

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Význam hematoencefalické bariéry pro absorpci kovů do mozku



Jana Patková

Bakalářská práce
2007

Školitel: RNDr. Maxmilián Vojtíšek, CSc., SZÚ

Interní garant : Doc. RNDr. Bohumír Štefl, CSc., Katedra fyziologie živočichů
a vývojové biologie

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze, 2.5 2007

.....

Podpis

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

ABSTRAKT

Význam hematoencefalické bariéry pro absorpci kovů do mozku

Jana Patková

Školitel : RNDr. Maxmilián Vojtíšek, CSs., SZÚ

Hematoencefalická bariéra (HEB) je rozhraní oddělující centrální nervový systém (CNS) a periferní oběhový systém. Nachází se na úrovni endotelu mozkových kapilár. Její funkcí je udržovat homeostázu v mozku, transportovat živiny do mozku a zabránit vstupu potenciálně toxických látek. Důležitou součástí je také bariéra hematolivorová, oddělující prostředí krevní plazmy a mozkomíšního moku. Je přítomná u malého procenta nervové tkáně, nicméně hraje významnou roli v transportu látek do mozku.

V mozku je běžně přítomná celá řada kovů, které působí na jeho funkci. Esenciální kovy, jako zinek, železo nebo měď, jsou nezbytné pro jeho normální vývoj a funkci a do mozku jsou transportovány specifickými transportními mechanismy. Do mozku však pronikají i kovy toxické, jako je rtuť nebo olovo, které dokážou mechanismy bariéry obejít. Nemají žádnou biologickou funkci a poškozují nervové buňky i samotné buňky bariéry. Esenciální kovy však mohou také působit toxicky a to při narušení regulačních mechanismů a zvýšení jejich koncentrace.

Narušení integrity bariéry a průnik dalších látek z krve do mozku, způsobuje narušení funkce CNS a rozvoj neurodegenerativních procesů. Pochopení mechanismů transportu kovů přes HEB a mechanismů jejich toxického účinku může být podkladem pro stanovení přesnějších limitů v prostředí a zabránění poškození mozku těmito látkami. To je obzvláště rozsáhlé u dětí, kde dochází k poruchám vývoje mozku a trvalému poškození. Umožní nám objasnit i roli některých kovů v rozvoji neurodegenerativních onemocnění.

Klíčová slova : CNS (centrální nervový systém), HEB (hematoencefalická bariéra), mozkové kapiláry, kovy, neurotoxicita, transport kovů

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

ABSTRACT

The significance of blood-brain barrier for the metal absorption into the brain

Jana Patková

Školitel : RNDr. Maxmilián Vojtíšek, CSs., SZÚ

The blood-brain barrier is the regulated interface between the peripheral circulation and the central nervous system (CNS). The anatomical substrate of the BBB is the cerebral microvascular endothelium. It functions as regulator of ion balance (maintains homeostasis of the neuronal environment), a facilitator of nutrient transport and a barrier to potentially harmful molecules. Another interface between blood and brain is the blood-cerebrospinal fluid barrier. It can be found only in a few small areas of the brain, nevertheless, it acts an important role in the drug transport to the brain.

A number of trace metals are normally present within the CNS and may have effects on its function. Several, e.g., zinc, iron and copper are essential for normal brain development and function. Others, e.g., lead and mercury, have no known essential role, but may be toxic even at low concentrations. They can bypass mechanisms of the barrier, enter the brain and damage neuronal function or they sequester in barrier and cause its breakdown. Of the essential metals, most may be toxic to the brain at high concentration, e.g., zinc, copper and manganese.

Disruption of BBB by toxic metals leads to impaired BBB function and thus compromise the CNS and cause a progress of neurodegenerative processes. Understanding of metal transport across the BBB and the mechanisms of their toxic action may be useful for determination of limits for metals in the environment and prevent damage of the brain. This may be particularly extensive in case of the children. It can help to understand the pathophysiological influence of the barrier in neurological disorders and possibly initiation of neurodegenerative diseases. Especially the role of brain barrier in metal-induced neurotoxicities.

Key words : CNS (central nervous system), Blood-brain barrier, brain capillaries, metals, neurotoxicity, metal transport

OBSAH

Prohlášení.....	1
Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Obsah.....	5
1. Úvod.....	6
2. Hematoencefalická bariéra (HEB).....	7
2.1 Historie.....	7
2.2 Morfologie hematoencefalické bariéry	7
2.2.1 Molekulární podstata HEB	9
2.3 Funkční složky bariéry	11
2.4 Mechanismy transportu látek přes HEB	12
2.5 Hematokvorní bariéra (HLB).....	13
2.5.1 Plexus choroideus	14
3. Vývojové aspekty HEB	15
3.1 Podstata vývojových změn.....	16
3.2 Citlivost nezralé HEB k chemickým látkám	16
4. Transport kovů přes HEB a jejich toxický účinek.....	17
4.1 Role kovů v CNS	17
4.2 Význam HEB pro transport kovů do mozku.....	18
4.2.1 Přímé poškození bariéry.....	18
4.2.2 Nepřímé poškození bariéry	19
4.3 Role choroidálního plexu v absorpci kovů do mozku.....	19
4.4 Chemická forma kovů.....	20
4.5 Specifický transport kovů přes HEB.....	21
4.5.1 Transport železa přes HEB	21
4.5.2 Transport rtuti přes HEB	22
4.6 Role kovů v rozvoji neurodegenerativních onemocnění.....	22
4.7 Experimentální přístup.....	23
5. Účinky a mechanismus působení vybraných kovů.....	24
5.1 Olovo (Pb).....	24
5.1.1 Role HEB v transportu Pb	25
5.1.2 Toxický účinek na CNS a HEB	25
5.1.3 Transport olova přes HEB	26
5.1.4 Závažnost účinků Pb.....	27
5.2 Mangan (Mn)	28
5.2.1 Toxicita manganu	28
5.2.2 Role HEB v transportu Mn.....	28
5.2.3 Interakce manganu se železem	29
5.2.4 Transport manganu přes HEB	29
5.2.5 Shrnutí působení Mn.....	30
6. Závěr.....	30
Seznam obrázků	31
Seznam zkratk	322
Seznam použité literatury.....	323

1. Úvod

Centrální nervový systém (CNS) je nejcitlivější a nejdůležitější systém v lidském těle. Správná funkce neuronů vyžaduje vysoce regulované extracelulární prostředí, ve kterém musí být koncentrace iontů jako Na^+ , K^+ a Ca^{2+} udržována ve velmi úzkém rozmezí. Nervová tkáň je také vysoce citlivá k celé škále chemických látek, z nichž mnoho běžně konzumujeme a ačkoliv jsou rychle metabolizovány a vylučovány, aniž by škodily periferním orgánům, mohou být ve skutečnosti neurotoxické.

Je tedy nezbytné, aby rozhraní mezi CNS a periferním oběhovým systémem plnilo funkci dynamického regulátoru iontové rovnováhy, transportéru důležitých živin a bariéry pro potenciálně toxické látky.

Všechny tyto funkce zastává a homeostázu v CNS udržuje hematoencefalická bariéra, oddělující systémový krevní oběh a mozkovou tkáň. Je tvořena specializovaným systémem endotelových buněk mozkových kapilár. Brání průniku látek do mozku, popřípadě škodlivé látky aktivně odstraňuje.

Hematoencefalická bariéra je tedy zásadní v regulaci vnitřního prostředí mozku a udržování životaschopnosti a aktivity neuronů. Narušení její integrity je kritické pro správnou funkci CNS a ovlivňuje a urychluje neurodegenerativní procesy a rozvoj neurologických onemocnění.

Některé chemické látky dokážou mechanismy bariéry obcházet a pronikají skrz ni do mozku nebo se v ní hromadí a způsobují její poškození. Narušení integrity bariéry je následováno zvýšenou absorpcí potenciálně škodlivých látek z krve do mozku a narušením funkce neuronů a gliových buněk.

Mezi látky vysoce škodlivé pro nervový systém patří právě kovy, které se akumulují v mozku i v bariéře a způsobují dlouhodobé následky. Zvláště závažná je v některých případech ireverzibilita poškození CNS (mangan).

2. Hematoencefalická bariéra (HEB)

2.1 Historie

První důkaz o existenci HEB byl popsán německým biologem Paulem Ehrlichem (1885), který zjistil, že ve vodě rozpustná barviva aplikovaná do oběhového systému krysy obarví všechny orgány kromě mozku a míchy. Ehrlich však přisuzoval tento výsledek nízké afinitě nervové tkáně k danému barvivu. Následující experimenty Ehrlichova studenta Edwina Goldmana (1909) toto tvrzení vyvrátily. Injekce trypanové modři přímo do mozkomíšního moku (mozkových komor) obarvila všechny buněčné typy v mozku, ale barvivo nepenetrovalo do periferních tkání. To byl důkaz, že existuje bariéra mezi CNS a periferním oběhem, na úrovni mozkových kapilár. Lewandowsky byl poté první, kdo použil termín hematoencefalická bariéra. (13)

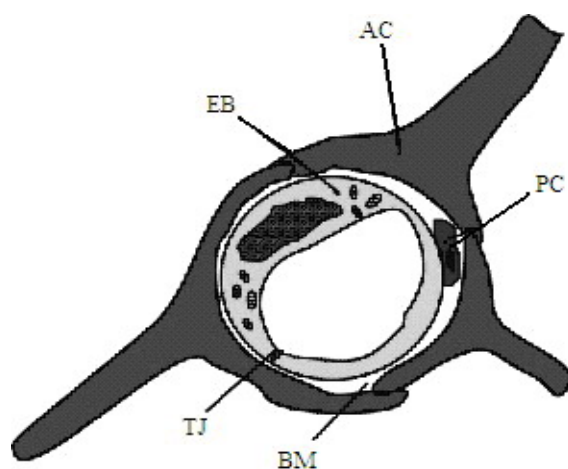
Až do roku 1967 nebylo jasné, jaký je strukturní základ bariéry. Původně se předpokládalo, že je formována gliovými buňkami obalujícími mozkové kapiláry. Použití markeru křenové peroxidasy (horseradish peroxidase HRP) a elektronové mikroskopie však potvrdilo lokalizaci HEB na úrovni endotelových buněk mozkových kapilár. Křenová peroxidasa nebyla po intravenózní injekci nalezena v extracelulárním prostoru obklopujícím mozkové kapiláry, zatímco když byla aplikována přímo do ventrikulárního systému, prošla výběžky astrocytů, obalujícími kapiláry a zadržela se na endotelové plazmatické membráně (Reese a Karnovsky, 1967; Brightman a Reese, 1969). (14)

2.2 Morfologie hematoencefalické bariéry

Ačkoliv byl koncept HEB v posledních letech vylepšen, porozumění základní struktury je postaveno na výsledcích práce Reese, Karnovského a Brightmana ke konci 60 letch.

HEB existuje primárně jako selektivní difúzní bariéra na úrovni endotelu mozkových kapilár. Je charakterizována přítomností těsných spojů (tight junction) mezi sousedními buňkami a absencí fenestrací.

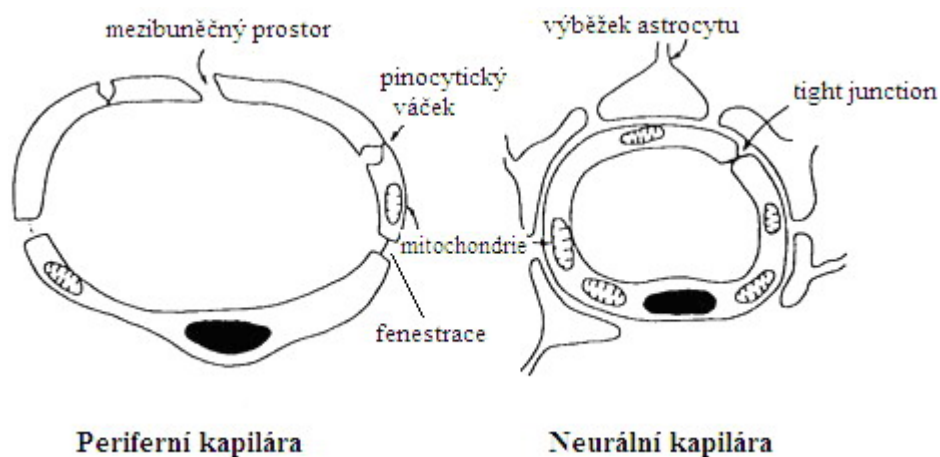
Komplexní bariéru tvoří několik buněčných typů – endotelové buňky, astrocyty, pericyty a bazální lamina. (viz. Obr. 1)



Obr. 1 : Schématický průřez mozkovou kapilárou, EB – endotelová buňka, AC – astrocyt, PC – pericyt, BM – bazální membrána, TJ – tight junction (14)

Endotelové buňky. Obvod lumen mozkové kapiláry je obklopen jedinou endotelovou buňkou. Ta je odlišná od ostatních endotelových buněk nacházejících se v periférii.

Jejími hlavními znaky jsou : zvýšený obsah mitochondrií, absence fenestrací, minimální pinocytická aktivita a v neposlední řadě přítomnost těsných spojů (tight junction). Zvýšený počet mitochondrií a tím zvýšený energetický potenciál je vyžadován pro aktivní transport živin přes HEB. Minimální pinocytická aktivita zase silně omezuje transcelulární transport. (14)



Obr. 2 : Rozdíl ve stavbě periferní a neurální kapiláry (13)

Na abluminální membráně endotelové buňky jsou nepravidelně umístěny pericyty, které jsou společně s endotelovými buňkami obaleny bazální membránou.

Pericyty hrají zřejmě roli v kontrole růstu endotelových buněk. Jsou schopné fagocytózy, čímž limitují transport látek, které překročily endotelovou bariéru.

Bazální membrána, která obklopuje endotelové buňky a pericyty je 30 až 40 nm silná, tvořená kolagenem typu IV, lamininem, fibronektinem a jinými extracelulárními proteiny. Tvoří mechanickou podporu při kontaktu buněk a může hrát roli bariéry při průchodu makromolekul.

Astrocyty. Celou cévu pak obalují koncové výběžky astrocytů, které těsně přiléhají k endotelovým buňkám (bazální membrána cévy a membrána astrocytů jsou v kontaktu) a jejich role spočívá pravděpodobně v indukci, formování a udržování tight junction mezi endotelovými buňkami a tím udržování funkce HEB. Původně se předpokládalo, že by astrocyty mohly být základem HEB. Zjištění gap junction, které jsou průchodné pro křenuvou peroxidázu, však toto tvrzení vyvrátilo. (13, 14, 15)
Základ HEB tvoří astrocyty pouze u bezobratlých. (24)

2.2.1. Molekulární podstata HEB

Intercelulární prostor mezi endotelovými buňkami je asi 20 nm široký, což u běžného endotelu umožňuje difúzi látek. U endotelu mozkových kapilár je tento prostor uzavřen dvěma typy spojů – adherens junctions (AJ) a tight junctions (TJ).

Adherens junctions netvoří přímo fyzickou bariéru. Zprostředkovávají adhezi endotelových buněk, kontaktní inhibici, iniciaci buněčné polarity apod.

Ačkoliv narušení AJ může vést ke zvýšené propustnosti, jsou to primárně TJ, které způsobují nízkou paracelulární propustnost a vysoký elektrický odpor.

Tight junctions jsou struktury, které spřahují apikální oblasti membrán endotelových buněk mozkových cév. Zabraňují paracelulárnímu transportu a rozdělují membrány endotelových buněk na dvě strany, lumenální (do krevního oběhu) a abluminální (do mozku). Na každé straně existuje populace odlišných lipidů a proteinů. (15)

Díky těmto intracelulárním strukturám může dosahovat elektrický odpor pro paracelulární transport $1500 - 2000 \Omega/\text{cm}^2$. Pro srovnání, u periferních cév dosahuje hodnot $3 - 30 \Omega/\text{cm}^2$. (14, 15)

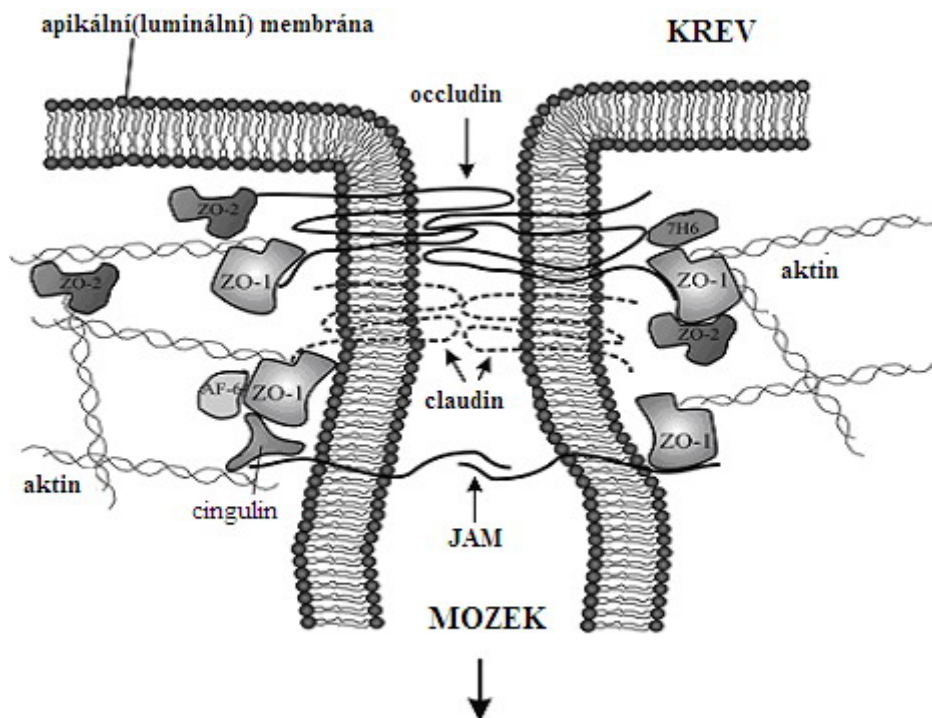
TJ jsou tvořené transmembránovými proteiny, které vytváří primární bariéru a jsou spojené s přidavnými proteiny (zonula occludens) a aktinovým cytoskeletem v buňce.

Transmembránové komponenty zahrnují

- adhezní molekuly (junctional adhesion molecule – JAM) - patří do rodiny imunoglobulinů a regulují migraci leukocytů
- occludin - regulační protein, zvyšuje elektrický odpor tkáně a jeho cytoplazmatické membrány umožňují asociaci s cytoskeletem a přidavnými proteiny (zonula occludens)
- claudin - je primární element TJ, formuje dimery a váže se homotypicky ke claudinům sousední endotelové buňky

Přidavné proteiny, které s transmembránovými asociují v cytoplazmě, jsou důležité pro strukturní podporu. Je to rodina proteinů MAGUK (membrane-associated guanylate kinase-like homolog family), které slouží ke koordinaci a shlukování proteinových komplexů k buněčné membráně. Byly identifikovány tři typy MAGUK proteinů v TJ – ZO-1, ZO-2, ZO-3 (zonula occludens).

Další přidavné proteiny TJ zahrnují cingulin, AF-6 a 7H6. Aktinová filamenta hrají strukturní a dynamickou roli v buňce. (14, 16)



Obr. 3 : Základní molekulární organizace tight junctions HEB (14)

2.3. Funkční složky bariéry

HEB je dynamická struktura a je tvořena několika složkami. První, pasivní složkou je bariéra fyzikální (difúzní). Ta je dána vlastnostmi těsných spojů mezi endotelovými buňkami, které zabraňují intercelulárnímu transportu hydrofilních látek a buňkami samotnými, které zabraňují díky nízké endocytóze paracelulárnímu transportu. (2)

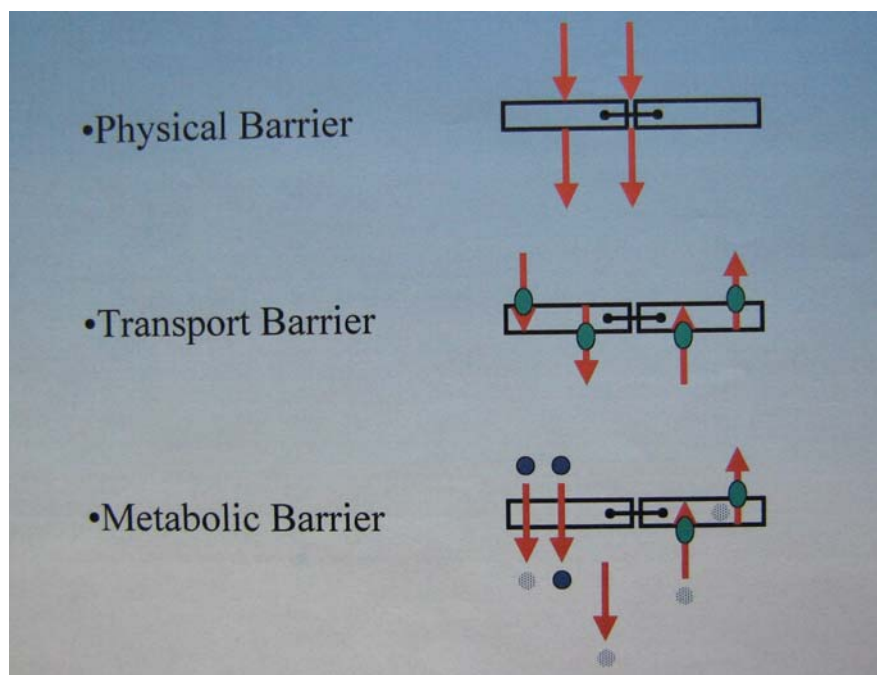
Druhou složkou je bariéra metabolická, kterou představují enzymy přítomné v endotelových buňkách, podporující ochranou a detoxifikační roli bariéry, schopné rychle metabolizovat a deaktivovat potenciálně škodlivé látky. Enzymy jako catechol *O*-methyltransferáza nebo pseudocholinesteráza jsou zahrnuty v degradaci neurotransmiterů. Hladiny enzymů jako je monoamin oxidáza a γ -glutamyltranspeptidáza jsou zvýšené v neurálních cévách, zatímco v periferních cévách úplně chybí nebo jsou exprimovány v malé míře. (13, 31)

Třetí složkou je bariéra transportní. Tvoří ji specifické transportní proteiny začleněné do plazmatické membrány. Tyto elementy chrání CNS před potenciálně toxickými látkami, ale na druhou stranu znemožňují i vstup léčiv.

V současné době je známo asi 15 multispecifických transportních proteinů, které řadíme do rodin podle molekulové a funkční specifity. (MDR-multidrug resistance protein, OCT – organic kation transporter apod.). Z těchto proteinů určených na základě detekce mRNA bylo 9 imunologicky lokalizováno v membráně endotelových buněk.

Jedním z důležitých transportérů je p-glykoprotein (Pgp). Je to protein patřící do rodiny ATP-vázajících transportérů. Pracuje s velkým množstvím substrátů. Díky jeho lokalizaci, potenciálu a široké specifitě je jedním z klíčových faktorů vstupu xenobiotik do CNS. Je lokalizován na lumenální membráně mozkových cév a to mu umožňuje být bariérou vstupu a zároveň exportní pumpou látek. Je hojně studován zejména kvůli možnosti porozumění vstupu léčivých látek do mozku. (2)

V abluminální membráně je ve velkém množství obsažen enzym Na, K-ATPáza. Tvoří pumpu, která současně transportuje Na^+ z endotelu do mozku a K^+ z mozku do endotelu. K^+ má významný efekt na přenos nervových impulsů a aktivaci neuronů. Asymetrická distribuce této ATPázy se podílí na udržování nízké koncentrace K^+ v extracelulární tekutině v mozku a tím správné funkci neuronů. (28)



Obr.4 : Jednotlivé složky hematoencefalické bariéry : bariéra fyzická, transportní a metabolická
Použito s vědomím autora : David. S. Begley

2.4 Mechanismy transportu látek přes HEB

Jak již bylo uvedeno, hlavní fyziologický význam HEB je udržovat konstantní prostředí v mozku. Díky lipofilní povaze bariéry hydrofilní substance jako sodík, hydrogen, bikarbonát a jiné ionty nemohou bariérou projít.

Výjimkou jsou však metabolicky důležité látky jako glukóza, laktát nebo aminokyseliny. Ty jsou do mozku aktivně transportovány pomocí specifických transportních systémů. Pro transport glukózy, manózy a galaktózy slouží glukózový přenašeč (GLUT-1). Je exprimován asymetricky v poměru 3:1 v abluminální a luminální membráně. Dále jsou známe tři vysoce afinitní transportní systémy pro aminokyseliny, konkrétně pro velké neutrální, bazické a kyselé aminokyseliny. Byly identifikovány také transportéry pro purin, nukleotidy, thyroidní hormony a další.

Difúze přes HEB závisí na fyzicko-chemických vlastnostech látek jako je rozpustnost v tucích, molekulová hmotnost, elektrický náboj a stupeň ionizace.

Lipofilní látky prochází bariérou snadno. Patří mezi ně plyny, jako O₂, CO₂, NO. Obecně řečeno, čím lipofilnější látka je, tím snadněji difunduje do mozkové tkáně.

Důležitou cestou vstupu látek do mozku je i receptorem zprostředkovaná endocytóza. Je to vysoce specifický typ aktivního transportu. Tímto způsobem prochází HEB např. Fe-transferin vazbou na transferinový receptor (Tfr) a některé hormony jako insulin a leptin.

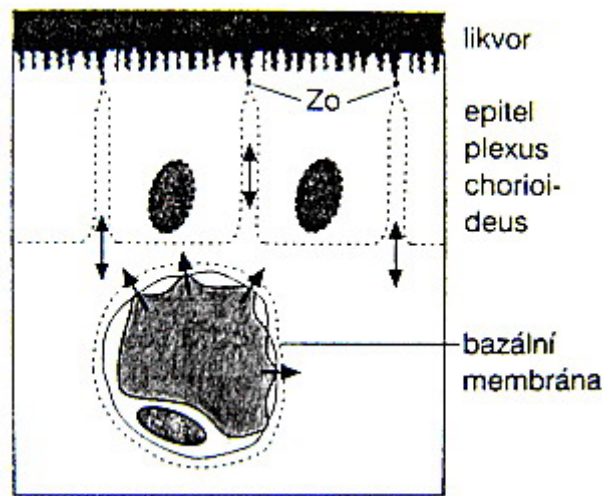
Aktivním transportem jsou také vylučovány látky z CNS. Jsou to mnohá léčiva, xenobiotika a endogenní, ale neurotoxické metabolity a odpadní produkty. Významným zástupcem je již zmíněný p-glykoprotein. (16, 22)

2.5 Hematolivorová bariéra (HLB)

HEB je přítomná u 99% neurálních kapilár, ale existují oblasti mozku, kde se místo ní nachází bariéra hematolivorová. Ta je přítomná u tzv. cirkumventrikulárních orgánů (CVO), což jsou malé struktury ohraničující prostor 3. a 4. mozkové komory. Patří mezi ně : plexus choroideus, subfornikální orgán, area postrema a eminentia mediana, organum vasculosum laminy terminalis, subkomisurální orgán, epifýza a některé části hypofýzy. HLB není tak striktní jako HEB, ale také zabraňuje vstupu látek z krve do mozku. (13)

CVO mají specifické morfologické charakteristiky, které je odlišují od zbytku nervové soustavy. Kapiláry mají endotel s okénky a jejich stěny jsou mimořádně dobře propustné oběma směry. Naproti tomu ependym na těchto místech má těsné spoje. Hranice mezi likvorem a prostředím krevní plazmy zde tedy leží na povrchu výstelky. Přejít mezi CVO a okolní mozkovou tkání se vyznačuje náhlým přechodem ve stavbě kapilár (s okénky → nepropustné) a prudkým přechodem v utváření výstelky (nepropustný → propustný ependym). Mezi oběma typy mozkových oblastí existuje úzká „šedá zóna“, kde se prostředí krevní plazmy a likvoru překrývají.(18)

Mezi unikátní znaky CVO patří kontakt se dvěma významnými fázemi - krví a mozkomíšním mokem. Jsou to cílové struktury pro informace pocházející z krve a směřující do mozku. Fungují tedy jako přenašeče neurální a chemické informace mezi mozkem, mozkomíšním mokem a krví. (17)



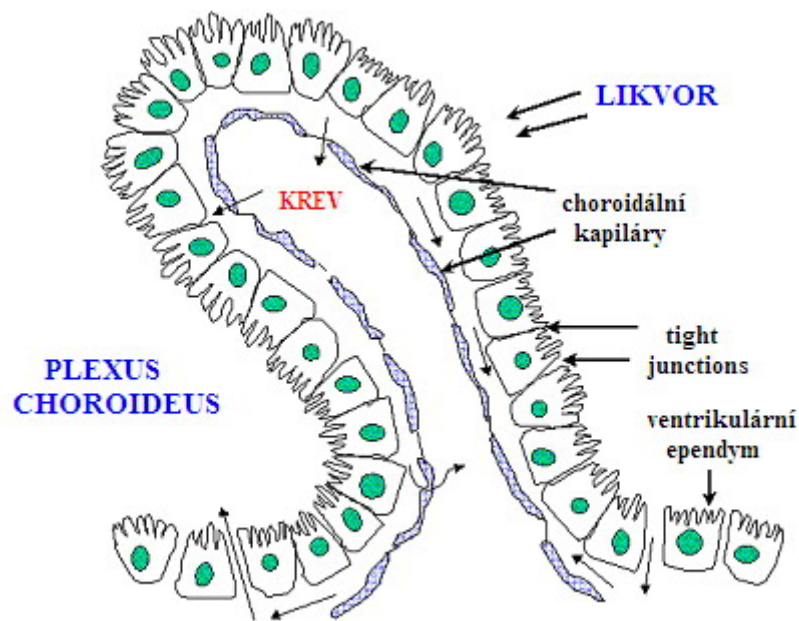
Obr. 5 : Hematolikvorová bariéra, Zo – zonula occludens (18)

2.5.1 Plexus choroideus

Významnou roli mezi CVO hraje plexus choroideus, který je díky své pozici a vlastnostem cílem mnoha toxických organických i anorganických látek

Plexus choroideus se vyznačuje několika specifickými anatomickými a fyziologickými znaky:

1. Přestože co do velikosti je to orgán poměrně malý (u většiny obratlovců méně než 5% váhy mozku) jeho povrchová plocha je ve srovnání s velikostí obrovská. Kromě primárních mikrovilů, je veškerý plexus choroideus ještě zprohýbán a tvoří sekundární makrovili, které mnohonásobně zvětšují povrch této tkáně. Velká plocha této bariéry umožňuje účinnou výměnu látek mezi mozkomíšním mokem a krví. Zvyšuje tedy i možnost absorpce toxických látek.
2. Tok krve v choroidálním plexu byl zjištěn 3–5krát rychlejší než v ostatních částech mozku, což je pravděpodobně díky jeho fyziologické roli - sekrece mozkomíšního moku a doprava substancí do cerebrálního kompartmentu. Rychlý tok krve, na druhou stranu, zajišťuje účinný přítok potenciálně toxických látek do mozkomíšního moku.
3. Tight junctions mezi epitelovými buňkami nejsou tak pevné jako u endotelu mozkových cév. To znamená, že jsou přístupnější pro vstup xenobiotik do cerebrálního kompartmentu.
4. Unikátní lokalizace mezi mozkovými komorami (29)



Obr 6 : Plexus choroidues, choroidální kapiláry a ventrikulární ependym (31)

3. Vývojové aspekty HEB

HEB ve vyvíjejícím se mozku je méně efektivní než ve zralém, nicméně je poměrně dobře formovaná již na počátku vývoje. Formuje se pravděpodobně jakmile cévy poprvé penetrují do mozku (hematoencefalická bariéra) a jakmile se diferencují epitelové buňky plexus choroideus (hematolikvorová bariéra). HEB je však bariéra selektivně propustná a dynamicky se měnící, její vlastnosti se tedy v průběhu vývoje postupně mění.

Základní prvkem HEB v již vyvinutém mozku, je bariéra zabráňující penetraci proteinů z krve do mozku (a do mozkomíšního moku). Ta se zdá být u fetu také dobře formovaná. Je dána přítomností tight junctions mezi sousedními endotelovými buňkami, které se objevují již na počátku vývoje, i když ne ještě kompletně vyvinuté. Přirozeně se vyskytující proteiny v plazmě neprocházejí ani nejméně vyvinutými mozkovými cévami na počátku vývoje. Ačkoliv proteinům je zabráněno ve vstupu do mozku, bariéra fetu je propustná pro malé molekuly jako je sacharóza a inulin.

Mechanismy bariéry, které závisí na buněčných přenašečích nebo enzymech se objevují později ve vývoji. Rozdílné systémy, se stávají zřetelnými na různých úrovních vývoje mozku. (5)

Přenašeči zprostředkovaný transportní mechanismus, regulující vstup glukózy, aminokyselin, purinů, nukleotidů a cholinu byl zjištěn poměrně dobře vyvinutý u novorozených králíků. Tyto studie dokazují, že důmyslná, selektivní bariéra je formovaná již při narození. (7)

3.1 Podstata vývojových změn

Buněčná a molekulární podstata těchto vývojových změn je pravděpodobně následující. Mozkové endotelové buňky mají schopnost formovat tight junctions, jakmile poprvé invadují mozkovou tkáň. Nicméně díky jejich přítomnosti jsou schopné zabránit pouze vstupu proteinů. TJ se vyvíjí velmi časně, nezískávají však okamžitě kompletní vlastnosti, striktně zabraňující propustnosti, jejich elektrický odpor je ještě poměrně nízký. Pozdější schopnost zabraňovat vstupu malých molekul závisí na dalším zrání tight junctions, které je ovlivněno sekrecí látek výběžky astrocytů, které indukují vznik HEB fenotypu. Astrocyty jsou pravděpodobně důležité i pro expresi různých specifických mechanismů endotelových buněk. (5)

Interakce astrocytů a endotelových buněk byla hojně studována, nicméně se stále nedošlo k jasným závěrům. Astrocyty jsou nezbytné pro utváření TJ endotelových buněk a udržení funkce bariéry, ale pro kompletní vývoj jsou zřejmě nutné lokální podmínky v mozku a kontakt i s dalšími buněčnými typy. (1)

3.2 Citlivost nezralé HEB k chemickým látkám

Během neonatální periody CNS roste rychle a je vysoce citlivý k toxickým účinkům chemických látek. Mohutné poškození a trvalé následky způsobují kovy jako olovo a rtuť v organické podobě (methylrtuť).

HEB není plně vyvinutá až do zhruba 6 měsíců po narození. Toxické látky se ve vyvíjejícím se mozku zadržují mnohem snadněji než ve zralém. Animální studie dokázaly, že toxický efekt chemických látek je odlišný v různých stupních vývoje. Tyto rozdíly v účinku mohou být dány rozdílnou kinetikou nebo závisí na postupném vývoji receptorů. Mozek je obzvláště náchylný, během růstového spurtu, což je perioda, ve které mozek podstupuje několik zásadních změn, jako dendritický a axonální růst, synaptogeneze, myelinizace apod. (21)

4. Transport kovů přes HEB a jejich toxický účinek

4.1 Role kovů v CNS

V CNS je běžně přítomno množství kovů, které pozitivně působí na jeho funkci.

Některé, jako např. zinek, železo, měď a mangan jsou nezbytné - esenciální pro normální vývoj a funkci mozku. Ty musí být přijímány z prostředí v adekvátním množství.

Jiné, jako např. olovo, rtuť nebo kadmium nemají žádnou esenciální roli a mohou být toxické i ve velmi nízkých koncentracích. Tyto toxické kovy většinou patří do skupiny těžkých kovů. (4)

Lidská civilizace a ji provázející zvyšující se industriální aktivita postupně přerozdělila toxické kovy ze zemské kůry do prostředí a zvýšila pravděpodobnost expozice u člověka. Z velkého množství toxických elementů, jsou těžké kovy – kadmium, olovo a rtuť, jsou obzvláště rozšířené, díky jejich industriálnímu využití. (12)

Rozmanité integrované funkce nervového systému jsou citlivým cílem pro toxické kovy. Ty mají tendenci akumulovat se v mozku a způsobovat dlouhodobé následky.

Esenciální kovy, jsou však pro mozek také potenciálně toxické a to při vysokých koncentracích, kdy mohou mozek poškozovat nebo ovlivňovat absorpci ostatních esenciálních prvků. Tak je tomu například u zinku, mědi nebo manganu.

Kovy hrající roli ve fungování CNS bych, alespoň pro potřeby této práce, rozdělila na 2 skupiny:

- (a) **kovy velké toxické významnosti** (např. Pb, Hg, Cd), které jsou rozšířené v životním prostředí a kterým jsme exponováni
- (b) **esenciální stopové kovy** (např. Mn, Se, Zn, Fe) nezbytné pro správnou funkci mozku, ale potenciálně toxické ve vysokých koncentracích

Esenciální kovy hrají důležitou roli jako katalyzátory, druzí poslové nebo regulátory genové exprese. Jsou také esenciálními kofaktory, které jsou nutné pro aktivaci a stabilitu celé řady enzymů jako je superoxid dismutáza, metalloproteáza, protein kináza a pro některé transkripční faktory. Kovy musí být dodávány do CNS na optimální úrovni, protože deficit, stejně jako nadbytek může způsobit narušení normální funkce CNS. (28)

4.2 Význam HEB pro transport kovů do mozku

Vstup kovů do mozku musí nastat z krve a zahrnuje tedy překonání hematoencefalické, popřípadě hematolymphatické bariéry.

Transport iontů kovů přes bariéru je první krok v regulaci jejich hladiny v CNS. Bariéra je relativně nepropustná k vysoce nabitým iontům kovů nebo jejich polárním komplexům. Je v ní však přítomno množství aktivních nebo receptorem zprostředkovaných transportních systémů, které slouží ke kontrole transportu kovů do mozku a udržení jejich optimální koncentrace.

Tyto systémy jsou nezbytné pro transport esenciálních kovů z krve do mozku, bohužel však slouží i pro transport kovů toxických. (4, 28)

4.2.1 Přímé poškození bariéry

HEB a HLB bariéra chrání různorodými mechanismy CNS před škodlivými látkami. Molekuly toxických kovů umí tyto mechanismy buď obejít a projít přes bariéru nebo se začleňují do buněk bariéry a mohou poškozovat je i jejich funkci. Bylo nalezeno nejméně 9 kovů, které se akumulují v HEB a HLB. Poškození endotelové struktury HEB je základní příčinou propouštění v krvi přítomných látek do okolního parenchymu nervové tkáně a vzniku neurodegenerativních procesů. (28)

Rtuť

Přímé poškození HEB způsobují např. sloučeniny rtuti, zejména organické jako je metylrtuť. Ty snadno prochází HEB a pronikají do nervové tkáně po akutní i chronické expozici.

Ionty rtuti penetrují přes systém mozkových bariér a vstupují do mozku. Již malá frakce rtuti přítomná v krevním oběhu je schopná indukovat poškození a disfunkci HEB a HLB vedoucí k propouštění látek z krve do nervové tkáně.

Rtuťnaté ionty poškozují membrány buněk a to zřejmě vazbou na membránové struktury a inhibicí enzymů asociovaných s membránou. Zvýšená propustnost mozkových cév po aplikaci rtuti je tedy dána zřejmě zvýšenou propustností endotelových buněk a membrán gliových buněk.

Rtuť také inhibuje řadu enzymů asociovaných s HEB jako je alkalická fosfatáza nebo adenosin trifosfatáza.

Ovlivnění enzymatické aktivity, společně s poškozením endotelových buněk a membrán gliových buněk, způsobuje prostup látek z krve do nervové tkáně.

Byla pozorována také nápadná degenerace mitochondrií endotelových buněk a to velmi brzy po podání rtuti (4-6h). S tím souvisí i následná snížená aktivita mitochondriálních enzymů.

Všechny tyto děje se podílí na narušení funkce HEB a následném průniku látek z krve do mozku. (27)

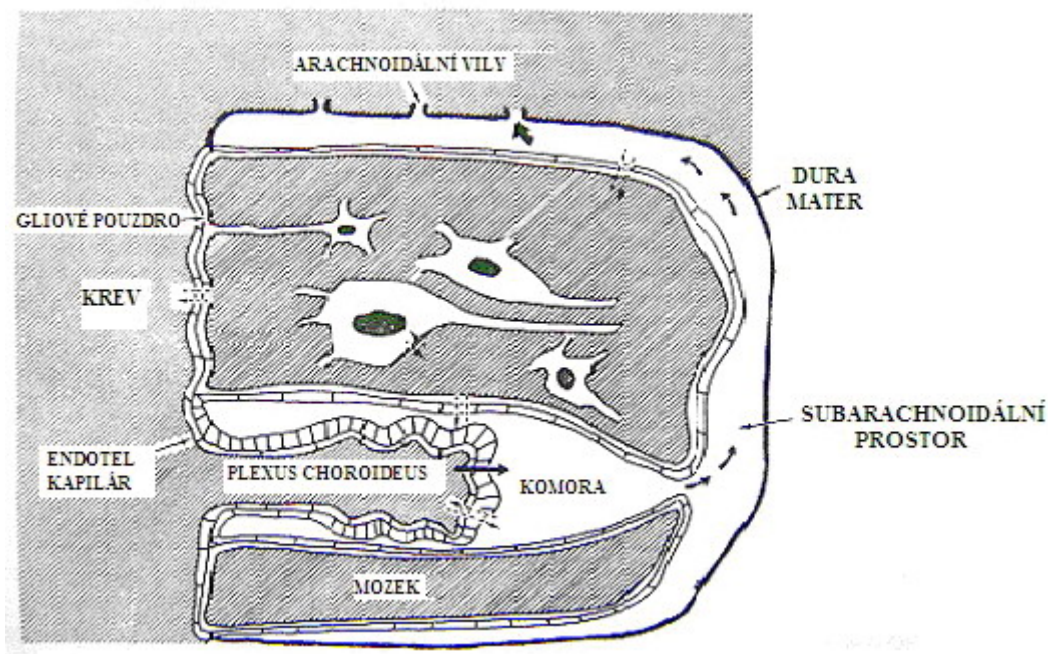
4.2.2 Nepřímé poškození bariéry

Role bariéry je různorodá a její poškození má tedy rozličné následky. Funguje především jako fyzikální bariéra, udržující vnitřní homeostázu v mozku a bránící vstupu škodlivých látek. Mimo to však, obzvláště některé části jako plexus choroideus, aktivně spolupracuje na mnohých funkcích mozku, jako je časný vývoj a zrání mozkové tkáně, neuroendokrinní regulace apod. Poškození může být tedy i nepřímé, narušením regulačních mechanismů, jako je tomu u manganu. (28)

4.3 Role choroidálního plexu v absorpci kovů do mozku

Plexus choroidues patří mezi CVO a je u něj přítomná HLB. Díky své pozici a vlastnostem je cílem mnoha toxických organických i anorganických látek. Mnohé pokusy dokázaly významnou roli choroidálního plexu v transportu a hromadění toxických kovů a kovových iontů.

Některé kovy jako olovo, rtuť nebo mangan mají tendenci se v něm akumulovat v mnohem větších koncentracích, než jaké jsou nalezeny v mozkomíšním moku nebo jinde v mozkové tkáni. Tyto kovy mohou způsobovat morfologické poškození struktury bariéry nebo indukovat změny v její funkci narušením regulačních mechanismů.



Obr. 7 : Možné cesty transportu v systému krev-mozek-mozkomíšní mok (3)

Kovy působící na plexus choroideus mohou být rozděleny do tří kategorií :

1. obecně toxické
2. selektivně toxické
3. kumulativní

Obecně toxické kovy se obvykle akumulují v plexu a způsobují značné poškození jeho struktury. To nejenže dovoluje kovům samotným difundovat do mozku, ale také zprostředkuje vstup dalších neuroaktivních toxických látek. Do této skupiny patří rtuť, kadmium a arsen.

Selektivně toxické kovy obvykle nemění přímo propustnost plexu ani nezpůsobují masivní patofyziologické změny. Poškozují však specifické regulační cesty kritické pro vývoj a funkci mozku. Tato skupina zahrnuje kovy jako olovo, mangan, měď a tellur.

Kumulativní toxické kovy jsou ukládány v plexu, ale toto hromadění není spojeno s žádnými patologickými či patofyziologickými následky pro HLB. Jedná se zřejmě o obranný mechanismus CNS. Patří sem železo, zinek, stříbro a zlato.

Jak je zřejmé, plexus choroideus hraje důležitou roli v transportu kovů do mozku. Výzkumy týkající se toxikologického aspektu plexus choroideus jsou však stále nedostačující. Objasnění toxikologie nám umožní porozumět roli plexu v rozvoji kovy-indukovaných onemocnění, která stále ještě není jasná.
(29)

4.4 Chemická forma kovů

Chemická forma, ve které se kov nachází v séru a jiných extracelulárních tekutinách, je většinou první aspekt, určující jeho schopnost transportu přes HEB.

Některé stavy mohou být přístupné transportním mechanismům, zatímco jiné nikoliv. Obecně, kovové ionty vázané na proteiny neprocházejí přes HEB, jedině je-li komplex kov-protein přepraven receptorem-zprostředkovanou endocytózou jako je tomu u Fe-transferrinu.

Na rozdíl od běžných iontů jako je Na^+ , K^+ nebo Mg^{2+} , existuje velmi malá frakce volných ionizovaných molekul kovů přítomných v tělní tekutině.

Kovy se nachází v séru ve čtyřech možných chemických stavech :

1. jako volné kovové ionty
2. jako nízkomolekulární komplexy, buď s anorganickým iontem, jako je hydroxyl, chlorid, nebo s aminokyselinou či jinou organickou kyselinou - cysteinem, histidinem nebo citrátem
3. reverzibilně vázané na protein, nejčastěji albumin
4. vázané na specifický vazebný protein (metalloprotein) - Fe-transferrin, Cu-caeruloplasmin, Zn- α_2 -makroglobulin (4)

4.5 Specifický transport kovů přes HEB

Transport esenciálních kovů a živin přes HEB je zprostředkovaný specifickými transportními mechanismy. Specifické transportéry naváží kovy na apikálním povrchu a exportují je na bazolaterální stranu a působí i v jejich intracelulární distribuci.

Hladiny esenciálních kovů jsou transportéry striktně regulovány. Tato přísná regulace zabraňuje poškození, které nastává při vyšších hladinách Fe, Zn a Cu, které indukují oxidativní poškození nervových buněk.

Poměrně dobře prozkoumaný je transportní systém pro železo, méně už pro prvky jako měď nebo zinek.

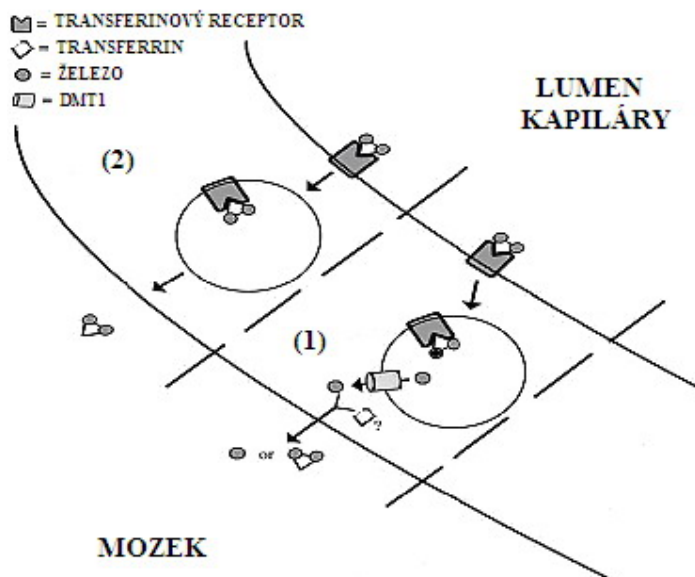
Přenašečem zprostředkovaný transport byl prokázán u zinku, manganu a olova. Transport některých kovů zajišťují i Ca-kanály. (8) O transportu olova a manganu se podrobně zmíním v další části.

Hlavní hodnota identifikace transportérů, které zprostředkovávají absorpci kovů do mozku, spočívá v možnosti predikce rizikových faktorů, které zvyšují jejich toxicitu.

4.5.1 Transport železa přes HEB

Železo je transportováno receptorem zprostředkovanou endocytózou. Fe-transferrin se váže na transferinový receptor (Tfr) a je endocytován. Nízké pH v endosomu uvolňuje Fe z ferritinu a to je poté z endosomu transportováno pomocí DMT1 (divalent metal transporter). Mechanismus, kterým je Fe transportováno přes bazolaterální membránu do mozku je zatím nejasný. (8)

V nedávných studiích (Burdo, J.R., 2003) byl prokázán rovněž transport Fe-transferrinu transcytozou. Fe může být také uskladněno v endotelových buňkách (byl u nich zjištěn ferritin), čímž je zabráněno nadměrnému vstupu do mozku, ale také slouží pro potřeby buňky nebo jako rezervoár při snížení jeho hladiny v mozku. (9)



Obr. 8 : Schéma transportu Fe přes HEB, 1 – endocytóza/ exocytóza, 2 – transcytóza (9)

4.5.2 Transport rtuti přes HEB

Organické sloučeniny rtuti, zejména methylrtuť (MeHg) jsou vysoce lipofilní a schopné procházet HEB bez pomoci jakéhokoliv transportního systému. V krvi se však nachází převážně vázaná na proteiny a nízkomolekulární komplexy obsahující SH- skupinu, jako je cystein. Komplex MeHg-cystein, strukturně podobný methioninu, vystupuje jako analog skutečné aminokyseliny a je transportován L systémem pro neutrální aminokyseliny. Napodobuje tedy skutečný endogenní substrát a využívá jeho transportní systém přes HEB. (28)

4.6 Role kovů v rozvoji neurodegenerativních onemocnění

Nerovnováha v regulaci extracelulárního a intracelulárního transportu kovů, může částečně vysvětlit etiologii a progresi některých neurodegenerativních onemocnění. Např. plaky izolované z mozků pacientů s Alzheimerovou nemocí (AN) vykazují vysoké hladiny Cu, Zn a Fe. U nejtěžších případů Parkinsonovy nemoci (PN) byly zjištěny vysoké hladiny Fe v některých částech mozku – zejména v substantia nigra.

Jak již bylo řečeno Zn, Cu a Fe jsou při vyšších hladinách potenciálně toxické. Ionty Fe a Cu katalyzují tvorbu oxidačních agens – hydroxidů, z peroxidu vodíku. Zn nekatalyzuje tuto reakci, ale také indukuje oxidativní poškození neuronů.

Aby bylo zabráněno tomuto typu poškození neuronů, hladiny těchto kovů jsou přísně regulovány extracelulárními a intracelulárními transportéry, enzymy katalyzujícími oxidaci kovů a vazebnými proteiny. Právě selhání těchto regulačních mechanismů je jednou z příčin vzniku neurodegenerativních onemocnění.

Toxické kovy interagují s transportéry zprostředkujícími absorpci, export a distribuci esenciálních kovů. Je identifikována řada kovů, které narušují homeostázu Fe (např. Cu, Al, Mn). Následkem této interakce může být hladina Fe, ale i Zn v mozku zvýšená, což vede k toxicitě způsobené aktivitou těchto kovů. (8)

4.7 Experimentální přístup

Jednou z možností studia transportu kovů přes HEB je perfúze cévního systému mozku nebo části mozku médiem o známé kompozici, obsahující radioizotop sledovaného kovu.

Další metodou je studium in vitro, na kulturách endotelových buněk, opět s médiem o známé kompozici.

Většina měření propustnosti HEB se provádí na laboratorních krysách.

Pro použití modelů uvedených výše je užitečné znát rychlost výměny a toku kovu přes HEB. Rychlost vstupu kovu do mozku může být určena zavedením

(a) kontinuální intravenózní infúze radioizotopu kovu

- po skončení je zvíře dekapitováno a radioizotop je určen v různých oblastech mozku, choroidálním plexu a mozkomíšním moku, měřením aktivity na Geiger-Müllerově počítací (appropriate counter) nebo autoradiografií a denzitometrií. Touto metodou byla určena např. rychlost absorpce do mozku pro ^{203}Pb , ^{65}Zn a ^{59}Fe (Bradbury et al., 1992)

(b) jednorázovou intravenózní injekcí radioizotopu kovu

- měření rychlosti absorpce do mozku pro ^{67}Ga a ^{65}Zn . (Bradbury et al., 1992)

4.7.1 Rychlost absorpce různých kovů do mozku po kontinuální infúzi radioizotopů

Bradbury a Dean (1992) studovali absorpci čtyř radioizotopů kovů (^{54}Mn , ^{203}Pb , ^{65}Zn a ^{59}Fe) do kortexu mozku po zhruba konstantní hladině v krvi udržované intravenózní infúzí. Ve všech případech nebyla překročena koncentrace kovu v séru o více než 25% nad kontrolní hodnotu. Absorpce byla zjištěna lineární v čase a to zřejmě díky HEB, která limituje rychlost transportu těchto kovů do mozku. V případě množství stopových kovů, existuje pravděpodobně velký rezervoár vazebné kapacity v mozku, která redukuje kov dostupný pro zpětný transport a umožňuje měřit jednosměrný tok po několik hodin.

Rozdíly rychlosti absorpce jednotlivých kovů byly zjištěny až řádově rozdílné. Kolísaly od $1,7 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pro Mn po $5,2 \cdot 10^{-3} \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pro Fe. (4)

5. Účinky a mechanismus působení vybraných kovů

Protože není možné rozebírat zde detailně všechny kovy působící na CNS, vybrala jsem jednoho zástupce z každé skupiny, jak jsem uvedla na začátku této kapitoly. Olovo jako toxický kov a mangan, jako esenciální, ale potenciálně toxický kov.

5.1 Olovo (Pb)

Olovo patří mezi nejstarší průmyslové jedy. Otravy jsou známy už z antického Říma (vodovody, glazury, barviva). Akutní otravy jsou dnes velice vzácné (tzv. saturnismus), spíše lze pozorovat otravy chronické, související se znečištěním životního prostředí.

Toxicita Pb je v dnešní době dobře prozkoumaná a je považovaná za jeden z hlavních rizikových zdravotních faktorů, obzvláště v některých oblastech USA, ale také zemí třetího světa. Pb působí na lidi i zvířata každého věku, jeho účinek je však nejzávažnější u dětí. (25)

Účinky olova na CNS dětí se liší od akutní encefalopatie po chronické, komplikované změny v chování a kognici. (10)

Účinek olova na člověka obecně je velmi složitý, zahrnuje ovlivnění krevního barviva a červených krvinek, svalstva, cév, trávicí soustavy, ledvin, žláz s vnitřní sekrecí, reprodukci a v neposlední řadě nervový systém. (25)

Já se v této práci zaměřím na jeho účinky na nervový systém, popř. HEB.

5.1.1 Role HEB v transportu Pb

Toxický účinek olova na HEB je centrem zájmu vědců. Olovo, ať už vstřebané střevem nebo plícemi může vstoupit do mozku pouze z krve. HEB je tedy buněčnou bariérou, která brání vstupu olova do mozku a jeho působení na neurony a gliové buňky, ale zároveň i místem možného toxického účinku.

HEB je významným cílem pro toxicitu olova. Chronická expozice vysokým koncentracím vede k poškození mozkových cév. Olovem indukované poškození se vyznačuje propustnými mozkovými cévami, způsobenými charakteristickým otevřením interendoteliálních tight junctions a zvýšenou pinocytickou aktivitou.

Olovo má specifickou afinitu k endotelovým buňkám mozkových kapilár, ve kterých se akumuluje v mnohem větším množství než v ostatních buněčných typech.

Zajímavá je situace u choroidálního plexu. Olovo nevstupuje aktivně do mozkomíšního moku, ale hromadí se v plexu a to mnohonásobně více než v endotelových buňkách. Tyto hladiny signifikantně stoupají se zvyšující se dávkou, zatímco hladiny v mozkové tkáni nikoliv. Hladina olova v choroidálním plexu je až stokrát vyšší než v mozkové kůře. (28) V mozku se olovo akumuluje obzvláště v hippocampu. (29)

5.1.2 Toxický účinek na CNS a HEB

Neurotoxický účinek zahrnuje ovlivnění funkce neurotransmiterů, mitochondrií, druhých poslů, endotelových buněk HEB, astrocytů a oligodendrocytů.

Ačkoliv nemohou být všechny toxické účinky shrnuty pod jeden mechanismus, většina souvisí s jeho schopností napodobovat nebo inhibovat činnost vápníku jako regulátoru buněčné funkce. Olovo se nejvíce hromadí v mitochondriích endotelových buněk, zřejmě ve stejném kompartmentu jako Ca^{2+} ionty, je tedy spojeno s poruchami intracelulárního metabolismu Ca^{2+} , stejně jako změnami transepiteliálních transportních procesů.

Dochází k narušení mechanismů udržujících homeostázu v mozku, změněnému chování endotelových buněk a narušení funkce bariéry.

Na neuronální úrovni, expozice olova ovlivňuje uvolňování neurotransmiterů z presynaptických zakončení. Spontánní uvolnění je zesíleno, zatímco indukované uvolnění je inhibováno. Toto narušení neuronální aktivity, může změnit vývojové procesy formování synapsí a způsobit méně výkonnou funkci mozku s kognitivním deficitem. (8, 19)

Olovo také působí na protein-kinázový systém. V endotelových buňkách HEB i epiteliálních buňkách HLB aktivuje proteinkinázu C (PKC). Aktivace PKC je úzce spjata se ztrátou funkce epitelových buněk jako bariéry a zvýšením transendotelové propustnosti .

Olovo také narušuje funkci astrocytů. Jelikož astrocyty jsou důležité pro vytváření, udržování a modulaci funkce mozkových kapilár, i tímto způsobem zvyšuje propustnost mozkových cév.

Akumulace olova v choroidálním plexu může selektivně měnit funkce HLB. Protein transthyretin (TTR) je produkován a regulován výhradně v choroidálním plexu. U člověka slouží TTR jako hlavní thyroideální hormon-vázací protein v CNS a k transportu thyroxinu v mozkomíšním moku. TTR gen je exprimován ve velkém množství v časném vývoji, tento jev souvisí s důležitostí thyroideálních hormonů pro vývoj mozku v embryonálním období.

Chronická expozice a akumulace olova selektivně redukuje sekreci a tím i hladiny TTR v mozkomíšním moku a tím omezuje transport thyroideálních hormonů z krve do mozku. Nedostatek thyroideálních hormonů u dětí způsobuje morfologické, biochemické a elektrofyziologické změny neuronů a gliových buněk vedoucí k ireverzibilní mentální retardaci. (28)

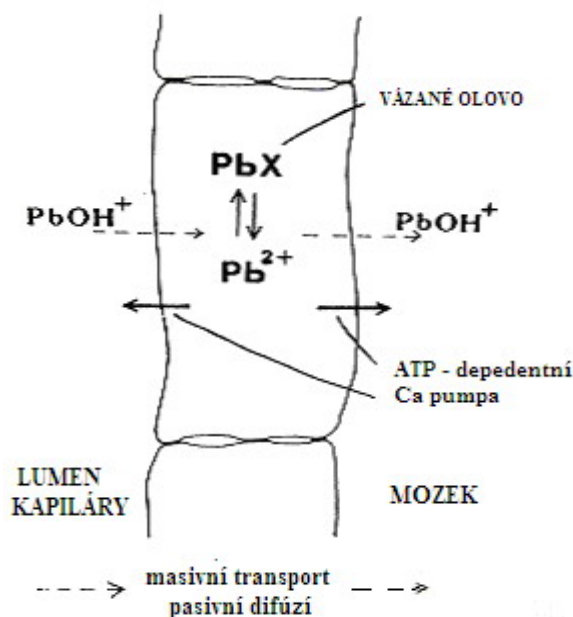
5.1.3 Transport olova přes HEB

Olovo vstupuje do endotelových buněk pasivní difúzí a to ve formě volných iontů Pb^{2+} nebo jednoduchých anorganických komplexů (jako je $PbOH^+$, $PbCl^+$). (28)

Deane a Bradbury (1990) zkoumali absorpci Pb do mozku po krátké perfúzi mozkových cév roztokem obsahujícím radioizotop ^{203}Pb . Transport ^{203}Pb do mozku byl poměrně rychlý při absenci organických látek v roztoku, zatímco v přítomnosti albuminu a L-cysteinu se transport rapidně snížil až zastavil.

Hladina volného olova v séru je asi 10^{-12} M, hlavní část olova je vázaná na proteiny a sloučeniny obsahující SH- skupinu, jako je L-cystein .

Ačkoliv tak rychlý pohyb velkých nabitých iontů přes lipidickou membránu je překvapující, vysoká propustnost pro olovo byla zjištěna i u membrán jiných buněk, např. červených krvinek.



Obr. 9 : Hypotetický model transportu olova přes endotel mozkových cév (6)

Vysoká propustnost bariéry pro olovo, mu umožňuje uplatnit toxicitu přímou aktivitou na nervové buňky, než nepřímým efektem na transport a regulaci ostatních látek. (4)

Transport olova do mozku je inhibován ATP-depedentní Ca^{2+} pumpou. Ta je lokalizována na luminální i abluminální membráně endotelu. Značné množství olova, které pronikne do cytosolu endotelových buněk je tímto mechanismem vraceno do lumen kapiláry. (6)

5.1.4 Závažnost účinků Pb

Závěrem můžeme říct, že HEB v podstatě neformuje neprostupnou překážku pro vstup olova do mozku, ať už zralého nebo vyvíjejícího se. Tím pádem, účinek olova i v nízkých koncentracích spočívá v přímém ovlivnění funkce neuronů a gliových buněk.

Nebezpečí spočívá také v tom, že přestože poločas rozpadu olova v krvi je poměrně krátký (~35 dní), v mozku je to až dva roky. Perioda, během níž je možné detekovat olovo v krvi je mnohem kratší, než doba toxického působení v mozku. Jakmile je olovo jednou absorbováno do mozku je eliminováno velmi pomalu. Navíc v případě mozku není možné použít k léčbě chelatační činidla. Tento fakt společně se skutečností, že již velmi nízká hladina olova v krvi má negativní účinky na vývoj mozku, činí olovo jedním z nejzávažnějších neurotoxických kovů. (19)

5.2 Mangan (Mn)

Koncentrace manganu v mozkové tkáni je mnohonásobně nižší než u ostatních esenciálních kovů (dokonce 100-500krát nižší než u železa), přesto je esenciálním prvkem nutným pro normální funkci mozku. Je nezbytnou součástí enzymu glutamin syntetázy, která katalyzuje syntézu neurotransmiterů a mitochondriální superoxid dismutázy (SOD), antioxidačního enzymu, redukujícího kyslíkové radikály. Aktivita celé řady dalších enzymů a receptorů v mozku je ovlivněna koncentrací Mn (kataláza, pyruvát-karboxyláza, kalmodulin depedentní fosfatáza apod.) (23)

5.2.1 Toxicita manganu

Na druhou stranu nadměrná expozice manganu může působit toxicky. Toxicita manganu je dobře známá jako pracovní riziko pro lidi, kteří inhalují vysoce koncentrovaný manganový prach, jako pracovníci v těžebních a metalurgických provozech.

Ačkoliv je postiženo množství orgánů, Mn-indukovaná neurotoxicita je považována za nejcitlivější bod. (20)

Vysoká koncentrace manganu ovlivňuje metabolismus neurotransmiterů, díky jeho roli v glutamin syntetáze. Nadměrný příjem manganu způsobuje Parkinson-like syndrom, který je spojen právě s poškozením neurotransmiterů, obzvláště dopaminergního systému. (11)

Je možné, že dokonce existuje přímo souvislost mezi nadměrným příjmem manganu a rozvojem Parkinsonovy nemoci. Příčinou této choroby je nedostatek dopaminu v substantia nigra a víme, že mangan je ve velkém množství transportován právě do substantia nigra a že negativně ovlivňuje tvorbu dopaminu.

V jednom pokusu či spíše analýze dosavadních studií bylo zjištěno, že mezi 325 dělníky exponovanými manganu se Parkinsonova nemoc vyskytla u 15% z nich, což vysoce překračuje odhad incidence Parkinsonovy choroby v populaci nad 70 let věku, pro kterou je tato choroba příznačná, a kde postihuje jen asi 1,5 - 2,5%. (26)

5.2.2 Role HEB v transportu Mn

Protože obojí, nedostatek i nadbytek manganu, způsobuje poškození nervové funkce, je regulace toku Mn přes HEB nezbytná pro udržení správné hladiny manganu v mozku. Neexistuje žádný důkaz o tom, že by Mn indukoval přímo poškození struktury mozkových cév nebo epiteliálních buněk HLB.

Akumuluje se aktivně v choroidálním plexu. Jeho tok do plexu je 150–1000krát vyšší než do mozkové kůry a mozkomíšního moku.

5.2.3 Interakce manganu se železem

Ačkoliv otrava manganem nezpůsobuje přímo histopatologické poškození HEB nebo HLB, selektivně pozměňuje schopnost bariéry regulovat homeostázu Fe v mozku. Mangan a železo zřejmě sdílí společné transportní mechanismy. Mají i několik společných znaků, které ovlivňují jejich interakci : v periodické tabulce leží vedle sebe, oba se vyskytují v séru jako dvoumocné a trojmocné ionty, oba se vážou na transferrin a v buňce se primárně akumuluje v mitochondriích. Není tedy překvapující, že mangan interaguje s železem na celulární i subcelulární úrovni. (29)

Za normálních fyziologických podmínek, mozek reguluje rovnováhu Fe kontrolou vstupu Fe do mozku (TfR-zprostředkovaný proces), skladováním Fe (závisí na dostupnosti ferritinu) a odtokem Fe, jehož rychlost je kontrolována rychlostí toku mozkomíšního moku. Posttranslační modulace TfR a syntézy ferritinu je regulována enzymem cytoplazmatickou akonitázou (ACO1). Mn mění enzymatickou aktivitu akonitázy a tím i efektivní regulaci hladiny Fe.

Abnormální metabolismus Fe v oběhovém systému a zejména v mozku souvisí s etiologií řady neurodegenerativních onemocnění, zahrnujících i Parkinsonovu nemoc (PN). Velké množství Fe v bazálních gangliích, obzvláště v substantia nigra, může katalyzovat vznik reaktivních oxidativních částic a zvyšovat peroxidaci lipidů. Takový Fe-indukovaný stres může vést k degeneraci nigrostriatálních dopaminergních neuronů u PN pacientů. (28)

5.2.4 Transport manganu přes HEB

Navzdory důležitosti manganu, ať už jako živiny nebo toxické látky pro mozek, se zatím ví málo o tom, jak vstupuje do mozku. Studie zkoumající celkovou distribuci manganu ukazují, že mozek obdrží jen malé množství podané dávky, což naznačuje, že absorpce do mozku je omezena HEB. Mangan se akumuluje ve specifických oblastech CNS a jeho absorpce je závislá na sérovém železu.

Mangan vstupuje do mozku buď přes HEB nebo přes HLB do mozkomíšního moku a pak do mozku. Transport manganu do mozku probíhá difúzí nebo přenašečem zprostředkovaným transportem. Při fyziologické koncentraci manganu v plazmě byl zjištěn tok do mozku nesaturující a primárně cestou přes endotel kapilár HEB, zatímco při vysokých koncentracích v plazmě byl tok saturující a primárně přes plexus choroideus a tedy mozkomíšní mok. Mangan může být transportován také transferrin-dependentním mechanismem.

Chemická forma manganu ovlivňuje, jako u jiných kovů, možnost jeho transportu do mozku.

Mn^{2+} se vyskytuje v séru v několika formách, velká část je vázaná na albumin, v menší míře se vyskytuje jako hydratovaný ion, v komplexu s HCO_3^- , s citrátem nebo jinými nízkomolekulárními ligandy. Mn^{3+} je v séru téměř 100% vázán na transferrin.

Hlavní chemickou formou transportovanou přes HEB je zřejmě Mn citrát, další formou je pak volný Mn^{2+} . (11)

5.2.5 Shrnutí působení Mn

Závěrem bych snad jen zdůraznila, že mangan je sice méně známým esenciálním prvkem, nicméně hraje důležitou roli v živých systémech. Na druhou stranu, při vysokých dávkách a dlouhodobé expozici, způsobuje vážné zdravotní následky. Podle nejnovějších výzkumů snad souvisí i s rozvojem Parkinsonovy nemoci.

6. Závěr

Ve své práci jsem se pokusila shrnout hlavní znaky a charakteristiky HEB, HLB a některé aspekty jejího vývoje, které vysvětlují vysokou citlivost k toxickým látkám v časném vývoji.

HEB se stala v posledních letech středem zájmu výzkumů, je totiž hlavním vstupem toxických látek, ale na druhou stranu i léčiv, z krve do mozku.

V této práci jsem se zaměřila na kovy. Esenciální, které jsou nezbytné pro vývoj mozku, ale při vysokých koncentracích potenciálně toxické. Toxické, většinou těžké kovy, které jsou schopné obcházet mechanismy bariéry, hromadí se v ní, poškozují ji a následně i mozkové buňky, čímž narušují správnou funkci a vývoj mozku. Podle nejnovějších poznatků souvisí zvýšené hladiny některých kovů v mozku i s etiologií rozličných neurodegenerativních onemocnění. Zvýšená hladina Fe a Zn se podílí na vzniku a rozvoji Alzheimerovy nemoci, vysoká koncentrace Mn vyvolává Parkinson-like syndrom a je možné, že se podílí i na vzniku Parkinsonovy nemoci.

Bohužel současné poznatky, týkající se transportu kovů přes HEB, jejich hromadění v bariéře a možný toxický efekt a role ve vzniku neurodegenerativních onemocnění jsou stále ještě nedostačující nebo často sporné. Proto je nutné se na tyto aspekty zaměřit v dalších studiích, zejména kvůli možnosti zabránění poškození mozku a objasnění vzniku a rozvoje neurodegenerativních onemocnění.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Číslo	Strana
Obr. 1 : Schématický průřez mozkovou kapilárou.....	3
Obr. 2 : Rozdíl ve stavbě periferní a neurální kapiláry	3
Obr. 3 : Základní molekulární organizace tight junctions HEB	5
Obr. 4 : Jednotlivé složky HEB : bariéra fyzikální, transportní a metabolická	7
Obr. 5 : Hematolivorová bariéra.....	8
Obr. 6 : Plexus choroideus, choroidální kapiláry a ventrikulární ependym	9
Obr. 7 : Možné cesty transportu v systému krev-mozek-mozkomíšni mok	14
Obr. 8 : Schéma transportu Fe přes HEB	16
Obr. 9 : Hypotetický model transportu Pb přes endotel mozkových cév	21

SEZNAM ZKRATEK

Al	Hliník
AN.....	Alzheimerova nemoc
Ca.....	Vápník
Cd	Kadmium
CNS	Centrální nervový systém
CO ₂	Oxid uhličitý
Cu	Měď
CVO.....	Cirkumventrikulární orgány
DMT1	Divalent metal transporter
Fe	Železo
Ga	Galium
g	Gram
HCO ₃ ⁻	Hydrogenuhlíčanový ion
HEB.....	Hematoencefalická bariéra
HLB.....	Hematolikorová bariéra
Hg	Rtuť
h	Hodina
K	Draslík
MeHg.....	Methylrtuť
Mg.....	Hořčík
ml.....	Mililitr
Mn	Mangan
Na.....	Sodík
NO	Oxid dusnatý
O ₂	Kyslík
Pb.....	Olovo
Pgp.....	P- glykoprotein
PKC.....	Proteinkináza C
PN	Parkinsonova nemoc
Se	Selen
SOD	Superoxid-dismutáza
Tfr.....	Transferinový receptor
TJ.....	Tight junction
TTR	Transthyretin
Zn.....	Zinek
ZO.....	Zonula occludens

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Abbott, N.J. (2002) *Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*, J. Anat. 200, 629-631
- (2) Bauer, B., Hartz, A.M.S, Fricker, G., Miller, D.S. (2005) *Modulation of p-Glykoprotein Transport Function at the Blood-Brain barrier*, Exp Biol Med 230, 118-120
- (3) Bradbury. M.W.B. (1979) *The concept of the blood-brain barrier*, 83
- (4) Bradbury M.W.B. (1992) *Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier*, 263-276
- (5) Bradbury M.W.B. (1992) *Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier*, 327-362
- (6) Bradbury, M.W.B. and Deane, R. (1993) *Permeability of the Blood-Brain Barrier to Lead*, NeuroToxicology 14, 131-136
- (7) Braun, L.D., Cornford, E.M., Oldendorf, W.H. (1980) *Newborn rabbit blood-brain barrier is selectively permeable and differs substantially from the adult*, J. Neurochem. 34(1), 147-152
- (8) Bressler, J.P., Olivi, L., Cheong, J.H., Kim, Y., Maerten, A. a Bannon, D. (2007) *Metal transporters in intestine and Brain : their involvement in metal-associated neurotoxicities*, Human & Experimental Toxikology 26, 221-229
- (9) Burdo, J.R., Antonetti, D.A., Wolpert, E.B., Connor, J.R. (2003) *Mechanism and regulation of transferrin and iron transport in a model blood-brain barrier system*, Neuroscience 121, 883-890
- (10) Clarkson, T.W. (1987) *Metal toxicity in the Central Nervous System*, Environmental Health Perspectives 75, 59-61
- (11) Crossgrove, J.S., Allen, D.D., Bukaveckas, B.L., Rhineheimer, S.S., Tomel, R.A. (2003) *Manganese Distribution Across the Blood-Brain Barrier I.Evidence for Carrier-Mediated Influx of Manganese Citrate as Well as Manganese and Manganese Transferrin*, NeuroToxicology 24, 3-13

- (12) Chowdhury B.A.; Chandra R.K. (1987) *Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions*, Prog Food Nutr Sci, 1987, 11, 55
- (13) De Vries, H.E., Kuiper J., De Boer, A.G., Van Berkel, T.J.C, Breimer, D.D. (1997) *The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases*, Pharmacological Reviews 49, 143-145
- (14) Hawkins, B.T., Davis, T.P. (2005) *The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease*, Pharmacological reviews 57, 173-179
- (15) Hawkins, R.A., O’Kane, R.L., Simpson, I.A., Viña, J.R. (2006) *Structure of the Blood-Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids*, The Journal of Nutrition 136, 218s-219s
- (16) Huber, J.D., Egleton, R.D., Davis, T.P. (2001) *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier*, TRENDS in Neuroscience 24, 719-722
- (17) Johnson, A.K., Gross, P.M. (1993) *Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways*, Faseb J. 7, 678-680
- (18) Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (2004) *Farmakologie a toxikologie*, 46-47
- (19) Lidsky, T., Schneider, J.S. (2003) *Lead neurotoxicity in children : basic mechanisms and clinical correlates*, Brain 126, 15
- (20) Murphy, V.A., Wadhvani, K.C., Smith, Q.R., Stanley I.R. (1991) *Saturable Transport of Manganese(II) Across the Rat Blood-Brain Barrier*, Journal of Neurochemistry 57, 948-954
- (21) Oskarsson, A, Hallén, I.P., Sundberg, J., Grawé, K.P. (1998) *Risk assessment in relation to neonatal metal exposure*, Analyst 123, 19-23
- (22) Paulson, O.B. (2002) *Blood-Brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow*, European Neuropsychopharmacology 12, 495-496
- (23) Prohaska, J.R. (1987) *Functions of Trace Elements in Brain Metabolism*, Physiological Reviews 67, 879-881

- (24) Rubin, L.L., Stadion, J.M. (1999) *The Cell Biology of the Blood-Brain Barrier*, Annu. Rev. Neurosci. 22, 12-15
- (25) Vlastimil Rusek (2001) *Základy toxikologie*, 103-104
- (26) Urban, P., Lukáš, R. (2000) *Profesionální aspekty Parkinsonských syndromů – II. část*, České pracovní lékařství 2, 109-113
- (27) Ware, R.A., Chang, L.W., Burkholder, P.M. (1974) *An Ultrastructural Study on the Blood-Brain Barrier Dysfunction Following Mercury Intoxication*, Acta Neuropath. 30, 211-224
- (28) Zheng, W., Aschner, M., Ghersi-Egea, J.F. (2003) *Brain barrier systems : a new frontier in metal neurotoxicological research*, Toxicology and Applied Pharmacology 192, 1-11
- (29) Zheng, W. (2001) *Toxicology of Choroid Plexus : Special Reference to Metal-Induced Neurotoxicities*, Microscopy Research and Technique 52, 89-90, 99-100
- (30) Zheng, W. (2001) *Neurotoxicology of the Brain Barrier System : New Implications*, Clinical Toxicology 39, 715
- (31) <http://users.ahsc.arizona.edu/davis/csfanatomy.htm> [2007]