующего в сопряжении клеток ГЭБ и формировании его барьерных свойств.

Таким образом, использование перицитов делает четырехклеточную Transwell-модель ГЭБ *in vitro* более релевантной по сравнению со стандартной трехклеточной моделью. Наряду с этим, данная модель сохраняет все преимущества стандартной Transwell-модели, поскольку остается простой в реализации и управлении, дешевой и позволяет использовать все тот же широкий спектр методов исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по результатам участия в стажировках “Освоение современных методов получения и культивирования клеток и органоидов головного мозга для решения задач персонализированной неврологии и регенеративной медицины” и “Освоение современных методов иммуногистохимии, электронной микроскопии в нейроморфологии”, поддержанных Красноярским краевым фондом поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках конкурса проектов организации участия студентов, аспирантов и молодых ученых в конференциях, научных мероприятиях и стажировках (II очередь 2021 г.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными соблюдали все принципы гуманности, изложенные в Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Работа была одобрена на заседании локального этического ко-

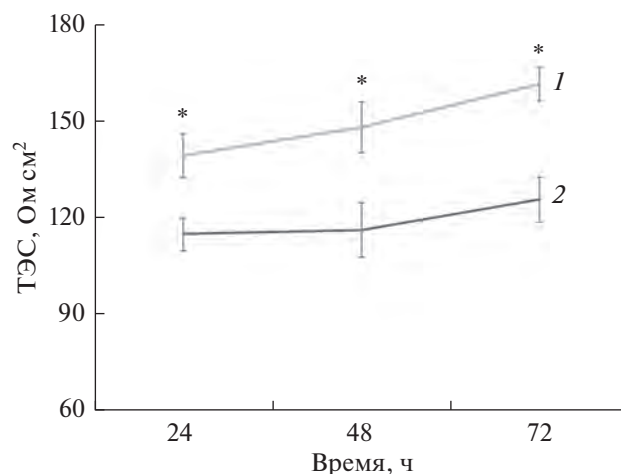


Рис. 3. Показатели трансэндотелиального сопротивления (ТЭС) в трех- (1) и четырехклеточной (2) моделях ГЭБ *in vitro*. * Различия достоверны при $p \leq 0.05$.

митета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 8 от 06.10.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хилажева Е.Д., Бойцова Е.Б., Пожиленкова Е.А., Солончук Ю.Р., Салмина А.Б. 2015. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro*. Цитология. Т. 57. № 10. С. 710. (Khilazheva E.D., Boytsova E.B., Pozhilenkova E.A., Solonchuk Yu.R., Salmina A.B. 2015. The model of neurovascular unit *in vitro* consisting of three cells types. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 57. № 10. P. 710.)
- Crouch E.E., Doetsch F. 2018. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. Nat. Protoc. V. 13. P. 738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.158>
- Hatherell K., Couraud P.-O., Romero I.A., Weksler B., Pilkington G.J. 2011. Development of a three-dimensional, all-human *in vitro* model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. J. Neurosci. Methods. V. 199. P. 223. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.05.012>
- Liu Y., Xue Q., Tang Q., Hou M., Qi H., Chen G., Chen W., Zhang J., Chen Y., Xu X. 2013. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. Microvasc. Res. V. 90. P. 199. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.00>
- Nortley R., Korte N., Izquierdo P., Hirunpattarasilp C., Mishra A., Jaunmuktane Z., Kyrargyri V., Pfeiffer T., Khennouf L., Madry C., Gong H., Richard-Loendt A., Huang W., Saito T., Saïdo T.C. et al. 2019. Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to peri-

- cytes. *Science*. V. 365. Article no. eaav9518. <https://doi.org/10.1126/science.aav9518>
- Nzou G., Wicks R.T., Wicks E.E., Seale S.A., Sane C.H., Chen A., Murphy S.V., Jackson J.D., Atala A.J. 2018. Human cortex spheroid with a functional blood brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling. *Sci. Rep.* V. 8. P. 7413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25603-5>
- Shin Y., Choi S.H., Kim E., Bylykbashi E., Kim J.A., Chung S., Kim D.Y., Kamm R.D., Tanzi R.E. 2019. blood–brain barrier dysfunction in a 3D *in vitro* model of Alzheimer’s disease. *Adv. Sci.* V. 6. P. 1900962. <https://doi.org/10.1002/advs.201900962>
- Srinivasan B., Kolli A.R. 2019. Transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) to measure the integrity of blood–brain barrier. *Neuroinformatics*. N.Y.: Humana Press. P. 142. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8946-1_6
- Stone N.L., England T.J., O’Sullivan S.E. 2019. A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Front. Cell Neurosci.* V. 13. P. 230. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00230>
- Sweeney M.D., Ayyadurai S., Zlokovic B.V. 2016. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* V. 19. P. 771. <https://doi.org/10.1038/nn.4288>
- Yang S., Jin H., Zhu Y., Wan Y., Opoku E.N., Zhu L., Hu B. 2017. Diverse functions and mechanisms of pericytes in ischemic stroke. *Curr. Neuropharmacol.* V. 15. P. 892. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170112170226>

Pericytes as an Essential Part in Transwell Models of the BBB *in Vitro*

A. I. Mosiagina^{a, *}, E. D. Khilazheva^a, and A. V. Morgun^a

^aResearch Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660022 Russia

*e-mail: angelina.mosiagina@gmail.com

In this study we aimed to demonstrate the advantages of using a quadruple culture model of the blood–brain barrier (BBB) *in vitro* in comparison with a common triple culture model, as well as to show the impact of pericytes on endothelial cells of the BBB. We co-cultured primary rat brain microvascular endothelial cells (BMECs), pericytes, astrocytes and neurons in a Transwell BBB model *in vitro*. Then, we carried out quantitative analysis to compare transendothelial electrical resistance (TEER) values, as well as expression levels of tight junction proteins, ZO1 and JAM1, in the triple culture and the quadruple culture Transwell BBB models *in vitro*. According to the obtained data, the quadruple culture model of the BBB *in vitro* has advantages over the triple culture model, since the presence of pericytes is accompanied by higher TEER values and higher expression levels of tight junction proteins in endothelial cells. The results presented in the study are consistent with the world scientific literature and confirm the hypothesis that pericytes not only offer mechanical support for endothelial cells, but also play a key role in signaling networks between different cell types of the neurovascular unit (NVU) and thus regulate the barrier functions of the BBB. According to this, co-culture of BMECs, astrocytes, and neurons with pericytes is essential for BMECs optimum phenotype and offers a closer representation of the *in vivo* environment.

Keywords: blood-brain barrier, Transwell, pericytes, neurovascular unit, tight junctions