



Hjernens forsvarsmur kortlagt og kopieret

Helms, Hans Christian; Waagepetersen, Helle S.; Nielsen, Carsten Uhd; Larsen, Birger Brodin

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2010

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Helms, H. C., Waagepetersen, H. S., Nielsen, C. U., & Larsen, B. B. (2010). Hjernens forsvarsmur kortlagt og kopieret. *Lægemiddelforskning*, 2010, 22-24.

Hjernens forsvarsmur kortlagt og kopieret

Blod-hjerne-barrieren er hjernens værn mod giftstoffer, men desværre spærrer den også vejen for næsten alle lægemiddelstoffer til behandling af hjernesygdomme. En kunstig model af hjernens effektive forsvarsmur kan lette udviklingen af ny medicin ved tidligt at vise, om et potentielt lægemiddelstof kan smugles ind i hjernen eller ej.

Af Hans Christian Helms, Helle Sønderby Waagepetersen, Carsten Uhd Nielsen og Birger Brodin

Hjernen er et af menneskets vigtigste og derfor mest beskyttede organer. En række mekanismer i kroppen arbejder på at skabe det optimale miljø for hjernen, så den har en konstant koncentration af salte og næringsstoffer omkring de fintfølende nerveceller. Mængden af salte skal være konstant, fordi saltene deltager i signalprocesserne i hjernen, og koncentrationen af næringsstoffer, især sukkerstoffet glukose, skal være konstant, så hjernen altid har rigeligt med brændstof til de energikrævende signalprocesser.

Derudover skal de sarte nerveceller beskyttes imod giftstoffer, som via kosten er kommet ind i blodet, samt imod blo-

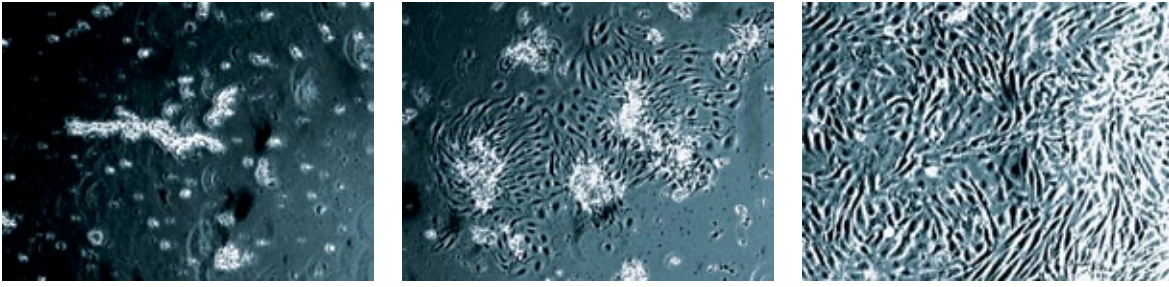
dets egne signalstoffer, der er beregnet til at virke andre steder end i hjernen. Til det formål er hjernen udstyret med en ekstremt effektiv forsvarsmur, blod-hjerne-barrieren, som hindrer indtrængning af uønskede stoffer.

Et kompliceret og effektivt forsvar

Blod-hjerne-barrieren udgøres af de små blodkar, der forsyner hjernen med ilt og næringsstoffer. Blodkarrenes vægge består af endothelceller, som har en vanskelig opgave, fordi de skal tillade hurtig passage af ilt og næringsstoffer til hjernen og samtidig holde salte og andre uønskede stoffer ude. For at kunne udføre arbejdet har endothelcellerne specielle egenskaber. De er bundet ekstremt tæt sammen, og derfor er det stort set umuligt for stoffer at trænge ind i hjernen imellem endothelcellerne. Dette forsvar er dog ikke tilstrækkeligt, fordi mange små fedtopløselige molekyler kan passere direkte gennem cellerne. Derfor er endothelcellerne udstyret med en række transportproteiner, som regulerer passagen af et bredt udsnit af stoffer fra blodet til hjernen. Nogle af disse transportører optager essentielle næringsstoffer og lader dem passere ind i hjernen, mens andre forhindrer adgangen for uønskede stoffer ved konstant at pumpe dem tilbage



Arbejdet med modellen af blod-hjerne-barrieren starter på slagteriet. Kraniet åbnes på en nyslaget kalv **1**, hvorefter hjernen tages ud **2** og fragtes til universitetet. Her skræbes det yderste lag, den grå substans, af hjernen **3**. Den grå substans homogeniseres, og blodkarrene fanges på et filter. Til sidst skylles blodkarrene af filtret, behandles med en enzymcocktail og nedfryses til senere brug i laboratoriet.



De isolerede blodkar udsås på bunden i dyrkningsflasker (tv.), hvor de ses som lysende fragmenter. Efter tre dage i flaskerne ses de første endothelceller som små mørke øer omkring blodkarrene (i midten), og efter fem-syv dage fylder endothelcellerne det meste af flaskens bund (th.). Endothelcellerne kan nu løsnes og bruges til dyrkning af cellekulturer, som udgør en model af blod-hjerne-barrieren.

til blodet. Som et sidste forsvar er endothelcellerne udstyret med en hær af enzymer, der omdanner fedtopløselige stoffer, som ellers ville kunne trænge igennem cellerne, til mere vandopløselige stoffer, som kun kan forsøge at passere imellem cellerne.

Endothelcellerne kan ikke klare alle disse krævende opgaver alene. Derfor er de omgivet af en rand af andre celletyper, især pericytter og astrocytter, som sender signaler til endothelcellerne. Uden denne kommunikation ville endothelcellerne miste deres specielle barriereegenskaber, og blod-hjerne-barrieren ville bryde sammen.

Blod-hjerne-barrieren er således en ekstremt kompleks og effektiv barriere, som vi normalt nyder godt af. Men når det drejer sig om at behandle sygdomme i hjernen med medicin, er blod-hjerne-barrieren en nærmest uovervindelig forhindring. Lige så effektiv som barrieren er til at beskytte hjernen mod giftstoffer, lige så effektiv er den til at holde lægemiddeltoffer ude. Man anslår, at over 95 procent af alle afprøvede kandidatstoffer bremses af blod-hjerne-barrieren, hvorved størstedelen af alle nyudviklede stoffer til behandling af hjernesygdomme fejler i udviklingsforløbet frem mod et færdigt lægemiddel. Derfor er der behov for at udvikle metoder, som på et meget tidligt tidspunkt i udviklingsprocessen kan

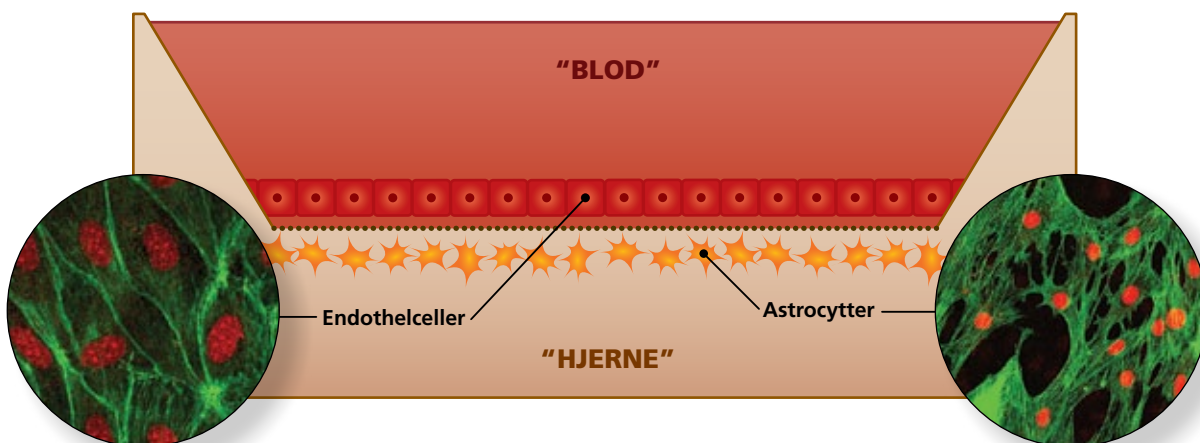
vide, om et lægemiddelstof har evnen til at trænge gennem blod-hjerne-barrieren.

Dyrkning af tætte modelvæv

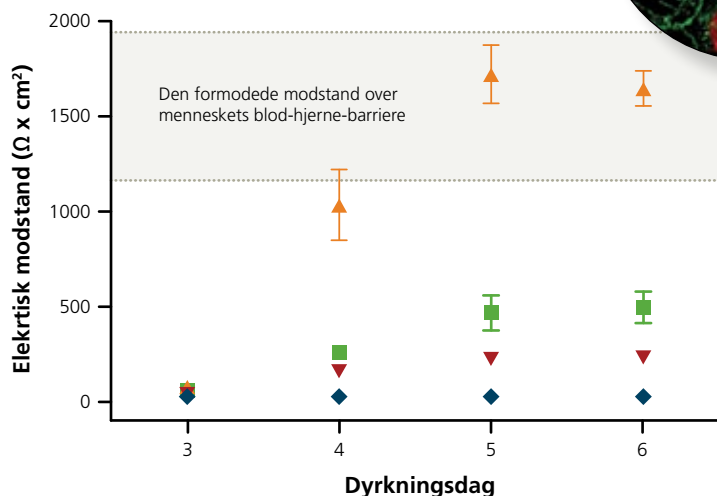
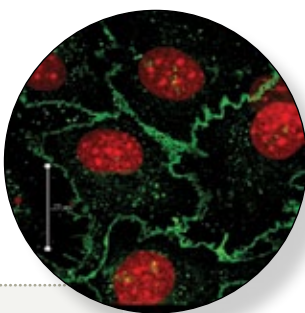
Der eksisterer på nuværende tidspunkt en række modelvæv, som er opdyrket kunstigt i laboratoriet. Modelvævene har nogle af de samme egenskaber som endothelcellerne i hjernen, men endnu har det ikke været muligt at udvikle modeller, som kan benyttes til industriel screening. Det helt store problem er, at det har været vanskeligt at få endothelceller til at danne tætte cellelag i laboratoriet, hvorved blod-hjerne-barrierens essentielle tæthed ikke kan efterlignes.

I forskningsgruppen har vi startet et projekt med at lave bedre cellemodeller af blod-hjerne-barrieren. Som udgangspunkt benytter vi blodkar fra kalvehjerner, som skaffes fra nyslagte kvæg. Blodkarrene placeres i dyrkningsflasker, hvor endothelcellerne får de bedst mulige vækstvilkår og forsynes med et næringsmedium. Når blodkarrene har sat sig fast i flaskerne, begynder endothelcellerne langsomt at vokse ud, og med tiden dækker de hele dyrkningsoverfladen. Ved hjælp af enzymatisk behandling løsnes endothelcellerne, som derefter kan bruges til at lave cellekulturer.

Som tidligere nævnt kan endothelcellerne ikke alene opret-



En skematisk opsætning af modellen af blod-hjerne-barrieren. Endothelceller og astrocytter dyrkes sammen på et filter forsynet med porer. Endothelcellerne dyrkes på oversiden af filtret, hvor de kan danne en tæt barriere, mens astrocytterne dyrkes under filtret, hvorfra de kan sende signaler til endothelcellerne. Det øverste kammer repræsenterer blodbanen, mens det nederste kammer repræsenterer hjernen. Endothelcellerne (tv.) vokser i et ordnet og tæt monolag, mens astrocytterne (th.) ikke udviser samme orden og ikke danner et tæt lag.



Elektrisk modstand målt over blod-hjerne-barrieremodellen som funktion af dyrkningsdage. ◆ = astrocyt monolag, ▼ = endothelcelle monolag, ■ = endothelceller og astrocytter i co-kultur under standardbetingelser, ▲ = endothelceller og astrocytter i co-kultur med optimeret dyrkningsmedium. Området mellem de stiplede linjer indikerer den estimerede modstand over menneskets blod-hjerne-barriere. Det ses, at kun vores optimerede model opnår modstande svarende til dette niveau.

ELEKTRISKE MÅLINGER VISER, AT MODEL-BARRIEREN ER TÆT

Elektriske målinger viser, hvor tæt vores kunstige blod-hjerne-barriere er. Ved målingerne placerer vi en elektrode på hver side af cellelaget og registrerer, hvor stor en modstand vævet yder for bevægelse af salte i opløsningen. Tætheden af vævet udtrykkes som elektrisk modstand – jo tættere, jo større modstand.

Den præcise elektriske modstand over blod-hjerne-barrieren i mennesker kendes ikke, men den anslås at ligge i området 1000–2000 ohm x cm², og målet er derfor at udvikle en cellemodel med samme tæthed. De fleste tidligere forsøg med lignende modeller af blod-hjerne-barrieren har givet modstande i størrelsesordenen 50–300 ohm x cm².

I vores arbejde har vi identificeret en række faktorer, der øger den kunstige blod-hjerne-barrieres tæthed, heriblandt kalvenes alder ved isolering af cellerne og sammensætningen af dyrkningsmedierne. Ved at optimere begge dele er det lykkedes os at opnå modstande på op til 1600 ohm x cm²; altså en barriere med en tæthed, der nærmer sig menneskets blod-hjerne-barriere.

holde blod-hjerne-barrieren. Den næstvigtigste celletype er astrocytterne, som omringer blodkarrene i hjernen og forsyner endothelcellerne med signaler, og vi dyrker derfor endothelcellerne sammen med astrocytter fra rottehjerner. Astrocytterne placeres på undersiden af små porøse filtre, hvor de repræsenterer hjernesiden af barrieren, og endothelcellerne placeres på oversiden af filtrene, hvor de repræsenterer blodsiden. Filtret dækkes med specielle vækstmedier, og astrocytterne udsender stoffer, som får endothelcellerne til at udvikle sig og blive tætte. Når endothelcellerne har dannet et sammenhængende lag, kan man undersøge transporten af lægemiddelstoffer gennem cellelaget og benytte resultaterne til at forudsige, hvorvidt potentielle lægemiddelstoffer vil kunne trænge gennem blod-hjerne-barrieren. Vi har opnået særdeles gode resultater med at fremdyrke modelvæv, som – modsat tidligere modeller – nærmer sig blod-hjerne-barrierens tæthed.

Optimeringen af dyrkningsmediet har en særlig stor effekt på barrierens tæthed, hvilket skyldes en opregulering af proteinet Claudin-5 i endothelcellerne. Claudin-5 er et særlig vigtigt protein i blod-hjerne-barrieren, fordi det binder cellerne tæt sammen med en slags molekylær lynlås, der sidder i et bælte

rundt om cellerne og forbinder dem med nabocellerne. Det kan være en særdeles brugbar viden, fordi meget tyder på, at ændringer i dette protein er af stor vigtighed for blod-hjerne-barrierens tæthed og dermed dens effektivitet.

Fokus på transportører og enzymer

Selv om det er lykkedes at opnå en model, der efterligner blod-hjerne-barrierens tæthed, er vi endnu ikke i mål. Modellen skal nemlig også udstyres med alle de rigtige transportproteiner og enzymer, før den er klar til at blive brugt til industriel screening af potentielle lægemiddelstoffer til behandling af hjernesygdomme.

Næste trin i projektet er derfor at bestemme tilstedeværelsen og mængden af disse transportører og enzymer. Dette bliver i øjeblikket undersøgt ved hjælp af molekylærbiologiske metoder i modellen samt studier af, hvordan cellelaget transporterer lægemiddelstoffer. Indtil videre har vi fundet en række af de vigtige transportører, men arbejdet er langt fra slut. Det kræver en lang række undersøgelser med kendte lægemiddelstoffer, både stoffer, der bør passere barrieren, og stoffer som ikke bør, før vi endeligt kan konkludere, at det er lykkedes os at kopiere hjernens effektive forsvarsmur.

Cand.pharm. Hans Christian Helms er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Helle Sønderby Waagepetersen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Ph.d. Carsten Uhd Nielsen er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Ph.d. Birger Brodin er lektor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

