

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Patrik Kellner

Fyziologie hematoencefalické bariéry
Physiology of the blood-brain barrier

Bakalářská práce

Vedoucí práce a Školitel: doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení autora práce

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně a uvedl veškeré použité informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného či stejného akademického titulu.

.....

V Praze, 1.1.2021
Patrik Kellner

Abstrakt

Práce se zabývá tématem hematoencefalické bariéry. Hematoencefalická bariéra je fyziologická bariéra oddělující oběhový systém od mozku, v místě jejich vzájemné konfrontace. Podstatou bariéry je udržování homeostázy a regulace transportu látek v obou směrech. Nejvýznamnější skupinou proteinů, které zprostředkovávají tento transport, jsou ABC transportéry. Alterace vlastností bariéry během patologií ale také distribuce léčiv je předmětem výzkumů. Přehled o výšše zmíněných tématech se tato práce pokusí zprostředkovat.

Klíčová slova: Hematoencefalická bariéra, Endoteliální buňky, Těsné spoje,

Abstract

This thesis takes on the theme of blood-brain barrier. Blood-brain barrier is a physiological barrier, that divides the circulatory system from brain, in place of their confrontation. Barriers main task is to maintain homeostasis and regulate the transport of substances in both directions. The most important group of proteins, responsible for transport, are the ABC transporters. Alterations of barrier properties during the pathological states, but also the distribution of medical drugs is subject of further investigations. Overview of the above mentioned themes will be mediated by this thesis.

Key words: Blood-brain barrier, Endothelial cells, Tight junctions

Obsah

1. Úvod k tématu	6
2. Struktura.....	7
2.1. Neurovaskulární jednotka.....	7
2.1.1. Mikrovaskulární endoteliální buňky	7
2.1.2. Pericyty	9
2.1.3. Astrocyty.....	9
2.1.4. Mikroglie.....	10
2.1.5. Extra celulární matrix bazální membrány	10
3. Vývoj.....	10
3.1. Vaskulogeneze	10
3.2. Angiogeneze.....	10
3.3. Tvorba bariéry	11
4. Transportní systém	12
4.1. Transcelulární transport.....	12
4.2. ABC transportéry	13
4.2.1. P-Glykoprotein.....	13
4.2.2. MRP1.....	14
4.3. SLC Transportéry.....	14
4.3.1. GLUT1	15
4.4. Aquaporíny.....	15
5. Role HEB v Patofyziologiích CNS	15
5.1. Cévní mozková příhoda	16
5.1.1. Ischemie.....	16
5.1.2. Reperfúze.....	16
5.2. Parkinsonova choroba	18
5.2.1. Parkinsonova choroba a hematoencefalická bariéra	18

6. Metody měření	19
6.1. In situ.....	19
6.2. In vivo.....	19
6.2.1. Neinvazivní metody	20
6.2.2. Invazivní metody.....	20
6.3. In vitro.....	21
6.3.1. Buněčné kultury	21
7. Závěr.....	23
Bibliografie.....	24

1. Úvod k tématu

K jedné ze základních funkcí oběhového systému patří distribuce látek do celého těla. Spektrum látek zahrnuje, jak látky pro tělo zdravé, tak látky tělu nebezpečné. Hematoencefalická bariéra vznikla na místech, kde je oběhová soustava v těsném kontaktu s centrální nervovou soustavou a jejím úkolem je, především udržování homeostázy. Brání vstupu neuropatogenním molekulám, zároveň však propouští sloučeniny, které jsou nezbytné pro výživu mozku a okolní centrální nervové soustavy.

První experimenty, které vedli k oběvení Hematoencefalické bariéry, vedl německý vědec Paul Ehrlich. Podstatou těchto experimentů bylo barvení tkání anilinovými barvivy. Po vpravení látky do těla modelového organismu, došlo k obarvení všech orgánů kromě mozku. Edwin Goldmann, Ehrlichův student, provedl podobný experiment. Injekcí barviva přímo do mozkomíšního moku došlo k obarvení jen u CNS a nikoliv u dalších orgánů. Tím byla prokázána fyziologická existence bariéry.

Hematoencefalická bariéra hraje klíčovou roli u nemocí spjatých s centrální nervovou soustavou jako je například epilepsie. Pochopení fyziologie HEB nám pomůže objasnit fungování těchto nemocí a zefektivní léčbu.

Cílem této práce je, zaměřit se na strukturu a fyziologii a shrnout možné metody získávání dat, které se uplatňují ve výzkumu onemocněních centrální nervové soustavy.

2. Struktura

2.1 Neurovaskulární jednotka

Struktura je podmíněna komponenty oběhového a nervového systému. Tyto komponenty nesou označení neurovaskulární jednotka (Neurovascular unit, NVU) a jejich vzájemné interakce jsou klíčové pro tvorbu funkční fyziologické bariéry. Jedná se především o buňky mikrovaskulárního endotelu a přilehlé pericity. Z hlediska buněk nervového systému jsou to mikroglie, astroglie, respektivně jejich výběžky, a také samotné neurony nacházející se v blízkosti bariéry. Nebuněčným komponentem je pak extracelulární matrix (ECM). Za součást neurovaskulární jednotky mohou být považovány i buňky imunitního systému z periferie (1).

2.1.1 Mikrovaskulární endoteliální buňky

Cévy jsou tvořeny endoteliálními buňkami, (Endothelial cells, EC) pokrývající jejich vnitřní stěnu, svalovinou a pojivovou tkání. Proporce těchto vrstev nejsou napříč cévami konstantní a v různých částech těla se liší. Mozkové kapiláry jsou tvořeny převážně endotelem, který neobsahuje fenestrace a tvoří mezi sebou těsné spoje (2).

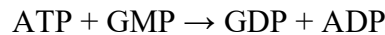
Základní stavební jednotkou těsných spojů je occludin. Occludin je 65 kDa velký fosfoprotein lokalizovaný na apikální plasmatické membráně EC. Tento protein má 4 transmembránové domény a jeho C-terminální i N-terminální konec směřuje do cytoplasmy. Occludin je prostřednictvím proteinů ZO-1 a ZO-2 na C-terminálním konci napojen na aktinový cytoskelet (3).

Dalším stavebním kamenem těsných spojů jsou proteiny z rodiny claudinů. Nejčastěji pak Claudin-1 a Claudin-5, jejichž morfologie a výskyt jsou velmi podobné occludinu a vykazují i jisté sekvenční podoby (4). Claudiny jsou fosfoproteiny o velikosti 22 kDa, které, stejně jako occludin, disponují čtyřmi transmembránovými doménami. Heteropolymery těchto dvou proteinů se podílejí na funkčnosti těsných spojů z hlediska selektivní difuze skrze fluktuální kanály, které regulují průchod malých hydrofilních molekul a různých iontů (5).

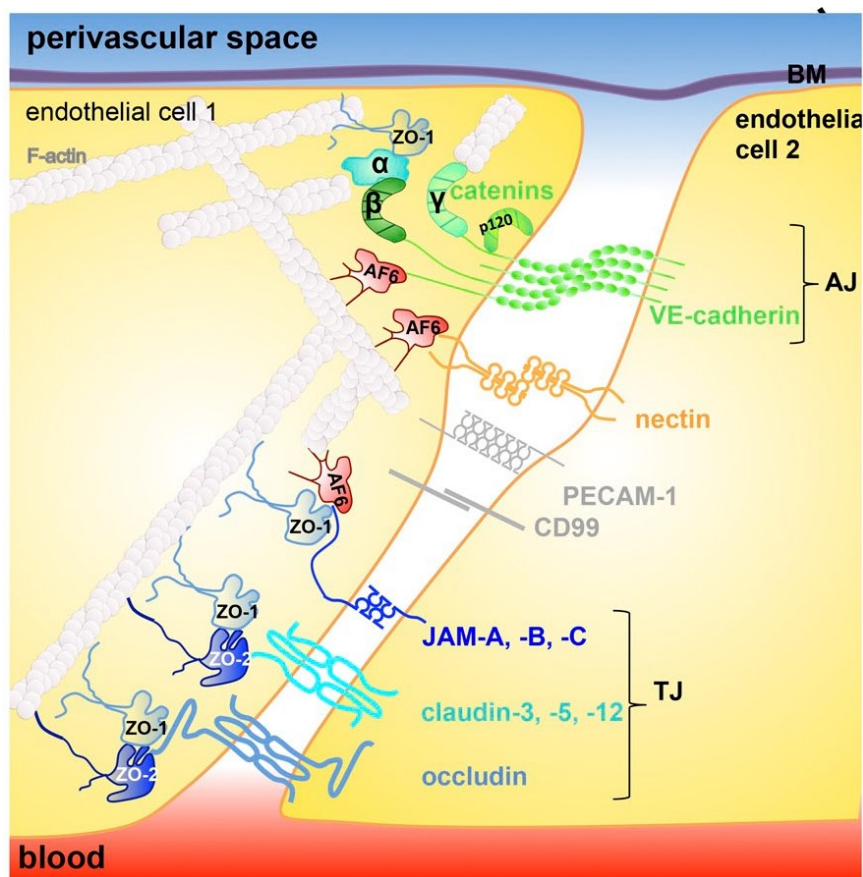
Junctional adhesion molecules (JAM) jsou třetím komponentem těsného spoje. Jedná se o proteiny z rodiny imunoglobulinů, které mají jednu transmembránovou doménu. Jejich role v HEB není zcela prozkoumána, prozatím se má za to, že hrají roli v migraci leukocytů (6).

Stejně jako occludin, tak i JAM a claudiny využívají vazby na cytoplazmatické proteiny jako již více zmíněné ZO-1 a ZO-2 ale také například ZO-3, 7H6, nebo cingulin. Úkolem těchto cytoplazmatických proteinů je především strukturalní podpora. ZO-1, ZO-2, ZO-3 patří do

skupiny membránových proteinů asociovaných s guanylát kinázou (Membrane-associated guanylate kinase, MAGuK) (7). Guanylát kináza je enzym, který katalyzuje reakci:



Jedná se tedy o fosfotransferázu. Mimo těsných spojů se v HEB uplatňují i spoje adhezní, které se nacházejí za spoji těsnými (ve směru od krve do mozku). Funkčnost těsných spojů koreluje se správnou funkcí bariéry jako takové. Má se za to, že existence adhezních spojů je zásadní pro vznik těsných spojů aktivací exprese claudinu-5. Tuto aktivaci umožňuje transkripční faktor FoxO1 (Forkhead box factor 1, FoxO1), který je fosforylován díky inhibici translokace beta-cateninu do jádra. Translokace beta-cateninu do jádra buňky je inhibována zkrze VE-cadherin (8). VE-cadherin (vascular endothelial cadherin, cadherin-5) je membránový protein z rodiny cadherinů typu II. Oba tyto typy mají pět extracelulárních domén jejichž vazebná interakce je dána vápenatými kationty. VE-cadherin je, spolu s ostatními cadheriny (např.: E-cadherinem), základním membránovým adhezním proteinem. Napojení na aktinový cytoskelet je zprostředkováno cateninovým komplexem, díky tomu jsou cadheriny klíčové pro dynamiku endoteliálních buněk (9). Cytoplasmatická doména cadherinu se váže na proteiny z rodiny cateninů, které svou funkcí připomínají cytoplasmatické proteiny asociované s těsnými spoji.



Obr. 1.: Schéma spojů mezi endoteliálními buňkami hematoencefalické bariéry (10).

2.1.2 Pericyty

Pericyty (Pericyte, PC), nebo také Rougetovi buňky, jsou perivaskulární buňky přiléhající na kapiláry. Jedná se buněčný typ z linie buněk vaskulárního jemného svalstva (vaskular smooth muscle cell, VSMC), které sdílejí společně s endotheliálními buňkami bazální membránu(11). Pericyty vyskytující se v blízkosti mozkových endotheliálních buněk mají větší míru výskytu než v případě endotelálních buněk napříč organismem. Pokrytí mozkových kapilár na modelovém organismu činí přibližně až 32%, kdežto u endotelálních buněk kosterního svalu téhož modelového organismu je pokryto zhruba 21% (12).

Funkcí vaskulárních pericytů je strukturální podpora kapilár, ale uplatňují se i při vaskulární diferenciaci. Nově vznikající angiogenické endotelální buňky mohou pomocí proteinové signální dráhy Pdgf-b/Pdgfr-beta (Platelet-derived growth factor subunit B / Platelet-derived growth factor receptor) přitahovat vyvíjející se pericyty. Tato signální dráha umožňuje společnou migraci pericytů a buněk cévního endotelu během angiogeneze (13). Adheze mezi pericyty a endotelem je zapříčena sekrecí proteinu TGF-beta (transforming growth factor) a také expresí jeho receptoru TGF-betaR2. To u pericytů vede k produkci molekul asociovaných s extracelulární matrix a u EC k pozitivní regulaci cadherinu-2 (1,14).

2.1.3 Astrocyty

Jedná se makroglie odvozené z ependymálních buněk vyvíjejících se z neurální trubice (15). Mají pro ně typický hvězdicovitý tvar, z kterého vystupuje spousta výběžků. Výběžky astrocytů (Astrocyte, AC) zcela úplně obklopují abluminální stranu mozkových kapilár a na rozhraní těchto dvou struktur dochází k membránovým specializacím (16). Při provádění pokusů s kokulturami EC a AC bylo zjištěno, že EC vyskytující se v těchto kokulturách mají větší frekvenci těsných spojů. Také bylo zjištěno, že tyto těsné spoje jsou podstatně větší respektivně delší a komplexnější než u těsných spojů sesterských kultur samostatných buněk endotelu (16).

Při dalších pokusech s trikulturou EC, PC a AC bylo zjištěno, že astrocyty napomáhají uspořádání vrstev endotelu a pericytů do trubicovité 3D struktury *in vitro*. To naznačuje, že by se astrocyty mohli podílet společně s pericyty a EC na morfogenezi a regulaci stěn kapilár při angiogenezi *in vivo* (17).

2.1.4 Mikroglie

Mikroglie jsou součástí adaptivní ale i vrozené imunitní odpovědi v centrální nervové soustavě (CNS), můžeme je považovat za stálé makrofágy CNS (18). V případě, že je CNS zdravá a netrpí žádnou patologií, jsou mikroglie v neaktivované formě. Takové mikroglie mají úzké a dlouhé výběžky vyrůstající z relativně malých těl (11). Aktivované mikroglie se vyskytují u nemocné CNS. Mění se jejich morfolgie, počínaje tloušťnutím výběžků, končeje přechodem přes amoební formu do fagocytické formy v důsledku změn exprese antigenů na povrchu glie (11).

2.1.5 Extra celulární matrix bazální membrány

Molekuly ECM, které jsou sekretovány EC, AC a PC, se podílejí na tvorbě bazální membrány (1). Jedná se hlavně o laminin, fibronectin, nidogen, glykosaminoglykany (GAGs) a kolagen IV. Na interakcích mezi matrix a buňkami ale i mezi buňkami a jinými buňkami se podílejí dva hlavní typy adhezních proteinů a jejich receptory (19).

První z výše zmíněných receptorů adhezních proteinů jsou integriny. Tyto transmembránové glykoproteiny tvoří heterodimery alfa a beta řetězců které vážou velkou škálu ligandů. Druhý typ receptorů adhezních proteínů jsou dystroglykany (20).

Vazby ligandů spouštějí aktivaci několika signálních kaskád a také různých růstových faktorů, které regulují buňčnou diferenciaci, migraci a růst během vývoje ale zároveň i při údržbě již vyvynuté HEB (1).

3. Vývoj

3.1 Vaskulogeneze

Vaskulogeneze je proces započatý během embrionální fáze organismu, během kterého dochází k diferenciaci angioblastů a vzniku primitivních cév *de novo*, které formují jednoduchou vaskulární síť (21). Prekurzorové buňky mají původ v kostní dřeni. Oba tyto buněčné typy jsou odvozeny z mezodermy jehož tvorba je započata během gastrulace (22).

3.2 Angiogeneze

Na rozdíl od vaskulogeneze vznikají cévy při angiogenezy z již existujících cév. Rozlišujeme dva typy angiogenezí. Prvním typem je takzvaná angiogeneze pučením (Sprouting

angiogenesis), která nastává již ve žloutkovém vaku a v embryu (21). Maturace endotelu *in vitro* je způsobena migrací a proliferací EC, která je navozena proteolytickou degradací ECM, za účasti angiogenetických aktivačních faktorů. Zda je tomu i *in vivo* není zcela jasné (23). Druhým typem angiogeneze je takzvaná angiogeneze vchlipováním (Splitting angiogenesis), když se existující céva rozdělí na dvě. Dochází k ní při proliferaci endotelu vně cév. Tento typ se uplatňuje především v plicích, kdežto angiogeneze pučením v mozku (21).

Průběh a zahájení procesu angiogeneze mají na starost signální bílkoviny ze skupiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF). Mezi tyto signální proteiny patří VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a placentární růstový faktor (Placental growth factor, PGF). VEGF je mitogen, který se váže na dva typy tyrosin kinázových receptorů, které se nachází na povrchu EC. Tyto receptory nesou označení VEGFR-1 a VEGFR-2 (24). Exprese VEGF je regulována koncentracemi kyslíku, jehož nedostatek má aktivační efekt (25). VEGF nese také označení VPF (Vascular permeability factor), je totiž zodpovědný za hyperpermeabilitu nově vzniklých kapilár pro cirkulující makromolekuly jako jsou například různé plazmatické proteiny (25).

3.3 Tvorba bariéry

Po vytvoření nových kapilár v CNS následuje maturace bariéry, která je podmíněná signálními drahami z mozkového parenchymu.

Jednou ze signálních drah účastnících se těchto procesů je Wnt/beta-cateninová signální dráha, jež hraje roli výhradně v CNS (26). Podstata této dráhy spočívá ve stabilizaci beta-cateninu. Cytoplazmatický beta-catenin je za normálních okolností udržován na nízkých hodnotách, to je zapříčeno systematickou degradací, kterou má na starosti komplex intracelulárních proteinů GSK3/APC/Axin (Glykogen syntáza kináza 3/Adenomatous Polyposis Coli/Axin). Po navázání Wnt proteinů na receptorový komplex Frizzled/LRP dojde k inhibici degradace a beta-catenin se začne hromadit v jádře a cytoplazmě (27). V jádře dojde k interakcím s transkripčními faktory (LEF/TCF). Jaderný beta-catenin se podílí na expresi několika genů spjatých s adhezí, morfogenezí, maturací, proliferací a spoustou dalších funkcí (26).

Další ze signálních drah podporující tvorbu a údržbu bariéry je Hedgehog signalizace. Rodina Hedgehog genů zahrnuje tři členy Desert Hedgehog (Dhh), Indian Hedgehog (Ihh) a Sonic Hedgehog (Shh). V tomto případě se uplatňuje Shh signalizace. Shh proteiny jsou sekretovány astrocyty a vážou se na PTC1/Smo komplex receptorů, který se nachází na

povrchu EC. Smo, patřící do rodiny Frizzled, je v inaktivovaném stavu, v případě že na PTC1 není navázaný ligand (Shh). Navázání Shh na PTC1 zapříčiní stabilizaci a aktivaci Smo, což umožní regulaci transkripčních faktorů Gli1, Gli2 a Gli3 (28). Nedávné studie uvádí, že Gli1 je spolu s SOX-18 (sex-determining region Y-box-18) zodpovědný za expresi Claudinu-5. Exprese Gli1 koreluje s činností Shh signální cesty. Z toho vyplývá že Shh výrazně napomáhá k udržování fyziologických vlastností bariéry (29).

4. Transportní systém

Základním systémem určeným pro transport látek jsou již zmíněné spoje mezi buňkami endotelu, které regulují paracelulární transport. Tímto způsobem však nedochází k transportu různých polárních molekul potřebných k metabolismu, jako jsou například aminokyseliny nebo glukóza (30). Proto je důležitá přítomnost polarizovaných transportních proteinů zasazených do lumenální nebo ablumenální strany membrány endotelu. Tyto přenašeče regulují transcelulární transport v obou směrech tj. jak směrem k nervové tkáni tak i směrem z nervové tkáně (30). Transport se dá dále rozdělit na pasivní a aktivní. Mezi aktivní transport lze zařadit celou řadu přenašečů, jako například ABC a SLC přenašeče. Mezi pasivní transport se považují například aquaporíny

4.1 Transcelulární transport

Mezi transcelulární přenos se dá zařadit prostá nebo usnadněná difuze, endocytóza, pinocytóza a patří tam také různé rodiny přenašečů. Transcytóza sama o sobě má také několik kategorií. Existuje adsorptivně-mediovaná transcytóza (AMT) a receptorově-mediovaná transcytóza (RMT). Aby mohlo dojít RMT musí nejdříve dojít k RME, přesněji k receptorem mediované endocytóze. Dochází tu k navázání na receptor a následnému vzniku vezikulového váčku (na lumenální straně). Váček putuje cytoplasmou až do doby kdy dojde k vylití váčku mimo buňku (exocytóza), k tomu dochází na ablumenální straně buňky. Může nastat situace, že nedojde k samotné transcytóze a váček se pošle na degradaci. Adsorptivně-mediovaná transcytóza využívá podobně jak RMT vezikuly ale je podmíněna transportem nabitě částice (kladně nabitě). To je dáno charakterem lumenální strany plasmatické membrány která nese negativní náboj (31).

Ukázkovým případem RMT je transferinový transportní systém. Receptory transferinu jsou přítomny na membráně endotelálních buněk a umožňují endocytózu transferinu do buňky. Tohoto systému se dá využít při léčbě mozkových patologií, kdy se díky chemickým

modifikacím dopravují léčiva cílená do mozkové tkáně, která by sama o sobě nevyužila plný potenciál při přechodu bariéry. Mezi již zmíněné modifikace patří například Transferin(Tf)-konjugované lipidové nanočástice (32).

4.2 ABC transportéry

ABC transportéry (ATP-binding cassette) tvoří super-rodinu transportérů, kterou dále dělíme do sedmi podskupin (A až G). V lidském genomu je 48 genů zodpovědných za expresi těchto proteinů. Funkcí většiny těchto proteinů je přenos látek zkrze biologické membrány za hydrolýzy ATP (adenosintrifosfátu) na jejich nukleotid-vázebných doménách (NBD, Nucleotide Binding Domain) (33).

ABC transportér je složen ze čtyř domén. Dvě transmembránové domény (TMD, Transmembrane Domain) a dvě nukleotid-vázebné domény. TMD domény obsahují dohromady proporciálně 12 alfa-helixů, 6 na každé z TMD. NBD jsou orientovány na cytoplazmatickou stranu membrány, mají hydrofilní charakter a jsou v nich obsaženy motivy (sekvence) nesoucí označení Walker A a Walker B (34). Specifickým motivem pro ABC transportéry je sekvence ALSGGQ také označovaná jako motiv C, který se nachází mezi motivy Walker A a Walker B (33).

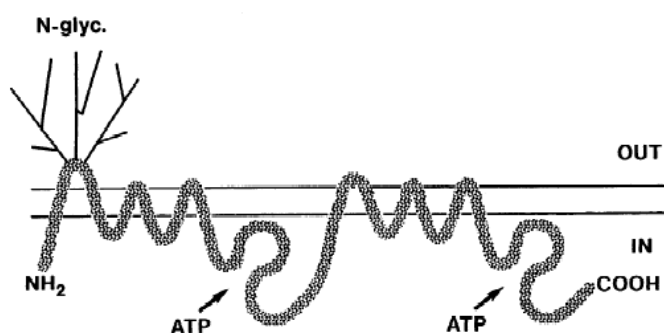
Rozlišujeme dva typy transportérů podle směru transportu. Importéry transportující látky do buňky, ty jsou však přítomné pouze u buněk prokaryotního typu. Exportéry transportující látky ven z buňky (35). Mechanismus transportu je založen na strukturních změnách konformací po navázání ATP a jeho následné hydrolýze. Důsledkem takové konformační změny je snížená vzdálenost mezi spřaženými helixy o zhruba 10-15 Å oproti stavu bez navázaného ATP. Přiblížení spřažených helixů způsobí přehození NBD z dovnitř směřující konformace na ven směřující. V tomto stavu mohou exportéry vyloučit látky ven, kdežto importéry mohou navázat své substráty. Po té co produkty hydrolýzy opustí vázebná místa dojde k opětovnému přehození na dovnitř směřující konformaci. V tomto stavu exportéry naváží nové substráty a importéry transportují své substráty do cytoplazmy (35).

4.2.1 P-Glykoprotein

P-Glykoprotein (P-gp, Pgp) je jedním z nejznámějších zástupců ABC transportérů (ABCB1). Je přítomen v buňkách tvořících HEB, kde se účastní exportu velké škály substancí ven z nervové tkáně. Jedná se o N-glykosilovaný membránový protein lokalizovaný s největší pravděpodobností na luminální membráně mozkových kapilár (36).

Pgp plní důležitou funkci v udržování homeostáze a neuroprotekcí. Tyto funkce byly demonstrovány na experimentu s generací myší (*mdr1a (-/-)*) postrádajících P-glykoprotein. Výsledkem bylo vykazování zvýšené senzitivity na neurotoxické látky, především ivermectin, který byl použit jako prostředek proti roztočům během experimentu. Ukázalo se že v mozcích uhynulých *mdr1a (-/-)* jedincích bylo naakumulováno přibližně stokrát větší množství ivermectinu než by bylo u klasických myších (36,37).

Jelikož až na výjimky je Pgp přítomno obligátně v buňkách tvořících HEB, lze usoudit, že se jedná o evoluční obraný mechanismus chránící mozek před různými potencionálně nebezpečnými látkami. Role Pgp v HEB je tedy klíčová pro funkci enzymatické bariéry (38).



Obr. 2.: Struktura a membránové uspořádání MDR1 P-gp (36).

4.2.2 MRP1

MRP1 (Multidrug Resistant Protein 1, ABCC1) je membránový protein o velikosti 190 kDa, který patří společně s Pgp do rodiny ABC transportérů (39).

MRP1 je lokalizovaný na bazolaterální straně membrány a jeho hlavní funkce je přeprava organických iontů jako je například glutathionový anion (GSH⁻). GSH funguje také jako kofaktor pro MRP1 a napomáhá tak transportu hydrofóbních proti rakovinových léčiv (40).

4.3 SLC Transportéry

Přenašeče typu SLC jsou důležitým faktorem při transportu látek, jež nejsou schopny samotné projít difuzí zkrze cytoplazmatickou membránu, která má lipofilní charakter. Transportéry tohoto typu, se vyznačují velkou specifitou. To konkrétně znamená že jsou specifické pro jednu danou látku, a svým způsobem fungují i jako regulátory. To je dáno tím, že jejich orientace na membráně může mít za následek upřednostnění transportu specifické látky pouze v jednom směru, tedy buďto ve směru z oběhové soustavy nebo naopak. Mezi látky, které využívají tento typ transportérů patří například cholin, různé organické kationy a aniony, aminokyseliny, ale také i glukóza (41).

4.3.1 GLUT1

Transport glukózy pro zajištění základních metabolických potřeb proliferujících buněk je zajišťován GLUT1 transportérem. Existují dvě formy tohoto transportéru, které jsou však kódovány stejným genem. Jedná se o GLUT1 (55 kDa) a GLUT1 (45 kDa). GLUT1 (55 kDa) se nachází v bariérách krevních tkáních, tedy i v HEB, kdežto GLUT1 (45 kDa) najdeme v mnoha různých typech buněk ale také v gliích, neuronech či v choroidním plexu (42).

Ze strukturního hlediska se jedná o transmembránový glykoprotein, který obsahuje 12 transmembránových domén a jeho C a N-terminální konce směřují oba do cytosolu. Transporter obsahuje dvě vazebná místa pro glukózu, která ovšem nemohou být zaplněna najednou. Jedno vazebné místo je přístupné z cytosolu a druhé externě mimo buňku (43). Na základě experimentů byl navržen model, který předpokládá, že glukózový transportér (v červených krvinkách) je homotetramerní a skládá se ze dvou dimerů. Tyto dimery mají antiparalelní charakter, takže když jeden dimer zaujme konformaci pro export druhý musí být v konformaci pro import a obráceně (44).

4.4 Aquaporíny

Tyto proteiny lze zařadit jako integrální membránové struktury jež mají za úkol napomáhat (v případě HEB) k udržení vodní homeostáze mozku. Výhodou oproti prosté difuzi je o něco vyšší rychlost přenosu. Z hlediska hematoencefalické bariéry a obecně i centrální nervové soustavy se nejvíce uplatňují zejména AQP-1, jež nalezneme v oblasti buněk *plexus choroideus* a AQP-4, který se nachází na koncových výběžcích astrocytů (45).

5. Role HEB v Patofyziologiích CNS

Mozek a celkově CNS podléhá jako každý jiný orgán opotřebení, ale stejně tak i různým interním a externím faktorům, které se posléze mohou manifestovat ve všelijaké patologii. Z hlediska HEB co by ochranné bariéry je velká část těchto patologií způsobena její dysfunkcí. Příkladem těchto onemocnění spojených s špatnou funkcí HEB mohou být: Epilepsie, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza, cévní mozková příhoda a celá řada dalších. V některých těchto příkladech není však možné určit, zda je disfunkce HEB příčinou či následkem ale lze říct, že tak jako tak tyto disfunkce napomáhají vývoji těchto patologií (30).

5.1 Cévní mozková příhoda

Jako jednu z příkladných ukázek patologií a jejich korelací s disfunkcí HEB si vezmeme cévní mozkovou příhodu. Ta probíhá ve dvou odlišných fázích, kterými jsou ischemie a reperfuze. Tyto fáze probíhají v čase a jsou charakterizovány procesy na buněčné a biochemické úrovni. Změny v HEB korelují s časovým průběhem těchto dvou fází (46).

5.1.1 Ischemie

Ischemická fáze cévní mozkové příhody je specifická tím že dochází k útlumu resp. ke ztrátě regionálního mozkového toku krve (regional cerebral blood flow, rCBF). Cévní sraženina (Thrombus) nebo vmetek (embolus) zapříčiní ucpání cévy a tím zvýší cévní rezistenci. K okolním tkáním se poté nedostane kyslík a ani nutrienty (obsažené v krvi), což spustí sérii událostí typických pro ischemickou fázi (46).

Dochází k vyčerpání zásob ATP, dále dochází ke zvýšení koncentrace vnitrobuněčného vápníku. Oxidativní stres, acidóza a aktivace zánětlivých procesů způsobí ztrátu metabolické funkce. V rádech minut až hodin po zahájení ischemické fáze, dojde ke vzniku otoku a tím pádem k redukci vnitřního kapilárního prostoru. To je v důsledku hromadění produktu anaerobního metabolismu, tedy kyseliny mléčné, jedná se tedy o proces laktoacidózy. Následuje degradace ECM u buněk HEB, která je zapříčiněná indukci proteáz. Právě tato indukce pravděpodobně vede ke zvýšení propustnosti TJ (46). Aby nedocházelo k úplnému poškození neuronů, dochází v ischemické oblasti ke zvýšené expresi HSP72 (47).

5.1.1.1 Ischemie z hlediska bariéry

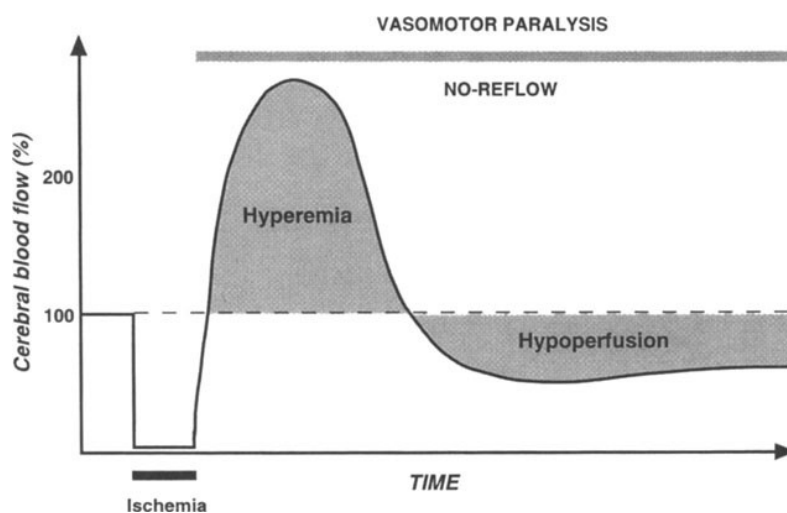
Pokusy prováděné na myších ukázaly korelaci mezi hypoxií a expresí claudinu-5. Claudin-5 byl méně exprimován v tkáních které trpěli nedostatkem kyslíku (48). Další pokus zaměřený na proteiny occludin a ZO-1 poukázal na sníženou expresi těchto proteinů v důsledku mozkové embélie (49).

Jelikož claudiny, occludiny a zonula occludens proteiny se přímo podílí na tvorbě a funkci TJ. Lze usoudit, že ischemická fáze cévní mozkové příhody má přímý vliv na správnou funkci HEB z hlediska uspořádání a funkčnosti TJ.

5.1.2 Reperfuze

Fáze reperfuze je důležitá pro následné přežití tkáně a nastává po ischemii. Je definována obnovením krevního toku do postižené oblasti. To však může představovat

problém, jelikož poškozené krevní řečiště může prasknout a způsobit krvácení do okolních tkání (z hlediska cévní mozkové příhody se jedná o krvácení do mozku) (46). Paracelulární propustnost HEB je ve fázi reperfúze rozdělena do tří fází. Počáteční propustnost spojená s nástupem reperfúze respektivně se zvýšením toku krve v řečišti, tedy jev zvaný hyperémie a následná dvoufázová propustnost oddělená refrakterní fází (50). Reperfúzovány jsou jen některé části, které podléhali ischemii. Tato neúplnost reperfúze nese v angličtině označení „No-reflow phenomenon“ a je spojena se velkou škálou ovlivňujících faktorů, jako je například zvýšený intrakraniální tlak, zvýšená vizkozita krve či doba trvání ischemie. Po prvotní hyperémii následuje postischemická hypoperfúze v důsledku metabolického vyčerpání ischemického mozku. Při tomto jevu dojde k opětovnému snížení rCBF, tedy i ke sníženému přínosu živin nutných k přežití popřípadě obnově tkáně (51).



Obr. 3.: Graf cévní mozkové příhody v závislosti rCBF na čase (51)

5.1.2.1 Vazogenní edém a TJ

Vazogenní edém (otok) nastává zhruba mezi druhým až pátým dnem po ischemii. Je způsoben disfunkcí TJ, které propouští tekutinu z intravaskulárního prostoru do prostoru extravaskulárního. To způsobí že objem mozku vzroste, což je příčinou klinického zhoršení stavu po cévní mozkové příhodě (52). Důvodem této disfunkce těsných spojů je angiogenní aktivita poškozených tkání oběhového systému, kde TJ podléhají složení a rozložení podle toho jak se nová vaskulární síť modeluje a remodeluje (46).

5.1.2.2 Angiogeneze po ischemii

Expresí genů spjatých s angiogenezí rapidně stoupá v postischemické oblasti v řádech hodin a poté dochází k jejímu útlumu v řádech dní. Pokus prováděný na modelu myši zkoumal expresi 96 genů (dále jen „K“) spojených s angiogenezí. Autor tohoto pokusu dospěl k závěru, že po jedné hodině od počátku reperfúze, došlo k zvýšení aktivity u 43,8 % z K a u 0% z K došlo ke snížení. Po jednom dni od počátku reperfúze došlo k navýšení pouze u 30,2 % a ke snížení u 2,1 %. Po třech týdnech došlo ke zvýšení jen u 13,5 %, kdežto procento u genů z K se sníženou aktivitou zůstalo stejné (53).

Dochází také k nárustu mRNA VEGF a příslušných receptorů (VEGFR-1 a VEGFR-2), stejně tak i u mRNA pro endotek-specifické receptory Tie1 a Tie2. Naopak došlo k ústupu mRNA Ang1 v řádech hodin po zahájení reperfúze a pozdějšímu nárustu po 24 hodinách. Autor použil pro tento pokus jako modelový organismus samce krysy Wistar (54). Je nutné brát v potaz, že výsledky podobných experimentů se budou lišit v závislosti na modelovém organismu. Lze však předpokládat, že i přes různé odlišnosti budou probíhat v podobné mantře.

Jak bylo již zmíněno, VEGF je také znám jako VPF a jeho výskyt koreluje s mikrovaskulární permeabilitou (25,54).

5.2 Parkinsonova choroba

Jako druhý příklad patologie korelující s disfunkcí Hematoencefalické bariéry, jsem zvolil parkinsonovu chorobu. Jedná se o onemocnění spadající do skupiny neurodegenerativních poruch. Ty jsou specifické tím, že u nich dochází k strukturním ale i funkčním poruchám neuronů, potažmo jejich odumřením. Progresivní charakter těchto chorob má za následek postupné zhoršování věkem. Mimo Parkinsonovu chorobu do této skupiny patologií patří také například Alzheimerova choroba a i roztroušená skleróza.

Sama o sobě je Parkinsonova choroba zapříčena ztrátou dopaminergních neuronů ale také přítomností Lewyho tělísek v *pars compacta substantiae nigrae*, nacházející se ve středním mozku. Obecně platí, že manifestace této choroby koreluje s vysokým věkem ovšem není to pravidlem (55).

5.2.1 Parkinsonova choroba a hematoencefalická bariéra

Ani zde nelze přesně určit zda se jedná o příčinu či následek, avšak i parkinsonova choroba je spojována s disfunkcí hematoencefalické bariéry. Konkrétně zde hraje roli již výše zmíněný P-glykoprotein. Podle studie z roku 2008, kde se pomocí pozitronové emisní

tomografie měřilo množství [¹¹C]-verapamilu v mozkové tkáni, nebyla prokázána disfunkce P-glykoproteinu u pacientů s nemocí v ranném stádiu. Ke snížení funkce proteinu však dochází, podle téže studie, až v pokročilém stádiu onemocnění (56).

Dalším předmětem výzkumu hematoencefalické bariéry v kontextu parkinsonovi choroby, bylo pozorování aktivních mikroglií v oblasti středního mozku. Aktivní mikroglie je příčinou zvyšování koncentrace protizánětlivých cytokinů. To vede ke zvýšené propustosti, jelikož vyšší koncentrace cytokinů, konkrétně TNF-alfa, IL-6 a IL-beta1, je kauzalitou pro alteraci proteinové struktury v těsných spojích. Konkrétní vliv byl pozorován v snížené aktivitě produkce proteinů zonula occludens 1 a také i u occludinů (57).

6. Metody měření

Markantní význam pro vývoj léčiv, má jejich vztah k propustnosti HEB. Respektivně jak moc jsou schopné či neschopné překonat tuto bariéru. Je nutno tedy tuto vlastnost nějakým způsobem experimentálně určit. Experimentální metody se dají rozdělit do tří skupin, *in situ*, *in vivo* a *in vitro*, tedy experimenty prováděné v místě výskytu daného fenoménu, v živém organismu a experimenty prováděné mimo například v petriho miskách.

6.1 In situ

In situ metody jsou prováděny na detekci endogenních či popřípadě exogenních molekul, které by za normálních okolností nedokázali přes bariéru proniknout a když už, tak jen velmi omezeně. Endogenní látky tohoto typu jsou například imunoglobulin G či albumin. Exogenní látky nesou označení „tracer“ a dnes jich je velká škála, nejznámější je asi evansova modř (Evans blue, Eb), která se díky své vysoké afinitě k albuminu používá na jeho detekci (58).

6.2 In vivo

In vivo metody patří mezi nejspolehlivější metody a tvoří experimentální základ pro další stupně výzkumných experimentů. Poskytují nám relevantní informace o rovnovážném stavu krevního elementu a mozku, stejně tak ale poskytují informace z hlediska kinetických vlastnostech bariéry (59). Lze uvažovat o rozdělení *in vivo* metod na základě nutnosti zasahovat přímo do organismu, z tohoto pohledu dělíme *in vivo* metody na invazivní a neinvazivní

6.2.1 Neinvazivní metody

6.2.1.1 Magnetická rezonance

Magnetická rezonance (Magnetic resonance imaging, MRA) se používá pro získání kvantitativních i kvalitativních dat, při pozorování různých patologických stavů HEB. Pro tyto účely je nutná kontrastní látka, kterou většinou bývá gadolinium diethylenetriaminpentaocetové kyseliny (Gd-DTPA) podávaný intravenózně (59). Výsledně se semikvantitativně porovnávají data vypovídající o propustnosti HEB před a po podání traceru (58).

6.2.1.2 Pozitronová Emisní Tomografie

Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography, PET) je analytická metoda zobrazování, využívající sloučenin označených radioizotopem schopným emitovat pozitron (kladně nabitý elektron, který vzniká například při přeměně protonu na elektron a je typický pro záření gama). Mezi tyto izotopy patří například ^{14}O , ^{15}O , ^{11}C nebo ^{13}N ale používají se i izotopy různých kovů a spousta dalších (60). Pro pokusy zaměřené na HEB se jako tracer používá například ^{13}N -Glutamát (58).

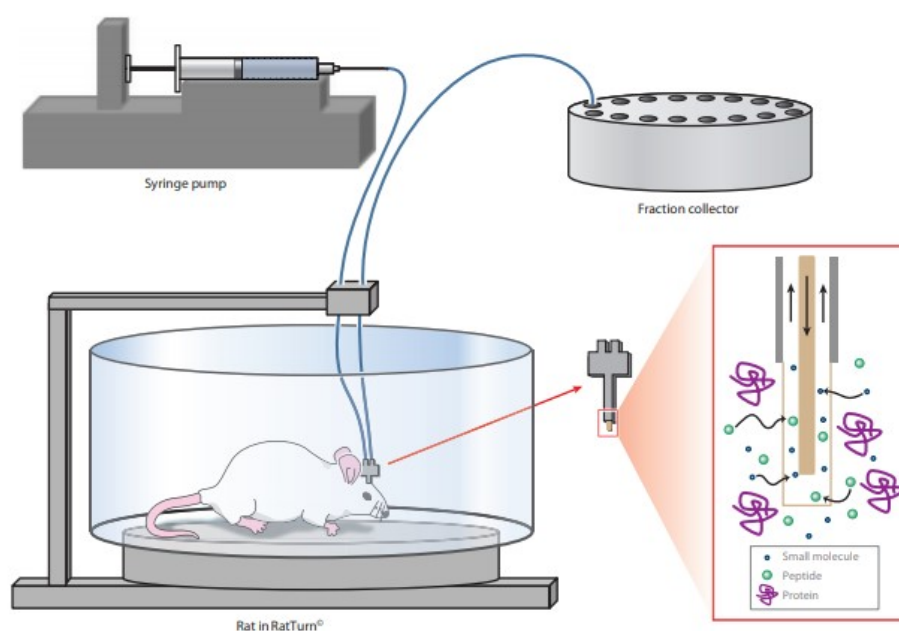
Jelikož se jedná o neinvazivní metodu, je jí možno provádět jak na zvířecích testovacích subjektech, tak i na lidech. Druhou výhodou těchto metod je, že díky svému citlivému charakteru poskytují relativně přesná data. Nevýhodou však zůstává fakt, že PET nepatří k nejlevnějším, tudíž se nevyplácí pro běžné používání (59). K tomu se přidává fakt, že radioaktivní prvky podléhají poločas rozpadu, který u některých může nabývat hodnot v řádech hodin či dokonce minut, u ^{11}C je to přibližně 20 minut a u ^{18}F se poločas rozpadu pohybuje kolem dvou hodin (61), tudíž syntéza těchto substancí musí být provedena těsně před experimentem.

6.2.2 Invazivní metody

6.2.2.1 Mikrodialýza

Mikrodialýza patří mezi starší osvědčené metody, která byla vyvinuta v sedmdesátých letech minulého století (62). Její invazivnost spočívá ve použití sondy, která je implantována přímo do tkáně. Je tedy nutné brát v potaz reálné ovlivnění tkáně onou sondou. Stejně tak jsou ovlivněná data v důsledku složení perfúzního roztoku použitého pro účely mikrodialýzi. Zároveň se musí určit poměr koncentrací mikrodialyzátu a extracelulární tekutinou mozku pro určení kvantitativních dat (31).

Sonda obsahuje semipermeabilní membránu složenou z dutých vláken (59). Sondou umístěnou v extracelulární prostoru mozku poté pomalu protéká perfuzát. Perfuzní roztok je takový roztok, který je složením a vlastnostmi velmi podobný extracelulární cerebrální tekutině. Mezi tyto vlastnosti řadíme primárně iontovou sílu (I, suma všech elektricky nabitých částic v rámci daného roztoku) (62). Látky nacházející se v extracelulárním prostoru mohou difundovat přes membránu sondy, z které jsou transportovány dál a buďto jsou akumulovány pro pozdější vyhodnocení, nebo jsou vyhodnocovány okamžitě zkrze nějaký systém (62). Touto metodou se však vyhodnocují pouze látky volné, tedy chemicky nevázané, což může představovat určitou nevýhodu (31).



Obr. 4.: Schéma mikrodialýzi (62)

6.3 In vitro

6.3.1 Buněčné kultury

Izolace buněčných kultur otevřela vědcům dveře k velké škále experimentů, které přinesly nový náhled na danou problematiku. Výhodou *in vitro* modelů je bezpochyby ztráta omezení, kterým disponují *in vivo* metody. Ovšem s rostoucí variabilitou *in vitro* technik a modelů dochází k problému spojenému s odlišností výsledných dat napříč modelovými organismy (63).

6.3.1.1 Izolace cerebrálních kapilár

Jedná se především o kapiláry ze zvířecích modelů, avšak je možné izolovat i lidské (například během pitvy). Z pravidla bývají tyto kapiláry, tvořené z EC, obalené v basální membráně s pericyty, popřípadě i s astrocyty a nervovými zakončeními (63).

Izolované kultury tohoto typu velmi dobře napodobují podmínky svého *in vivo* analogu. Mají však nevýhodu v tom, že jejich lumenální povrch je velmi těžko dostupný. Z tohoto důvodu se zkoumají na transport látek (např. léčiv) jen ve směru z ablumenální strany do lumenální strany(59).

6.3.1.2 Primární cerebrální mikrovaskulární EC

Pro tyto účely se používají vepřové a hovězí kultury (PBMEC a BBMEC) jelikož jejich zisk několikanásobně převyšuje zisk z hlodavčích modelových organismů. Takovéto kultury se používají například k experimentům a studiím, které se zaměřují na transport LDL (low density lipoprotein), endocytózu zprostředkovanou přes receptory nebo na odtok Pgp (63).

6.3.1.3 Imortalizované buněčné linie

Aby se vědci vyhnuli procesu izolace, který je relativně zdlouhavý, začli vytvářet imortalizované buněčné linie (immortal = nesmrtelný) (63). Proced imortalizace spočívá v transfekci imortalizujícího genu. Díky této alteraci lze předpokládat i změny ve vlastnostech. Například je u nich zvýšená paracelulární propustnost, nejsnou tedy moc vhodné pro studium transportu přes HEB. Naopak jsou vhodné pro histochemické metody určování molekul v intra a extracelulárním prostoru (64).

7. Závěr

Jedním z vytyčených cílů této práce bylo popsat strukturu a fyziologii hematoencefalické bariéry. To se podařilo již v úvodních kapitolách této práce, kde se bylo možno seznámit se základními složkami, které tvoří podstatu hematoencefalické bariéry. Stejně tak i s jejich vzájemnými interakcemi, jež ovlivňují a definují jejich specifické vlastnosti, a tedy i vlastnosti bariéry jako celku. Z uvedených informací vyplývá, že existenci bariéry jako takové zajišťuje správně fungující neurovaskulární jednotka, resp. její komponenty, které za normálního stavu téměř dokonale oddělují mozek od oběhového systému.

Dále bylo prokázáno na základě uvedených informací, že transport zkrze bariéru je ze své podstaty omezený a vyžaduje přítomnost speciálních proteinů, jako jsou ABC transportéry.

Dalším cílem této práce bylo uvést přehled metod využívaných ve výzkumech zabírajících se tímto fenoménem. Bylo prokázáno využití relativně velkého spektra metod jež poskytují více i méně relevantní data pro nyníjší i budoucí výzkum.

Dle mého názoru má výzkum HEB velký potenciál, zejména v oblastech farmacie a farmakologie, neboť propustnost bariéry pro léčiva je důležitým faktorem při léčbě různých nemocí. Kdybych měl navrhnout téma pro pokračování této práce, navrhl bych takové, které do hloubky prozkoumá ABC transportéry a jejich aspekty. V nich tkví velký potenciál, který může posunout vědu vpřed.

Bibliografie

1. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*. 2013;19(12):1584.
2. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*. 2005;57(2):173–185.
3. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*. 2004;16(1):1–13.
4. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *The Journal of cell biology*. 1999;147(4):891–903.
5. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(3):225.
6. Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood*. 2001;98(13):3699–3707.
7. Anderson JM, Fanning AS, Lapierre L, Van Itallie CM. Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGuKs) of the tight junction. Portland Press Limited; 1995.
8. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology*. 2008;10(8):923.
9. Vestweber D. Cadherins in tissue architecture and disease. *Journal of Molecular Medicine*. 2015;93(1):5–11.
10. Tietz S, Engelhardt B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol*. 2015;209(4):493–506.
11. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178–201.
12. Allt, G., and Lawrenson, J.G. (2001). Pericytes:... - Google Scholar.
13. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277(5323):242–245.
14. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature neuroscience*. 2011;14(11):1398.
15. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature reviews neuroscience*. 2006;7(1):41.

16. Tao-Cheng J-H, Brightman MW. Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 1988;6(1):25–37.
17. Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood–brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *The FASEB Journal*. 2002;16(10):1274–1276.
18. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature neuroscience*. 2016;19(1):20.
19. Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood–brain barrier formation and stroke. *Developmental neurobiology*. 2011;71(11):1018–1039.
20. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *cell*. 2002;110(6):673–687.
21. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *nature*. 1997;386(6626):671.
22. Goldie LC, Nix MK, Hirschi KK. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. In: *VEGF in Development*. Springer; 2008. s. 40–51.
23. Risau W. What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer and Metastasis Reviews*. 1996;15(2):149–151.
24. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669.
25. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology*. 1995;146(5):1029.
26. Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuo CJ, Barres BA. Wnt/ β -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(2):641–646.
27. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781–810.
28. Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, Tariq S, Zakaria F, Asghar MW, et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Annals of neurosciences*. 2014;21(1):28.
29. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011;334(6063):1727–1731.
30. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13–25.

31. de Lange EC. .4 Microdialysis as a method to study blood-brain barrier transport mechanisms. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 2006;16:545–572.
32. Gupta Y, Jain A, Jain SK. Transferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of quinine dihydrochloride to the brain. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(7):935–940.
33. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;204(3):216–237.
34. Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Research in microbiology*. 2001;152(3–4):205–210.
35. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural biology*. 2007;17(4):412–418.
36. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier. *Advanced drug delivery reviews*. 1999;36(2–3):179–194.
37. Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen mO, Beijnen JH, Wagenaar E, Van Deemter L, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994;77(4):491–502.
38. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64:138–153.
39. Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1999;1461(2):359–376.
40. Schinkel AH. The roles of P-glycoprotein and MRP1 in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. In: *Biological Reactive Intermediates VI*. Springer; 2001. s. 365–372.
41. Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, et al. Subcellular localization of transporters along the rat blood–brain barrier and blood–cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*. 2008;155(2):423–438.
42. Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. 1997;21(1):2–21.
43. Paul W. Hruz MMM. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Molecular membrane biology*. 2001;18(3):183–193.
44. Hamill S, Cloherty EK, Carruthers A. The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochemistry*. 1999;38(51):16974–16983.

45. Blixt J, Svensson M, Gunnarson E, Wanecek M. Aquaporins and blood–brain barrier permeability in early edema development after traumatic brain injury. *Brain research*. 2015;1611:18–28.
46. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease*. 2008;32(2):200–219.
47. Hoehn B, Ringer TM, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK, et al. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001;21(11):1303–1309.
48. Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, et al. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2007;170(4):1389–1397.
49. Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;339(4):1197–1203.
50. Preston E, Sutherland G, Finsten A. Three openings of the blood-brain barrier produced by forebrain ischemia in the rat. *Neuroscience letters*. 1993;149(1):75–78.
51. Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. In: *Cerebral ischemia*. Springer; 1999. s. 3–32.
52. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;39(1):51–70.
53. Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2003;23(2):166–180.
54. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood–brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2002;22(4):379–392.
55. Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B. Blood–brain barrier pathology in Alzheimer’s and Parkinson’s disease: implications for drug therapy. *Cell transplantation*. 2007;16(3):285–299.
56. Bartels AL, Willemsen ATM, Kortekaas R, De Jong BM, De Vries R, De Klerk O, et al. Decreased blood–brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson’s disease, PSP and MSA. *Journal of neural transmission*. 2008;115(7):1001–1009.
57. Wong D, Dorovini-Zis K, Vincent SR. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Experimental neurology*. 2004;190(2):446–455.

58. Wunder A, Schoknecht K, Stanimirovic DB, Prager O, Chassidim Y. Imaging blood–brain barrier dysfunction in animal disease models. *Epilepsia*. 2012;53:14–21.
59. Mensch J, Oyarzabal J, Mackie C, Augustijns P. In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009;98(12):4429–4468.
60. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(16):9226–9233.
61. Hammarlund-Udenaes M, Bredberg U, Fridén M. Methodologies to assess brain drug delivery in lead optimization. *Current topics in medicinal chemistry*. 2009;9(2):148–162.
62. Kuhnline Sloan CD, Nandi P, Linz TH, Aldrich JV, Audus KL, Lunte SM. Analytical and biological methods for probing the blood-brain barrier. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2012;5:505–531.
63. Reichel A, Begley DJ, Abbott NJ. An overview of in vitro techniques for blood-brain barrier studies. In: *The Blood-Brain Barrier*. Springer; 2003. s. 307–324.
64. De Boer AG, Gaillard PJ. In vitro models of the blood-brain barrier: when to use which? *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*. 2002;2(3):203–209.