

STRUKTURA I FUNKCJE BARIERY KREW-MÓZG

THE STRUCTURE AND ROLE OF BLOOD-BRAIN BARRIER

Katarzyna BRZEZIŃSKA, Marek ZIAJA

Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie: Ośrodkowy układ nerwowy w unikalny sposób odizolowany jest w znacznym stopniu od bezpośredniego wpływu środowiska zewnętrznego. Jest ona możliwa dzięki istnieniu, złożonej w swojej budowie, bariery-krew mózg będącą kompilacją cech anatomicznych jak i fizjologicznych. Charakterystyczne jest istnienie połączeń ścisłych między komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych, stanowiących naturalną przeszkodę w biernym transporcie wielu substancji z krwi do mózgu, dlatego też dominuje transport aktywny poprzez barierę. Przerwanie jej ciągłości może nastąpić w wyniku szeregu schorzeń układu nerwowego, ale niewątpliwie najczęstszym tego powodem są urazy mózgowia, stanowiące coraz istotniejszy problem medyczny. Dlatego też ważne są wszelkiego rodzaju badania nad budową i przepuszczalnością bariery krew-mózg, które dostarczają coraz bardziej szczegółowych danych, poszerzających naszą wiedzę.

Słowa kluczowe: złącza ścisłe, uszkodzenie mózgu, narządy okołokomorowe

Summary: Central nervous system is in unique manner isolated from the direct influence of external environment. This isolation is possible thanks to the existence of complicated in its structure, blood-brain barrier, which is a compilation of anatomical as well as physiological attributes. It is characteristic that connections between endothelial cells are tightening, which is an obvious passive transport obstacle and active carriage through the barrier dominates. Disruption of barrier continuity can happen due to many neurological diseases, but undoubtedly, the main reasons are brain injuries, which may increasingly be growing medical problem. Therefore, so important are every type of studies on structure and permeability of blood-brain barrier because they provide more and more detailed data, which broaden our knowledge.

Key words: tight junctions, brain injury, circumventricular organs

WSTĘP

Historia badań nad barierą krew – mózg (*ang. Blood Brain Barrier – BBB*) sięga XIX wieku, kiedy to niemiecki mikrobiolog i fizjolog Paul Ehrlich zaobserwował, że wstrzyknięty do krwioobiegu żyjących zwierząt barwnik

anilinowy, powoduje zabarwienie wszystkich tkanek z wyjątkiem mózgu i rdzenia kręgowego [6, 24]. Wy tłumaczył to zjawisko mniejszym powinowactwem układu nerwowego do pochłaniania kwaśnego barwnika. Badania Ehrlicha kontynuował jeden z jego uczniów – Edwin Goldman, w latach 20-tych XX wieku. W 1913 roku wykonał on podobny eksperyment, w którym wykazał, że wstrzyknięty do płynu mózgowo – rdzeniowego błękit trypanu, barwi mózgowie i rdzeń kręgowy, a pozostałe organy nie [6, 39]. W ten sposób założono istnienie swoistej bariery między komórkami mózgowymi a układem krążenia, i od tamtego czasu rozpoczęto intensywne badania nad poznaniem jej fizjologii i patologii. Termin „bariera krew – mózg” (niem. *Bluthirnschranke* lub *Blut-Hirn-Schranke*) wprowadził do medycyny niemiecki neurolog Max Lewandowsky [6].

Obecnie uważa się, że bariera krew – mózg stanowi fizyczną i enzymatyczną granicę pomiędzy naczyniami krwionośnymi a tkanką nerwową. Ma ona na celu zabezpieczyć ośrodkowy układ nerwowy (OUN) przed szkodliwymi czynnikami, a także umożliwić selektywny transport związków krążących we krwi do płynu mózgowo-rdzeniowego. Oprócz funkcji ochronnej bierze udział w utrzymaniu sprawnej homeostazy (ryc. 1 b).

Na selektywność transportu w obrębie mózgowia wpływ mają dwa połączenia barierowe. Obok bariery krew – mózg, którą tworzy w głównej mierze śródbłonek mózgowych naczyń włosowatych, istnieje także bariera krew – płyn mózgowo – rdzeniowy (*Blood Cerebro – Spinal – Fluid Barrier; BCSFB*) zbudowana z nabłonka spłotów naczyniówki [7, 15]. Obie bariery wykazują podobną budowę i dlatego w niektórych danych literaturowych termin BBB używany jest w odniesieniu do wymiany ostatecznej przez obie zapory komórkowe [20]. W dalszej części pracy termin bariera krew – mózg (BBB) odnosi się do bariery zbudowanej z komórek śródbłonka.

BUDOWA I FUNKCJE BARIERY KREW – MÓZG

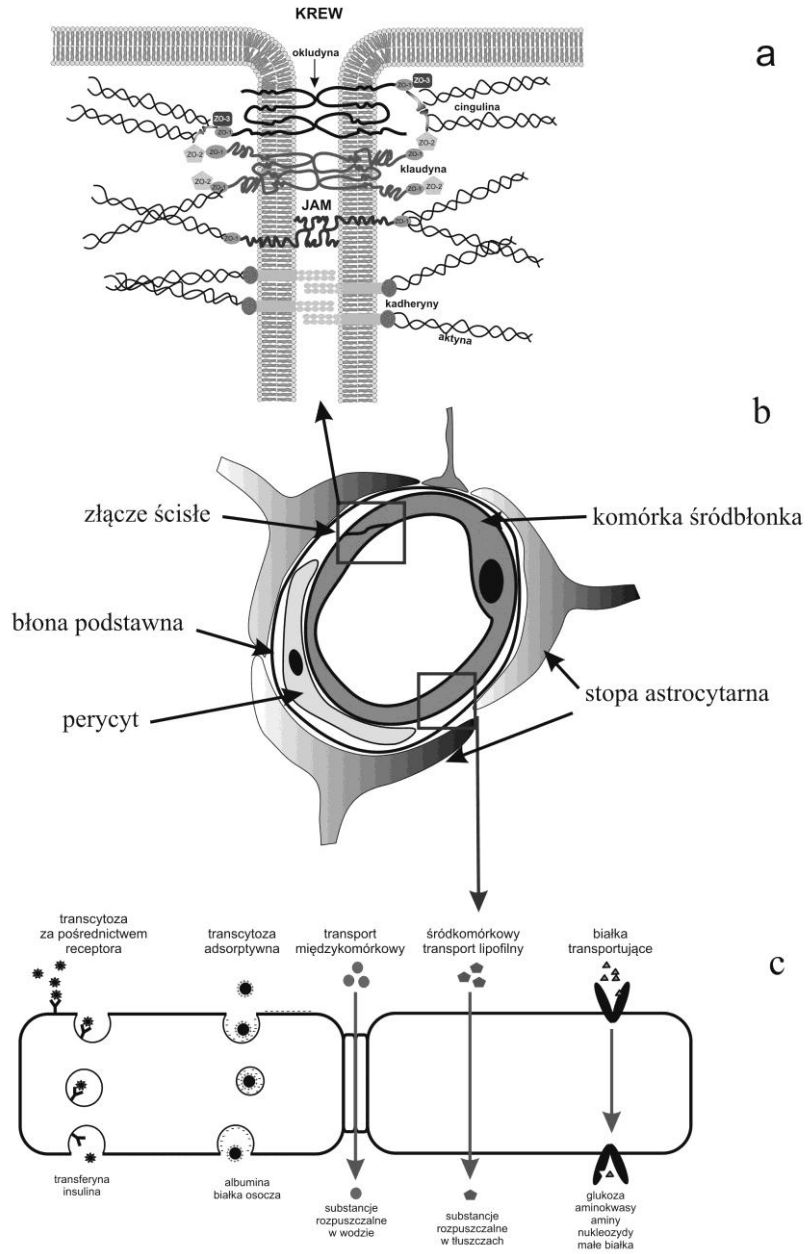
Barierę pomiędzy krwią a macierzą zewnątrzkomórkową mózgu tworzy szczelna struktura komórek endotelialnych (*ang. endothelial cells; ECs*), zespolonych ze sobą za pomocą białkowych złącz [4, 24]. Badania morfologiczne, z zastosowaniem technik mikroskopowo-elektronowych, oraz czynnościowe wykazały, że śródbłonek naczyń krwionośnych pełni ważne funkcje w wielu procesach zachodzących w żywym organizmie [4, 19]. Komórki te należą do wyspecjalizowanych nabłoneków płaskich, tworzących jednowarstwową, spolaryzowaną wyściółkę po wewnętrznej stronie ściany kapilarnej. Zbudowane są z glikozaminoglikanów zintegrowanych z białkami i lipidami błony komórkowej, m.in.: receptorami błonowymi i enzymami [49]. By móc sprawnie wykonywać swoje funkcje ochronne, przestrzeń międzykomórkowa śródbłonka naczyń włosowatych pokryte są gęstą siecią wysokooporowych połączeń. Najważniejszymi z nich są złącza ścisłe – TJs (*ang. Tight Junctions*),

zlokalizowane głównie po apikalnej stronie błon komórkowych [36]. W bazalnej części zlokalizowane są natomiast połączenia przylegające – AJs (*ang. Adherens Junctions*) [36]. AJs zbudowane są z koneksyny 43, należącej do obszernej rodziny cząstek adhezyjnych – kaderyn, oraz z peryferyjnych białek – katenin [8, 45]. TJs są o tyle ważniejsze w utrzymaniu szczelności barier mózgowych, ponieważ charakteryzują się bardzo wysoką opornością elektryczną ($1500 - 2000 \Omega\text{cm}^{-2}$) [4, 8, 45].

Głównymi komponentami złącz ścisłych są transmembranowe białka okludyny i rodzina śródbłonkowych białek – klaudyn. Oba te białka łączą się z elementami cytoszkieletu za pomocą cytoplazmatycznych protein wchodzących w skład kompleksu zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) [1, 8, 19]. Okludyna była pierwszym odkrytym białkiem połączenia barierowego [4, 8, 45]. Jest to fosfoproteina o masie cząsteczkowej 65 KDa, czterokrotnie przechodząca przez błonę komórkową. Zarówno koniec karboksylowy jak i aminowy znajdują się po stronie cytoplazmatycznej. Końce te łączą się bezpośrednio z białkami strefy zamykającej, będącymi w sąsiedztwie włókien aktynowych. Badania na myszach z nokautem w genie dla okludyny, wykazały, że brak ekspresji dla białka nie wpływa na obniżenie funkcji barierowych, jak również w porównaniu ze szczepem dzikim, nie powoduje istotnych różnic w wartości oporności naczyń włosowatych w mózgowiu [8, 45]. Te badania wykazały, że białko to nie jest odpowiedzialne w sposób bezpośredni za utrzymanie szczelności bariery, a raczej sugerują, że poprzez współdziałanie z innymi elementami połączenia barierowego, białko spełnia rolę regulatorowe w szlakach transdukcji sygnałowej [24, 29].

Klaudyna jest mniejsza od okludyny – jej masa cząsteczkowa wynosi 22 kDa [4, 24, 26, 29]. Do tej pory zidentyfikowano 24 białka z tej rodziny [4, 29]. Wszystkie wykazują podobną topologię w błonach komórkowych w stosunku do okludyn (ryc.1a). Zbudowane są z 4 transmembranowych domen i dwóch zewnątrzkomórkowych pętli. W komórkach śródbłonka zlokalizowano dotychczas 4 typy tego białka: klaudynę -1, -3, -5, i -15 rodziny [4, 24, 29]. W mózgu ssaków komórki śródbłonka wykazują ekspresję dla klaudyny – 3 i -5 rodziny [31, 48]. Współczesne badania podkreślają rolę klaudyny – 5 w aktywacji metaloproteinazy - 2, sugerując jej ważną rolę w utrzymaniu szczelności bariery mózgowej i w angiogenezie [22]. Ponadto zwierzęcy model zaburzenia genetycznego w ekspresji tego białka, potwierdza jego krytyczną rolę w formowaniu się złącz ścisłych [33].

Kolejnymi komponentami połączeń barierowych w mózgowiu są białka adhezji komórkowej - JAM-A, -B, -C oraz -D (*ang. Junction Adhesion Molecules*) [16]. Są to białka należące do nadrodziny immunoglobulin. W mózgu najbardziej rozpowszechnioną cząstką adhezyjną dla leukocytów jest typ A, która poprzez swój terminalny koniec zanurzony w cytoplazmie, łączy się z guanylowaną resztą kinazową domeny okludyny [16]. Sugeruje się że JAM-A wpływa na zachowanie polarności komórek śródbłonka i jest bardzo ważna w formowaniu się złącz ścisłych.



RYCINA 1. Schemat budowy i rodzaje transportu poprzez barierę krew-mózg. **(a)** Składniki połączeń ścisłych między komórkami śródbłonka, wchodzącymi w skład bariery krew-mózg. Połączenia ścisłe tworzą trzy główne grupy białek tj. białka transbłonowe: kładyny, okludyna i cząstki adhezyjne

(JAM), białka towarzyszące ZO (ZO-1, -2, itd.) oraz białka cytoszkieletu jak aktyna i inne. **(b)** Rodzaje komórek tworzących barierę. Komórki śródbłónka naczyniowego połączone są ściśle ze sobą. Towarzyszą im komórki okołonaczyniowe tzw. perycyty i razem z nimi pokryte są wspólną błoną podstawną, która pokrywają zakończenia wypustek astrocytów tzw. stopki astrocytarne. **(c)** Rodzaje transportu cząsteczek poprzez barierę krew-mózg

FIGURE 1. Schematic diagram of structure and transport across blood-brain barrier. **(a)** Components of tight junctions between blood-brain barrier endothelial cells. Tight junctions are made by three main protein groups i.e. transmembrane: claudins, occludine and Junction Adhesion Molecules; accessory proteins of Zonula Occludens (ZO-1, -2 etc) as well as cytoskeleton ones as actin and others. **(b)** Types of cells that constitute blood-brain barrier. Endothelial cells are tightly interconnected and accompanied by perivascular cells, so called perycytes and commonly covered by basement membrane, which is enclosed by astrocytic processes. **(c)** Types of molecules transport through blood-brain barrier

Oprócz białek błonowych w składzie połączeń barierowych wyróżnia się jeszcze białka cytozolowe. Pierwszym odkrytym białkiem cytoplazmatycznym związanym z barierą krew - mózg było ZO-1 o masie 210 – 225 kDa [16]. W kilka lat później odkryto jeszcze dwa izomery z rodziny białek strefy zamykającej, tj. ZO-2, ZO-3. Wszystkie trzy proteiny tworzą wewnątrz cytoplazmatyczny kompleks – „blaszkę” – z jednej strony za pomocą ZO-1 połączony z C – końcem okludyny, a z drugiej z cinguliną [36]. Schemat organizacji białek w połączeniach barierowych w mózgowiu przedstawia rycina 1a.

Dzięki tak precyzyjnej organizacji połączeń między komórkami śródbłónka, endotelium tworzy ciągłą warstwę, która na swej powierzchni pokryta jest dodatkowo przez zdolne do fagocytozy perycyty, zespolone z błoną podstawną [23]. Błona ta stanowi zewnątrzkomórkową macierz, w skład, której wchodzi m.in.: kolagen typu IV i V, fibronektyna oraz laminina [23]. Endotelium naczyń krwionośnych wykazuje specyfikę gatunkową, osobniczą jak również narządową, stąd wyodrębniono 3 zasadnicze jego typy [49]. Do pierwszego rodzaju zalicza się włosniczki pozbawione w swoich ścianach fenestracji (okienek), a więc nieprzeprowadzające ważnego transportu międzykomórkowego – pinocytozy. Taki typ kapilar tworzy barierę krwio - mózgową i występuje w obrębie niemal całego ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [49], a poza nim w siatkówce, męskich gruczołach płciowych i w płucach [49]. Kolejny rodzaj to śródbłonek o budowie okienkowej – znajdujący się w kłębuszkach nerkowych, gruczołach dokrewnych i splocie naczyniówkowym, gdzie wchodzi w skład BCSFB. Ostatni typ stanowią komórki nieciągłe charakterystyczne dla naczyń zatokowych, wątroby, szpiku i śledziony [49].

W skład neuronaczyniowego zespołu komórkowego wlicza się dodatkowo astrocyty. W 85 - 90 % endotelium mózgu, otoczone jest przez stopki końcowe neurogleju tworzące glejową błonę okołonaczyniową [24]. Tworzy ona dodatkową osłonę, jaką muszą pokonać związki chemiczne krążące we krwi, aby dostać się do mózgu. Zwiększa tym samym wybiórczo przepuszczalność bariery krew - mózg podczas wzmożonej czynności neuronalnej. Uważa się, że mechanizm tego zjawiska polega na depolaryzacji błony astrocytów, które znajdują się w ścisłym

sąsiedztwie śródbłonka naczyniowego. Wpływ jonów potasowych z astrocytów zwiększa przewodność kanałów Ca^{2+} w endotelium, a dokomórkowy prąd wapniowy aktywuje elementy cytoszkieletu w cytoplazmie komórek śródbłonka i powoduje skurcz poszerzający odstępy między złączami [17]. Ponadto czynniki transkrypcyjne komórek astrogleju indukują ekspresję koneksyny 43 – białka budującego połączenia przylegające w śródbłonku mózgowym [17]. Schemat neuronaczyniowej bariery mózgowej przedstawia rycina 1b.

Integralność budowy bariery mózgowej pozwala jej zatem na spełnianie wielu funkcji, z których najważniejszą jest precyzyjna wymiana związków chemicznych między OUN a układem krążenia [24]. Ścisła kontrola transportu substratów i metabolitów odbywa się za sprawą błonowych układów transportujących (pompa Na^+/K^+ , symport, antyport) oraz w wyniku aktywności kontaktujących się z nimi astrocytów. Bariera krew – mózg stanowi więc uzupełnienie ochronnej funkcji błon komórkowych pojedynczych neuronów, a z uwagi na swą wybiórczą selektywność zabezpiecza OUN przed gwałtownymi zmianami zawartości płynu podczas wahań ciśnienia tętniczego i przed zaburzeniami osmolarności płynów ustrojowych [17]. Ponadto zapewnia ochronę przed działaniem substancji neuroaktywnych (katecholamin) i toksyn krążących we krwi, oraz pozwala zaopatrzyć neurony w ważne funkcjonalnie substancje, jak glukoza czy aminokwasy. Dodatkowo ta trudna do przełamania formacja stanowi zaporę dla komórek układu odpornościowego [36].

SELEKTYWNOŚĆ TRANSPORTU PRZEZ BARIERĘ KREW-MÓZG

Skład środowiska otaczającego neurony OUN objęty jest precyzyjną regulacją. Substancje obecne w osoczu takie jak: gazy (O_2 , CO_2), związki rozpuszczalne w lipidach (etanol, eter, hormony steroidowe, tarczycowe i niektóre leki lipofilne), czy peptydy o masie 400 - 800 Da docierają do wewnętrznego środowiska mózgu na zasadzie prostej dyfuzji [4]. Pozostałe drogi pasażu molekuł do OUN kontrolowane są w sposób selektywny aktywnością BBB. Ogólnie przyjmuje się, że szybkość, z jaką substancje przenikają do tkanki mózgowia jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczek i wprost proporcjonalna do ich rozpuszczalności lipidowej [34]. Dlatego też związki spolaryzowane, hydrofilne przechodzą wolniej. Niektóre substancje infiltrują barierę bardzo powoli, natomiast znacznie szybciej przechodzą ich związki pokrewne. Dzieje się tak w przypadku dopaminy i serotoniny, których przenikanie do mózgowia jest bardzo ograniczone, zaś ich prekursorzy (L - dopa i 5-hydroksytryptofan) przełamują ją znacznie łatwiej [35].

Komórki bariery krew – mózg wychwytyują z krwi i inaktywują wiele substancji, lecz nie posiadają zdolności do pinocytozy, która w innych włósczkach stanowi główną drogę przechodzenia wysokocząsteczkowych

związków organicznych [23]. Komórki kapilar mózgowych zawierają liczne mitochondria i wykazują dużą aktywność metaboliczną [9]. Aktywność ta dostarcza niezbędnej energii dla czynnego transportu przez podwójną warstwę lipidową z wykorzystaniem nośników białkowych.

W błonie komórkowej śródbłonka naczyń mózgowia ulega ekspresji niezależny od insuliny transporter glukozy typu GLUT-1, białko zbudowane z 12 domen wewnątrzłonowych, tworzących łańcuch polipeptydowy typu α -helisy [53]. Ponadto w podwójnej warstwie lipidowej zlokalizowano transporter typu GLUT-3, doprowadzający glukozę przetransportowaną przez barierę krew – mózg do wnętrza neuronów [53]. Inne przenośniki białkowe odpowiadają za zaopatrzenie środowiska neuronów w aminokwasy budulcowe, aminy biogenne oraz prekursorzy neurotransmiterów. Jony przechodzą przez barierę tylko na zasadzie transportu czynnego. W błonach bazalnych komórek śródbłonka znajduje się pompa sodowo – potasowa (ATP-aza Na^+/K^+) wprowadzająca kationy sodu do płynu zewnątrzkomórkowego mózgu i usuwająca z niego potas [26]. Ważną rolę odgrywają również przeciwttransportery Na^+/H^+ i $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ znajdujące się w błonie luminalnej [26]. Dzięki współdziałaniu tych układów jony Na^+ i Cl^- wędrują do płynu zewnątrzkomórkowego, a jony K^+ , H^+ i HCO_3^- w przeciwnym kierunku. Niektórzy badacze sugerują, że międzykomórkowy pasaż substancji może odbywać się również poprzez hydrofilne złącza ścisłe (TJs) [24]. Kapilary mózgu wykazują względnie niską przepuszczalność dla wody. Przenika ona za pośrednictwem kanałów wodnych – głównie akwaporyn typu 1 (AQP_1), zgodnie z gradientem osmotycznym napędzanym transportem czynnym [28].

Rodzaj transportu zależy, zatem od masy cząsteczkowej molekuł, ich lipofilności, rodzaju ładunku, jakim zostały obdarzone, oraz od dostępności przenośników w błonach komórkowych. Dzięki istnieniu bariery, zmiany osmolarności płynu zewnątrzkomórkowego mózgu i płynu mózgowo - rdzeniowego wykazują znaczne opóźnienie czasowe w stosunku do zmian osmolarności innych płynów ustrojowych [28]. Te unikalne cechy warunkują utrzymanie sprawnej homeostazy w obrębie OUN. Drogi transportu przez śródbłonek mózgowy przedstawia rycina 1c.

Należy zwrócić uwagę, że rozwój bariery krew-mózg jest procesem stopniowym, który u ludzi zaczyna się w trakcie rozwoju płodowego, a w pełni dojrzałą strukturę i funkcjonalność osiąga ona około 6. miesiąca życia [11]. Jednocześnie trudno jest określić dokładne okresy krytyczne w rozwoju bariery, lecz generalnie uważa się, że proces jej formowania zaczyna się krótko po rozpoczęciu wykształcania sieci naczyniowej w tworzącym się układzie nerwowym [5] i osiąga swoje największe nasilenie we wczesnym okresie po urodzeniu, by ulec zahamowaniu w dojrzałym układzie nerwowym. Jednakże należy podkreślić, że nie wszystkie naczynia stają się nieprzepuszczalne w tym samym czasie, lecz zależy to od anatomicznej lokalizacji gdyż np. bariera w obrębie rdzenia kręgowego tworzy się wcześniej niż w np. przodomózgowiu [2]. Przykładem zarówno na stopniowe i zróżnicowane regionalne „uszczelnianie”

bariery krew mózg jest występowanie żółtaczki jąder podkorowych tzw. kernicterus, która jest częstsza u wcześniaków niż u noworodków urodzonych o czasie [14, 50]. Związana jest ona z podwyższonym stężeniem, niezwiązanej z albuminą bilirubiny we krwi, która przenika do mózgu przez niewykształconą w pełni barierę krew-mózg i ma toksyczny wpływ głównie na neurony i nie zróżnicowane astrocyty [42]. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym jej gromadzeniu w osoczu sprzyja fakt, iż noworodki mają po urodzeniu, przejściowo osłabiony system wiązania i usuwania bilirubiny [43]. Kiedy poziom bilirubiny osiągnie poziom toksyczny, dochodzi do zmian zachowania niemowlęcia, które staje się podrażnione lub ospałe, płaczące, obserwuje się zaburzenia układu słuchowego, a w skrajnych przypadkach może dojść do nieodwracalnej encefalopatii, kiedy następuje nasilenie się objawów neurologicznych jak zeszywnienie i wygięcie do tyłu kręgosłupa (tzw. opistotonus), nadmierne napięcie mięśniowe, piskliwy płacz, drgawki, a w późniejszym okresie następują ostre upośledzenie umysłowe [50]. Klinicznie zjawiska te związane są z wybiórczą degeneracją komórek w gałce bladej, substancji czarnej, jądrze podwzgórzowym, hipokampie, mózdzku oraz w słuchowym, przedśionkowym i okoruchowym jądrach pnia mózgu, a same struktury makroskopowo nabierają żółtą barwę [42]. Występowanie tej choroby nawet u kilkumiesięcznych niemowląt wskazuje, że dojrzewanie bariery krew-mózg jest procesem długotrwałym i może zachodzić także w okresie po urodzeniowym, z różnym nasileniem w poszczególnych strukturach układu nerwowego.

Z uwagi na precyzyjną wybiórczość bariery, większość leków nie może przechodzić do mózgu. Wiadomo, że tylko substancje nienaładowane, lipofilne i wykazujące małe rozmiary mogą przechodzić przez BBB bez większych przeszkód. Są to jednak poważne ograniczenia, z jakimi nie są w stanie poradzić sobie dostępne obecnie terapie. Dodatkowymi ograniczeniami dla nich są precyzyjne mechanizmy transportujące w komórkach endotelium, tj. niski poziom pęcherzyków pinocytarnych i selektywne transportery w błonie komórkowej. Wiadome jest, że wśród antybiotyków, penicylina oraz chlorotetracyklina przechodzą do mózgowia w niewielkim stopniu, natomiast przełamanie biologicznej bariery jest prawie niemożliwe dla sulfadiazyny i erytromycyny [3]. Ponad 98% potencjalnych leków nie spełnia zatem warunków selekcji mózgowego śródbłonna i z tej przyczyny BBB stanowi przedmiot wielu badań w dziedzinach biologii molekularnej i medycyny, a naukowcy szukają różnych metod, za pomocą, których można by pokonywać zaporę mózgu. Do metod tych zalicza się uszkodzenie tkanki nerwowej, dożylną iniekcję hipertonicznych płynów, podawanie naczyniowo aktywnych substancji, modyfikacja chemiczna leków, transcytoza receptorowa oraz strategie wektorowe [25]. Kilka z tych metod bazuje na wirusach i syntetycznych polimerach, a także na liposomach i lipoproteinach o małej gęstości – LDL [30]. Okazują się one jednak nieskuteczne, gdyż często nie dostarczają leków do miejsc ich przeznaczenia. Badania nad metodami przełamania bariery krew - mózg stanowią, zatem olbrzymie wyzwanie dla

dzisiejszej medycyny. Równie ważny z klinicznego punktu widzenia jest fakt, że bariera neuronaczyniowa jest rozluźniona w okolicach mózgowia, które zostały napromieniowane, zakażone lub umiejscowił się w nich guz. Zaburzenia mechanizmów barierowych obserwuje się również w przebiegu uszkodzeń głowy i wielu stanach chorobowych, jak stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona [24].

STRUKTURY W OBRĘBIE OUN POZBAWIONE BBB

Stopień przepuszczalności bariery jest różny w poszczególnych okolicach OUN i jest nieco wyższy w obrębie okołokomorowych narządów naczyniowych CVO (*ang. Circumventricular Organs*). Znajdują się one m.in.: w ścianach komory trzeciej, w podwzgórzu, w obrębie guza popielatego i lejka, pod dnem IV komory i w polu najdalszym [13]. Dzięki temu niektóre substancje hydrofilne o większej masie niż 800 Da, jak hormony peptydowe podwzgórza, mogą dostawać się do krwi oraz wnikać z krwi do mózgu, by tam oddziaływać na swoiste receptory.

Naczynia włosowate w obrębie CVO wykazują fenestracje [13], w rezultacie czego obszary te nie stanowią przeszkody dla nieco większych i rozpuszczalnych w wodzie związków. Stąd też mówi się o nich, że są „poza barierą krew – mózg”. Niektóre z tych rejonów pełnią funkcję narządów neurohemalnych, czyli takich, w których występujące neurony uwalniają do krwioobiegu określone substancje. Przykład stanowi tylny płat przysadki uwalniający do krwioobiegu oksytocynę i wazopresynę.

Również gruczoły dokrewne związane z mózgiem jak szyszynka czy przedni płat przysadki mają naczynia włosowate o budowie okienkowej. Taka budowa śródbłonna pozwala na sprawną sekrecję neuropeptydów do krążenia wrotnego występującego w tych gruczołach.

Pozostałe okolice CVO działają jako pola chemoreceptorowe. Jest tak w przypadku pola najdalszego (*area postrema*), skąd jest inicjowany odruch wymiotny w odpowiedzi na zmiany składu chemicznego osocza [13].

BARIERA KREW – MÓZG A USZKODZENIE MÓZGU

Urazy czaszkowo-mózgowe stanowią olbrzymi problem społeczny i ekonomiczny w krajach wysoce zurbanizowanych. Są one częstszą przyczyną śmiertelności niż urazy jakiegokolwiek innego narządu, w czym dwukrotnie częściej stwierdza się je u mężczyzn niż u kobiet [10]. Z uwagi na szerokie spektrum zmian pourazowych, związanych z uszkodzeniem mózgu (*ang. Traumatic Brain Injury, TBI*), w obecnym czasie dużo uwagi poświęca się badaniom dotyczącym tego zagadnienia.

Uszkodzenie tkanki mózgowej jest klasyfikowane na pierwotne i wtórne. Pierwszy typ zdarza się tuż po zadziałaniu na głowę czynnika uszkodzającego, z kolei wtórne zaburzenia są wynikiem skomplikowanych reakcji, które w rezultacie prowadzą do rozległych zmian neurologicznych. Czas od chwili wystąpienia uszkodzenia, do momentu wystąpienia wtórnej reakcji to tzw. „okno terapeutyczne” dla podania leków, czyli interwencji w celu redukcji liczby uszkodzonych neuronów, co w rezultacie prowadzić może do zdrowienia.

Uszkodzenie pierwotne ma miejsce natychmiast po dokonaniu deformacji tkanki, na skutek przerwania ciągłości naczyń krwionośnych, naruszenia struktury neuronów oraz komórek glejowych. Te morfologiczne zmiany następują na skutek zadziałania na tkankę siły mechanicznej i prowadzą do ogniskowego lub rozproszonego uszkodzenia mózgu. W pierwszej kolejności dochodzi do bezpośredniego zniszczenia komórek śródbłonna. Powierzchnia błony od strony światła naczynia krwionośnego zostaje zmieniona morfologicznie, – co jest przyczyną wzmożonego kontaktu elementów morfotycznych krwi z komórkami endotelium. W procesie upośledzenia ich funkcji, następuje rozszczelnienie złączeń międzykomórkowych i powstawanie wolnych przestrzeni, przez które krwiopochodne elementy (komórki immunokompetentne, krwinki czerwone, białka osocza, frakcje lipidów) wędrują z krwioobiegu do mózgu [38]. Chronologicznie pierwsze komórki, jakie przenikają uszkodzoną barierę to neutrofile, a zaraz za nimi makrofagi. Komórki te prowadzą do rozszczelnienia bariery przez obfite uwalnianie mediatorów reakcji zapalnych oraz reaktywne formy tlenu i tlenek azotu [10]. Na skutek traumy lokalnie produkowane cytokiny (TNF, IL – 1, IL – 6) i chemokiny wywierają synergiczny efekt na komórki śródbłonna, indukując syntezę cząstek adhezyjnych dla leukocytów [52].

Mózg uważany jest za organ aktywnie biorący udział w reakcji odpornościowej. Niemal wszystkie komórki w obrębie toczącego się procesu zapalnego są w stanie wydzielać cytokiny. Neurony ponadto są w stanie syntetyzować także swoiste dla tych mediatorów receptory. W TBI bariera zostaje otwarta w dwóch fazach. Wczesne zaburzenia funkcji BBB obserwowane są od 3 godziny po uszkodzeniu i prowadzą do drugiej fazy przeciekania bariery, która zachodzi w 1 i 2 dniu po stronie uszkodzenia [41]. Za przyczyny takiego zjawiska uznaje się wpływ mediatorów reakcji zapalnej, wtórnych przekaźników, i metaloproteinaz, czyli substancji, które w głównej mierze wydzielane są przez aktywowany endotelium. Metaloproteinazy wchodzą w interakcje z reaktywnymi formami tlenu, prowadząc do przełamania zapory mózgowej [18]. Uszkadzają bowiem komórki śródbłonna, białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz w głównej mierze białka błony podstawnej. Modułują, więc funkcje BBB w stanach chorobowych. Mogą być produkowane przez wszystkie komórki w obrębie mózgu, oraz mogą być dostarczane wraz z rekrutowanymi leukocytami. W mózgu ekspresji ulega kilka metaloproteinaz, jednak najważniejsze proteazy zaangażowane w procesy rozszczelnienia bariery mózgowej to MMP-2 oraz MMP-9 [18]. Odpowiadają one bowiem za proteolizę białek błony podstawnej. Otwarcie

bariery krew – mózg na skutek działania metaloproteinaz ma miejsce pierwotnie w 3 godz. od powstania lezji, a wtórnie, jako opóźniona faza zachodzi w 48 godz. od uszkodzenia. Istnieje koincydencja pomiędzy wzrostem ekspresji MMP-2 a pierwszym otwarciem mózgowej zatory w 3 godzinie, która dzieje się na skutek rozkładania składników macierzy, jak również pomiędzy ekspresją MMP – 9 w 24 – 48 godzin po uszkodzeniu, a późniejszym wtórnym jej otwarciem [18]. MMP – 2 spełnia także role ochronne, gdyż wykazano jej ekspresję na stopkach końcowych astrocytów w rejonie głozy [40]. W miejscu obrzęku pojawiają się także trombiny, czyli potencjalni aktywatorzy metaloproteinaz. Ponadto trombiny konwertują fibrynogen do fibryny, stabilizując w ten sposób skrzep [21].

Po uszkodzeniowe niedokrwienie jest bez wątpienia przyczyną nieprawidłowego działania BBB. Prowadzi ono również do rozciągnięcia się uszkodzenia na stronę przeciwną. Patofizjologiczne następstwa uszkodzenia mózgu są bardzo skomplikowane, a są wynikiem także pierwotnych procesów toksycznych. Czynnikiem uszkodzającym są: niedobór tlenu i glukozy, ekscytotoksyczne stężenie glutaminianu oraz reaktywne formy tlenu. Procesy utleniania biologicznego, polegają na przenoszeniu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Dochodzi do zużycia większości tlenu dostarczanego wraz z krwią, w celu produkcji wysokoenergetycznych związków, takich jak ATP [1]. Z niewielkiej części tlenu (5%) tworzą się wolne rodniki tlenowe – w tym tlenek azotu. Wysoki poziom NO wywołuje postępujące uszkodzenie komórek, a wewnątrzkomórkowy wzrost jonów wapnia prowadzi do zwiększenia jego produkcji przez aktywację syntazy, NOS-1 [12]. Powstałe w ten sposób nadtlenuki uszkodzają DNA powodując apoptozę komórek, a co za tym idzie przerywając integralność bariery krew – mózg.

Poziom glutaminianu gwałtownie podnosi się na skutek rozpadu neuronów i uwalniania ich zawartości do otaczających je komórek. Prowadzi to do nabrzmiewania neuronów. Dodatkowo na powierzchni śródbłoka ulegają ekspresji oba receptory dla glutaminianu – rec. NMDA i AMPA [37]. Wysoki poziom cytokin stymuluje uwalnianie glutaminianu, który pobudza receptory metabotropowe na komórkach endotelium. Obecne badania sugerują, że cytotoksyczny poziom glutaminianu wpływa na uszkodzenie śródbłoka przez łączenie się do jonotropowych receptorów NMDA na ich powierzchni, natomiast aktywacja metabotropowych receptorów prowadzi do wzrostu rezystancji komórek śródbłoka [37]. Dokładny mechanizm tych zjawisk nie został jednak dostatecznie poznany. Poza właściwościami receptorowymi dla glutaminianu, receptor NMDA służy jako kanał jonowy dla jonów wapnia, sodu i potasu, z preferencją dla wapnia [47]. Jednym ze sposobów w jaki glutaminian może wpływać na zmianę szczelności barierowej, to wzmożona ekspresja receptorów NMDA prowadząca do wzrostu stężenia wapnia. To z kolei prowadzi do kaskady wtórnych zdarzeń biochemicznych, prowadzących do powstawania reaktywnych form tlenu i co za tym idzie fosforylacji białek złącz ścisłych. Wapń z kolei jest przyczyną nadmiernej aktywacji enzymów zależnych od Ca^{+2} , w tym kinaz białkowych,

proteaz i endonukleaz – tzn. enzymów degradujących białka cytoszkieletu, białka regulatorowe i kwasy nukleinowe. Wzrost stężenia tych enzymów w komórkach śródbłonka skutkuje fosforylacją ZO –1, ZO – 2, a także produkcją NO, na skutek wzmożonej syntezy tlenu azotu. Tlenek azotu może bezpośrednio przyczynić się do zmian w przepuszczalności bariery krew – mózg, za sprawą nitrozytacji oraz nitroazytacji białek w obrębie TJs, głównie ZO – 1 [27].

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia na skutek mechanicznego uszkodzenia prowadzi, zatem do reorganizacji złącz ścisłych, a więc zmienia morfologię komórek śródbłonka. Wiele badań nad zjawiskami, jakie zachodzą w obrębie złącz ścisłych na skutek uszkodzenia sugeruje, że dotyczą one zmian w lokalizacji białek wchodzących w ich skład. Głównie fluktuacjom podlegają okludyna i białka strefy zamykającej [44]. Zmiany te, oraz zaburzenia w ekspresji białek w mózgowym śródbłonku, prowadzą do przepuszczalności komórkowej. Po niedotlenieniu i niedokrwieniu białka budujące złącza ściśle ulegają fosforylacji, na skutek działania wolnych rodników. Powoduje to powiększenie odległości pomiędzy komórkami endotelium. Pewne potranslacyjne modyfikacje mogą wpływać na funkcje TJs na różne sposoby. Okludyna może być fosforylowana w kilku miejscach. Gdy proces ten zachodzi w resztach Ser/Thr, lokalizacja białka w obrębie endotelium nie ulega zmianie. Gdy fosforylowana zostaje reszta tyrozyny, białko jest degradowane, a co za tym idzie, zostają zaburzone wewnątrzplazmatyczne połączenia z białkami strefy zamykającej (ZO – 1, ZO – 2, ZO – 3). Skutkiem tego jest rozszczelnienie bariery krew – mózg [46].

W obszarach, w których giną neurony, zaobserwowano intensywną mikroglejozę i astroglejozę. Zmiany te rozwijają się z opóźnieniem w stosunku do uszkodzenia, ale utrzymują się przez wiele tygodni. Po uszkodzeniu komórki mikrogleju ulegają hipertrofii, wędrują do ogniska chorobowego, gdzie dzięki własnościom żernym fagocytują degenerujące lub obumarłe neurony; wydzielając cytokiny, rekrutują makrofagi i limfocyty, a także indukując astroglejozę [38]. Aktywacja astrocytów jest opóźniona względem aktywacji mikrogleju. Astrocyty ulegają hipertrofii i podejmują syntezę substancji troficznych działających neuroprotekcynie, m.in. czynnika wzrostu nerwów (*ang. Nerve Growth Factor - NGF*) i czynnika wzrostu fibroblastów (*ang. Fibroblast Growth Factor - FGF*) [38]. Aktywowane astrocyty wypełniają ubytki po obumarłych neuronach, mogą też wpływać na przekazywanie synaptyczne, wydzielając D-serynę, która zwiększa wiązanie Glu z receptorem NMDA. Ponadto na procesy naprawcze ma wpływ tlenek azotu, który promuje angiogenezę poprzez zapobieganie agregacji płytek krwi oraz inhibicji adhezji leukocytów w uszkodzonej tkance [38].

MARKERY STOSOWANE W BADANIU ZMIAN PRZEPUSZCZALNOŚCI BARIERY KREW – MÓZG

Spośród endogennych białek osocza, najczęściej stosowanymi wskaźnikami do badania zmian przepuszczalności bariery krew – mózg są: albumina o masie cząsteczkowej 66-69 kDa, immunoglobuliny klasy G (IgG) o masie cząsteczkowej 150 kDa, fibronektyna (200 kDa) oraz fibrynogen (340 kDa) [32]. W odróżnieniu do wskaźników egzogennych, białka te są dużymi molekułami, co teoretycznie może upośledzić ich dyfuzję w miejscu uszkodzenia. Jednakże ze względu na ich stałą obecność w organizmie, infiltracja bariery jest zależna od czasu. Zatem nawet w przypadku wolnego przeciekania oraz niskiego tempa dyfuzji, białka osocza mogą być użyte do pomiaru przepuszczalności bariery krew – mózg w stanach chorobowych [32]. Jednakże ich stosowanie ma pewne ograniczenia, ponieważ koncentracja białek we krwi może się wahać w zależności od zmian zachodzących w organizmie, takich jak uszkodzenie nerek, niedożywienie czy hemostaza. Egzogenne wskaźniki są mniej narażone na takie fluktuacje, jednakże ich stężenie we krwi także może ulegać zmianom, w zależności od stanu czynnościowego wątroby czy nerek. Najczęściej stosowanym markerem egzogennym jest peroksydaza chrzanowa (HRP) o masie cząsteczkowej 40 kDa i błękit Evansa o masie cząsteczkowej 950 Da, które z wysokim powinowactwem łączą się do endogennej albuminy [51]. Są one szeroko rozpowszechnionymi markerami, stosowanymi w badaniach integralności bariery krew – mózg w przebiegu wielu stanów chorobowych, takich jak: udar, niedotlenienie, guzy mózgu, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera, choroba Parkinsona oraz urazy czaszkowo – mózgowe.

PODSUMOWANIE

Bariera krew – mózg stanowi delikatną strukturę, która tworzy selektywną zaporę pomiędzy środowiskiem mózgu a układem krążenia. Działa ona poprzez precyzyjne mechanizmy kontrolujące pasaż molekuł z krwi do mózgu. Osiągnięte zostają one poprzez współdziałanie ze sobą kilku typów komórek, które razem tworzą neuronaczyniowy zespół komórkowy. Oprócz bezokienkowych komórek śródbłonna, na właściwości selekcyjne wpływają również perycyty, astrocyty, białka błony podstawnej i neurony. Ta precyzyjnie działająca zapora stanowi przeszkodę dla czynników uszkadzających delikatne środowisko mózgu, jednakże jest też nieosiągalna dla substancji leczniczych. Okazuje się, że szczelność omawianej formacji komórkowej może być rozregulowana w przebiegu wielu jednostek chorobowych, takich jak schorzenia neurodegeneracyjne, zmiany naczyniowe oraz bezpośrednie uszkodzenia mózgu. Stąd też niesłychanie ważne jest, aby poznać dokładnie fizjologiczne własności BBB oraz zaburzenia,

w których dochodzi do rozluźniania jej struktury. Dokładne poznanie różnorodnych aspektów budowy BBB, a także mechanizmów, które prowadzą do zmian w przepuszczalności barierowej, może okazać się zatem kluczem do osiągnięcia sukcesu terapeutycznego.

LITERATURA

- [1] ABBOTT NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; **20**: 131-147.
- [2] AHDAB-BARMADA M. Kernicterus in the premature neonate. *J Perinatol* 1987; **7**: 149-152.
- [3] AYRTON A, MORGAN P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 2001; **31**: 469-497.
- [4] BALLABH P, BRAUN A, NEDERGAARD M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* 2004; **16**: 1-13.
- [5] BAUER HC, BAUER H. Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; **20**: 13-28.
- [6] BECHMANN I, GALEA I, PERRY VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in immunology* 2007; **28**: 5-11.
- [7] BEGLEY DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & therapeutics* 2004; **104**: 29-45.
- [8] BERNACKI J, DOBROWOLSKA A, NIERWINSKA K, MALECKI A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep* 2008; **60**: 600-622.
- [9] BICKEL U, YOSHIKAWA T, PARDRIDGE WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Advanced drug delivery reviews* 2001; **46**: 247-279.
- [10] CHERIAN L, HLATKY R, ROBERTSON CS. Nitric oxide in traumatic brain injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2004; **14**: 195-201.
- [11] COSTA LG, ASCHNER M, VITALONE A, SYVERSEN T, SOLDIN OP. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2004; **44**: 87-110.
- [12] DAWSON VL, DAWSON TM. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochemistry international* 1996; **29**: 97-110.
- [13] DUVERNOY HM, RISOLD PY. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain research reviews* 2007; **56**: 119-147.
- [14] ENGELHARDT B. Development of the blood-brain barrier. *Cell and tissue research* 2003; **314**: 119-129.
- [15] EYAL S, HSIAO P, UNADKAT JD. Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? *Pharmacology & therapeutics* 2009; **123**: 80-104.
- [16] FORSTER C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology* 2008; **130**: 55-70.
- [17] GIAUME C, TABERNERO A, MEDINA JM. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* 1997; **21**: 114-123.
- [18] GIDDAY JM, GASCHÉ YG, COPIN JC, SHAH AR, PEREZ RS, SHAPIRO SD, CHAN PH, PARK TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *American journal of physiology* 2005; **289**: H558-568.
- [19] GLOOR SM, WACHTEL M, BOLLIGER MF, ISHIHARA H, LANDMANN R, FREI K. Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain research* 2001; **36**: 258-264.
- [20] GRAFF CL, POLLACK GM. Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Current drug metabolism* 2004; **5**: 95-108.
- [21] GUAN JX, SUN SG, CAO XB, CHEN ZB, TONG ET. Effect of thrombin on blood brain barrier permeability and its mechanism. *Chinese medical journal* 2004; **117**: 1677-1681.
- [22] GURNEY KJ, ESTRADA EY, ROSENBERG GA. Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiology of disease* 2006; **23**: 87-96.

- [23] HASELOFF RF, BLASIG IE, BAUER HC, BAUER H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and molecular neurobiology* 2005; **25**: 25-39.
- [24] HAWKINS BT, DAVIS TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews* 2005; **57**: 173-185.
- [25] HERVE F, GHINEA N, SCHERRMANN JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *The AAPS journal* 2008; **10**: 455-472.
- [26] HUBER JD, WITT KA, HOM S, EGLETON RD, MARK KS, DAVIS TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *American journal of physiology* 2001; **280**: H1241-1248.
- [27] KALAYCI R, KAYA M, UZUN H, BILGIC B, AHISHALI B, ARICAN N, ELMAS I, KUCUK M. Influence of hypercholesterolemia and hypertension on the integrity of the blood-brain barrier in rats. *The International journal of neuroscience* 2009; **119**: 1881-1904.
- [28] KIMELBERG HK. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* 2004; **129**: 851-860.
- [29] KNIIESEL U, WOLBURG H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; **20**: 57-76.
- [30] KREUTER J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 2004; **4**: 484-488.
- [31] LIEBNER S, FISCHMANN A, RASCHER G, DUFFNER F, GROTE EH, KALBACHER H, WOLBURG H. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* 2000; **100**: 323-331.
- [32] MA KC, OLSSON Y. Structural and vascular permeability abnormalities associated with lacunes of the human brain. *Acta neurologica Scandinavica* 1993; **88**: 100-107.
- [33] NITTA T, HATA M, GOTOH S, SEO Y, SASAKI H, HASHIMOTO N, FURUSE M, TSUKITA S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 2003; **161**: 653-660.
- [34] PAN W, KASTIN AJ. Why study transport of peptides and proteins at the neurovascular interface. *Brain research* 2004; **46**: 32-43.
- [35] PERSIDSKY Y, RAMIREZ SH, HAORAH J, KANMOGNE GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; **1**: 223-236.
- [36] PETTY MA, LO EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Progress in neurobiology* 2002; **68**: 311-323.
- [37] PLASCHKE K, SOMMER C, FAHRNER A, AMANN K, MARTIN E, BARDENHEUER HJ, KNAUTH M. Pronounced arterial collateralization was induced after permanent rat cerebral four-vessel occlusion. Relation to neuropathology and capillary ultrastructure. *J Neural Transm* 2003; **110**: 719-732.
- [38] RAIVICH G, BOHATSCHKE M, KLOSS CU, WERNER A, JONES LL, KREUTZBERG GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain research* 1999; **30**: 77-105.
- [39] RIBATTI D, NICO B, CRIVELLATO E, ARTICO M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anatomical record* 2006; **289**: 3-8.
- [40] ROSENBERG GA, CUNNINGHAM LA, WALLACE J, ALEXANDER S, ESTRADA EY, GROSSETETE M, RAZHAGI A, MILLER K, GEARING A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* 2001; **893**: 104-112.
- [41] SCHOLZ M, CINATL J, SCHADEL-HOPFNER M, WINDOLF J. Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Medicinal research reviews* 2007; **27**: 401-416.
- [42] SHAPIRO SM. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2010; **15**: 157-163.
- [43] SHAPIRO SM, BHUTANI VK, JOHNSON L. Hyperbilirubinemia and kernicterus. *Clinics in perinatology* 2006; **33**: 387-410.
- [44] SINGH AK, JIANG Y, GUPTA S. Effects of bacterial toxins on endothelial tight junction in vitro: a mechanism-based investigation. *Toxicology mechanisms and methods* 2007; **17**: 331-347.

- [45] STAMATOVIC SM, KEEP RF, ANDJELKOVIC AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Current neuropharmacology* 2008; **6**: 179-192.
- [46] TAKENAGA Y, TAKAGI N, MUROTOMI K, TANONAKA K, TAKEO S. Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; **29**: 1099-1108.
- [47] TIKHONOV DB. Ion channels of glutamate receptors: structural modeling. *Molecular membrane biology* 2007; **24**: 135-147.
- [48] VORBRODT AW, DOBROGOWSKA DH. Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 2004; **42**: 67-75.
- [49] WALSKI M, FRONTCZAK-BANIEWICZ M. [Ultrastructural features of normal and dysfunctional endothelium of the blood vessels]. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2007; **117 Suppl**: 46-49.
- [50] WENBERG RP. The blood-brain barrier and bilirubin encephalopathy. *Cellular and molecular neurobiology* 2000; **20**: 97-109.
- [51] WOLMAN M, KLATZO I, CHUI E, WILMES F, NISHIMOTO K, FUJIWARA K, SPATZ M. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta neuropathologica* 1981; **54**: 55-61.
- [52] ZAREMBA J, LOSY J. [Cytokines in clinical and experimental ischemic stroke]. *Neurologia i neurochirurgia polska* 2004; **38**: S57-62.
- [53] ZOVEIN A, FLOWERS-ZIEGLER J, THAMOTHARAN S, SHIN D, SANKAR R, NGUYEN K, GAMBHIR S, DEVASKAR SU. Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanisms mediating neuronal glucose transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **286**: R273-282.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 25.11.2011

Przyjęto: 24.01.2012

dr Marek Ziąja

Katedra i Zakład Histologii, Wydział Lekarski

Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum

ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków

tel.: 12 4227027

e-mail: marek.ziaja@uj.edu.pl