

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



***In vitro* metody pro predikci penetrace látek přes HEB**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Konzultant: Mgr. Tereza Kobrlová

Hradec Králové, 2019

Helena Zálešáková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, květen 2019

.....  
Helena Zálešáková



## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Tereze Kobřilové, docentovi PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. a PharmDr. Marii Vopršálové, CSc. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovali. Také bych ráda poděkovala všem pracovníkům Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, kteří mi byli vždy ochotni poradit a vyjít vstříc. V neposlední řadě patří můj dík rodině a přátelům, kteří mě podporovali při vypracovávání této diplomové práce a v průběhu celého studia, čehož si velmi vážím.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>2</b>
2.1	STAVBA HEMATOENCEFALICKÉ BARIÉRY	2
2.2	MECHANISMY TRANSPORTU PŘES HEB	5
2.2.1	<i>Pasivní difuze</i>	5
2.2.2	<i>Transport solutů zprostředkovaný specifickými přenašeči</i>	6
2.2.3	<i>Efluxní transportéry</i>	6
2.2.4	<i>Transcytóza</i>	7
2.2.5	<i>Migrace mononukleárních buněk</i>	8
2.3	ASPEKTY OVLIVŇUJÍCÍ PROSTUPNOST LÁTEK PŘES HEB	8
2.3.1	<i>Fyzikálně-chemické vlastnosti látek</i>	8
2.3.2	<i>Patologické stavy</i>	10
2.4	METODY PRO PREDIKCI PROSTUPNOSTI LÁTEK PŘES HEB	11
2.4.1	<i>In vivo metody</i>	11
2.4.2	<i>In vitro metody</i>	12
2.5	TABULKA PRO ZHODNOCENÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ	23
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>26</b>
4.1	POUŽITÝ MATERIÁL	26
4.1.1	<i>Přístroje a pomůcky</i>	26
4.1.2	<i>Chemikálie</i>	26
4.1.3	<i>Standardní látky</i>	26
4.2	PRACOVNÍ POSTUP	27
4.2.1	<i>Protokol PAMPA zkoušky</i>	27
4.2.2	<i>Postup měření na spektrofotometru</i>	28
4.2.3	<i>Protokol metody využívající MDCK buněčnou linii</i>	29
4.2.4	<i>Vliv koncentrace DMSO na lipidovou vrstvu u PAMPA metody</i>	30
4.3	ANALÝZA DAT A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ	30
4.3.1	<i>Výpočet koeficientu permeability <math>P_e</math>, PAMPA</i>	30
4.3.2	<i>Výpočet aparentního permeačního koeficientu <math>P_{app}</math>, MDCK model</i>	31
4.3.3	<i>Kontrola integrity MDCK monovrstvy</i>	32
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>33</b>
5.1	STANOVENÍ PROSTUPU POMOCÍ PAMPA METODY	33
5.2	STANOVENÍ PROSTUPU POMOCÍ METODY VYUŽÍVAJÍCÍ MDCK MODEL	35

5.3	VÝSLEDKY MĚŘENÍ METODOU PAMPA A MDCK MODELEM .....	36
5.4	VYUŽITÍ DMSO JAKO KOSOLVENTU V PAMPA METODĚ .....	37
5.5	VÝSLEDKY KONTROLY INTEGRITY MDCK MONOVRSTVY .....	39
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

# POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	Český význam
<b>ABC transportéry</b>	ATP binding cassette transporters	ATP-dependenční transportéry
<b>AJ</b>	Adherens junctions	Adherentní spoje
<b>AMT</b>	Adsorptive-mediated transcytosis	Adsorptivně zprostředkovanou transcytóza
<b>BMECs</b>	Brain microvascular endothelial cells	Endotelové buňky mozkové mikrovaskulatury
<b>CNS</b>	Central nervous system	Centrální nervová soustava
<b>CSF</b>	Cerebrospinal fluid	Mozkomíšní mok
<b>CVOs</b>	Circumventricular organs	Cirkumventrikulární orgány
<b>DIV-BBB model</b>	Dynamic <i>in vitro</i> blood-brain barrier model	Dynamický <i>in vitro</i> model hematoencefalické bariéry
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco médium pro buněčné kultury
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
<b>ECs</b>	Endothelial cells	Endotelové buňky
<b>ECM</b>	Extracellular matrix	Extracelulární matrix
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum	Fetální bovinní sérum
<b>FITC-dextran</b>	Fluorescein isothiocyanate-dextran	Fluorescenčně značený dextran
<b>HEB</b>	Hematoencephalic barrier	Hematoencefalická bariéra
<b>JAM</b>	Junctional adhesion molecules	Adhezivní molekuly spojení
<b>LAM</b>	Leukocyte adhesion molecules	Adhezivní molekuly leukocytů
<b>logBB</b>	Logarithm value of brain to plasma concentration ratio	Logaritmická hodnota poměru koncentrace mozek/plazma
<b>MDCK buňky</b>	Madin-Darby Canine Kidney cells	Madin-Darby buňky psích ledvin
<b>NSCs</b>	Neural stem cells	Neuronové kmenové buňky
<b><i>Papp</i></b>	Apparent permeability coefficient	Aparentní permeační koeficient
<b>PAMPA</b>	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay	Zkouška paralelního umělého membránového pronikání
<b>PBL</b>	Polar brain lipid (porcine)	Extrakt lipidu z mozku (vepř)
<b>PBS</b>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Fosfátový pufr

<b><i>Pe</i></b>	Permeation coefficient	Permeační koeficient
<b>P-gp</b>	P-glycoprotein	P-glykoprotein
<b>PSA</b>	Polar surface area	Polární povrch
<b>QSAR</b>	Quantitative structure–activity relationship	Kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou
<b>RMT</b>	Receptor-mediated transcytosis	Receptory zprostředkovaná transcytóza
<b>SLCs</b>	Solute carriers	Specifické transportéry solutů
<b>SS</b>	Shear stress	Smykové napětí
<b>TEER</b>	Transendothelial electrical resistance	Transendoteliální elektrický odpor
<b>VSA</b>	Van der Waals surface area	Povrchová plocha van der Waals



# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: **Helena Zálešáková**

Školitel: **PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.**

Název diplomové práce: ***In vitro* metody pro predikci penetrace látek přes HEB**

Tato diplomová práce se zabývá korelací mezi dvěma *in vitro* modely simulujícími hematoencefalickou bariéru (HEB, z angl. hematoencephalic barrier) a jejich porovnáním z hlediska praktického využití. Jedná se o metodu PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) a metodu využívající MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) buněčnou linii, což jsou modely pro screening látek potenciálně penetrujících do centrálního nervového systému (CNS, z angl. central nervous system). V rámci této práce byl změřen set šestnácti standardních léčiv. Vlastní provedení bylo podobné u obou metod s cílem získat informaci o tom, jaké množství testovaných látek prostoupí přes membránu z donorové části destičky do akceptorové. Koncentrace v donorové části byla změřena pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Hlavní odlišností mezi metodami je membrána, přes kterou látky prostupují. V případě PAMPA se používá fosfolipid, který byl izolován z mozku vepře (PBL, z angl. polar brain lipid). Tento lipid simuluje fosfolipidovou membránu endotelu mozkových kapilár. U MDCK modelu je membrána tvořena monovrstvou MDCK buněk, které jsou pěstovány na mikroporézní membráně umístěné mezi donorovou a akceptorovou částí systému. Detekovaná donorová koncentrace byla převedena na permeabilitní koeficienty a metody byly porovnány mezi sebou a také s *in vivo* prostupností získanou z literatury. Bylo zjištěno, že u třinácti léčiv výsledky z obou metod odpovídají *in vivo* situaci a že nejlepší korelace je u látek, které prostupují přes HEB pasivní difuzí. V PAMPA modelu byla zjištěna chybná predikce pro látky využívající aktivní transportní mechanismy, kterou model využívající MDCK buněčnou linii z velké části eliminoval. MDCK model sice obsahuje aktivní transportéry, ale všechny nemají stejnou substrátovou specifitu jako v HEB. Navíc některé transportéry přítomné v HEB zde zcela chybí. Proto MDCK model chybně určuje prostup látek, které podléhají některým transportérům specifickým pro HEB. Metoda PAMPA je v porovnání s MDCK modelem rychlá, levná a vhodná pro screening větších setů látek. Dílčím cílem bylo zjištění vlivu dimethylsulfoxidu (DMSO) použitého jako kosolventu při rozpouštění vzorků s výsledkem, že v koncentracích použitých za tímto účelem spolehlivost metody PAMPA neovlivňuje.

Klíčová slova: hematoencefalická bariéra, *in vitro*, PAMPA, MDCK linie, DMSO

# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: **Helena Zálešáková**

Supervisor: **PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.**

Title of diploma thesis: ***In vitro* Methods for the Prediction of Blood Brain Barrier Penetration**

This thesis deals with the correlation between two *in vitro* models simulating the blood-brain barrier (HEB, hematoencephalic barrier) and their comparison in terms of practical use. These are the PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) method and the MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cell line, which are models for potential central nervous system (CNS) penetration screening. Within this work, a set of sixteen standard drugs were measured. The procedure was similar in both methods in order to obtain information on the amount of test substances passing through the membrane from the donor portion of the plate to the acceptor. The concentration in the donor portion was measured by UV-VIS spectrophotometry. The main difference between these methods is the membrane through which the substances penetrate. In the case of PAMPA, a lipid solution that has been isolated from pig brain (PBL, polar brain lipid) is used. This lipid simulates the phospholipid membrane of the brain capillary endothelium. In the MDCK model, the membrane is a monolayer of MDCK cells that are grown on a microporous membrane located between the donor and acceptor portions of the system. The detected donor concentration was converted to permeability coefficients and the methods were compared with each other and also with *in vivo* permeability. For thirteen drugs, the results from both methods corresponds to the *in vivo* situation. It has been found that the best correlation is for substances that pass through HEB by passive diffusion. In the PAMPA model, a wrong prediction was found for substances using active transport mechanisms, which the MDCK model largely eliminated. Although the MDCK model contains active transporters, they do not all have the same substrate specificity as in the HEB. In addition, some transporters present in the HEB are missing. Therefore, the MDCK model erroneously determines the transmission of substances that are subject to transporters that are specific to HEB. The PAMPA method is fast, cheap and suitable for screening larger sets of substances compared to the MDCK model. A partial goal was to determine the effect of dimethylsulfoxide (DMSO), which was used as a co-solvent in sample dissolution. The DMSO concentrations used were found not to affect the reliability of the PAMPA method.

Key words: blood brain barrier, *in vitro*, PAMPA, MDCK cell, DMSO

# 1 ÚVOD

Stanovení penetrace přes hematoencefalickou bariéru (HEB) je velmi významný faktor ve výzkumu a vývoji nových léčiv. Týká se hlavně potenciálních kandidátů na léčiva s cílem působení v centrálním nervovém systému (CNS), u nichž penetrace zajišťuje účinek léčiva. Zjištění průchodu do CNS je důležité i u léčiv, jejichž účelem je působit mimo CNS, tedy na periférii. Zde může být průnik do mozku příčinou řady nežádoucích účinků.

Výzkum HEB je velmi náročný, ale objevují se stále nové poznatky a počet publikací neustále vzrůstá. Pro pochopení funkce HEB je důležité znát její anatomickou stavbu, která zajišťuje omezenou propustnost látek a rozumět transportním mechanismům, které se v HEB odehrávají. Ke studiu fyziologie i patologie HEB a ve farmaceutickém výzkumu je k dispozici řada *in vitro* modelů, kterými se tato diplomová práce zabývá.

*In vitro* modely mají oproti *in vivo* metodám mnoho výhod. Jsou relativně levné v porovnání s experimenty na zvířatech a jejich propustnost látek je výrazně vyšší. Zajišťují tedy testování většího množství látek v kratším časovém intervalu a za jednodušších pracovních podmínek. Díky těmto vlastnostem mohou sloužit v raných stádiích výzkumu a předcházet studiím na zvířatech a člověku. Je k dispozici řada *in vitro* modelů HEB od jednodušších, po složitější a dokonalejší systémy. Ovšem v současné době neexistuje dokonalý *in vitro* model, který by plnohodnotně nahradil *in vivo* modely, což je důvod jejich neustálého vývoje.

Rozhodli jsme se porovnat dva *in vitro* modely a posoudit jejich vhodnost pro testování permeability léčiv. Prvním z nich je PAMPA metoda, která se řadí mezi nebuněčné modely a vyniká v predikci pasivní difuze přes HEB. Druhý model je založen na pěstování monokultury živých MDCK (Madin-Darby Canin Kidney) buněk, zahrnující již některé aktivní mechanismy, které se podílejí na transportu léčiv přes tuto monovrstvu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stavba hematoencefalické bariéry

Savčí mozek omezuje vstup iontů a solutů cirkulujících v krevním oběhu dvěma buněčnými bariérami. Bariérou krve a mozku (HEB, z angl. hematoencephalic barrier) a bariérou krve a mozkomíšního moku (CSF, z angl. cerebrospinal fluid) (Ueno 2007).

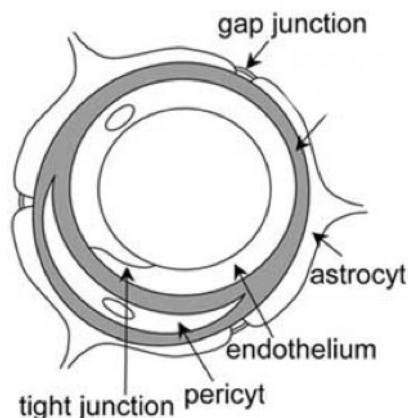
HEB je speciální strukturální, biochemická a vysoce selektivní polopropustná bariéra. Reguluje vstup molekul z krve do mozkové tkáně a extracelulární tekutiny v centrální nervové soustavě (CNS, z angl. central nervous system) a udržuje tím homeostázu mozku (Stamatovic et al. 2008). Tato přesná kontrola homeostázy CNS umožňuje správnou funkci nervů a chrání nervovou tkáň před toxiny a patogeny z vnějšího prostředí. Změny bariérových vlastností a narušení integrity HEB jsou důležitou součástí patologie a progresu různých neurologických onemocnění (Daneman and Prat 2015).

Mimo ochrany před škodlivými látkami HEB zároveň umožňuje vycytávání živin a hormonů z krve, které jsou potřebné pro správnou funkci mozku. Prostup živin z krve umožňují transportéry (například pro glukózu, insulin, aminokyseliny či neuroaminové prekurzory). Vysokou metabolickou aktivitu HEB nutnou pro transportní funkce zajišťuje přítomnost mitochondrií v endotelových buňkách mozkové mikrovaskulatury (BMECs, z angl. brain microvascular endothelial cells) (Oldendorf et al. 1977; Ueno 2007; He et al. 2014).

Výjimkou jsou cirkumventrikulární orgány (CVOs, z angl. circumventricular organs). Jedná se o vysoce vaskularizované oblasti, které se liší od zbytku mozkového parenchymu tím, že nejsou obklopeny HEB. Dosud byly identifikovány tři smyslové a čtyři sekreční CVOs (Miyata 2015). Nachází se kolem třetí a čtvrté mozkové komory a díky fenestrovaným kapilárám umožňují, aby jejich neurony měly (na rozdíl od HEB) přímý kontakt s látkami přenášenými krví. Tím je zajištěna jejich klíčová role v regulaci většiny autonomních a endokrinních funkcí (Sisó et al. 2010). Ochrannou roli zde hrají mikroglia a neuronové kmenové buňky (NSCs, z angl. neural stem cells), které reagují na informace získané z krve a signály z CSF (Miyata 2015).

Těsné bariérové vlastnosti HEB jsou přičítány unikátním paracelulárním a intracelulárním transportním vlastnostem BMECs. Tyto buňky jsou zde v mnohem těsnějším uspořádání než buňky endotelu na periférii (He et al. 2014). Důležitá je úzká interakce BMECs s ostatními složkami neurovaskulární jednotky, do které se zapojují také koncové výběžky astrocytů, pericyty zakotvené v bazální membráně a samotné neurony. Tato neurovaskulární

jednotka jako celek zajišťuje správnou funkci CNS a udržuje vlastnosti HEB (viz Obrázek 1) (Persidsky et al. 2006).

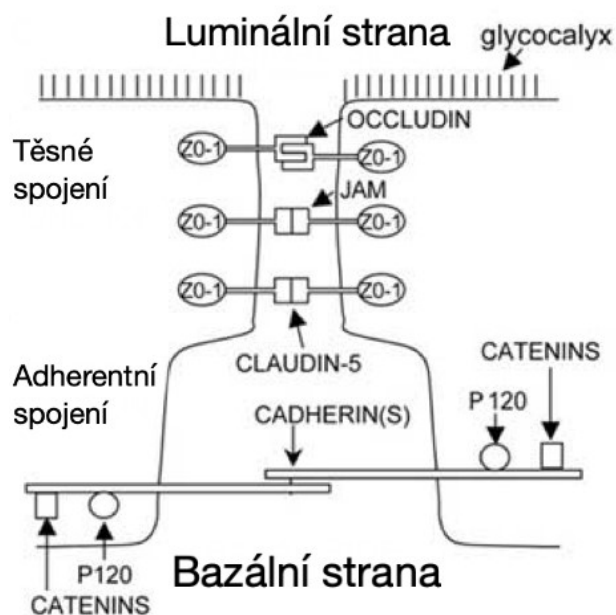


*Obrázek 1 Schematický náčrtek neurovaskulární jednotky. Na příčném řezu kapilárou HEB lze pozorovat endotel s těsným spojením, bazální membránou, pericytem a astrocyty. Dále gap junction neboli vodivý spoj. Modifikováno dle: Ueno (2007).*

Za vlastnosti HEB jsou primárně zodpovědné spojovací komplexy BMECs, které představují těsné spoje (TJs, z angl. tight junctions) a adherentní spoje (AJ, z angl. adherens junctions) (Stamatovic et al. 2008). Tyto mezibuněčné spoje hrají klíčovou roli z hlediska paracelulární permeability (Wilhelm et al. 2011). Spojovací komplex se skládá z transmembránových proteinů a doplňkových cytoplazmatických proteinů umístěných na apikální straně endotelu (Stamatovic et al., 2008). Transmembránové proteiny interagují přímo uvnitř spojovacího komplexu. Zatímco cytoplazmatické proteiny slouží jako kotva, vázající se na transmembránové proteiny s aktinovým cytoskeletem, který je potřebný pro udržování strukturní a funkční integrity endotelu (Petty and Lo 2002; Ueno 2007).

TJs jsou zodpovědné za separaci apikální a basolaterální membránové domény vedoucí k polarizaci buňky a k omezení paracelulární transportní dráhy (González-Mariscal et al. 2003). Spojují BMECs pomocí proteinů: claudin, okcludin, adhezní molekuly (JAM, junctional adhesion molecules) a pomocí řady cytoplazmatických pomocných proteinů, včetně zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), cingulinu a dalších (Ueno 2007).

Co se týče struktury AJ, tak jejich transmembránovými proteiny jsou kadheriny (hlavně VE-kadherin), které je spojeny přes kateniny (alfa, beta a gama) s cytoskeletem (viz Obrázek 2) (Wilhelm et al. 2011). Správná funkce AJ je potřebná pro pevný spojovací komplex (Schulze and A Firth 1993). Navíc TJs a AJ mohou být strukturně propojeny, protože byla prokázána interakce mezi ZO-1, ZO-2 a alfa-kateninem (Itoh et al. 1999; Wilhelm et al. 2011).



Obrázek 2 Schematické znázornění interakce proteinů tvořících těsné spoje v hematoencefalické bariéře. Je znázorněn claudin-5 (hlavní složka TJs endoteliálních buněk mozku), okcludin a adhezivní molekuly spojení (JAM), což jsou transmembránové proteiny. ZO-1, p120 cateniny, claudin a kadherin jsou cytoplazmatické proteiny. Modifikováno dle (Ueno 2007).

Pericyty jsou buňky obklopující abuminální povrch endoteliálních buněk v kapilární síti mozku. Hrají důležitou roli v regulaci angiogeneze a infiltrace imunitních buněk, depozici extracelulární matrix, hojení ran a regulaci toku krve v reakci na nervovou aktivitu. Kromě toho se ukázalo, že se tyto buňky účastní vývoje HEB a udržují její funkce v dospělosti a při stárnutí organismu (Daneman and Prat 2015). Udržují tzv. plasticitu mozku.

Výběžky astrocytů tvoří komplexní síť obklopující kapiláry a toto blízké spojení je důležité při indukci a udržování bariérových vlastností, kterých je dosaženo expresí TJs, transportérů a polarizací endotelu (Abbott et al. 2010; He et al. 2014). Zralé astrocyty tedy modulují, udržují bariéru (Abbott et al. 2010) a poskytují buněčné spojení mezi neuronálními obvody a krevními cévami. Tímto způsobem je regulován tok krve (Daneman and Prat 2015).

Buňky z monocytové linie, odvozené z kostní dřeně, vstupují do mozku během embryonálního vývoje a stávají se rezidentními, imunokompetentními buňkami CNS, tedy mikroglie (Glezer et al. 2007). Mikroglie, pericyty a nervová zakončení jsou úzce spojeny s endotelem a udržují jeho funkci (Abbott et al. 2010).

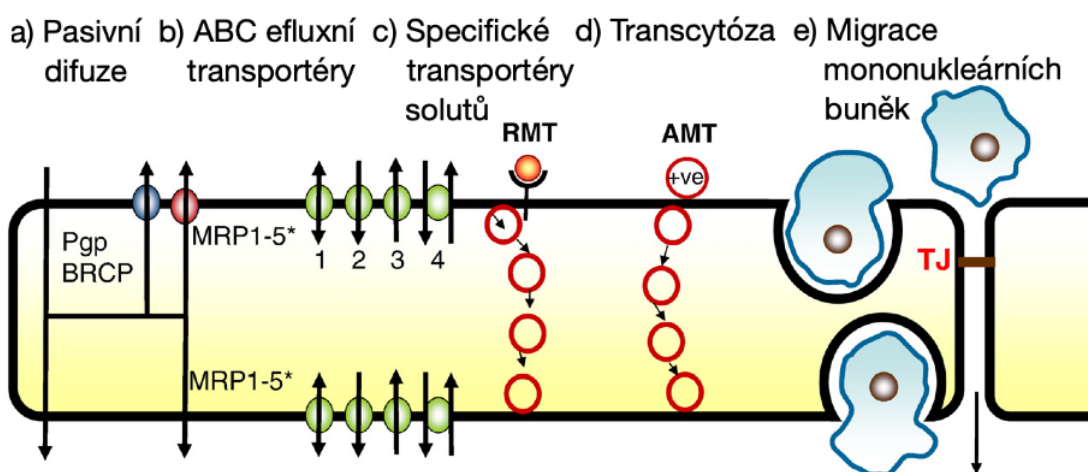
Permeabilita HEB může být regulována uvolňováním vazoaktivních peptidů a dalších mediátorů z buněk, které jsou spojeny s endotelem (Abbott et al. 2010). Dále se na udržování vaskulární permeability podílí glykokalyx, což je záporně nabitý povrch proteoglykanů,

glykosaminoglykanů a adsorbovaných plazmatických proteinů, lemujících luminální povrch endotelu. Poškození glykokalyxu posouvá rovnováhu směrem k pro-oxidačnímu stavu a následně může vést k zánětu a aterogenezi (Ueno 2007). Aby bylo dosaženo restriktivnější permeability, mají BMECs ve srovnání s periferními endotelovými buňkami nižší počet endocytických váčků, čímž je omezen transcelulární transport (Tajes et al. 2014).

BMECs regulují intracelulární dopravu dvěma hlavními mechanismy. Zatímco malé lipofilní molekuly prochází volně přes BMECs, hydrofilní molekuly jsou transportovány přes specifické transportéry a receptory (He et al. 2014).

## 2.2 Mechanismy transportu přes HEB

Pohyb rozpuštěných látek přes HEB je buď pasivní, poháněný koncentračním gradientem nebo může být usnadněn pasivními a aktivními transportéry v buněčných membránách endotelu. Pronikání široké škály rozpuštěných látek do CNS omezují efluxní transportéry. Hlavní transportní cesty jsou znázorněny na Obrázek 3 (Abbott et al. 2010).



Obrázek 3 Cesty transportu přes HEB. Modifikováno dle: Abbott et al. (2010)

### 2.2.1 Pasivní difuze

Široká škála molekul může difundovat přes HEB a vstupovat do mozku pasivně. Tento proces podporuje vyšší lipofilita molekuly a několik dalších fyzikálně-chemických faktorů. Pasivní difuzí probíhá např. přivádění kyslíku do mozku a odstraňování oxidu uhličitého, děj je závislý na průtoku krve a jeho směr na koncentračním gradientu (Abbott et al. 2010).

Naopak faktory jako vysoká polarita povrchu (PSA; z angl. polar surface area), větší než 80 Å<sup>2</sup>, tendence tvořit více než šest vodíkových vazeb (faktor, který výrazně zvyšuje potřebu

volné energie pro pohyb z vodné fáze do lipidu buněčné membrány), přítomnost rotačních vazeb v molekule, přebytečná molekulová hmotnost (nad 450 Da) a vysoká afinita vazby k plazmatickým proteinům mohou snížit penetraci do CNS (Lipinski 2004).

Ovšem existuje mnoho příkladů centrálně účinných léčiv v klinické praxi, které nejsou v souladu s těmito obecnými pravidly. Jedná se o látky a jejich metabolity, které jsou aktivně vylučovány z mozku a kapilárního endotelu tvořícího HEB pomocí ABC transportérů (z angl. ATP Binding Cassette transporter), mezi něž patří například některá antidepresiva a antiepileptika. Naopak exprese specifických transportérů solutů (SLCs, z angl. solute carriers) může usnadnit příjem léků s nízkým prostupem přes membrány do CNS (Bodor and Buchwald 2003; Ueno 2007; Abbott et al. 2010; Kis et al. 2010). SLCs usnadňují prostup do CNS například antiepileptiku gabapentinu a antiparkinsoniku L-DOPA (Pardridge 2012).

Báze, které nesou pozitivní náboj, lépe penetrují skrz HEB než kyselé látky. Pravděpodobně díky jejich kationtové povaze a interakci s negativně nabitým glykokalyxem a fosfolipidovou skupinou na vnější straně endotelové buňky (Abbott et al. 2010).

### **2.2.2 Transport solutů zprostředkovaný specifickými přenašeči**

HEB obsahuje řadu specifických transportérů rozpuštěných látek (SLCs). Jedná se o transportéry pro důležité sloučeniny, jako jsou: glukóza, aminokyseliny, organické kationty a anionty, aminy, monokarboxylové kyseliny, cholin a další látky nezbytné pro metabolismus. Některé z těchto transportních proteinů jsou vloženy pouze do luminální nebo abluminální membrány, jiné jsou součástí obou membrán endotelových buněk. Transport může být pasivní (podle koncentračního či iontového gradientu) nebo může probíhat protisměrná aktivní výměna substrátů (Abbott et al. 2010).

### **2.2.3 Efluxní transportéry**

V HEB se nacházejí ABC transportéry, jejichž význam spočívá v zajištění efluxního transportu. Fungují jako aktivní výtoková čerpadla, která spotřebovávají ATP a přepravují různorodé sloučeniny rozpustné v lipidech z endotelu mozkových kapilár a CNS. Odstraňují z mozku neurotoxické endogenní látky nebo xenobiotické molekuly a provádějí tedy vitální neuroprotektivní a detoxikační funkce. Nejvýznamnější pro exfluxní transport jsou P-glykoprotein (P-gp, Multidrug Resistance Protein, ABCB1), proteiny asociované s multirezistencí (MRPs, z angl. multidrug resistance proteins, ABCC1, 2,4, 5 a také 3 a 6) a



protein rezistence k rakovině prsu (BRCP, z angl. breast cancer resistance protein, symbol genu: ABCG2) (Abbott et al. 2010).

Multisubstrátový efluxní transportér P-gp byl jako protein plazmatické membrány nejprve demonstrován v nádorových buňkách snížením intracelulárních hladin chemoterapeutických léků. Dále se ukázalo, že P-gp je exprimován v různých tkáních, jako jsou játra, ledviny, střeva a mozek, kde slouží k ochraně tkáně před potenciálně toxickými exogenními sloučeninami. Substráty P-gp zahrnují nejen širokou škálu antineoplastických léků, ale také mnoho dalších hydrofobních sloučenin, jako jsou imunosupresivní činidla, srdeční glykosidy, opioidní analgetika, antibiotika, pesticidy, antiepileptika, antidepresiva a inhibitory proteáz viru lidské imunodeficience (Ueno 2007).

Vzhledem k jejich široké substrátové specifitě mohou tyto efluxní systémy přispět k opakované lékové rezistenci během farmakologického léčení poruch CNS, jako je např. epilepsie a nádor mozku (Naik and Cucullo 2012).

## 2.2.4 Transcytóza

Transcytóza makromolekul přes HEB probíhá prostřednictvím endocytotických mechanismů. Poskytuje hlavní cestu pro vstup hormonů, peptidů a proteinů do CNS v nezměněné podobě (Abbott et al. 2010; Tajes et al. 2014).

Tyto vezikulární mechanismy zahrnují receptory zprostředkovanou transcytózu (RMT, z angl. receptor-mediated transcytosis) nebo adsorptivně zprostředkovanou transcytózu (AMT, z angl. adsorptive-mediated transcytosis). Jejich hlavním principem je endocytóza, poté následuje transport skrz buňku a nakonec je molekula exocytována na druhé straně buňky (Abbott et al. 2010). V případě RMT je transcytóza zahájena vazbou ligandu na receptor, kdežto u AMT je třeba kladný náboj na molekule, díky němuž je zprostředkována interakce s negativně nabitými složkami membrány BMECs (Tajes et al. 2014).

Pro úspěšnou transcytózu intaktního proteinu nebo peptidu, je třeba se vyhnout enzymatickému, lysozomálnímu kompartmentu uvnitř buňky. V HEB se endosom při transportu přes buňku tomuto rozkladnému, lysozomálnímu kompartmentu vyhýbá, což je jev, který se nevyskytuje v mnoha tkáních. Pravděpodobně se jedná o specializovaný rys HEB, kde se intaktní transcytóza významného počtu makromolekul stává nutností (Nag and Begley 2005)(Nag a Begley 2005).

## 2.2.5 Migrace mononukleárních buněk

Jak již bylo popsáno výše, buňky monocytové linie odvozené z kostní dřeně vstupují do buněk mozku během embryonálního vývoje a stávají se rezidentními imunologicky kompetentními mikroglie (Glezer et al. 2007). Ovšem mononukleární leukocyty, monocyty a makrofágy mohou být rekrutovány do CNS za patologických stavů. Poté zde hrají role komplementární k rolím rezidentních mikroglíí nebo se mohou transformovat na mikroglíální fenotyp (Davoust et al. 2008; Abbott et al. 2010).

Leukocyty procházejí přes HEB buď procesem diapedézy přes endotelové buňky (blízko těsných spojovacích oblastí) nebo přes modifikovaná těsná spojení. V průběhu zánětlivých patologických stavů CNS mohou být TJs mezi endoteliálními buňkami otevřeny v důsledku působení cytokinů a jiných činitelů a mononukleární buňky pak mohou vstupovat jak transcelulárními, tak paracelulárními cestami (Abbott et al. 2010).

Bylo zjištěno, že BMECs vytvářejí na svém lumenálním povrchu membránové výčnělky, kterými obklopí mononukleární buňky a vytvoří struktury podobné šálkům. Nakonec dojde k tvorbě póru, kterým buňka projde s tím, že lumenální membrána se uzavírá ještě před tím, než se vytvoří otvor v ablumenální membráně (Wolburg et al. 2005; Abbott et al. 2010).

## 2.3 Aspekty ovlivňující prostupnost látek přes HEB

### 2.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti látek

HEB zabraňuje vychytávání většiny léčiv mozku. Transport přes HEB je přísně omezen fyzickými bariérami (TJs), metabolickými bariérami (enzymy, efluxní transportní systémy) a také funkční polaritou mezi lumenální a ablumenální částí endotelu (Persidsky et al. 2006; Pardridge 2012).

Penetrace přes HEB je jedním z nejdůležitějších parametrů, který má významnou úlohu v chemických toxikologických studiích a při designu léků. Prostup přes HEB molekulou léku zaměřenou na receptor v mozku je nezbytná pro dosažení terapeutického účinku. Na druhé straně u léčiva, které není zaměřeno na CNS, by permeabilita přes HEB mohla způsobit nežádoucí vedlejší účinky. Rychlé výpočetní metody pro screening velkých chemických databází jsou proto velmi žádoucí pro předběžný výběr slibných kandidátů léčiv (Bujak et al. 2015).

V současné klinické praxi většina léků s cílem působení v mozku vyhovují duálním kritériím pro volnou difuzi zprostředkovanou lipidy HEB. Jedná se o (1) prahovou hodnotu

molekulové hmotnosti MW 400 Da a (2) vysokou rozpustnost v lipidech, což je vlastnost ekvivalentní nízké schopnosti molekuly tvořit vodíkové vazby. V praxi jen velmi málo kandidátů na léky vyhovuje oběma kritériím. Na základě znalostí endogenních transportních systémů však mohou být léky upraveny pro transport přes HEB (Pardridge 2012).

Rozdělovací koeficient oktanol/voda ( $\log P$  o/w) se stal výhodnou standardní mírou lipofility a pravděpodobně to je jeden z nejdůležitějších fyzikálně-chemických parametrů používaných ve farmacii a medicíně.  $\log P$  má jistá omezení v predikci poměru koncentrací mozek/krev. V kombinaci s jinými parametry však může stále rozumně předvídat prostup přes HEB (Bodor and Buchwald 2003). K predikci prostupnosti látek lze využít Lipinského pravidlo pěti, které vedle  $\log P$  popisuje další parametry, které jsou popsány výše v kapitole Pasivní difuze.

Existuje obecná korelace mezi rychlostí, při které solut vstupuje do CNS a jeho rozpustností v tucích, obvykle stanovená jako  $\log D$  (distribuční koeficient) neboli koeficient oktanolu/pufry při pH 7,4. Na rozdíl od  $\log P$ , který se týká rozdělení jedné formy sloučeniny, nejčastěji neutrální,  $\log D$  obsahuje v řešení jak neutrální, tak i ionizované formy sloučeniny (Abbott et al. 2010). Pokud je znám  $\log P$  a  $pK_a$ , může být  $\log D$  odvozen pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice (Bickel 2005).

Schopnost sloučeniny proniknout HEB může být odhadnuta měřením její distribuce krev/mozek,  $\log BB$ , která je definována jako logaritmus poměrů koncentrace mozek/krev v rovnováze. Existují různé metody hodnocení distribuce léčiva v mozku: *in silico*, *in vivo* a *in vitro* modely (Bujak et al. 2015).

Jednou z možností je sestavování modelů kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou molekuly (QSAR) pro prostup přes HEB (Zhang et al. 2008). Ačkoliv Zhang et al. (2008) pro vývoj modelu použili mnoho různých typů deskriptorů, bylo zjištěno, že v šesti typech přijatelných modelů jsou nejčastěji používány následující deskriptory: PSA,  $\log P$ , počet donorů vodíkových vazeb a akceptorových atomů.

PSA byla stanovena jako důležitá vlastnost pro penetraci léčiv skrz HEB. Van de Waterbeemd et al. (1998) zjistili, že horní limit pro PSA v molekule, u které se očekává, že pronikne do mozku, je kolem  $90 \text{ \AA}^2$ . Hodnoty PSA lze vypočítat z chemické struktury a vysoce korelují s vodíkovou vazebnou kapacitou. Kromě toho je známo, že relativně lipofilní léčiva mohou procházet HEB pasivní difuzí, která je také ovlivněna jejich vodíkovou vazebnou kapacitou. Polárním molekulám průnik přes HEB usnadňují aktivní transportéry. Vazebnou afinitu mezi membránovými transportéry a organickými sloučeninami mohou ovlivňovat počty

donorů a akceptorů v molekule. Proto se jedná o důležité faktory ovlivňující permeabilitu (Bickel 2005; Zhang et al. 2008).

Bylo však zjištěno, že i další deskriptory molekul, jako jsou indexy elektrostatického stavu a deskriptory VSA (van der Waals surface area), jsou statisticky významnými faktory a mohly by přispět k predikci pasivní difuze a efluxního transportu. (Zhang et al. 2008).

### 2.3.2 Patologické stavy

Mnoho onemocnění CNS, včetně různých zánětlivých onemocnění, diabetu, rakoviny a mikrobiálních infekcí, způsobuje narušení HEB. Dysfunkce může zahrnovat změny v mnoha různých vlastnostech HEB, včetně ovlivnění TJs, transportérů, transcytózy a exprese leukocytárních adhezních molekul (LAM, z angl. leukocyte adhesion molecule). Tato porucha může vést k edému, narušení iontové homeostázy, změně signalizace a imunitní infiltraci, která vede k neuronální dysregulaci a nakonec i degeneraci. (Stamatovic et al. 2008; Daneman and Prat 2015).

Poruchy HEB na úrovni neurovaskulární jednotky mohou mít neurodegenerativní charakter (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba) nebo se jedná o poruchu se zánětlivým podkladem (infekce, mrtvice, vaskulární demence a roztroušená skleróza) (Persidsky et al. 2006). Ovšem i u neurodegenerativních onemocnění je porušení HEB spojeno s přechodnou sekrecí zánětlivých mediátorů (Stamatovic et al. 2008).

Ve zdravém CNS je nízká úroveň imunitního dozoru s velmi malým počtem neutrofilů a lymfocytů v parenchymu. Vstup leukocytů z krve do tkáně je vícestupňový proces, který zahrnuje adhezi a extravazaci, což vyžaduje řadu různých adhezivních molekul, včetně selektinů (E-selektin, P-selektin) a imunoglobuliny. Exprese těchto adhezivních molekul se zvyšuje během neurozánětlivých onemocnění jako je mrtvice a roztroušená skleróza. Jsou pozorovány různé podskupiny zánětlivých buněk, které infiltrují CNS u jednotlivých onemocnění. Například u roztroušené sklerózy dochází k infiltraci T buněk, B buněk, neutrofilů a makrofágů v místech aktivních lézí. Zatímco u mrtvice převažují infiltráty neutrofilů a makrofágů, lymfocyty jsou z velké části nepřítomny (Daneman and Prat 2015).

Mozková ischemie vede k narušení průtoku krve, zvýší se permeabilita HEB a dochází k rychlému vyčerpání základních živin a kyslíku (Persidsky et al. 2006). Použitím *in vitro* modelů HEB Mark a Davis (2002) ukázali, že hypoxie a reoxygenace zvýšily permeabilitu HEB a byly spojeny se znehodnocením TJs.

S řadou neurologických poruch souvisí změna exprese transportních systémů, která by mohla hrát roli v jejich patogenezi. Ukázalo se, že exprese P-gp inverzně koreluje s ukládáním  $\beta$ -amyloidu u Alzheimerovy choroby. Nadměrná exprese transportérů v HEB je popsána u epilepsie. P-gp je také up-regulován po fokální cerebrální ischemii. Naopak ke snížení aktivity P-gp dochází u Parkinsonovy choroby (Persidsky et al. 2006).

Další důležité dopravní systémy, například GLUT1 (transportér pro glukózu 1) zodpovědný za dodávku glukózy do mozku, jsou také ovlivněny různými chorobnými stavy, jako je trauma mozku, epilepsie, ischemie a Alzheimerova choroba (Guo et al. 2005).

Je zřejmé, že narušení HEB se u mnoha onemocnění jeví jako multimodální. Roste vezikulární transport, dochází k poškození úzkých spojovacích řetězců, ke změnám endoteliálního transportu a metabolických procesů. Zůstává ovšem nejasné, jak tyto procesy interagují navzájem (Daneman and Prat 2015).

## 2.4 Metody pro predikci prostupnosti látek přes HEB

### 2.4.1 *In vivo* metody

Míra, do jaké látka z krevního oběhu získává přístup k CNS, musí být stanovena pro potenciální neurofarmaka i pro kandidáty na léčiva s primárními cíli na periférii (Helms et al. 2016).

I když techniky *in vivo*, jako je perfuze mozku, patří k nejpřesnějším metodám pro hodnocení permeability potenciálních kandidátů na léčiva přes HEB, přímé testování *in vivo* není vždy nejlepší možností v časných fázích výzkumu. V časné fázi je nezdědka žádoucí screening kombinačních knihoven sloučenin. Nevýhodou jsou také mezidruhové rozdíly mezi lidmi a laboratorními zvířaty, např. hlodavci, kteří jsou běžně užívaní v preklinickém testování (Banerjee et al. 2016).

Omezený translační význam, vysoké náklady a pracnost při vývoji vhodného modelu (např. transgenních nebo inbredních kmenů), jsou další faktory, které vedou k upřednostnění paralelních *in vitro* přístupů alespoň v prvotních fázích výzkumu (Naik and Cucullo 2012).

## 2.4.2 *In vitro* metody

Reprodukce fyziologických charakteristik *in vitro* představuje kritický biotechnologický průlom. *In vitro* modely založené na primárních nebo imortalizovaných buněčných kulturách pomáhají vědcům pochopit mechanismy, které se podílejí na cerebrovaskulární odezvě na řadu fyziologických a patologických podnětů a slouží také pro *in vitro* studie transportu léčiv. Získané poznatky poskytují možnosti k urychlení vývoje nových alternativních a účinnějších strategií zaměřených na cíle CNS (Naik and Cucullo 2012; Helms et al. 2016).

*In vitro* modely HEB mají řadu výhod: (1) nákladová efektivita – jsou relativně levné v porovnání s experimenty na zvířatech, s výrazně vyšším výkonem pro testování permeability léčivých látek (kvalita nejžádanější ve farmaceutickém průmyslu); (2) zjednodušené pracovní prostředí – umělé prostředí poskytované těmito *in vitro* modely umožňuje studovat a manipulovat s HEB bez dalších proměnných, které je třeba vyřešit při práci s celým organismem; (3) všestrannost – možnost využití široké škály podmínek/stimulů těžko proveditelných *in vivo* (Naik and Cucullo 2012).

Existuje řada závažných nedostatků spojených s použitím *in vitro* systémů. Buňky kultivované *ex situ* podléhají dediferenciaci kvůli nedostatečnému vystavení fyziologickým faktorům. To může ovlivnit expresi relevantních buněčných biologických znaků (např. transportérů, ligandů, enzymů apod.). Tím se potenciálně mění fyziologie *in vitro* HEB, stejně jako její reakce na endogenní a exogenní stimuly. Z tohoto důvodu je nezbytné ověřit zjištění *in vitro* v podmínkách *in vivo*. I když je stále nad našimi schopnostmi reprodukovat všechny složité funkce HEB, existuje několik zásadních požadavků, které by měl splňovat ideální *in vitro* model (viz Tabulka 1) (Naik and Cucullo 2012).

Tabulka 1 Funkční a strukturální požadavky na ideální *in vitro* model k napodobení *in vivo* situace v HEB. Převzato z: (Naik and Cucullo 2012).

	⇒ <i>těsných a adherentních spojení</i>
	⇒ <i>enzymů</i>
• Exprese	⇒ <i>efluxních systémů</i>
	⇒ <i>transportérů</i>
• Zanedbatelná paracelulární difuze	
• Selektivní a asymetrická permeabilita pro ionty	
• Laminární smykové napětí	
• Přítomnost glií, pericytů a jiných buněk	
• Mezibuněčná komunikace	
• Reprodukovatelnost širokého spektra podnětů	
• Škálovatelnost a nákladová efektivita	

#### 2.4.2.1 Izolované mikrokapiláry

Izolované mozkové mikrokapiláry byly úspěšně použity k identifikaci mechanismů a biochemických signálů, které hrají roli při regulaci funkcí HEB jak ve fyziologických, tak v patologických stavech (Palmiotti et al. 2014).

Hlavní výhodou jejich použití je zachování strukturálních a buněčných charakteristik v experimentu *ex vivo*. Mezi další výhody patří dostupnost a rozsáhlý počet dobře zdokumentovaných metod k získání purifikovaných mozkových kapilár. Naopak existuje řada nevýhod, které je třeba vzít v úvahu: (1) izolační postupy jsou poměrně obtížné a náročné na pracovní sílu a navzdory pokroku v purifikačních technikách je potenciální přítomnost neuronů a/nebo jiných nečistot nezanedbatelná; (2) omezená životaschopnost vaskulárního endotelu způsobená metabolickými nedostatky během izolace cévy. Vzhledem k těmto omezením byly vyvíjeny různé přístupy výzkumu založené na výpočetních modelech, umělých membránách a systémech buněčné kultury *in vitro* (Naik and Cucullo 2012).

#### 2.4.2.2 Zkouška paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA)

Zkoušky paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA, z angl. Parallel Artificial Membrane Permeation Assay) se staly užitečným a všestranným *in vitro* nástrojem pro předpovídání prostupnosti léčiv přes specifické fyziologické membrány *in vivo* (Di et al. 2003; Naik and Cucullo 2012). PAMPA byla poprvé zavedena Kansy et al. (1998) jako vysoce

výkonný permeační test pro predikci perorální absorpce. Dále byly PAMPA testy modifikovány pro predikci průniku přes HEB použitím membrány tvořené lipidem z mozku prasete (PBL, z angl. porcine Polar brain lipid) (Palmiotti et al. 2014).

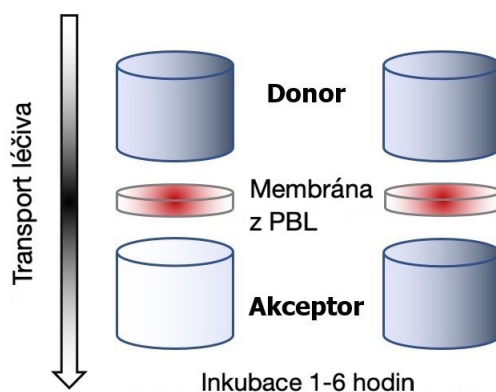
PAMPA zkoušky jsou založeny na pasivní difuzi, což je jeden z mechanismů prostupu látek přes membránu. Pasivní difuze je důležitá cesta v absorpci léků napříč většinou fyziologických membrán. Proto se PAMPA považuje za vhodnou alternativu v časném stupni screeningu, za kterou následují časově náročnější a finančně nákladnější testy využívající např. buněčné kultury (Naik and Cucullo 2012).

Principem zkoušky je měření permeability (permeačního koeficientu,  $Pe$ ) sloučeniny přes speciálně konstruovanou membránu. Ta je tvořena PBL a vytváří rozhraní mezi donorovým a akceptorovým oddílem. Do donorových částí s takto připravenou membránou jsou pipetovány roztoky testovaných látek. V akceptorovém oddílu je na začátku experimentu pouze pufr ve stejném objemu jako testovaná látka v donoru (Di et al. 2003). Jedná se o takzvané „sendvičové“ uspořádání. V průběhu inkubace mohou látky volně difundovat přes membránu z donorové části systému do akceptorové. Koncentrace testované látky v obou kompartmentech je po inkubaci měřena v určitých časových intervalech (viz Obrázek 4). Koncentrace se stanoví spektrofotometricky, případně pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou (UHPLC-MS) detekcí. Z údajů jednotlivých koncentrací se počítá  $Pe$  testovaných sloučenin (Di et al. 2003; Naik and Cucullo 2012).

Systém lze upravit k posouzení vlivu širokého rozmezí pH na prostup testovaného léčiva. Je tedy možné testovat účinek fyziologického pH nebo pH gradientu, kterým je vystaven specifický orgán/membrána *in vivo* (Velický et al. 2010).

Výhodou PAMPA metody je reprodukovatelnost, rychlost a nenáročnost metody spolu s finanční přívětivostí a malou spotřebou vzorku. Hlavním omezením systému PAMPA oproti modelům založeným na buňkách a studiím *in vivo* je však jejich neschopnost reprodukovat aktivní transportní mechanismy (influx a/nebo efflux) nebo metabolické transformace. To může významně ovlivnit předvídatelnost biologické dostupnosti léčiva v cílovém místě, a proto by použití samotné PAMPA metody bylo nedostatečné. PAMPA zahrnuje pouze zákonitosti prostupu závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech. Kombinace PAMPA s *in silico* metodami a použití složitějších algoritmů mohou dále rozšiřovat použití toho modelu nad skenovací nástroj raného stupně výzkumu (Di et al. 2003; Naik and Cucullo 2012).





Obrázek 4 Znáznornění PAMPA systému.

### 2.4.2.3 Buněčné modely

Tato práce popisuje nejpoužívanější *in vitro* modely HEB, včetně nově vyvinutých mikrofluidních modelů a analyzuje jejich výhody a nevýhody. Na základě toho, zda na buňky působí smykové napětí (SS, z angl. shear stress), jsou tyto modely rozděleny na statické a dynamické. Vzhledem k tomu, že žádný z nich plně nenapodobuje podmínky *in vivo*, neexistuje dokonalý *in vitro* model HEB (He et al. 2014).

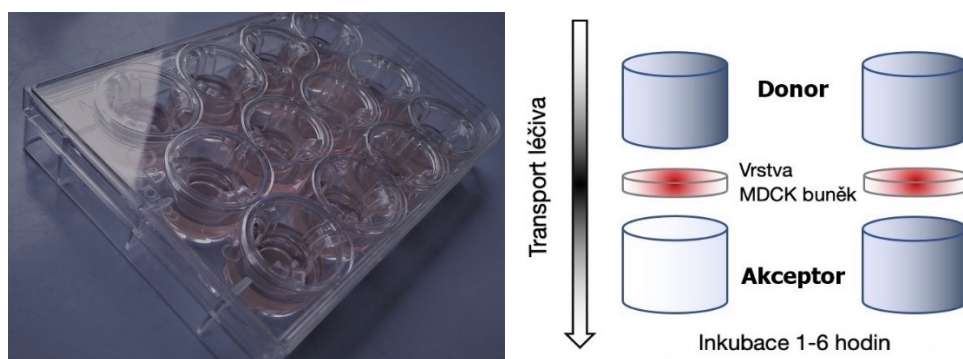
#### Statické modely

Statické modely nereplikují smykové napětí vyvolané proudem krve v podmínkách *in vivo*. Podle počtu zahrnutých buněčných typů se statické modely HEB dále kategorizují na modely využívající monovrstvu nebo kokultivní modely (He et al. 2014).

#### Monovrstvé modely:

Jedná se o nejběžnější a nejvíce používané modely. Modely jsou tvořeny monovrstvou buněk, která je pěstována ve vložce Transwellu (Naik and Cucullo 2012).

Transwell (např. Corning, Lowell, MA) je vertikální oboustranně difuzní systém (víceúrovňová destička), který vede přes mikroporézní (0,4 $\mu$ m) semipermeabilní membránu, která umožňuje volný průchod živin a růstových faktorů mezi luminální a abluminální částí. Insert napodobuje krevní (luminální) stranu, zatímco jamka, ve které insert sedí, napodobuje parenchymální (abluminální) stranu (viz Obrázek 5). Mezi nejběžněji používanou monovrstvou patří BMECs (z různých zdrojů: hovězí, hlodavčí, prasečí, primát a člověk). Buňky se pěstují až do dosažení konfluence na horním (luminálním) povrchu membrány, ponořené do specifických růstových médií (Naik and Cucullo 2012; He et al. 2014).



Obrázek 5 Znáznornění Transwell aparátu.

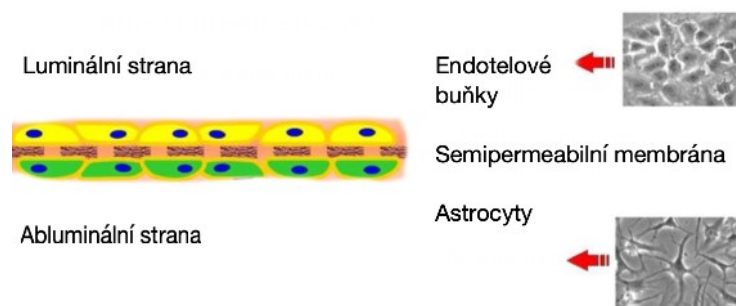
Výhody kultivovaného endotelu zahrnují potenciál použití populací čistých buněk stejně jako jejich relativní životaschopnost ve srovnání s izolovanými arterioly *ex situ* (Naik and Cucullo 2012). Vzhledem ke své vnitřní jednoduchosti tento model umožňuje vysoce výkonné testování permeability léčiv a měření vazebné afinity mezi receptorem a ligandem (Berezowski et al. 2004).

Shromážděné důkazy ukazují, že si BMECs zachovávají mnoho biochemických a morfologických vlastností, které charakterizují HEB *in vivo*, jako je přítomnost TJs a polarizovaná exprese transportérů, receptorů a enzymů (Cecchelli et al. 2007). Nicméně se stále jedná o poměrně zjednodušenou rekonstrukci HEB, která postrádá řadu kritických vlastností, které jsou nezbytné pro vývoj skutečných vlastností HEB *in vitro*. Absence přirozených fyziologických podnětů, jako je interakce buněk s perivaskulárními astrocyty a jinými parenchymálními buňkami (např. neurony), či nevystavení intraluminálnímu SS a oběhu krevních buněk (Hamm et al. 2004; Naik and Cucullo 2012). Kromě toho tento nefyziologický kultivační stav může urychlovat endoteliální dediferenciaci a zvyšovat ztrátu charakteristik HEB sériovou pasáží buněk (Betz and Goldstein 1978).

Endotelové buňky (ECs, z angl. endothelial cells) pěstované v systému Transwell mají tendenci získávat nepravidelné vzory buněčné adheze, což vyvolává takzvaný „okrajový efekt“. Ten se projevuje jako neschopnost vytvářet správné TJs mezi sousedními buňkami a mezi endotelem po obvodu membrány a vnitřní stěnou luminální komory, což vede k artefaktální paracelulární difuzi, která ovlivňuje spolehlivost měření propustnosti napříč endoteliální monovrstvou. Toto je zvláště důležité při testování vysoce hydrofilních sloučenin, které omezeně prostupují přes dvojvrstvé lipidové membrány buněk pasivní difuzí (Naik and Cucullo 2012).

### **Modely kokultu:**

Pro důvěryhodnější napodobení anatomické struktury HEB *in vivo* se BMECs kultivují s dalšími buňkami, které přímo přispívají k bariérovým vlastnostem HEB. Jedná se o gliové buňky, pericyty a dokonce i neurony (viz Obrázek 6) (He et al. 2014).



Obrázek 6 Příklad modelu kokultu. Kultivace endotelových buněk s astrocyty. Modifikováno dle: (Palmiotti et al. 2014).

### ***Kokultury endotelových buněk s astrocyty***

BMECs jsou kultivovány s astrocyty pro zlepšení jejich bariérových vlastností. Interakce mezi BMECs a astrocyty zvyšuje expresi transportérů (např. GLUT-1, P-gp), přispívá k pevnosti TJs, indukuje tvorbu buněčné polarity v BMECs a podporuje fenotyp, který blíže napodobuje HEB *in vivo* (Naik and Cucullo 2012; He et al. 2014). Tento *in vitro* model byl aplikován ke zkoumání endoteliální patofyziologie, propustnosti endoteliální bariéry a mezibuněčné komunikace. Dále je možno sledovat účinek volných radikálů během mrtvice imitací snížených hladin kyslíku a glukózy (Yang et al. 2012; Szoleczky et al. 2012).

BMECs jsou naočkovány do vložky Transwellu a astrocyty se pěstují buď na spodní straně vložky Transwellu, nebo na dně jamky, ve které je vložka umístěna (He et al. 2014).

Transendoteliální elektrický odpor (TEER, z angl. transendothelial electrical resistance), který měří iontovou vodivost přes HEB, je typicky vyšší v systémech kokultury než v monokulturách. Vyšší hodnoty znamenají vytvoření přísnějšího a selektivnějšího modelu cévní vrstvy (Naik and Cucullo 2012). Ovšem hodnoty TEER získané z modelu kokultivace BMECs-astrocytů jsou nižší, než hodnoty v podmínkách *in vivo*, což naznačuje, že i další buňky přispívají k celistvosti HEB (Gumbleton and Audus 2001).

### ***Kokultury endotelových buněk s pericyty***

Bylo prokázáno, že kokultura BMECs s pericyty zvyšuje TEER u potkaních modelů a ukázalo se, že pericyty indukují expresi MRP6 v endotelových buňkách (Wilhelm et al. 2011). Také indukují sekreci matrixové metaloproteinázy (MMP) v endotelových buňkách (Zozulya et al. 2008). Pericyty produkují TGF- $\beta$ , který indukuje bariérovou těsnost a up-regulovanou aktivitu P-gp v endotelové buněčné linii myšího mozku (MBEC4) kokultivované s krysími pericyty (Banerjee et al. 2016).

### ***Kokultury endotelových buněk s astrocyty a pericyty***

V návaznosti na dvojkultury byl charakterizován trojitý model kultivace zahrnující endotelové buňky, astrocyty a pericyty, jenž vykazoval vysokou TEER a nízkou propustnost (Wilhelm et al. 2011). Přestože přímá komunikace mezi astrocyty a BMECs/pericyty chybí, model zahrnuje nepřímý účinek astrocytů na regulaci HEB prostřednictvím sekretovaných rozpustných faktorů. Jak bylo očekáváno, tento trojitý model kokultury má výrazně vyšší TEER a nižší permeabilitu, což naznačuje, že pericyty i astrocyty přispívají k celistvosti HEB. Model s trojitou kulturou je tedy spolehlivější. Tato kokultura může být také použita jako ischemický reperfuzeční model pro patofyziologické studie nebo rozsáhlý screening potenciálních kandidátů na léčiva (He et al. 2014).

### ***Kokultury endotelových buněk s neurony***

K výše uvedeným buněčným typům se již také neurony a další buněčné typy kultivovaly s BMECs. Neurony udržují úzké spojení s astrocyty. Mohou tak nepřímo regulovat permeabilitu HEB modulací vlastností BMECs prostřednictvím astrocytů. Model také prokázal zvýšenou expresi P-gp a ZO-1. Bylo prokázáno, že neurony v HEB indukují expresi enzymů a okludinu a také významně snižují únik sacharózy v modelu kokultivace BMECs-astrocytů. Makrofágy v kokulturách s BMECs významně zvýšily TEER. Buněčné směsi odvozené z neurálních progenitorových buněk, včetně neuronů, astrocytů, oligodendrocytů a proliferujících nervových progenitorů také ukázaly, že indukují fenotyp HEB u BMECs potkanů (He et al. 2014; Banerjee et al. 2016).

Modely kokultury lépe odrážejí anatomickou strukturu HEB *in vivo*. Vytvářejí přísnější bariéru a jsou ideální pro studie permeability, vzájemné interakce buněk a vývoj nových léčiv. Hlavním nedostatkem kokultur je nepřítomnost SS, které hraje kritickou roli v indukci a udržení fenotypu HEB (Siddharthan et al. 2007; Tarbell 2010).

## **Dynamické modely**

Smykové napětí generované proudem krve ve fyziologických podmínkách ovlivňuje expresi transportérů, TJs a tím pádem i funkci endoteliální bariéry. Bylo prokázáno, že začlenění průtoku do modelů významně zvyšuje expresi ZO-1 a snižuje propustnost lidské BMECs monovrstvy. Proto byly vyvinuty dynamické modely HEB, které zahrnují SS. Existují 3 hlavní typy dynamických modelů HEB: Cone-Plate Apparatus, dynamický *in vitro* model a mikrofluidní *in vitro* model (He et al. 2014).

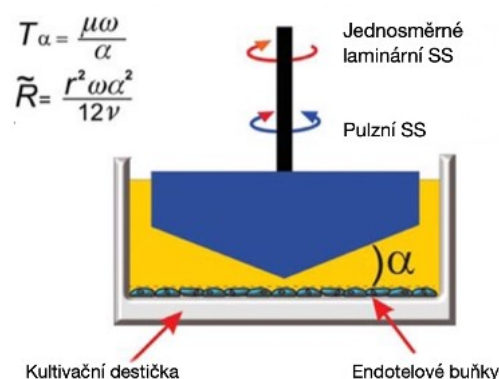
### **Cone-Plate Apparatus**

Použití kuželového a destičkového viskozimetru bylo prvním pokusem, jak vystavit model endoteliální vrstvy průtoku tekutiny *in vitro*. V tomto modelu rotující kužel generuje SS, které se přenáší na endoteliální monovrstvu přes médium (viz Obrázek 7). Úhlová rychlost a úhel kužele určují úroveň vygenerovaného SS. Vzhledem k tomu, že SS není rovnoměrně rozloženo podél poloměru desek, endotelová monovrstva přijímá odlišné SS v závislosti na svém umístění v deskách (He et al. 2014). Zařízení s kuželovými destičkami představuje první pokus o zavedení laminárního nebo turbulentního toku *in vitro* ke studiu jeho vlivu na fyziologii HEB (Naik and Cucullo 2012).

Laminární SS hraje hlavní roli v endoteliální fyziologii HEB, jako je podpora těsnosti buněk, exprese mechanismů rezistence vůči lékům, iontových kanálů a dalších specializovaných transportních systémů. SS může modulovat i bioenergetické chování endotelu (Cucullo et al. 2011). Předchozí studie rovněž ukázaly, že SS indukuje tvorbu vazoaktivních látek (Ando and Kamiya 1996).

Při zkoumání vlivu turbulentního SS bylo zjištěno, že má zcela odlišný účinek na endoteliální fyziologii HEB. Včetně zvýšené proliferace buněk, ztráty těsnosti HEB a zvýšené transendoteliální propustnosti (Naik and Cucullo 2012).

Tento systém však sám o sobě nebyl navržen tak, aby reprodukoval tok a prostředí, které se nachází ve vaskulárním endotelu *in vivo*, jelikož do tohoto modelu nejsou zahrnuty jiné buněčné komponenty HEB, jako jsou astrocyty a pericyty, což zapříčiňuje omezení plné diferenciace buněk. Tím pádem se snižuje spolehlivost a význam dat, které generuje. Kvůli těmto nedostatkům vedl výzkum k vývoji nových generací dynamických *in vitro* systémů (Naik and Cucullo 2012; He et al. 2014).



Obrázek 7 Cone-plate apparatus. Endotelová monovrstva může být vystavena kvazi/uniformnímu laminárnímu nebo pulznímu smykovému napětí (SS).  $\mu$  je viskozita,  $\nu$  je kinematická viskozita,  $\omega$  je úhlová rychlost a  $\alpha$  je úhel kužele. Kuželový úhel a úhlová rychlost určují hladinu SS, kterému je endotel vystaven. Modifikováno dle (Naik and Cucullo 2012).

### **3D Dynamické in vitro modely hematoencefalické bariéry**

V 3D dynamickém *in vitro* modelu HEB (DIV-BBB, z angl. Dynamic *in vitro* blood-brain barrier model) se cerebrální endotelové buňky kultivují na vnitřní (luminální) i vnější (abluminální) straně polypropylenových mikroporézních dutých vláken pokrytých fibronektinem v přítomnosti astrocytů. Svazek těchto dutých vláken je umístěn do uzavřené komory opatřené elektrodami pro průběžné monitorování TEER. Buňky jsou pod expozicí kvazi-fyziologického pulsatilního laminárního SS. To umožňuje tvorbu modelu HEB, který se podobá *in situ* jak funkčně, tak anatomicky. Lze použít primární (komerčně dostupné nebo čerstvě izolované) nebo immortalizované buněčné linie. Do modelu lze zařadit další relevantní buněčné typy, dokonce i pericyty a neurony (Naik and Cucullo 2012; He et al. 2014; Banerjee et al. 2016).

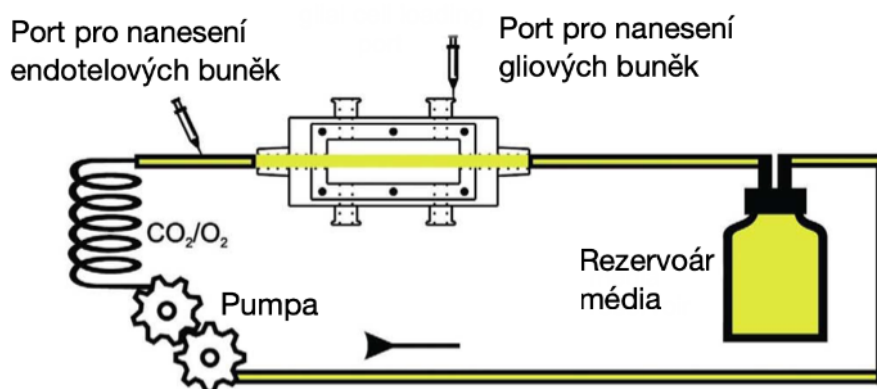
Použití těchto 3D umělých dutých vláken představujících kapilární geometrii poskytlo větší povrchovou plochu pro komunikaci mezi buňkami a zlepšilo prostředí pro působení SS. Tento typ modelu byl původně vyvinut a rozsáhle studován Cucullo et al. (2002).

Kultivační médium se pumpuje do systému pomocí čerpadla s proměnlivou rychlostí, aby bylo dosaženo SS srovnatelného s tím, které se projevuje ve fyziologických podmínkách *in vivo*. Pro udržení stabilního mikroprostředí je potrubní systém připojující kapiláry k nádrži s médiem propustný pro plyn a umožňuje výměnu  $O_2$  a  $CO_2$ . Porty umístěné na obou stranách modelu umožňují přístup k luminálním a abluminálním oddělením (viz Obrázek 8). DIV-BBB umožňuje reprodukci více funkčních vlastností a fyziologických reakcí pozorovaných v HEB *in situ*. Jedná se o nízkou permeabilitu pro intraluminální draselné a polární molekuly (např. sacharózu a další paracelulární markery), vysokou TEER, zanedbatelnou extravazaci bílkovin,

expresi specializovaných transportérů, iontových kanálů a efluxních systémů (např. GLUT-1 a P-gp) (Naik and Cucullo 2012).

Tento dynamický *in vitro* model HEB umožňuje souběžný oběh krevních buněk, který je možno použít pro studium patofyziologie různých onemocnění CNS souvisejících s reologickými poruchami, zánětem, či hypoperfuzí. Nedávno revidované systémy DIV-BBB umožňují přenos buněk přes tuto umělou HEB, což dále rozšiřuje použitelnost modelu ke studiu a charakterizaci role HEB v patogenezi neuroinflamačních onemocnění (např. meningitida, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba atd.). Stejný počítačově řízený čerpací mechanismus lze využít pro reprodukci reologických rysů i v jiných vaskulárních oblastech, například v žilách a velkých tepnách (Naik and Cucullo 2012).

Vzhledem k nedávným trendům ve farmaceutické oblasti a klinickým zájmům o studium CNS existuje řada omezení u tohoto modelu HEB. Přesněji řečeno, jeho konstrukce neumožňuje přímou vizualizaci endoteliální morfologie v luminálním oddělení. I když buňky mohou být charakterizovány po ošetření trypsinem, může proces sběru změnit morfologii a fyziologické vlastnosti buněk. Na rozdíl od běžných statických modelů (např. Transwell), toto zařízení není navrženo pro vysoce výkonnou farmaceutickou studii. Technická náročnost a čas potřebný k vytvoření systému jsou u dynamických modelů podstatně vyšší než u statických. Kromě toho je počáteční požadavek na počet buněk pro sestavení modelu poměrně významný ( $>1 \times 10^6$  buněk), zejména pokud se mají používat primární kultury. Navíc doba, než se ustálí TEER může být 9-12 dní. Tento model však může být užitečný při validaci/optimalizaci „lead compound“ ve výzkumu a vývoji nových léčiv (Naik and Cucullo 2012; He et al. 2014).



Obrázek 8 Dynamický *in vitro* model HEB. Modifikováno dle (Cucullo et al. 2002).

### **3D extracelulární in vitro modely založené na matrix a modely sféroidální**

V těchto modelech se buňky pěstují v gelových maticích umožňujících jejich volnou migraci a komplectaci. BMECs v gelových maticích obsahujících proteiny extracelulární matrice (ECM, z angl. extracellular matrix) vytvářejí trubkovité konstrukce („lešení“), které jsou obklopené pericyty a astrocyty. Ve sféroidních modelech jsou buňky schopné se samovolně sestavit bez „lešení“ a tvoří kulovité celulární agregáty, ve kterých jsou pericyty a astrocyty obklopeny vrstvou BMECs (Ruck et al. 2015).

Tyto *in vitro* modely poskytují alternativu k použití umělých kapilárních strukturních nosičů (např. DIV-BBB). Trojrozměrné systémy kultivace na bázi ECM umožňují úzkou interakci mezi buňkami a tvorbu biochemické expozice podobné jako *in vivo*. Na buňky zde působí také příslušné trofické a diferenciacní faktory. Skrz tyto faktory je zajištěna komunikace mezi buňkami. S nedávným pokrokem ve vývoji mikrofluidních systémů je nyní možné sledovat migraci buněk ve 3D prostředí s přímou aplikací na metastázy rakoviny a studie angiogeneze (Naik and Cucullo 2012).

Jejich nevýhodou je vysoká cena, obtížnost nastavení/ovládání a nedokonalé napodobení maticové architektury *in vivo*. Některé aspekty fyziologie HEB, jako jsou buněčná migrace a řízené transportní mechanismy, potřebují ještě sofistikovanější techniky a zařízení. Například 3D mikrofluidní systémy (Naik and Cucullo 2012; Ruck et al. 2015).

### **3D mikrofluidní modely HEB**

Buňky byly trojrozměrně imobilizovány v mikrofluidním kanálu pomocí dynamického očkovaní přes mikropilární pole. Imobilizované buňky v mikrofluidním kanálu se pak stabilizují a podepírají 3D maticemi, které jsou vytvořeny laminární proudovou koacervační reakcí polyelektrolytů (Ruck et al. 2015).

Ve srovnání s relativně podobným modelem DIV-BBB mají tyto mikrofluidní *in vitro* modely mnoho výhod. Tenčí membrány umožňují studie transportu ve stavu, který lépe napodobuje strukturu HEB *in vivo*. Další výhodou je možnost nedestruktivní mikroskopie díky průhlednosti materiálů a pokročilým zobrazovacím technikám. Navíc k dosažení ustáleného stavu TEER je zapotřebí třikrát až čtyřikrát méně času (3-4 dny) než v DIV-BBB modelech. Tyto modely pro sestavení vyžadují pouze malé množství buněk a jsou méně náročné na technické dovednosti. Na druhé straně mají také určité nedostatky. Například hodnota TEER není u těchto modelů dostatečně vysoká, což může být kvůli krátké době inkubace v kultuře (3-4 dny). Vliv inkubační doby na TEER je zatím předmětem výzkumu (Booth and Kim 2011, 2012).



### ***Dynamické modely shrnutí***

Žádný ze současně dostupných modelů nelze celkově hodnotit jako ideální. Ideální model by měl poskytnout fyziologickou expresi a organizaci TJs tak, aby byla významně omezena paracelulární difuze. BMECs by měly být polarizovány vlastnostmi lumenálních a ablumenálních transportních systémů *in vivo*. Nacházely by se zde funkční efluxní, metabolické a katalytické mechanismy. Ideální model má reprodukovat *in vivo* bariérové vlastnosti, jako je TEER a koeficienty permeability podle hydrofilních vlastností a velikosti molekul. Transmigrační procesy by byly přísně regulovány a závislé na vzájemných interakcích mezi buňkami. Model by měl představovat dynamický systém reagující na hemodynamické, nutriční, zánětlivé a farmakologické podněty. 3D modelování HEB a modulace laminárního SS by měly být součástí vývoje ideálního modelu. V neposlední řadě se očekává, že model bude uživatelsky přívětivý a nákladově efektivní (He et al. 2014).

## **2.5 Tabulka pro zhodnocení buněčných linií**

Tabulka 2 Zhodnocení výhod a nevýhod vybraných buněčných monokultur jako modelů HEB

	<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>
<b>MDCK</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ snadná a rychlá kultivace</li><li>✓ možnost genetické modifikace lidským genem např. na linii MDCK-MDR1 s významným efluxem</li><li>✓ vysoké hodnoty TEER</li><li>✓ exprese transportérů pro organické kationty (OCT2), peptidy a monokarboxylové kyseliny</li><li>✓ proteiny MRp1, Mrp2 a 5</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ rozdílná exprese transportérů v porovnání s HEB</li><li>✓ nižší korelace v případě měření pasivní difuze</li><li>✓ epiteliální buňky</li><li>✓ psí gen Mdr1</li></ul>
<b>hBMEC</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ modely řady neurologických etiologií, které nelze provádět s živočišnými buňkami</li><li>✓ fyziologicky podobné s HEB buňkami</li><li>✓ přítomnost TJs, transportérů a efluxních mechanismů</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ náročná izolace z mozkové tkáně</li><li>✓ stárnutí buněk po několika málo cyklech dělení</li><li>✓ vysoké náklady</li></ul>

<b>hCMEC / D3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ dostupnost a nízká variabilita mezi izolovanými šaržemi</li> <li>✓ exprese SLCs, MRP-4, BCRP, P-gp</li> <li>✓ lidský původ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ snížená exprese klaudinu-5</li> <li>✓ nízké hodnoty TEER</li> </ul>
<b>Caco-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ možnost modifikovat na buňky s vysoce aktivními P-gp (VB-Caco-2)</li> <li>✓ efluxní transportéry včetně P-gp</li> <li>✓ exprese SLCs</li> <li>✓ přítomnost c-glutamyltranspeptidáza a alkalické fosfatázy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ necerebrální původ</li> <li>✓ rozdíly v TJs a expresi transportérů oproti HEB</li> <li>✓ kultivace 14 až 28 dní</li> <li>✓ nízká a variabilní aktivita P-gp oproti HEB</li> <li>✓ nádorová buněčná linie</li> </ul>
<b>BBMEC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ exprese klaudinu-5, ZO-1 a okludinu</li> <li>✓ vysoké TEER</li> <li>✓ exprese P-gp a genů pro Mrp 4, 5 a 6</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ náročná izolace, vysoké náklady</li> <li>✓ rozdíly mezi jednotlivými liniemi</li> <li>✓ obtížná reprodukovatelnost</li> </ul>
<b>RBE4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ exprese kationtových, karnitinových, serotoninových transportérů</li> <li>✓ P-gp</li> <li>✓ exprese klaudinu-5, okludinu and ZO-1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ down-regulovaná exprese řady ABC transportérů, včetně P-gp, BCRP</li> <li>✓ nízké hodnoty TEER</li> <li>✓ snížená exprese <math>\gamma</math>-glutamyltransportéru-1 a alkalické fosfatázy</li> </ul>

*Vysvětlivky: MDCK: Madin–Darby Canine Kidney cells, MDCK-MDR1: Madin–Darby Canine Kidney cells transfected with human MDR1 gene, hCMEC / D3: Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line, hBMEC: Human Brain Microvascular Endothelial cells, Caco-2: human colon carcinoma cell line, BBMEC: Bovine Brain Microvascular Endothelial Cells, RBE4: immortalized cell line of rat cerebral capillary endothelial cells. Čerpáno z: (Banerjee et al. 2016; Dubey et al. 2019; Hellinger et al. 2012; Helms et al. 2016; Friedrich et al. 2003; Volpe 2011; Wilhelm et al. 2011)*

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjištění korelace mezi dvěma *in vitro* metodami pro hodnocení prostupu přes HEB na základě testování setu standardních léčiv. Jedná se o metodu PAMPA a metodu využívající MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) buněčnou linii. Dále porovnání metod především z hlediska praktického využití. Partikulárním cílem bylo určit vliv koncentrace DMSO (dimethylsulfoxid) na prostup látek lipidovou membránou, kterou využívá PAMPA.

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Použitý materiál

### 4.1.1 Přístroje a pomůcky:

**Centrifuga Universal 320 R** Hettich Schoeller

**Multidetekční reader Synergy HT**, BioTek

**Analytické váhy CPA225**, Sartorius Stedim Biotech

**Ultrazvuková lázeň**, Bandelin Sonorex

**Vodní lázeň**, PolyScience

**Automatické pipety Research plus**, Eppendorf

**Vortex Mixer Wizard**, Velp Scientifica

**UV permeabilní titrační desky Merck Millipore**, MAIPN 4550

**Eppendorf Tubes 2.0 ml**, Eppendorf AG

**Eppendorf Tips 50-1000 µl**, Eppendorf AG

**Centrifuge Tubes 50 ml**, TPP

**Transwell** o vel.pórů 0,4 µm, Sigma-Aldrich (3402)

### 4.1.2 Chemikálie:

**Dimethyl Sulfoxide for Molecular Biology**, Sigma-Aldrich

**Dodecane**, Sigma-Aldrich

**Polar Brain Lipid Extract**, Avanti Polar Lipids

**Fosfátový pufr Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline pH = 7.4**, Sigma-Aldrich

**Dulbecco's Modified Eagle medium**, Sigma-Aldrich; D6429

**Opti-MEM I (1X)**, Gibco

**Trypsin-EDTA (0, 25%)**, Sigma-Aldrich

**FITC-dextran**, Sigma-Aldrich

### 4.1.3 Standardní látky

**Atenolol**, Sigma-Aldrich

**Cefuroxim**, Sigma-Aldrich

**Kofein**, Sigma-Aldrich

**Desipramin**, Sigma-Aldrich

**Donepezil**, Sigma-Aldrich

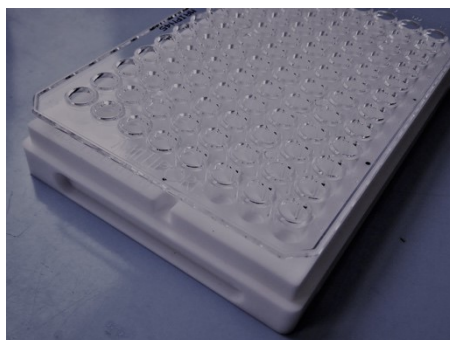
**Estradiol**, Sigma-Aldrich

**Chlorpromazin**, Sigma-Aldrich  
**Imipramin**, Sigma-Aldrich  
**Piroxikam**, Sigma-Aldrich  
**Rivastigmin**, Sigma-Aldrich  
**Takrin**, Sigma-Aldrich  
**Theofylin**, Sigma-Aldrich  
**Testosteron**, Sigma-Aldrich  
**Ranitidin**, Sigma-Aldrich  
**Sulfasalazin**, Sigma-Aldrich  
**Chlorothiazid**, Sigma-Aldrich  
**Furosemid**, Sigma-Aldrich

## 4.2 Pracovní postup

### 4.2.1 Protokol PAMPA zkoušky

1. Výpočtem pomocí molekulové hmotnosti látky, požadované koncentrace a požadovaného objemu zásobního roztoku zjistíme množství látky, které si navážíme.
2. Dobře rozpustné hydrofilní sloučeniny rozpustíme rovnou ve fosfátovém pufru. V případě nedostatečné rozpustnosti v PBS použijeme přídavek DMSO a po té vzorek naředíme na požadovanou koncentraci do PBS (primární roztok).
3. Promícháme a vložíme na několik minut do ultrazvuku či vodní lázně vyhřáté na 37 °C.
4. Naředíme si roztoky pro vytvoření kalibrační škály. Zvolíme minimálně 3 body (pokud je maximální koncentrace 100 µM, např. 25, 50, 75 apod.). Spektrofotometrem změříme absorpční spektrum látky v roztoku v oblasti 200-700 nm.
5. Odečteme vlnovou délku absorpčního maxima a absorbanci při maximální koncentraci (první kontrolní bod pro sledování změny koncentrace).
6. Poté proměříme při absorpčním maximu absorbanci všech koncentrací pro sestavení kalibrační křivky.
7. Primární roztok necháme minimálně 12 hodin stát při laboratorní teplotě.
8. Následující den promícháme roztok a zkontrolujeme, jestli se látka z roztoku nevysrážela. Pokud ano, zcentrifugujeme (teplota na 25 °C, rychlost otáček 5000ot/min, 5 min). Je důležité odebrat nasycený roztok bez obsahu nerozpuštěných krystalů.
9. Inkubujeme za využití „sendvičového“ uskupení dvou mikrotitračních destiček (viz Obrázek 9), skládající se z horní donorové části s membránou na dně a spodní akceptorové části. Na membránu v každé jamce napipetujeme 4 µl roztoku PBL v dodekanu o  $c = 20$  mg/ml. Do akceptorové části přidáme 300 µl PBS. Do donorové části napipetujeme 300 µl primárního roztoku testované látky, pro každý časový bod (4 časové body) do 4 jamek (kvadruplikát).



Obrázek 9 „Sendvičové“ uspořádání mikrotitračních destiček. Spodní akceptorová část obsahuje pufr PBS. V donorové části jsou napipetovány vzorky standardů léčiv.

10. Titrační destičku s roztoky testovaných látek inkubujeme 3 hodiny ve tmě za laboratorní teploty.
11. Po 3. hodině inkubace odebereme z prvního časového bodu objem 250  $\mu$ l pro donorovou i akceptorovou část, napipetujeme na novou titrační destičku a změříme absorbanci ve spektrofotometru.
12. Postup opakujeme po každé další hodině. Celkem 4 časové body až do 6. hodiny inkubace. Inkubace probíhá opět za tmy a laboratorní teploty.
13. Koncentrace roztoků je poté vypočítána z hodnot zjištěné absorbance dle příslušné kalibrační přímky.
14. V průběhu celého pokusu (24 hodin, 4 časové body) sledujeme změnu absorbance změřením triplikátů primárního roztoku v objemu 250  $\mu$ l za účelem monitorování změn jeho koncentrace. V ideálním případě by měla být koncentrace v jednotlivých časech podobná při všech měřeních. Pokud výrazně klesá, znamená to, že je látka špatně rozpustná a je pro nás hůře detekovatelná, když se vysráží.
15. Mimo to si připravíme roztok teoretické koncentrace sloučenin, simulující rovnovážný stav, pokud by byla membrána ideálně propustná, tzv. equilibrium. Koncentrace sloučenin v jamce donoru a akceptoru a rovnovážná koncentrace byly vypočteny ze standardní křivky a vyjádřeny jako permeabilita ( $P_e$ ) (podle rovnice v kapitole Výpočet koeficientu permeability  $P_e$ , PAMPA). Roztok připravíme smícháním zásobního roztoku látky a PBS v poměru 1:1 a změříme v triplikátu.

#### 4.2.2 Postup měření na spektrofotometru:

1. Zapneme Multidetekční Reader Synergy HT, BioTek a poté počítač s nainstalovaným programem Synergy HT.
2. Do detektoru vložíme titrační desku a uzavřeme.
3. Na začátku potřebujeme zjistit vlnovou délku absorpčního maxima, která se proměřuje z maximálně koncentrovaného vzorku roztoku. Po otevření programu zvolíme v tabulce pole s umístěným vzorkem a proměříme absorpční maximum.
4. Odečteme příslušnou vlnovou délku, která nám bude sloužit jako výchozí hodnota, při níž se následně proměří ostatní vzorky kalibrační řady včetně pufru.
5. Zjištěnou vlnovou délku použijeme pro měření kontrol koncentrací a koncentrací v akceptoru a donoru v určitých časových bodech nastavením módu měření jedné vlnové délky (End Point).

### 4.2.3 Protokol metody využívající MDCK buněčnou linii

1. Buněčná linie MDCK je pěstována v DMEM médiu s přidavkem FBS (Fetal Bovine Serum) 10 %. Po dosažení 90 % konfluency buněčné kultury v kultivační láhvi můžeme buňky nasadit na Transwell.
2. Vytáhneme kultivační lahev s buňkami z inkubátoru a dále pracujeme v laminárním boxu. Odstraníme celý objem média a propláchneme buňky 7 ml PBS. Po celou dobu pracujeme opatrně, abychom se nedotkli špičkou vrstvy buněk.
3. Následně k buňkám napipetujeme 2 ml trypsinu a opět inkubujeme při 37 °C přibližně 15 minut. Během inkubace pozorujeme postupné uvolnění buněk z povrchu kultivační lahve.
4. Poté k buňkám v laminárním boxu přidáme 4 ml DMEM a tímto způsobem zastavíme proces trypsinizace.
5. Spočítáme množství buněk, do zkumavky pipetujeme 8 ml média a 0,2 ml média s buňkami.
6. Poté ze zkumavky odebereme 10  $\mu$ l směsi a přeneseme do Büchnerovy komůrky, ve které spočítáme množství buněk pomocí mikroskopu.
7. Dle množství buněk vypočítáme množství roztoků, které použijeme pro aplikaci do Transwellu. Do 12-ti jamkového Transwellu pipetujeme do donorových částí buňky v počtu 0,5 mil./jamku v objemu 0,5 ml média. Do akceptorové části pipetujeme médium v objemu 1,5 ml.
8. Po dvou dnech inkubace provedeme výměnu média. Nejprve odsajeme roztok z akceptorové části a zkontrolujeme, zda vrstva neprotéká. Poté dáme nové médium dolů do akceptorové části. Výměnu provedeme i v donorové části. Postupujeme opatrně, abychom nepoškodili rostoucí vrstvu buněk. Opět vložíme do inkubátoru.
9. Následující den naředíme roztoky testovaných látek v Opti-MEMu na požadovanou koncentraci. Dále si proměříme kalibrační škálu stejným způsobem jako v metodě PAMPA.
10. V laminárním boxu propláchneme 750  $\mu$ l PBS akceptorovou i donorovou část.
11. Do akceptorové i donorové části destičky napipetujeme Opti-MEM 750  $\mu$ l a inkubujeme 15 minut, při 37 °C (ekvilibrace monovrstvy).
12. Odsajeme Opti-MEM z donoru a napipetujeme 750  $\mu$ l testované látky. Každou látku v triplicátu.
13. Vložíme destičku do inkubátoru a inkubujeme při 37 °C a po 1., 2., 4. a 6. hodině odebíráme již mimo laminární box vzorky o objemu 100  $\mu$ l, které pipetujeme do mikrotitrační destičky. Následuje stejný postup měření koncentrace v jednotlivých kompartmentech použitím spektrofotometru jako u metody PAMPA.
14. Na konci experimentu po posledním odběru odsajeme všechny zbylé roztoky, propláchneme PBS a provedeme kontrolu integrity buněčné vrstvy pomocí fluorescenčně značeného dextranu (FITC-dextran).
15. Do akceptoru pipetujeme čistý Opti-MEM 750  $\mu$ l, do donorového kompartmentu FITC-dextran 750  $\mu$ l v koncentraci 0,4 mg/ml.
16. Po hodinové inkubaci změříme fluorescenci při vlnových délkách:  $\lambda_1 = 485$  nm,  $\lambda_2 = 528$  nm. Objem 100  $\mu$ l z akceptorové části pipetujeme do mikrotitrační destičky a ve spektrofotometru si nastavíme příslušné hodnoty vlnových délek, pro každou jamku měříme triplicát, dále PBS a zásobní roztok FITC-dextranu.

## 4.2.4 Vliv koncentrace DMSO na lipidovou vrstvu u PAMPA metody

Jelikož jsme pro sloučeniny méně rozpustné v PBS použili jako kosolvent DMSO, bylo třeba ověřit, zda zvýšení jeho koncentrace neovlivní kvalitu PAMPA testu. Otestovali jsme koncentrační škálu přídatku DMSO v rozmezí od 0 % do 10 %.

## 4.3 Analýza dat a statistické zhodnocení

### 4.3.1 Výpočet koeficientu permeability $Pe$ , PAMPA

První den měření se stanovilo absorpční spektrum pomocí spektrofotometru. Z absorpčního spektra se odečetla vlnová délka absorpčního maxima, tj. vlnová délka, při které absorbance dosahuje nejvyšších hodnot. Všechny vzorky z koncentrační řady, včetně pufru, se proměřili při zjištěné vlnové délce a naměřené hodnoty se zaznamenaly do excelové tabulky. Poté se vytvořila kalibrační přímka.

Následující den byl vytvořen kvadruplikát koncentrací pro 4 časové intervaly. První měření absorbance roztoku v donorové a akceptorové části systému proběhlo po třech hodinách inkubace a pak se opakovalo každou další hodinu. Celkem ve čtyřech časových bodech (po 3., 4., 5. a 6. hodině).

Koncentrace roztoku v donorové a akceptorové části systému se vypočítala pomocí kalibrační přímky a absorbance. Z aritmetického průměru kvadruplikátu byl vypočítán koeficient permeability  $Pe$  pro každý časový bod, dle rovnice:

$$\log Pe = \left\{ C \times \ln \left( 1 - \frac{[drug]_{acceptor}}{[drug]_{equilibrium}} \right) \right\} \text{ where } C = \frac{(V_D \times V_A)}{(V_D \times V_A) \text{ Area} \times \text{Time}}$$

kde

Log  $Pe$  – logaritmus koeficientu permeability

$[drug]_{acceptor}$  – množství látky v akceptorové části systému

$[drug]_{equilibrium}$  – teoretické množství látky simulující rovnovážný stav

$V_D$  – objem v donorové části systému (0,3 ml)

$V_A$  – objem v akceptorové části systému (0,3 ml)

Area – plocha (0,28 cm<sup>2</sup>)

Time – čas (4 časové intervaly: 10800 s, 14400 s, 18000 s, 21600 s)



Převzato z (Sandhya et al. 2008).

Za každý časový bod byly získány celkem 4 hodnoty  $Pe$ , které byly následně zprůměrovány v jednotlivých měřeních. Z 3-8 nezávislých měření se získala výsledná hodnota  $Pe$  a hodnota SEM pro každou testovanou látku.

### 4.3.2 Výpočet aparentního permeačního koeficientu $P_{app}$ , MDCK model

Změří se absorpční maximum a vytvoří kalibrační křivka stejným způsobem, jako v metodě PAMPA.

Pro každou látku byl změřen triplikát. Měření absorbance roztoku v donorové a akceptorové části systému proběhlo po 1., 2., 4. a 6. hodině. V každém časovém bodu se odebíraly roztoky ze všech vzorků zkoušených látek. To znamená vzorky ze třech donorových a třech akceptorových částí pro jednu látku.

Koncentrace roztoku v donorové a akceptorové části systému se vypočítala pomocí kalibrační přímky a absorbance. Z lineární části průběhu změny koncentrace v donorové části byl vypočítán aparentní permeační koeficient  $P_{app}$  dle rovnice:

$$P_{app} = \left( \frac{dC}{dt} \right) \times \frac{V_r}{(A \times C_0)}$$

kde

Area/A .... plocha jamky/buněčné monovrstvy

dC/dt ..... kumulativní množství látky v akceptorovém kompartmentu v čase

$V_r$  ..... objem akceptorového kompartmentu

$C_0$  ..... počáteční koncentrace látky

Modifikováno dle (Sandhya et al. 2008).

Z 3-4 nezávislých měření se získala průměrná hodnota  $P_{app}$  a hodnota SEM pro každou testovanou látku.

### **4.3.3 Kontrola integrity MDCK monovrstvy**

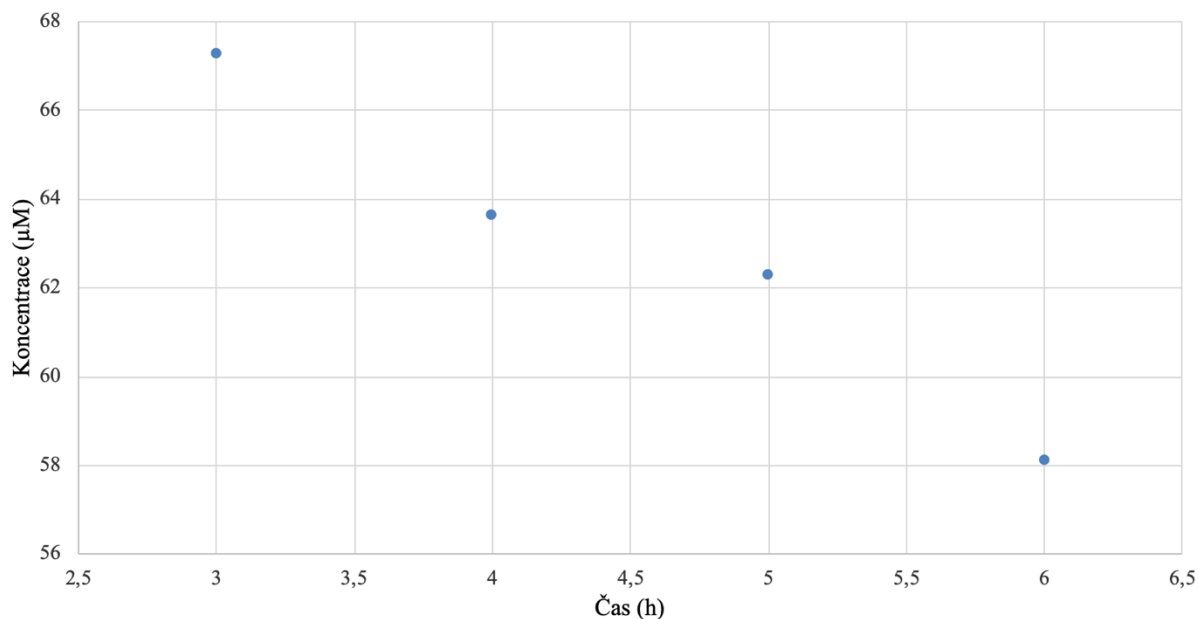
Na konci experimentu bylo třeba ověřit, zda nedošlo k poškození buněčné monovrstvy. Studie permeability byly prováděny za použití FITC-dextranu jako markeru paracelulární permeability.

Po hodinové inkubaci FITC-dextranu v donorové části Transwell byly odebrány triplikáty vzorků pro každou jamku a obsah FITC-dextranu byl kvantifikován fluorescenční spektrofotometrií. Zároveň se změřila fluorescence čistého FITC-dextranu v PBS, pro každý z těchto roztoků kvadruplikát. Od průměru fluorescence FITC-dextranu byl odečten průměr PBS. Koncentrace FITC dextranu v akceptoru by neměla přesáhnout 5 % původní koncentrace (Lechanteur et al. 2017).

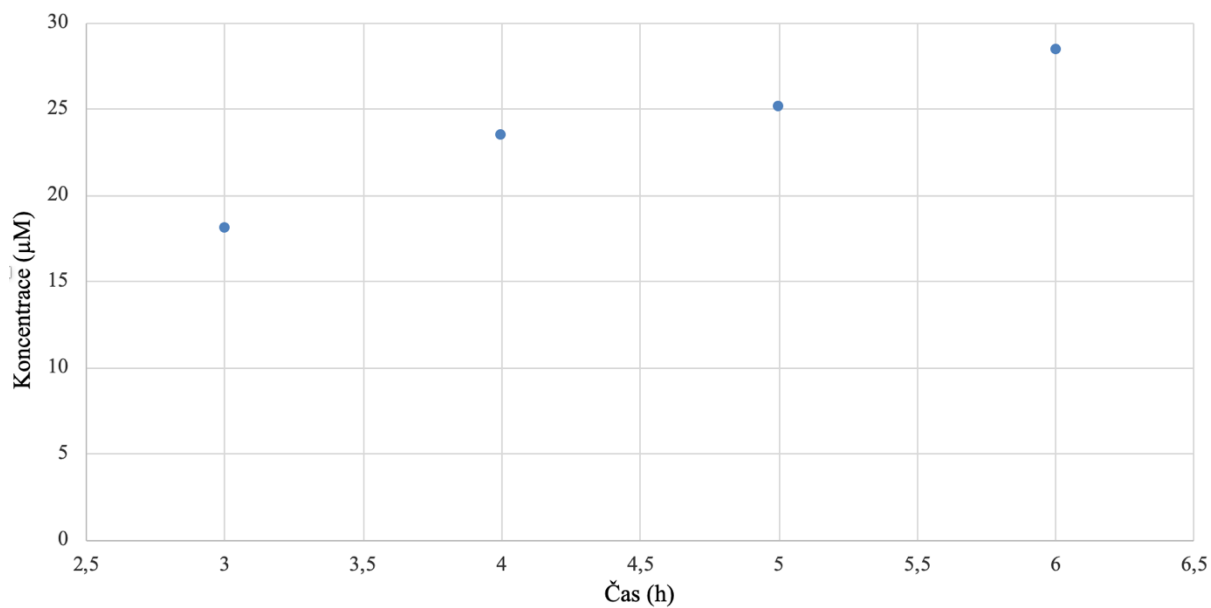
## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení prostupu pomocí PAMPA metody

Jako příklad byl vybrán donepezil, což je sloučenina, která po rozpuštění dobře proniká přes vrstvu PBL v PAMPA modelu a prostupuje do CNS v *in vivo* podmínkách.



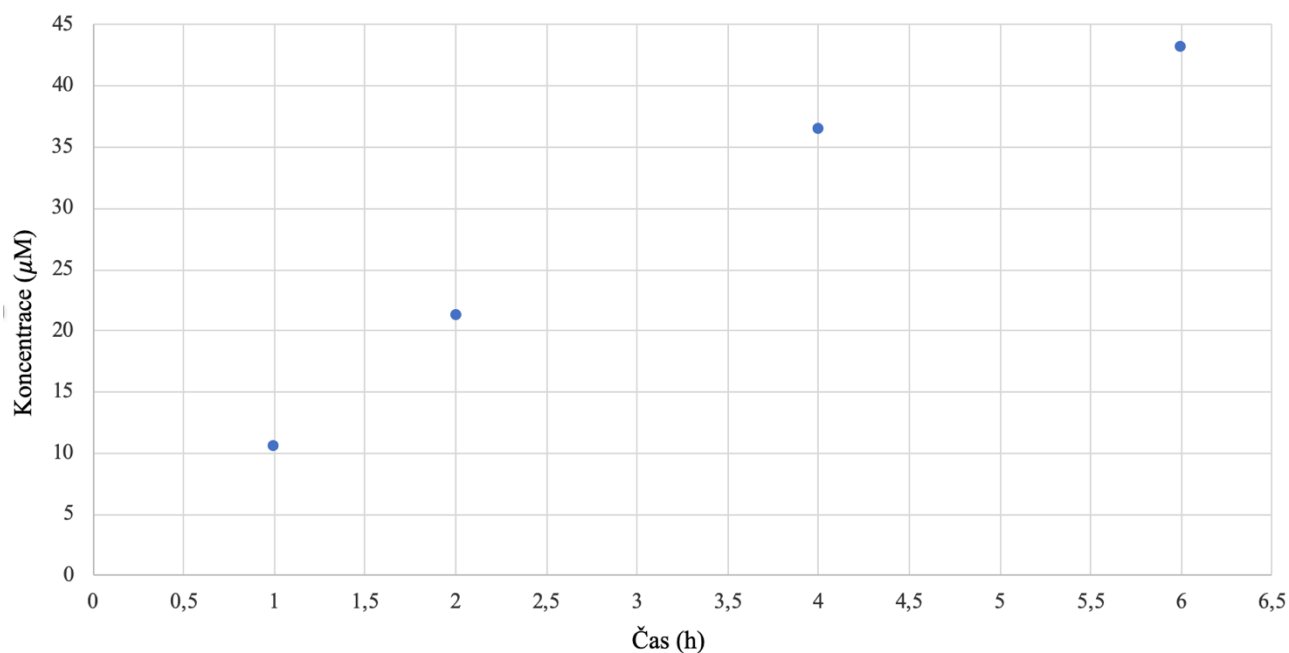
Obrázek 10 Graf závislosti koncentrace donepezilu v donorové části na čase v průběhu inkubace. Zobrazeny 4 hodnoty koncentrace, jež byly získány z kvadruplikátu a zprůměrovány: 67,28 µM; 63,64 µM; 62,28 µM a 58,10 µM ve 4 časových intervalech: 3., 4., 5. a 6. hod. Koncentrace vzorku s přibývajícím časem klesá.



*Obrázek 11 Graf zobrazující závislost koncentrace donepezilu v akceptorové části na čase v průběhu inkubace. Lze vidět 4 hodnoty koncentrace, jež byly získány z kvadruplikátu a zprůměrovány: 18,07 µM; 23,46 µM; 25,10 µM; a 28,46 µM. Naměřeny byly ve 4 časových bodech: 3., 4., 5. a 6. hod. Koncentrace vzorku s postupem času stoupá.*

## 5.2 Stanovení prostupu pomocí metody využívající MDCK model

Jako příklad pro toto stanovení byl vybrán teofylin, což je sloučenina, která po rozpuštění dobře proniká přes vrstvu MDCK buněk a prostupuje do CNS v podmínkách *in vivo*.



Obrázek 12 Graf zobrazující závislost koncentrace teofylinu v akceptorové části na čase v průběhu inkubace. Lze vidět 4 hodnoty koncentrace, jež byly získány z triplikátu a poté zprůměrovány: 10,51 µM; 21,30 µM; 36,54 µM; a 43,21 µM. Naměřeny byly ve 4 časových bodech: 1., 2., 4. a 6. hod. Koncentrace vzorku s přibývajícím časem stoupá.

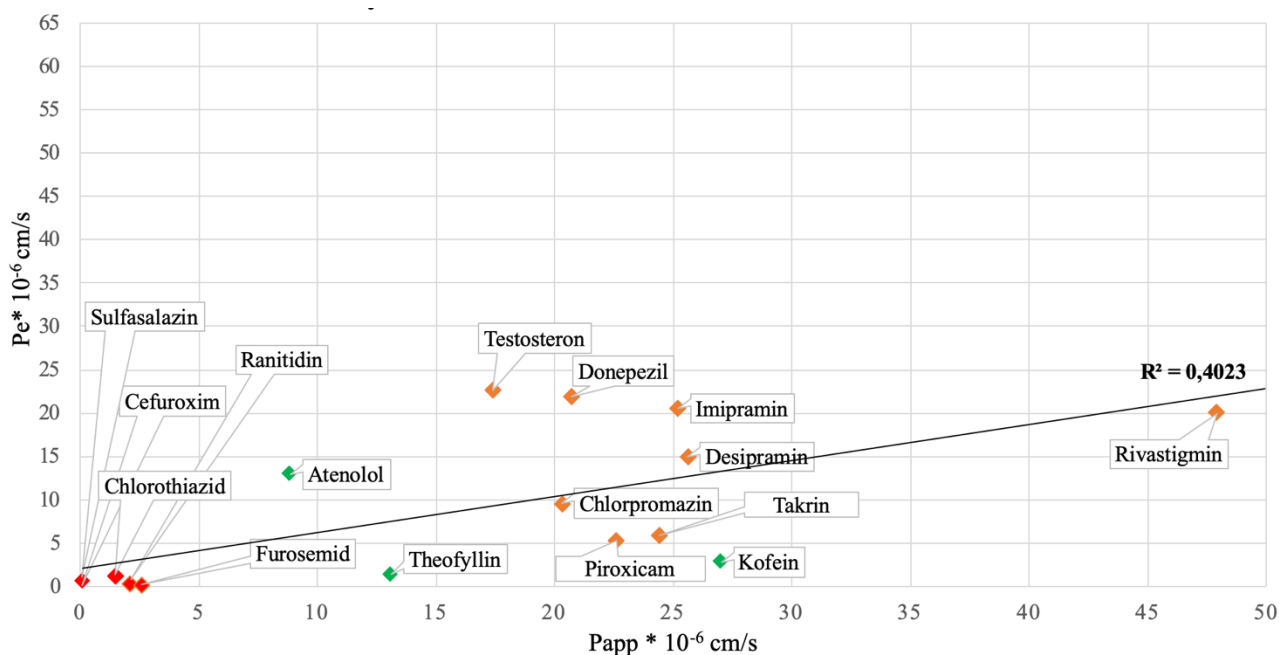
## 5.3 Výsledky měření metodou PAMPA a MDCK modelem

Tabulka 3 Výsledky měření prostupu standardních látek metodou PAMPA, metodou využívající MDCK buněčnou linii a porovnání s reálným *in vivo* prostupem.

Látka	PAMPA ± SEM (n=3-8) (Pe * 10 <sup>-6</sup> cm/s)			MDCK ± SEM (n=3-4) (Papp * 10 <sup>-6</sup> cm/s)			<i>In vivo</i> CNS+/CNS-
Atenolol	12,92	±	4,29	8,85	±	2,30	-
Cefuroxim	0,63	±	0,16	0,09	±	0,08	-
Kofein	2,80	±	0,43	27,00	±	3,54	+
Desipramin	14,96	±	3,48	25,60	±	7,46	+
Donepezil	21,93	±	2,06	20,70	±	3,37	+
Chlorpromazin	9,56	±	1,61	20,30	±	2,58	+
Imipramin	20,50	±	1,93	25,20	±	1,40	+
Piroxicam	5,30	±	1,13	22,60	±	2,80	+
Rivastigmin	20,04	±	2,07	47,90	±	2,64	+
Takrin	5,96	±	0,58	24,40	±	2,21	+
Teofylin	1,35	±	0,59	13,10	±	2,71	+
Testosteron	22,73	±	4,29	17,40	±	3,95	+
Ranitidin	0,35	±	0,31	2,10	±	0,83	-
Sulfasalazin	0,52	±	0,43	0,10	±	0,08	-
Chlorothiazid	1,15	±	0,54	1,50	±	1,39	-
Furosemid	0,19	±	0,07	2,60	±	0,79	-

*Pe* - permeační koeficient, *Papp* - aparentní permeační koeficient, *SEM*-standartní chyba průměru, *n*-počet měření. V tabulce lze vidět hodnoty *Pe* a *Papp* standardních látek s hodnotami *SEM* a údaje o *in vivo* prostupu do CNS: + látka prochází, - látka neprochází. Údaje byly získány výpočtem pomocí vzorců pro koeficienty *Pe* a *Papp*, jež jsou uvedeny v části Analýza dat a statistické zhodnocení.

Údaje o prostupu do CNS *in vivo* získány z: (Traykov et al. 1999; Di et al. 2003; Boyce et al. 2012; Bicker et al. 2016; Hosmann et al. 2018; Shah et al. 2018; Sigaroudi et al. 2018; Gabr and Abdel-Raziq 2018)

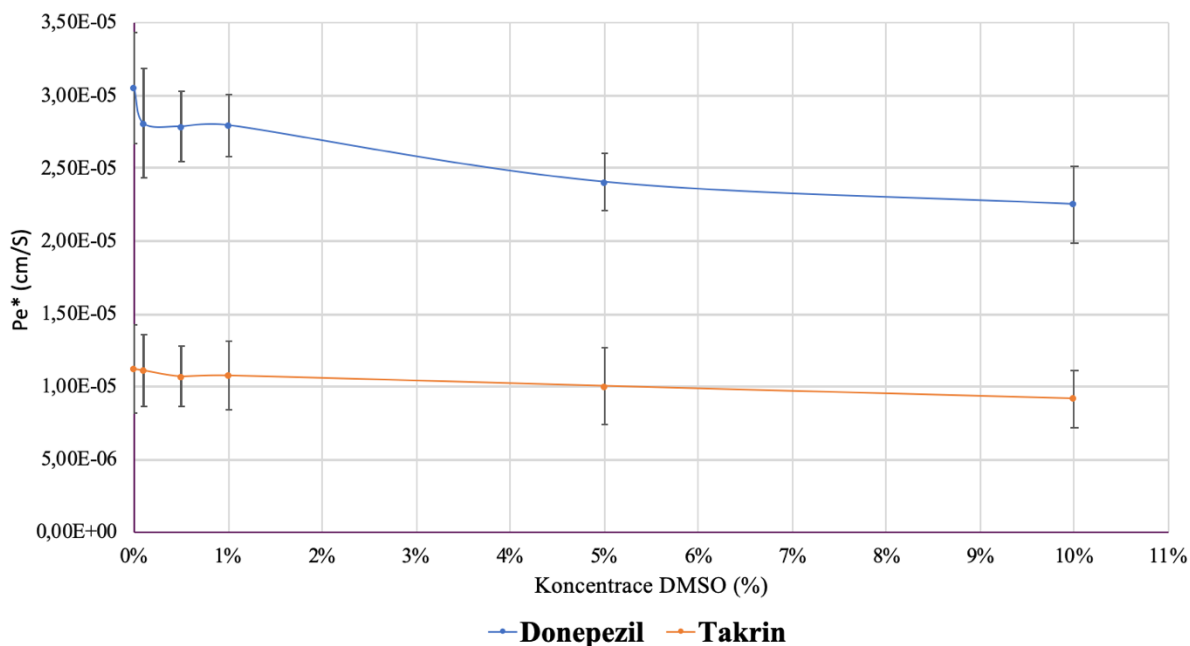


Obrázek 13 Graf znázorňující korelaci hodnot  $Pe$  a  $Papp$  pro standardní látky uvedené v Tabulka 3. Červeně jsou označeny léčiva, která neprochází skrz HEB, oranžově léčiva procházející a zeleně léčiva, jejichž výsledky nekorelují s in vivo situací.

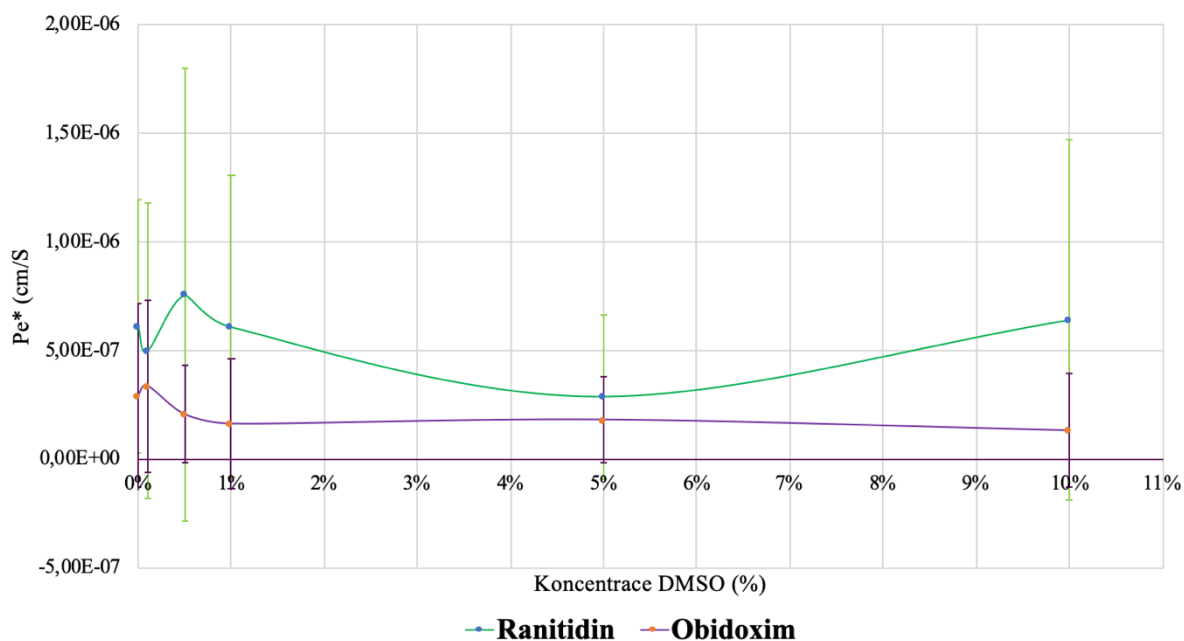
## 5.4 Využití DMSO jako kosolventu v PAMPA metodě

Některá léčiva ze zkoušeného setu vykazovala nízkou rozpustnost v PBS nebo se látka rozpustila, ale po čase docházelo ke zpětné precipitaci v roztoku. Tento jev ovlivňuje stanovení propustnosti přes fosfolipidovou membránu, jelikož měření probíhá ve 4 časových bodech. Metoda UV/VIS má relativně nízký práh detekce pro nižší koncentrace, tím pádem může docházet i k velkým chybám měření.

Proto jsme použili jako kosolvent DMSO, pro dosažení koncentrací testovaných látek měřitelných pomocí UV/VIS metody a k zajištění vyšší stability zásobního roztoku. K experimentu byly vybrány čtyři léčiva. Dva zástupci prostupující do CNS: donepezil a takrin a dva neprostupující: obidoxim a ranitidin. Tato léčiva jsme vybrali proto, že jsou dobře rozpustná i bez přídavku DMSO a jejich výsledky z předchozích měření byly konzistentní.



Obrázek 14 Graf znázorňující závislost permeability donepezilu a takrinu na koncentraci použitého DMSO. Jednotlivé body udávají průměrné hodnoty  $Pe$  pro jednotlivá léčiva ( $n = 2$ ). Údaje byly získány výpočtem pomocí vzorce pro koeficient  $Pe$  v části Výpočet koeficientu permeability  $Pe$ , PAMPA. Dochází k mírnému poklesu permeability od 1% koncentrace DMSO.



Obrázek 15 Graf znázorňující závislost permeability ranitidinu a obidoximu na koncentraci použitého DMSO. Jednotlivé body udávají průměrné hodnoty  $Pe$  pro jednotlivá léčiva ( $n = 2$ ). Údaje byly získány výpočtem pomocí vzorce pro koeficient  $Pe$  v části Výpočet koeficientu permeability  $Pe$ , PAMPA. Permeabilita ranitidinu nejprve klesá a od 5% koncentrace DMSO začíná stoupat. V případě obidoximu mírně klesá od 5% koncentrace DMSO.



## **5.5 Výsledky kontroly integrity MDCK monovrstvy**

V našich experimentech se naměřené hodnoty kontroly integrity MDCK monovrstvy pohybovaly v rozmezí 0,01-2,28 % koncentrace FITC-dextranu v akceptorové části. Jedná se tedy o hodnoty méně než 5 %, což značí neporušenou integritu monovrstvy buněk (Lechanteur et al. 2017).

## 6 DISKUZE

V experimentech stanovení prostupu látek do CNS pomocí metody PAMPA a modelu využívajícího MDCK buněčnou linii, jsme použili set šestnácti standardních léčiv. Jedná se o sadu léčiv s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, s rozličnou farmakodynamikou a různými cíli působení.

Dle literatury jsme v PAMPA experimentech použili PBL o koncentraci 20 mg PBL/1 ml dodekanu a o objemu 4  $\mu$ l na jamku, což zajišťuje optimální podmínky pro rozdělení léčiv na CNS+ a CNS-, dle hodnot  $Pe$ . CNS+ látky prostupují do mozku a jejich  $Pe$  je více, než  $4,0 \times 10^{-6}$  cm/s. CNS- skupina zahrnuje látky s nízkou predikcí vstupu do CNS.  $Pe$  CNS- látek se pohybuje pod hranicí  $Pe$   $2,0 \times 10^{-6}$  cm/s. Látky, které nevyhovují  $Pe$  ani jedné skupiny, tzn.  $Pe$   $2,0 \times 10^{-6}$  cm/s –  $4,0 \times 10^{-6}$  cm/s, se řadí mezi léčiva, jimž lze predikovat nejistou penetraci do CNS.

Léčiva, která svými hodnotami  $Pe$  spadají do jiné skupiny, než *in vivo*, jsou známy tím, že jsou ovlivňovány aktivními transportními procesy (influx, eflux) nebo metabolismem (Di et al. 2003). Například  $Pe$  hodnoty kofeinu, jak můžeme vidět na Obrázek 13, kofein zařazují mezi látky s omezeným prostupem do CNS. Je známo, že kofein vstupuje do mozku jak pasivní difuzí, tak pomocí aktivního transportu, a to konkrétně adenosinovým transportérem (McCall et al. 1982; Wilkinson and Pollard 1993), který vrstva PBL postrádá. V tomto případě byl kofein falešně zařazen mezi látky s omezeným prostupem do CNS. Stejný jev pozorujeme u teofylinu.

Další látkou, která má rozporuplné výsledky prostupu je atenolol, jak můžeme vidět v Tabulka 3. Chen et al. (2017) systematicky hodnotili rozsah distribuce *S*-atenololu (enantiomer zodpovědný za farmakologický účinek) do mozku pomocí mikrodialýzy. Studie naznačují, že na transport atenololu, který probíhá pasivní difuzí má vliv eflux zprostředkovaný transportérem. Ačkoli v současné době není jasné, který transportér (nebo transportéry) je zodpovědný za efluxní transport atenololu v HEB, není vhodné používat atenolol jako modelový lék pro paracelulární transport nebo pasivní difuzi, což se nám potvrdilo (Chen et al. 2017). V našem experimentu atenolol dobře prochází přes MDCK monovrstvu pravděpodobně díky nepřítomnosti daných efluxních transportérů, které MDCK model na rozdíl od HEB postrádá. Atenolol je relativně malá molekula a odpovídá Lipinskému pravidlu pěti, takže teoreticky může procházet přes PBL membránu. To odpovídá i našim výsledkům (viz Tabulka 3). Ovšem, jak již bylo řečeno, *in vivo* atenolol penetruje přes HEB minimálně, což naznačuje nedokonalost systému PAMPA opět hlavně z důvodu nepřítomnosti efluxních transportérů.

Za našich experimentálních podmínek mají sloučeniny s  $P_{app} > 3 \times 10^{-6}$  cm/s potenciál vstupu do CNS; kdežto sloučeniny s  $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$  cm/s nejsou schopny proniknout HEB (Wang et al. 2005).

Můžeme vidět v Tabulka 3, že MDCK model na rozdíl od PAMPA modelu správně vyhodnotil vstup teofylinu i kofeinu do CNS v porovnání s *in vivo* situací, jelikož zahrnuje i aktivní transport. Tento buněčný model je možno geneticky modifikovat lidským genem MDR1 pro expresi P-gp. Tím lze ještě zlepšit predikci aktivního transportu, konkrétně efluxu, jak popisuje Volpe (2011).

Korelace mezi MDCK a PAMPA modelem má hodnotu  $R^2 = 0,4023$ , což značí střední lineární korelaci. Obecně dobrou korelaci mezi metodami pozorujeme u látek, které prochází přes HEB primárně pasivní difuzí (Di et al. 2009).

Naše zjištění potvrzují schopnost PAMPA metody predikovat pouze transport látek zprostředkovaný pasivní difuzí, protože PBL membrána neobsahuje žádné aktivní mechanismy transportu. Na druhou stranu je metoda PAMPA nenákladná, snadno reprodukovatelná, rychlá a vhodná pro screening většího množství látek. Dle Di et al. (2009) se jedná o relevantnější a přesnější model pasivní permeability než MDCK monovrstva. MDCK model údajně dává méně přesné výsledky pasivní difuze než PAMPA, protože PBL membrána v PAMPA je oproti MDCK monovrstvě méně tekutá, pevnější a zajišťuje omezenější permeabilitu podobně jako *in vivo* HEB (Di et al. 2009).

Pro rozpuštění látek byl používán jako kosolvent roztok DMSO. V lipidových membránách mohou být vytvářeny póry přidáním určitých chemikálií, mezi které patří právě také DMSO (Fernández and Reigada 2014). Tyto vodní póry tvoří možnou cestu pro zvýšení pronikání molekul léčiva prostřednictvím lipidových membrán (Notman et al. 2006). Proto je klíčovou otázkou získání informace o vlivu přítomnosti DMSO na výsledky PAMPA, což je jeden z cílů této diplomové práce.

Ověřili jsme ve dvou měřeních se čtyřmi léčivy (dvě léčiva pasivně prostupující a dvě neprostupující), zda přítomnost DMSO nějakým způsobem neovlivňuje permeabilitu. V měřeních  $P_e$  a  $P_{app}$  standardních léčiv koncentrace DMSO nikdy nepřevyšovala 1 %. Nejvyšší zkoušenou koncentrací v experimentu s DMSO byla koncentrace 10 %. Zjistili jsme, že koncentrace nad 1 % DMSO a výše mírně ovlivňují výslednou permeabilitu, což můžeme vidět v grafech (viz. Obrázek 14 a Obrázek 15). Pro tyto experimenty je tedy žádoucí nepřekročit 1 % koncentraci DMSO.

Použití UV/VIS spektroskopie může být limitujícím faktorem přesnosti získaných výsledků. Možností je použití citlivější, ale dražší a složitější metody detekce pomocí HPLC/UV nebo LC-MS (Müller et al. 2015).

PAMPA model je tedy vhodný pouze pro predikci pasivní difuze. Na druhou stranu má spoustu výhod. Je levný, rychlý, jednoduchý, snadno reprodukovatelný a vhodný pro orientační screening většího množství látek.

Výhoda MDCK monovstvy buněk spočívá v přítomnosti jistého aktivního transportu, takže je vhodná pro látky, u kterých aktivní transport předpokládáme. Limitací je rozdílná exprese transportérů (kvalitativní i kvantitativní) oproti HEB. Jelikož se jedná o buněčný model, tak je citlivější na toxické látky než PAMPA.

## 7 ZÁVĚR

Korelace mezi MDCK a PAMPA modelem má hodnotu  $R^2 = 0,4023$ . Jedná se o střední hodnotu korelace. Nejlépe byly korelovány látky, které jsou transportovány přes HEB pasivní difuzí. Naopak léčiva podléhající aktivnímu transportu (kofein, teofylin) hodnotu korelace snižují. To je dáno přítomností aktivního transportu v MDCK linii buněk, který PAMPA model postrádá.

PAMPA metoda vyniká svou jednoduchostí, rychlostí, nenákladností. Je snadno reprodukovatelná a vhodná pro hodnocení pasivní difuze. Také může zajistit screening většího množství látek. Jejím limitem je absence aktivních procesů přítomných *in vivo*. Léčiva podléhající aktivnímu transportu mají v PAMPA metodě falešně pozitivní (substráty efluxních transportérů) nebo falešně negativní (substráty aktivních transportérů) výsledky permeability.

Naopak MDCK model je vhodný pro testování látek, u nichž se předpokládá transport pomocí aktivních mechanismů, zejména transport zprostředkovaný SLCs. Jedná se o buňky, které se snadno a rychle kultivují. Dle Di et al. (2009) MDCK linie odhaduje transport pasivní difuzí méně přesně než PAMPA. Tento rozdíl je dán složením lipidů v membránách těchto modelů. Limitací MDCK buněčné linie je rozdílná exprese transportérů v porovnání s lidskou HEB.

Na základě výsledků z experimentu zkoumajícího vliv koncentrace DMSO a průběžné kontroly koncentrace během jednotlivých měření pomocí UV/VIS spektroskopie jsme dospěli k závěru, že přidavek DMSO do fosfátového pufru (PBS) nám může zajistit potřebné rozpuštění testovaných látek. Při dodržení maximální koncentrace 1 % DMSO v celkovém objemu nedochází k současnému ovlivnění hodnot permeability látek přes membránu.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Ando J, Kamiya A (1996) Flow-dependent regulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Jpn Heart J* 37:19–32
- Banerjee J, Shi Y, Azevedo HS (2016) *In vitro* blood-brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms. *Drug Discov Today* 21:1367–1386. doi: 10.1016/j.drudis.2016.05.020
- Berezowski V, Landry C, Lundquist S, et al (2004) Transport Screening of Drug Cocktails Through an *in Vitro* Blood-Brain Barrier: Is It a Good Strategy for Increasing the Throughput of the Discovery Pipeline? *Pharm Res* 21:756–760. doi: 10.1023/B:PHAM.0000026424.78528.11
- Betz AL, Goldstein GW (1978) Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science* 202:225–227
- Bickel U (2005) How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* 2:15–26. doi: 10.1602/neuroRx.2.1.15
- Bicker J, Alves G, Fortuna A, et al (2016) A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates. *Int J Pharm* 501:102–111. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.074
- Bodor N, Buchwald P (2003) Brain-Targeted Drug Delivery. *Am J Drug Deliv* 1:13–26
- Booth R, Kim H (2012) Characterization of a microfluidic *in vitro* model of the blood-brain barrier ( $\mu$ BBB). *Lab Chip* 12:1784–1792. doi: 10.1039/c2lc40094d
- Booth RH, Kim H (2011) A MULTI-LAYERED MICROFLUIDIC DEVICE FOR *IN VITRO* BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY STUDIES. Dostupné na URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/A-MULTI-LAYERED-MICROFLUIDIC-DEVICE-FOR-IN-VITRO-Booth-Kim/45b3c30f47b416f0214e6229fc236f8368edc3a3> Přístup: 28. 4. 2019
- Boyce M, David O, Darwin K, et al (2012) Single oral doses of netazepide (YF476), a gastrin receptor antagonist, cause dose-dependent, sustained increases in gastric pH compared with placebo and ranitidine in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 36:181–189. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05143.x
- Bujak R, Struck-Lewicka W, Kaliszan M, et al (2015) Blood-brain barrier permeability mechanisms in view of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR). *J Pharm Biomed Anal* 108:29–37
- Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, et al (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6:650–661. doi: 10.1038/nrd2368

- Chen X, Slättengren T, de Lange ECM, et al (2017) Revisiting atenolol as a low passive permeability marker. *Fluids Barriers CNS* 14:30. doi: 10.1186/s12987-017-0078-x
- Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, et al (2011) The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci* 12:40. doi: 10.1186/1471-2202-12-40
- Cucullo L, McAllister MS, Kight K, et al (2002) A new dynamic *in vitro* model for the multidimensional study of astrocyte–endothelial cell interactions at the blood–brain barrier. *Brain Res* 951:243–254. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03167-0
- Daneman R, Prat A (2015) The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:. doi: 10.1101/cshperspect.a020412
- Davoust N, Vuaillet C, Androdias G, Nataf S (2008) Davoust N, Vuaillet C, Androdias G, Nataf S From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 29:227-234
- Di L, Kerns EH, Bezar IF, et al (2009) Comparison of blood–brain barrier permeability assays: *in situ* brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J Pharm Sci* 98:1980–1991. doi: 10.1002/jps.21580
- Di L, Kerns EH, Fan K, et al (2003) High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem* 38:223–232
- Dubey SK, Ram MS, Krishna KV, et al (2019) Recent Expansions on Cellular Models to Uncover the Scientific Barriers Towards Drug Development for Alzheimer’s Disease. *Cell Mol Neurobiol* 39:181–209. doi: 10.1007/s10571-019-00653-z
- Fernández ML, Reigada R (2014) Effects of dimethyl sulfoxide on lipid membrane electroporation. *J Phys Chem B* 118:9306–9312. doi: 10.1021/jp503502s
- Friedrich A, Prasad PD, Freyer D, et al (2003) Molecular cloning and functional characterization of the OCTN2 transporter at the RBE4 cells, an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 968:69–79
- Gabr MT, Abdel-Raziq MS (2018) Design and synthesis of donepezil analogues as dual AChE and BACE-1 inhibitors. *Bioorganic Chem* 80:245–252. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.06.031
- Glezer I, Simard AR, Rivest S (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147:867–883. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.055
- González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1–44. doi: 10.1016/S0079-6107(02)00037-8
- Gumbleton M, Audus KL (2001) Progress and limitations in the use of *in vitro* cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 90:1681–1698
- Guo X, Geng M, Du G (2005) Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet* 43:175–187

- Hamm S, Dehouck B, Kraus J, et al (2004) Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res* 315:157–166. doi: 10.1007/s00441-003-0825-y
- He Y, Yao Y, Tsirka SE, Cao Y (2014) Cell-Culture Models of the Blood–Brain Barrier. *Stroke J Cereb Circ* 45:2514–2526. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005427
- Hellinger E, Veszelka S, Tóth AE, et al (2012) Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV* 82:340–351. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.07.020
- Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al (2016) *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:862–890. doi: 10.1177/0271678X16630991
- Hosmann A, Ritscher LC, Burgmann H, et al (2018) Concentrations of Cefuroxime in Brain Tissue of Neurointensive Care Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 62:. doi: 10.1128/AAC.02164-17
- Itoh M, Morita K, Tsukita S (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and  $\alpha$  Catenin. *J Biol Chem* 274:5981–5986. doi: 10.1074/jbc.274.9.5981
- Kansy M, Senner F, Gubernator K (1998) Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 41:1007–1010. doi: 10.1021/jm970530e
- Kis O, Robillard K, Chan GNY, Bendayan R (2010) The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends Pharmacol Sci* 31:22–35. doi: 10.1016/j.tips.2009.10.001
- Lechanteur A, Almeida A, Sarmiento B (2017) Elucidation of the impact of cell culture conditions of Caco-2 cell monolayer on barrier integrity and intestinal permeability. *Eur J Pharm Biopharm* 119:137–141. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.06.013
- Lipinski ChA (2004) Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* 1:337–341. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007
- Mark KS, Davis TP (2002) Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1485-1494. doi: 10.1152/ajpheart.00645.2001
- McCall AL, Millington WR, Wurtman RJ (1982) Blood-brain barrier transport of caffeine: dose-related restriction of adenine transport. *Life Sci* 31:2709–2715
- Miyata S (2015) New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front Neurosci* 9:390. doi: 10.3389/fnins.2015.00390



- Müller J, Esső K, Dargó G, et al (2015) Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci* 79:53–60. doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.019
- Nag S, Begley DJ (2005) Blood Brain Barrier, Exchange of metabolites and gases. *Pathol Genet Cerebrovasc Dis* 22–29
- Naik P, Cucullo L (2012) *In Vitro* Blood–Brain Barrier Models: Current and Perspective Technologies. *J Pharm Sci* 101:1337–1354. doi: 10.1002/jps.23022
- Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J (2006) Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J Am Chem Soc* 128:13982–13983. doi: 10.1021/ja063363t
- Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1:409–417. doi: 10.1002/ana.410010502
- Palmiotti ChA, Prasad S, Naik P, et al (2014) *In Vitro* Cerebrovascular Modeling in the 21st Century: Current and Prospective Technologies. *Pharm Res* 31:3229–3250. doi: 10.1007/s11095-014-1464-6
- Pardridge WM (2012) Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 32:1959–1972. doi: 10.1038/jcbfm.2012.126
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD (2006) Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 1:223–236. doi: 10.1007/s11481-006-9025-3
- Petty MA, Lo EH (2002) Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol* 68:311–323
- Ruck T, Bittner S, Meuth SG (2015) Blood-brain barrier modeling: challenges and perspectives. *Neural Regen Res* 10:889–891. doi: 10.4103/1673-5374.158342
- Sandhya K, Devi GS, Mathew ST (2008) Liposomal formulations of serratiopeptidase: *In vitro* studies using PAMPA and caco-2 models. *Mol Pharm* 5:92–97. doi: 10.1021/mp7G0090r
- Schulze Ch, A Firth J (1993) Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. *J Cell Sci* 104 ( Pt 3):773–82
- Shah B, Khunt D, Misra M, Padh H (2018) Formulation and *In-vivo* Pharmacokinetic Consideration of Intranasal Microemulsion and Mucoadhesive Microemulsion of Rivastigmine for Brain Targeting. *Pharm Res* 35:8. doi: 10.1007/s11095-017-2279-z
- Siddharthan V, Kim Y, Liu S, Kim K (2007) Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cell. *Brain Res* 1147:39–50. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.029

- Sigaroudi A, Kinzig M, Wahl O, et al (2018) Quantification of Hydrochlorothiazide and Ramipril/Ramiprilate in Blood Serum and Cerebrospinal Fluid: A Pharmacokinetic Assessment of Central Nervous System Adverse Effects. *Pharmacology* 102:133–137. doi: 10.1159/000489999
- Sisó S, Jeffrey M, González L (2010) Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 120:689–705. doi: 10.1007/s00401-010-0743-5
- Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV (2008) Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier. *Curr Neuropharmacol* 6:179–192. doi: 10.2174/157015908785777210
- Szoleczky P, Módis K, Nagy N, et al (2012) Identification of agents that reduce renal hypoxia-reoxygenation injury using cell-based screening: purine nucleosides are alternative energy sources in LLC-PK1 cells during hypoxia. *Arch Biochem Biophys* 517:53–70. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.005
- Tajes M, Ramos-Fernandez E, Weng-Jiang X, et al (2014) The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol Membr Biol* 31:152–167. doi: 10.3109/09687688.2014.937468
- Tarbell JM (2010) Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc Res* 87:320–330. doi: 10.1093/cvr/cvq146
- Traykov L, Tavitian B, Jobert A, et al (1999) *In vivo* PET study of cerebral [<sup>11</sup>C] methyl-tetrahydroaminoacridine distribution and kinetics in healthy human subjects. *Eur J Neurol* 6:273–278
- Ueno M (2007) Molecular Anatomy of the Brain Endothelial Barrier: An Overview of the Distributional Features. *Curr Med Chem* 14:1199–1206. doi: 10.2174/092986707780597943
- Van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, et al (1998) Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target* 6:151–165. doi: 10.3109/10611869808997889
- Velický M, Bradley DF, Tam KY, Dryfe RAW (2010) *In situ* artificial membrane permeation assay under hydrodynamic control: permeability-pH profiles of warfarin and verapamil. *Pharm Res* 27:1644–1658. doi: 10.1007/s11095-010-0150-6
- Volpe DA (2011) Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med Chem* 3:2063–2077. doi: 10.4155/fmc.11.149
- Wang Q, Rager JD, Weinstein K, et al (2005) Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 288:349–359. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.10.007
- Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA (2011) *In vitro* models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 71:113–128

- Wilkinson JM, Pollard I (1993) Accumulation of theophylline, theobromine and paraxanthine in the fetal rat brain following a single oral dose of caffeine. *Brain Res Dev Brain Res* 75:193–199
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B (2005) Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol (Berl)* 109:181–190. doi: 10.1007/s00401-004-0928-x
- Yang L, Shah KK, Abbruscato TJ (2012) An *in vitro* model of ischemic stroke. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 814:451–466. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0\_30
- Zhang L, Zhu H, Oprea TI, et al (2008) QSAR modeling of the blood-brain barrier permeability for diverse organic compounds. *Pharm Res* 25:1902–1914. doi: 10.1007/s11095-008-9609-0
- Zozulya A, Weidenfeller Ch, Galla H-J (2008) Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier *in vitro*. *Brain Res* 1189:1–11. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.099