

Формулы Фармации. 2022. Т. 4, № 2. С. 60-69

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ: ДИСКУССИОННАЯ ТРИБУНА

Обзорная статья

УДК 612.824; 615.21; 616.03

DOI: <https://doi.org/10.17816/phf109914>

Молекулярные механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер как мишени для фармакологического воздействия

Часть 1. Структурно-функциональная организация ГЭБ

©2022. А. Н. Трофимов^{1,2}, М. В. Литвинова^{1,3}, А. П. Шварц⁴, В. В. Кошеверова⁵,
А. А. Лебедев³, Н. А. Арсениев¹, А. И. Тюкавин¹

¹Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²Лаборатория нейробиологии интегративных функций мозга, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³Лаборатория общей фармакологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴Лаборатория молекулярных механизмов нейронных взаимодействий, ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁵Лаборатория динамики внутриклеточных мембран, ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
Автор, ответственный за переписку: Александр Николаевич Трофимов, aleksandr.trofimov@pharminnotech.com

АННОТАЦИЯ. Биологические барьеры играют ключевую роль в поддержании целостности и функционирования организма на всех уровнях его организации. На клеточном уровне барьерная функция опосредована гидрофобными свойствами цитоплазматической мембраны, благодаря которым осуществляется избирательная проницаемость плазмолеммы для различных веществ в зависимости от их физико-химических свойств. От тканевого и до организменного уровней функции барьеров осуществляют межклеточные белковые комплексы плазматической мембраны. Они образуют парацеллюлярные диффузионные барьеры, разделяющие внутренние и внешние жидкостные среды и обеспечивающие условия для развития и функционирования органов. Избирательный транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является одним из ведущих механизмов поддержания гомеостаза и функционирования головного мозга. Нарушение функции ГЭБ наблюдается при различных видах патологии ЦНС и системных аутоиммунных заболеваниях. В обзоре отражены основные этапы развития ГЭБ в эмбриогенезе, а также представлены современные данные об морфофункциональных особенностях организации ГЭБ, включая молекулярные механизмы, опосредующие барьерную функцию за счет комплексного участия клеток сосудистой стенки церебральных микрососудов, а также экспрессии генов ферментных комплексов, активных и пассивных механизмов транспорта веществ через ГЭБ. Высокая транспортная избирательность ГЭБ является актуальной проблемой для доставки лекарственных препаратов в головной мозг. Вместе с тем не менее важным является совершенствование принципов фармакотерапии и коррекции нарушенных функций ГЭБ при различных видах патологии нервной и других систем организма. Настоящий обзор ставит целью донести до разработчиков современных таргетных препаратов новые сведения о молекулярно-генетических механизмах транспорта веществ через ГЭБ, а также привлечь внимание специалистов в области прецизионной медицины к проблеме нарушений барьерной функции сосудов головного мозга при неврологических и других заболеваниях современного человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гематоэнцефалический барьер; механизмы массопереноса через ГЭБ; центральная нервная система; фармакотерапия; прецизионная медицина; тромбоцитарный фактор роста

СОКРАЩЕНИЯ:

АТФ – аденозинтрифосфат; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; НГВЕ – нейроглиоваскулярная единица; ЦНС – центральная нервная система; ABC (ATP-binding cassette) – АТФ-связывающая кассета; JAM (junction adhesion molecule) – молекула адгезии контакта; Mdr1 (multidrug resistance 1) – белок множественной лекарственной устойчивости; PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста; Pgp (P-glycoprotein) – гликопротеин P; SLC (solute carrier) – переносчик растворенных веществ; TGF- β (transforming growth factor- β) – трансформирующий фактор роста; VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов; ZO (zonula occludens) – семейство белков плотных контактов.

1. ВВЕДЕНИЕ

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) отделяет системный кровоток от ЦНС и строго контролирует молекулярный и клеточный транспорт между кровью и мозгом. Площадь поверхности ГЭБ составляет около 10–20 м², что, для сравнения, примерно в 10–15 раз больше площади кожного покрова. Функции ГЭБ способствуют поддержанию стабильной среды, необходимой для функционирования нейронов и клеток окружения [1]. Элементы ГЭБ обеспечивают поступление в мозг необходимых нутриентов и удаление продуктов обмена в кровоток, а также изоляцию мозга от потенциально токсичных циркулирующих в кровяном русле веществ и от проникновения иммунных клеток и патогенов. Кроме того, ГЭБ регулирует интенсивность мозгового кровотока в зависимости от функциональной активности нейронов. В настоящее время регуляция функции сосудистой системы мозга в целом и ГЭБ в частности привлекает внимание исследователей в контексте изучения механизмов нейропатологии и разработки высокоэффективных фармпрепаратов центрального действия [2].

Барьерная функция ГЭБ обеспечивается как клеточными, так и субклеточными ее компонентами. Микроциркуляторное русло ЦНС имеет уникальные свойства, которые являются основой для обеспечения избирательности транспортировки веществ между кровью и головным мозгом. Капилляры ЦНС имеют непрерывную базальную мембрану, на которой располагаются клетки эндотелия, соединенные между собой тесными контактами, что препятствует проникновению через стенку капилляров макромолекул. Кроме этого, структура ГЭБ включает в себя дополнительные регуляторные элементы (клетки различного генеза и макромолекулярные комплексы), которые увеличивают избирательность барьера. В области ГЭБ эти элементы вступают в тесное взаимодействие и функционируют как единое целое. Такое тесное функциональное взаимодействие между элементами ГЭБ привело к формированию концепции «нейроваскулярной» [3], или «нейроглиоваскулярной единицы» (НГВЕ) [4].

К основным механизмам, обеспечивающим избирательность переноса веществ через ГЭБ, относятся: (1) плотные контакты между эндотелиоцитами капилляров; (2) метаболический, или ферментативный, барьер, формирующийся за счёт деятельности вспомогательных клеток, окружающих капилляры (обеспечивает расщепление веществ, тем или иным способом проникших через слой эндотелиоцитов); (3) транспортеры выведения (эффлюкса), обеспечивающие активное выведение молекул из ткани в кровь.

Понимание механизмов работы этих барьерных систем представляет большой интерес для разработки фармпрепаратов, способных преодолевать ГЭБ.

2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЭБ

Основными клеточными компонентами ГЭБ являются клетки эндотелия микрососудов, перициты и астроциты [5]. На субклеточном уровне реализация барьерной функции обеспечивается, прежде всего, контактами эндотелиальных клеток и внеклеточным матриксом (ба-

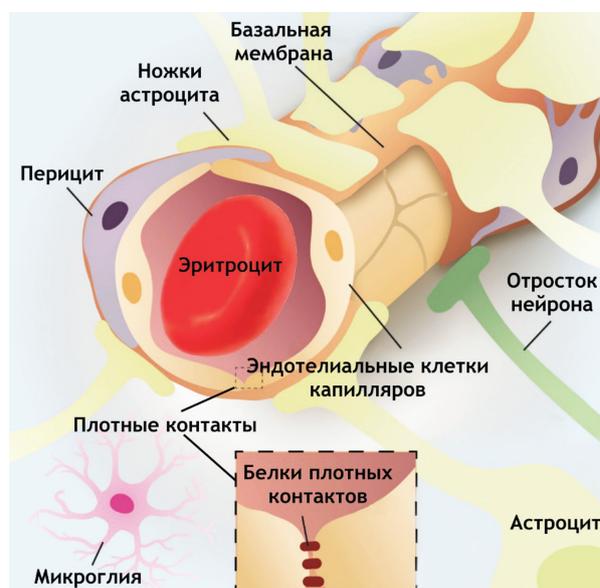


Рис. 1. Основные компоненты гематоэнцефалического барьера (по [6])

Fig. 1. Main components of the blood-brain barrier (BBB) (adapted from [6])

зальная мембрана на базальной поверхности и слой гликокаликса на апикальной поверхности эндотелиоцитов) (рис. 1).

Эндотелиальные клетки ГЭБ, лежащие на базальной мембране, соединены между собой плотными контактами. Плотные контакты эндотелиальных клеток, играющие ключевую роль в обеспечении избирательного массопереноса между кровотоком и ЦНС, не позволяют проникать веществам между клетками, парацеллюлярно. Плотные контакты эндотелиоцитов ЦНС имеют особенный состав и структуру, по сравнению с другими тканями, что способствует надёжному ограничению парацеллюлярного, межклеточного тока жидкости. Между эндотелиоцитами также располагаются адгезивные контакты, которые обеспечивают целостность барьерообразующих эпителиальных тканей.

2.1. Эндотелий

Капилляры ЦНС образованы непрерывным нефенестрированным эндотелием – его базальная мембрана непрерывна и отсутствуют промежутки (фенестры) между цитоплазмой. Капилляры плотно окружены перицитами. Эндотелиоциты сосудов мозга обладают рядом уникальных особенностей, которые способствуют строгой регуляции движения ионов, молекул и клеток между кровью и мозгом. Эндотелиоциты микрососудистого русла ЦНС на треть тоньше эндотелиоцитов мышечной ткани. Эндотелиоциты ЦНС соединены между собой плотными контактами. Плотные контакты образованы специальными белками: клаудинами и окклюдинами. Они укрепляют соединение с цитозольной стороны. Вспомогательные белки (ZO, цингулин и др.) способствуют закреплению специальных белков на структурах цитоскелета. Для эндотелиоцитов ЦНС характерен очень низкий уровень транскитоza, что способствует резкому ограничению трансцеллюлярного везикулярного

транспорта растворимых веществ через ГЭБ. Основной транспорт водорастворимых молекул через эндотелий сосудов ЦНС осуществляется за счёт специфических систем клеточного транспорта – он регулируется набором переносчиков, расположенных на люменальной (обращенной к просвету сосуда) и аблюменальной (обращенной к мозговой паренхиме) поверхности мембраны эндотелиоцитов. Эндотелиоциты ЦНС также отличаются низкой плотностью молекул адгезии лейкоцитов, что ограничивает способность иммунных клеток проникать в ЦНС. Для люменальной поверхности эндотелиоцитов характерна более высокая плотность молекул гликокаликса по сравнению с другими тканями, что снижает доступ крупных молекул из кровотока к поверхности эндотелиальных клеток.

2.2. Перициты

Эндотелиоциты окружены перицитами – одной из разновидностей муральных клеток – сократительных клеток, способных изменять просвет сосуда. На всем протяжении сосудистой сети организма перициты покрывают микрососуды (капилляры, вены, артериолы), в то время как более крупные сосуды кровяного русла окружают гладкомышечные клетки – другая разновидность муральных клеток. Перициты имеют длинные отростки, которые могут покрывать сразу несколько эндотелиоцитов. Перициты лежат на базальной мембране со стороны, обращенной к нервной ткани. Таким образом, плазматические мембраны перицитов и эндотелиальных клеток оказываются разделенными общей базальной мембраной, которую перициты синтезируют наряду с эндотелиоцитами. Перициты могут образовывать контакты с эндотелиоцитами в тех участках, где базальная мембрана прерывается. Перициты участвуют в регуляции ангиогенеза, ремоделирования и тонуса сосудов (в том числе, в ответ на изменение мозговой активности). Плотность перицитов в ЦНС намного выше, чем в других тканях.

Сосуды ЦНС окружены двумя базальными мембранами: внутренней базальной мембраной сосуда, продуцируемой эндотелиоцитами и перицитами, и внешней паренхимальной базальной мембраной, продуцируемой отростками астроцитов, охватывающих сосуд. Эти базальные мембраны состоят из различных секретируемых молекул, включая коллагены IV типа, ламинин, нидоген, протеогликаны сульфата гепарина и другие гликопротеины. Сосудистые и паренхиматозные базальные мембраны имеют различный состав, например, первый содержит ламинины $\alpha 4$ и $\alpha 5$, тогда как последний содержит ламинины $\alpha 1$ и $\alpha 2$. Эти базальные мембраны обеспечивают якорь для многих сигнальных процессов в сосудистой сети и дополнительный барьер для доступа молекул и клеток к нервной ткани. Разрушение этих базальных мембран матриксной металлопротеиназой является важным компонентом дисфункции ГЭБ и лейкоцитарной инфильтрации, которая наблюдается при многих неврологических расстройствах.

2.3. Астроциты

Астроциты контактируют частью отростков с отростками нервных клеток в мозговой паренхиме, а другими

своими отростками с кровеносными сосудами. Окончания отростков астроцитов практически полностью охватывают поверхность стенки сосуда. Таким образом, астроциты обеспечивают связь нервных клеток и сосудистого русла, играя важную роль в регуляции кровотока в ответ на изменения активности нейронов за счёт влияния на тонус сосудов – путём запуска сокращения/расслабления перицитов. Астроциты осуществляют доступ питательных веществ к нейронам и удаление продуктов обмена.

2.4. Другие клеточные элементы

Микроглиальные клетки в НГВЕ выступают в качестве первого рубежа защиты от проникновения патогенов в ЦНС [7]. Клетки микроглии являются основными продуцентами про-воспалительных молекул в ЦНС, что при их активации обеспечивает развитие нейровоспаления – важного защитного механизма, направленного на уничтожение и удаление патогена. Микроглия и астроциты, работая совместно, усиливают иммунный ответ за счёт их синергии.

Олигодендроциты, ещё один тип глиальных клеток, образуют богатую жирами многослойную миелиновую оболочку, покрывающую аксоны нейронов и ускоряющую проведение нервных импульсов.

2.5. Клеточные контакты, обеспечивающие целостность и изоляционную функцию ГЭБ

2.5.1. Плотные контакты

Эндотелиоциты соединены между собой плотными контактами (tight junctions, TJ). Этот тип межклеточных контактов обеспечивает соединение между мембранами соседних клеток за счёт трансмембранных белков, заякоренных с помощью цитоплазматических адаптерных белков с цитоскелетом клетки. В области плотных контактов расстояние между мембранами клеток сужается (рис. 2). Плотные контакты расположены на латеральной поверхности эндотелиоцитов ближе к апикальной части клеток, они опоясывают клетки эндотелия, дополнительно способствуя их поляризации: они ограничивают проникновение водорастворимых молекул из сосудистого русла, а также ограничивают диффузию мембранных белков между апикальной и базолатеральной поверхностью мембраны эндотелиоцита. В образовании плотных контактов участвуют трансмембранные белки трёх классов: окклюдины, клаудины и молекулы адгезии контактов (JAM – junction adhesion molecule).

Клаудины – семейство из 27 трансмембранных белков массой 20–30 кДа. Клаудины четырежды пересекают мембрану и имеют 2 внеклеточные и одну внутриклеточную петлю. Состав длинной внеклеточной петли, содержащей заряженные аминокислотные остатки, влияет на тканеспецифичную ионную селективность межклеточных контактов, а короткая отвечает за соединение молекулы с клаудинами соседней клетки.

Окклюдин – трансмембранный белок массой около 60 кДа. Внеклеточные домены окклюдина на поверхности соседних клеток участвуют в гомотипических взаимодействиях, обеспечивая клеточный контакт, а внеклеточные взаимодействуют со множеством

внутриклеточных адаптерных белков. Описаны специфические трансмембранные белки участвующие в контактах сразу трёх соседних клеток – трицеллюлин (Marvel D2), родственник окклюдина и имеющий схожее строение. Для капилляров ЦНС характерно более высокое содержание трицеллюлина по сравнению с другими тканями.

Трансмембранный белковый комплекс плотных контактов закорен с цитоскелетом через взаимодействие с внутриклеточными белками (ZO-1 и др.). Белки семейства ZO были первыми выделены из взаимодействующих с окклюдинам белков и названы в честь плотных контактов (*Zonula occludens*).

2.5.2. Адгезивные контакты

Помимо плотных контактов в связывании эндотелиоцитов между собой участвуют и адгезивные контакты (adherens junctions, AJ). Эти контакты расположены на латеральной поверхности эпителия ближе к базальной мембране, чем зона плотных контактов (рис. 2). Они обеспечивают соединение эндотелиоцитов, поддерживая целостность стенки сосуда. Основными молекулами клеточной адгезии в составе адгезивных контактов являются трансмембранные белки кадгерина. Две молекулы кадгерина на поверхности соседних клеток связываются друг с другом N-концевыми доменами при участии ионов кальция. Внутри клетки кадгерина связываются с актиновым цитоскелетом посредством катенина, который, в свою очередь, связывается с актиновыми филаментами через другие адаптерные белки, включая ZO-1. Адгезивные контакты образуют поясок на латеральной поверхности эндотелиоцитов. Единичные адгезивные контакты расположены также на базальной поверхности мембраны эндотелиоцитов, обеспечивая связь клеток с элементами межклеточного матрикса и с перицитами. В формировании межклеточных контактов участвуют VE-кадгерина, а в контактах с базальной мембраной – N-кадгерина.

2.6. Метаболический (ферментативный) барьер

Ферментативный барьер образован располагающимися в пространстве между капиллярами и тканью мозга ферментами, расщепляющими различные биологически-активные молекулы, в первую очередь, вещества с потенциальными нейромедиаторными свойствами. В состав enzymatic барьера входят ферменты, расщепляющие классические моноамины (гистамин), катехоламины (дофамин, адреналин, норадреналин), триптамина (серотонин), различные нейропептиды (энкефалин, эндорфин) и другие нейроактивные молекулы.

3. ФОРМИРОВАНИЕ ГЭБ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Формирование ГЭБ в онтогенезе начинается на ранней стадии эмбриогенеза, в течение 12-й недели созревания плода, что позволяет сформировать функциональный ГЭБ уже на ранних этапах развития: на 18-й неделе эмбриогенеза плотные контакты уже достаточно сформированы, чтобы задерживать молекулы с высокой молекулярной массой [9]. Этот процесс запускается формированием межклеточных связей между эндотелиоцитами и соседними клетками, которые составят буду-

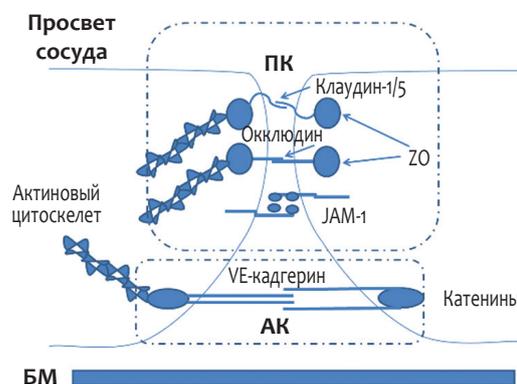


Рис. 2. Упрощенная схема межклеточных контактов, обеспечивающих целостность и барьерную функцию эндотелия (по [8]). АК – адгезивный контакт; БМ – базальная мембрана; ПК – плотный контакт; ЭЦ – эндотелиоцит; ZO – белки семейства *Zonula occludens*

Fig. 2. Simplified scheme of intercellular contacts providing integrity and barrier function of the endothelium (adapted from [8]). АК – adherens junction; БМ – basal membrane; ПК – tight junction; ЭЦ – endotheliocyte; ZO – *Zonula occludens* proteins

щие нейроваскулярные единицы, и включает следующие основные этапы:

- нейрональные предшественники секретируют фактор роста эндотелия сосудов VEGF (vascular endothelial growth factor);
 - клетки-предшественники эндотелиоцитов колонизируют нервную трубку в ответ на формирование градиента VEGF, запуская на 8-й неделе формирования плода мозговой ангиогенез – формирование кровеносных сосудов мозга;
 - взаимодействие будущих эндотелиоцитов гематоэнцефалического барьера с нейронами активирует несколько внутриклеточных сигнальных путей. Одним из основных эффектов включения этих сигнальных путей является активация экспрессии генов, кодирующих белки адгезивных и плотных контактов (β -катенина и клаудинов-3 и -5), а также продукция эндотелиоцитами тромбоцитарного ростового фактора PDGF (platelet-derived growth factor), который служит аттрактантом для перицитов;
 - контактирование перицитов и эндотелиоцитов запускает синтез трансформирующего фактора роста TGF- β (transforming growth factor- β), а активация TGF-сигнального каскада обеспечивает формирование нефенестрированной, лишённой межклеточных разрывов, капиллярной системы мозга;
 - взаимодействие эндотелиальных клеток-предшественников с перицитами имеет решающее значение для дифференцировки первых в зрелые эндотелиоциты и включает Notch и Smad-зависимые сигнальные пути;
 - формирование ГЭБ продолжается до рождения и созревания астроцитов;
 - на финальных этапах созревания ГЭБ в раннем постнатальном периоде астроциты обеспечивают окончательное формирование плотных контактов и нейроваскулярных единиц.
- Созревание ГЭБ завершается после рождения.

4. МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МАССОПЕРЕНОСА ЧЕРЕЗ ГЭБ

При наличии плотных контактов парацеллюлярный (т.е. между клетками) транспорт веществ между средами, разделёнными барьером, становится невозможным. В этом случае возможны только трансцеллюлярные типы транспорта (рис. 3, табл. 1):

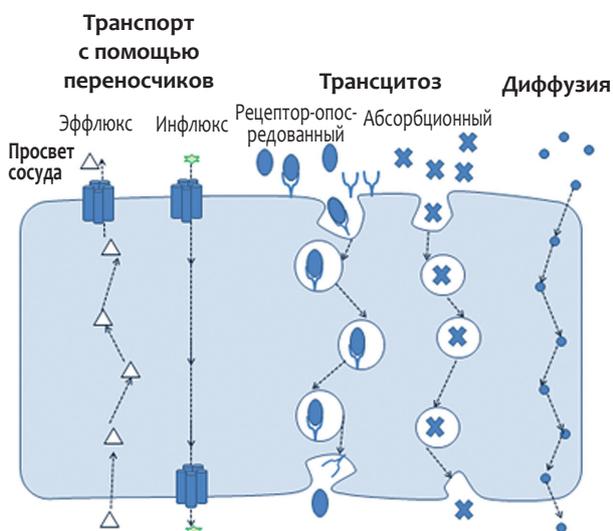


Рис. 3. Упрощенная схема основных видов трансцеллюлярного транспорта (по [8])
Fig. 3. Simplified scheme of the main types of transcellular transport (adapted from [8])

1) небольшие либо липофильные молекулы, способные проникать сквозь цитоплазматическую мембрану, могут транспортироваться простой **трансцеллюлярной диффузией по градиенту концентрации** (стероидные гормоны, кислород, углекислый газ, этанол, кофеин);

2) транспорт более крупных гидрофильных молекул возможен одним из трёх способов:

- **облегчённая диффузия** белками-переносчиками по градиенту концентрации и без затрат энергии (ионы, глюкоза – например, транспортер GLUT1);
- **активный транспорт** белками-переносчиками против градиента концентрации (глюкоза аминокислоты):
 - унипортеры обеспечивают транспорт одного типа молекул;
 - симпортеры обеспечивают однонаправленное перемещение двух молекул/ионов;
 - антипортеры производят разнонаправленный транспорт двух молекул/ионов;
- **транспорт в везикулах:**
 - адсорбционный транцитоз (участки отрицательно-заряженной клеточной мембраны, контактируя с положительно-заряженными белками, могут образовывать везикулы для трансцеллюлярного транспорта к противоположной стороне клетки; например, так может транспортироваться альбумин);
 - рецептор-опосредованный транцитоз (в этом случае формирование везикулы запускается контактом транспортируемой молекулы с собственным мембранным рецептором; таким образом транспортируются гормоны, ростовые факторы, ферменты).

Примеры молекул, транспортируемых разными видами трансцеллюлярного транспорта через ГЭБ

Табл. 1.

Examples of molecules transported by different types of transcellular transport across the BBB

Table 1.

Тип транспорта	Свойства молекул	Механизм	Примеры
Пассивная диффузия	Малый размер (<400 Da) и липофильность (формируют менее 8 водородных связей)	Перемещение молекул по электрохимическому градиенту через цитоплазматическую мембрану и цитоплазму клеток	CO ₂ , O ₂ , этанол, героин
Транспорт, обусловленный специфическими мембранными транспортерами	Некрупные заряженные молекулы	Перенос вещества специфическим белком-переносчиком за счёт изменения его конформации	Глюкоза (GLUT1), крупные нейтральные аминокислоты (LAT1), положительно-заряженные аминокислоты (CAT1), лактат, пируват, кетонные тела (MCT1)
Ионный транспорт	Малые неорганические ионы	Ионные каналы: переход ионов по электрохимическому градиенту через открытую селективную пору в молекуле канала. Ионные обменники: два типа ионов – один против градиента, другой по градиенту Транспорт за счёт изменения конформации белка-переносчика. Ионные помпы: транспорт против градиента за счёт энергии гидролиза АТФ	Ионы натрия, кальция, хлорид-, бикарбонат-ионы и др.
Рецептор-опосредованный транцитоз	Биологические макромолекулы	Связывание вещества со специфическим рецептором на мембране, активация рецепторов и запуск рецептор-опосредованного эндоцитоза (интернализация лиганд-рецепторных комплексов в составе везикул); высвобождение комплекса путём экзоцитоза	Инсулин, трансферрин
Абсорбционный транцитоз	Биологические макромолекулы, положительно-заряженные	Электростатическое взаимодействие молекул на поверхности гликокаликса эндотелиоцитов (несёт отрицательный заряд), захват кавеола-опосредованным эндоцитозом	Альбумин

4.1. Диффузионный механизм (пассивный)

Пассивным транспортом или диффузией называют перемещение веществ по градиенту концентрации. Различают облегченную диффузию, при которой молекулы перемещаются через мембрану клеток с участием специфических транспортных систем, и простую, при которой молекулы неспецифически проходят через мембрану клеток или межклеточное пространство. Путём простой диффузии через ГЭБ проходят небольшие (до 400 Да) липофильные молекулы: кислород, углекислый газ. Считается, что через ГЭБ не могут пассивно проникать молекулы, способные формировать более 8 водородных связей.

Облегчённой диффузией называют транспорт веществ через мембрану по электрохимическому градиенту с помощью специальных трансмембранных белков. Речь идёт в первую очередь об ионных каналах, которые имеют в своей структуре ионную пору, высокоселективную для ионов определенного заряда и размера. К простой диффузии также иногда относят транспорт веществ с помощью специфических белков-транспортёров, переносящих один вид гидрофильных молекул по градиенту концентрации (унипортеры) – этот вид транспорта значительно медленнее, чем перенос ионов через ионные каналы.

4.2. Трансцеллюлярный транспорт

Наличие плотных контактов, отсутствие пор и промежутков между клетками эндотелия делает невозможным проникновение крупных молекул из кровотока в ЦНС через межклеточное пространство. Крупные молекулы проникают через ГЭБ с помощью везикулярного транспорта в процессе трансцитоза в эндотелиоцитах [10]. Трансцитоз представляет собой трансцеллюлярный транспорт молекул через мембранные везикулы. Макромолекулы сначала поглощаются клетками в процессе эндоцитоза, интернализируются везикулами на одной стороне клетки, транспортируются везикулами через цитоплазму, а затем высвобождаются в процессе эндоцитоза на другой стороне клетки. Трансцитоз в эндотелиальных клетках ЦНС можно разделить на две категории: трансцитоз, опосредованный рецепторами, при котором связывание лиганда с рецепторами опосредует эндоцитоз, например, в случае инсулина и трансферрина, и неселективный адсорбционный трансцитоз, при котором заряженные взаимодействия между молекулой и плазматической мембраной облегчают его вход как в случае с альбумином. Для рецептор-опосредованного эндоцитоза, как следует из названия, необходимо связывание специфических рецепторов на поверхности со своими лигандами с последующей активацией рецепторов, которая запускает эндоцитоз лиганд-рецепторных комплексов. Так через ГЭБ транспортируется железосвязывающий белок *трансферрин*, *инсулин* и *липопротеины низкой плотности*. В случае адсорбционного трансцитоза положительно-заряженные (поликатионные молекулы: полиамины, катионные белки) связываются с отрицательно-заряженными молекулами гликокаликса, обогащёнными остатками сиаловой кислоты, и за счёт неспецифического эндоцитоза интернализируются в клетку в составе везикул.

Следует отметить, что интенсивность трансцитоза в эндотелиоцитах ЦНС намного ниже, чем в других тканях.

Эндоцитоз осуществляется двумя основными механизмами – клатрин-опосредованным и кавеола-опосредованным.

Клатрин-опосредованный эндоцитоз начинается в клатрин-окаймленных ямках на мембране клетки. Жёсткое окаймление ямок образовано полимеризованными молекулами белка клатрина, который взаимодействует с рядом адаптерных белков. Интернализация клатрин-окаймлённой везикулы с грузом происходит с участием белка динамина, который отщепляет везикулу с грузом от плазматической мембраны. После интернализации клатриновая оболочка разбирается. Как правило, рецептор-опосредованный эндоцитоз является клатрин-зависимым.

Кавеолы – небольшие впячивания мембраны, в образовании которых принимает участие трансмембранный белок кавеолин. Кавеолин взаимодействует с цитоплазматическим адаптерным белком кавином. В области кавеол липидный бислой мембраны обогащён холестерином и сфинголипидами. Посредством кавеол-опосредованного эндоцитоза через ГЭБ транспортируется альбумин. Количество кавеол на мембране эндотелиоцитов ЦНС сильно снижено по сравнению с сосудами других тканей. Низкая интенсивность трансцитоза в эндотелиоцитах ЦНС определяется специфичным для этих клеток белком *Mfsd2a*, который участвует в транспорте липидов и изменяет состав липидного бислоя: он перемещает фосфолипиды, содержащие остатки докозагексаеновой кислоты из наружного липидного слоя во внутренний. Изменение состава внутреннего липидного слоя мембраны затрудняет образования кавеол и их интернализацию. Нокаут гена *Mfsd2a* у мышей приводит к увеличению проницаемости ГЭБ за счёт усиления интенсивности трансцитоза, при нормальном функционировании плотных контактов. Считается, что в основном, путём кавеола-опосредованного эндоцитоза происходит неспецифический адсорбционный трансцитоз.

4.3. Активный транспорт

Активным транспортом называется перемещение веществ через мембрану клеток против электрохимического градиента. Энергия для осуществления этого процесса обеспечивается либо за счёт гидролиза АТФ, либо за счёт использования электрохимического градиента других веществ/ионов ко-транспортёрами – второй вариант называют вторичным активным транспортом.

Для активного транспорта характерны: (1) селективность – один транспортёр служит переносчиком для одного типа молекул, (2) энергозависимость (источником энергии может быть гидролиз АТФ в случае помп, либо электрохимический градиент ко-транспортируемых ионов в случае сим- и антипортов), (3) насыщенность (транспорт ограничен количеством транспортёров/помп на мембране и скоростью переноса – перенос каждой молекулы требует конформационных изменений белка).

Процесс, с помощью которого транспортёр переносит молекулу растворённого вещества через липидный бислой, напоминает реакцию фермент-субстрат, и во

многих отношениях транспортёры ведут себя как ферменты. Однако, в отличие от обычных фермент-субстратных реакций, транспортер не модифицирует переносимое растворенное вещество, а вместо этого доставляет его без изменений на другую сторону мембраны. Каждый тип транспортера имеет один или несколько специфических сайтов связывания с растворенным веществом (субстратом). Он переносит растворенное вещество через липидный бислой, подвергаясь обратимым конформационным изменениям, которые поочередно обнажают сайт связывания растворенного вещества сначала на одной стороне мембраны, а затем на другой, но не на обеих сторонах одновременно. Переход происходит через промежуточное состояние, в котором растворенное вещество недоступно или закрыто с обеих сторон мембраны. Когда транспортёр насыщен (то есть, когда все сайты связывания растворенного вещества заняты), скорость транспорта максимальна. Как и в случае с ферментами, связывание растворенного вещества может быть заблокировано либо конкурентными ингибиторами (которые конкурируют за один и тот же сайт связывания и могут или не могут транспортироваться), либо неконкурентными ингибиторами (которые связываются в другом месте и изменяют структуру транспортера).

4.4. Мембранные транспортёры

Мембранные транспортёры относятся к двум семействам белков:

- переносчики растворимых веществ (SLC) и
- семейство АТФ-связывающая кассета (ABC).

Конформационные изменения молекулы транспортера в ходе переноса веществ требуют затрат энергии.

Изменения конформации в ходе работы SLC-транспортеров осуществляются за счёт энергии электрохимического градиента переносимых веществ. SLC-транспортёры классифицируются по количеству и направлению переносимых веществ:

- унипортеры осуществляют транспорт одного типа молекул по градиенту концентрации, т.е. осуществляют облегченную диффузию;
- симпортеры осуществляют транспорт двух различных одновременно в одном направлении, при этом одно из веществ переносится против градиента концентрации, а другое по градиенту, компенсируя энергетические затраты;
- антипортеры переносят одновременно два вещества в разных направлениях, одно из них против градиента, а другое – по градиенту концентрации.

Представители SLC-транспортёров на эндотелиоцитах осуществляют в основном инфлюкс (транспорт веществ из кровотока в ЦНС).

Удаление веществ из мозговой ткани в кровяной ток, а также удаление из эндотелиоцитов некоторых молекул, проникающих туда за счёт диффузии, осуществляется эффлюксными транспортерами, которые относятся к ABC-семейству. Эти транспортёры используют гидролиз АТФ для транспорта своих субстратов против градиента их концентрации. Многие из этих транспортеров локализованы на люминальной (обращенной в просвет сосуда) поверхности мембраны эндотелиоцитов и транспортируют широкий набор субстратов в кровяное русло. Та-

кое широкое разнообразие субстратов позволяет этим переносчикам обеспечивать барьер для многих небольших липофильных молекул, которые в противном случае пассивно диффундировали бы через мембрану эпителиоцитов. Mdr1 (multidrug resistance 1 – белок множественной лекарственной устойчивости), также известный как Р-гликопротеин (Pgp), широко изучался в этом контексте, и у мышей с нокаутом по гену транспортера Mdr1 (Р-гликопротеин) обнаружено увеличение проницаемости ГЭБ для широкого спектра малых липофильных препаратов, а также эндогенных молекул. Повышенное содержание Mdr1 на мембране эпителиоцитов также связано с лекарственно-резистентной эпилепсией и опухолью.

Кроме того, разработка ингибиторов этих эффлюксных транспортёров является текущим направлением исследований, направленных на помощь в доставке низкомолекулярных соединений в ЦНС.

5. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИИ ГЭБ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Надлежащая межклеточная связь внутри НГВЕ жизненно важна для поддержания тканевого гомеостаза. Функционально-морфологические свойства ГЭБ могут меняться в условиях развития патологии [11], причем такие изменения могут как быть запущены периферическими факторами и служить причиной заболевания мозга, так и развиться вследствие происходящего в ЦНС патологического процесса. Спектр нейропатологий, при которых наблюдается снижение барьерной функции ГЭБ, очень широк и включает в себя травмы, инсульт, инфекционные поражения, онкологию, эпилепсию и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [12].

Одним из ключевых патологических изменений на молекулярном уровне при большинстве патологий является нарушение продукции белков плотных контактов и, как следствие, увеличение проницаемости ГЭБ для различных молекул. К таким молекулам, например, относятся циркулирующие в крови про-воспалительные цитокины, получающие возможность проникать в мозг в больших количествах. Это ведёт к активации клеток микроглии и индукции воспаления в нервной ткани, усугубляющего течение болезней ЦНС.

Ещё одним молекулярным механизмом нарушения функции ГЭБ является снижение количества транспортных белков на мембране эндотелиоцитов и астроцитов. Такое нарушение ведёт к снижению транспорта важных для нейронов молекул в мозг. Например, снижение количества глюкозных транспортеров приводит к энергетическому голоданию нейронов, наблюдаемому при нейродегенеративных процессах.

Разработка методов ранней диагностики нарушений, возникающих в ГЭБ, необходима для своевременного реагирования и терапевтического вмешательства с целью предотвращения развития патологии в мозге во избежание долговременных последствий. Восстановление целостности и нормальной функции ГЭБ при патологических процессах – это необходимое условие для излечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные представления о морфофункциональных свойствах ГЭБ, учитывающих сложную организацию нейроглиоваскулярной единицы и тонкую регуляцию массопереноса на молекулярном уровне позволяет по-новому взглянуть на интеграцию барьеров в ЦНС, их роль в развитии патологии и пролить свет на новые пути доставки лекарств. Важно понимать, что клеточные компоненты ГЭБ функционируют как

единое целое, и каждый компонент играет решающее значение для развития, функционирования, поддержания барьерной функции, нарушение которой ведёт к развитию тяжелых видов неврологической патологии. Знание и понимание механизмов молекулярного транспорта представляет важную задачу для современной фармацевтики и фармакологии при разработке таргетных препаратов, воздействующих на патологически измененные клетки ЦНС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Марьянович А. Т. Гематоэнцефалический барьер: защитная функция / А. Т. Марьянович, М. В. Андреевская // Российские биомедицинские исследования. – 2020. – Т. 5. – № 2. – С. 42–48.
2. Wardlaw J., Duplaà C., Dabertrand F., et al. Vascular hypotheses for understanding and restoring memory impairments. FENS Forum; July 2022; France; Paris.
3. Neuwelt E. A. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier // Neurosurgery. 2004. Vol. 54, no. 1. P. 131–142. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000097715.11966.8e>.
4. Kugler E. C., Greenwood J., MacDonald R. B. The «Neuro-Glial-Vascular» Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction // Front Cell Dev Biol. 2021. Vol. 9. P. 32820. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.732820>.
5. Liebner S., Dijkhuizen R. M., Reiss Y., et al. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease // Acta Neuropathol. 2018. Vol. 135, no. 3. P. 311–336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>.
6. Ahn S. I., Kim Y. Human Blood-Brain Barrier on a Chip: Featuring Unique Multicellular Cooperation in Pathophysiology // Trends Biotechnol. 2021. Vol. 39, no. 8. P. 749–752. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.010>.
7. Yuan M., Wang Y., Wang S., et al. Bioenergetic Impairment in the Neuro-Glia-Vascular Unit: An Emerging Physiopathology during Aging // Aging Dis. 2021. Vol. 12, no. 8. P. 2080–2095. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.04017>.
8. Neumaier F., Zlatopolskiy B. D., Neumaier B. Drug Penetration into the Central Nervous System: Pharmacokinetic Concepts and In Vitro Model Systems // Pharmaceutics. 2021. Vol. 13, no. 10. P. 1542 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101542>.
9. Menaceur C., Gosselet F., Fenart L., et al. The Blood-Brain Barrier, an Evolving Concept Based on Technological Advances and Cell-Cell Communications // Cells. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 133. <https://doi.org/10.3390/cells11010133>.
10. Ayloo S., Gu C. Transcytosis at the blood-brain barrier // Curr Opin Neurobiol. 2019. Vol. 57. P. 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.014>.
11. de Lange E. C. M., Hammarlund Udenaes M. Understanding the Blood-Brain Barrier and Beyond: Challenges and Opportunities for Novel CNS Therapeutics // Clin Pharmacol Ther. 2022. Vol. 111, no. 4. P. 758–773. <https://doi.org/10.1002/cpt.2545>.
12. Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., et al. Structure and function of the blood-brain barrier // Neurobiol Dis. 2010. Vol. 37, no. 1. P. 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Александр Николаевич Трофимов – канд. биол. наук, старший научный сотрудник физиологического отдела им. И. П. Павлова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры физиологии и патологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия, aleksandr.trofimov@pharminnotech.com

Мария Владимировна Литвинова – аспирант отдела нейрофармакологии им. академика РАМН С. В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; лаборант кафедры физиологии и патологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия, litvinova.mariya@pharminnotech.com

Александр Павлович Шварц – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия, aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com

Вера Владиславовна Кошеровова – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории динамики внутриклеточных мембран Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, vera77867@mail.ru

Андрей Андреевич Лебедев – д-р биол. наук., профессор, заведующий лабораторией общей нейрофармакологии, отдел нейрофармакологии им. академика РАМН С. В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия, aalebedev-iem@rambler.ru

Николай Анатольевич Арсениев – канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры физиологии и патологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия, nikolay.arseniev@pharminnotech.com

Александр Иванович Тюкавин – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и патологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия, atyukavin@mail.ru

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 01.06.2022 г., одобрена после рецензирования 25.06.2022 г., принята к публикации 20.07.2022 г.

Molecular mechanisms of molecular transfer across the blood-brain barrier as a target for pharmacological action

Part 1. Structure, function and pathology of the BBB

©2022. Alexander N. Trofimov^{1,2}, Mariya V. Litvinova^{1,3}, Alexander P. Schwarz⁴, Vera V. Kosheverova⁵, Andrei A. Lebedev³, Nikolai A. Arseniev¹, Alexander I. Tyukavin¹

¹Department of Physiology and Pathology, Saint Petersburg Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

²Laboratory of Neurobiology of the Brain Integrative Functions, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

³Laboratory of General Pharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

⁴Laboratory of Molecular Mechanisms of Neural Interactions, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

⁵Laboratory of Intracellular Membrane Dynamics, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author: Alexander N. Trofimov, aleksandr.trofimov@pharminnotech.com

ABSTRACT. Biological barriers play a key role in maintaining the integrity and functioning of the body at all levels of its organization. The barrier function at the cellular level is based on the hydrophobic properties of the cytoplasmic membrane, which provide selective permeability for various substances, depending on their chemical properties. At higher levels of organization, from tissue to organism, the barrier function is based on intercellular protein complexes of the plasma membrane, which form paracellular diffusion barriers and separate internal and external fluid media, which is a necessary condition for the development and functioning of each organ. The blood-brain barrier (BBB) plays an important role in maintaining the function of the brain. The review reflects the main stages in the embryonic development of the BBB, as well as presents current data on the morphological and functional features of the organization of the BBB, including molecular mechanisms that mediate the barrier function due to the complex participation of vascular cells of cerebral microvessels, as well as gene expression of enzyme complexes, active and passive substance transport mechanisms through the BBB. The high transport selectivity of the BBB is an urgent problem for the delivery of drugs to the brain. At the same time, it is equally important to improve the principles of pharmacotherapy for the correction of impaired BBB functions in various types of pathology of the nervous and other body systems. This review aims to convey to the developers of modern targeted drugs new information about the molecular genetic mechanisms of the transport of substances through the BBB, as well as to draw the attention of specialists in the field of precision medicine to the problem of violations of the barrier function of cerebral vessels in neurological and other diseases of a modern person.

KEYWORDS: blood-brain barrier; mechanisms of mass transfer across the BBB; central nervous system; pharmacotherapy; precision medicine; platelet-derived growth factor

REFERENCES

1. Maryanovich A. T, Andreevskaya M. V. Blood-brain barrier: protective function. *Russian biomedical research*. 2020;5(2):42-48. (In Russ.).

2. Wardlaw J., Duplaà C., Dabertrand F., et al. Vascular hypotheses for understanding and restoring memory impairments. *FENS Forum*; July 2022; France; Paris.

3. Neuwelt E. A. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery*. 2004;54(1):131-142. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000097715.11966.8e>.

4. Kugler E. C., Greenwood J., MacDonald R. B. The “Neuro-Glial-Vascular” Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:732820. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.732820>.

5. Liebner S., Dijkhuizen R. M., Reiss Y., et al. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):311-336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>.
6. Ahn S. I., Kim Y. Human Blood-Brain Barrier on a Chip: Featuring Unique Multicellular Cooperation in Pathophysiology. *Trends Biotechnol.* 2021;39(8):749-752. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.010>.
7. Yuan M., Wang Y., Wang S., et al. Bioenergetic Impairment in the Neuro-Glia-Vascular Unit: An Emerging Physiopathology during Aging. *Aging Dis.* 2021;12(8):2080-2095. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.04017>.
8. Neumaier F., Zlatopolskiy B. D., Neumaier B. Drug Penetration into the Central Nervous System: Pharmacokinetic Concepts and In Vitro Model Systems. *Pharmaceutics.* 2021; 13(10):1542. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101542>.
9. Menaceur C., Gosselet F., Fenart L., et al. The Blood-Brain Barrier, an Evolving Concept Based on Technological Advances and Cell-Cell Communications. *Cells.* 2021;11(1):133. <https://doi.org/10.3390/cells11010133>.
10. Ayloo S., Gu C. Transcytosis at the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol.* 2019;57:32-38. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.014>.
11. de Lange E. C. M, Hammarlund Udenaes M. Understanding the Blood-Brain Barrier and Beyond: Challenges and Opportunities for Novel CNS Therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* 2022;111(4):758-773. <https://doi.org/10.1002/cpt.2545>.
12. Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., et al. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13-25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alexander N. Trofimov – Ph.D. in Biological Sciences, Senior Researcher at the I. P. Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Associate Professor at the Department of Physiology and Pathology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia, alexander.n.trofimov@gmail.com

Mariya V. Litvinova – Postgraduate Student at the S. V. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Laboratory Assistant at the Department of Physiology and Pathology, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia, litvinova.mariya@pharminnotech.com

Alexander P. Schwarz – Ph.D. in Biological Sciences, Researcher at the Laboratory of Molecular Mechanisms of Neural Interactions, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia, aleksandr.pavlovich.schwarz@gmail.com

Vera V. Kosheverova – Ph.D. in Biological Sciences, Researcher at the Laboratory of Intracellular Membrane Dynamics, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia, vera77867@mail.ru

Andrei A. Lebedev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of General Pharmacology, S. V. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia, aalebedev-iem@rambler.ru

Nikolai A. Arseniev – Ph.D. in Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Physiology and Pathology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia, nikolay.arseniev@pharminnotech.com

Alexander I. Tyukavin – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Physiology and Pathology, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia, atyukavin@mail.ru

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted June 01, 2022; approved after reviewing June 25, 2022; accepted for publication July 20, 2022.