

Beyne İlaç Taşınması ve Dağılımının Farmakokinetiği

Tuğba Çopur*, Sibel Bozdağ Pehlivan*, Levent Öner*^o

Gönderilme: 31 Ocak 2017
Revizyon: 31 Mart 2017
Kabul: 05 Nisan 2017

Özet

Merkezi Sinir Sistemi (MSS) hastalıklarının sıklığında son zamanlarda ciddi bir artış görülmesi, bu alanda daha etkili ve güvenli tedaviler geliştirilmesi gerekliliğine yol açmıştır. İlaç keşfi ve geliştirilmesi çalışmalarında karşılaşılan en büyük zorluklardan biri beyinde etkili ve güvenli konsantrasyon profilinin elde edilmesidir. Farmakolojik etkinin ortaya çıkabilmesi için MSS ilaçlarının kan beyin engelini (KBE) geçmesi, hedef bölgeye etkili konsantrasyonlarda ulaşması ve ilacın serbest fraksiyonunun hedef ile uygun bir şekilde etkileşmesi gerekir. Serebral kan akım hızı (F), KBE'nin permeabilitesi (inflüks klerensi), ilacın fizikokimyasal özellikleri, beyin dokusuna nonspesifik bağlanma derecesi ve efluks klerensi beyne ilaç taşınmasında etkili olan temel faktörlerdir. Aktif inflüks ve/veya efluks taşıyıcılar da ilaçların mutlak beyin konsantrasyonunu etkiler. İlacın kan-beyin arasındaki dengelenme hızı (CL_{in} , K_{in}), dengelenme derecesi ($K_{p,uu,beyin}$) ve beyin içi dağılımı ($V_{u,beyin}$); beyinde etkili konsantrasyonlara ulaşımını doğrulamak için tespit edilmesi gereken başlıca parametrelerdir. Bu parametrelerin belirlenmesi için in vitro, in vivo ve in siliko yöntemler kullanılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Kan-beyin engeli, beyne ilaç taşınması, farmakokinetik

Abstract

Pharmacokinetics of Brain Drug Delivery and Distribution

Recently, significant increases in the frequency of central nervous system (CNS) diseases have led to the need to develop more effective and safe therapies. One of the biggest challenges in drug discovery and development studies is obtained the effective and safe concentration profile in the brain. In order for pharmacologic efficacy to occur, CNS drugs must cross the blood-brain barrier (BBB), reach effective concentrations at the target site, and the free fraction of the drug should interact appropriately with the target. Cerebral blood flow (F), permeability of BBB (influx clearance), physicochemical properties of the drug, nonspecific binding level to

* Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

^o Yazışma Yapılacak Yazar: e-posta: loner@hacettepe.edu.tr

the brain tissue and efflux clearance are the main factors that are effective in drug delivery to the brain. Active influx and/or efflux carriers also affect the absolute brain concentration of the drugs. The drug equilibrium rate (CL_{in} , K_{in}) and the drug equilibrium extent ($K_{p,uu,brain}$) between blood to brain and intracerebral distribution of the drug ($V_{u,brain}$) are the main parameters which should be determined in order to verify whether the drug has reached effective concentrations in the brain or not. In vivo, in vitro and in silico methods are being used for the determination of such parameters.

Keywords: Blood-brain barrier, brain drug delivery, pharmacokinetics

1. Giriş

Merkezi Sinir Sistemi (MSS) hastalıklarının tedavisine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında başarı oranı, beyin dokuları ve hücrelerinin karmaşık yapısı nedeniyle genel olarak düşüktür. Bu çalışmaların en zor ve kritik aşamalarından biri, beyinde etkili ve güvenli konsantrasyon profilinin elde edilebilmesidir [1-3]. Son yıllarda, Alzheimer, Parkinson, felç, epilepsi, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, şizofreni, bipolar bozukluklar, depresyon, ağrı, uykusuzluk ve beyin tümörleri gibi nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığında artış olmuştur [4,5]. Bu hastalıkların tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun beyin içine terapötik miktarda ilaç taşınmasını sağlamaktır [6].

Farmakolojik etkinin ortaya çıkabilmesi için etkin konsantrasyondaki serbest ilaç moleküllerinin hedef proteinlere bağlanması gerekir [7-9]. MSS hedef bölgesindeki ilaç konsantrasyonunu kontrol eden üç ana parametre: Beyne ilaç taşınma hızı, derecesi ve beyin içi ilaç dağılımının farmakokinetiği olarak sıralanabilir [10-12]. Daha önceki yıllarda, MSS'ne yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında ilacın beyin içi penetrasyon derecesini belirlemek için hayvan modellerinde toplam ilaç konsantrasyonu ölçülürken [13-16], günümüzde in vitro, in vivo ve in silico yöntemler kullanılmaktadır [17-20].

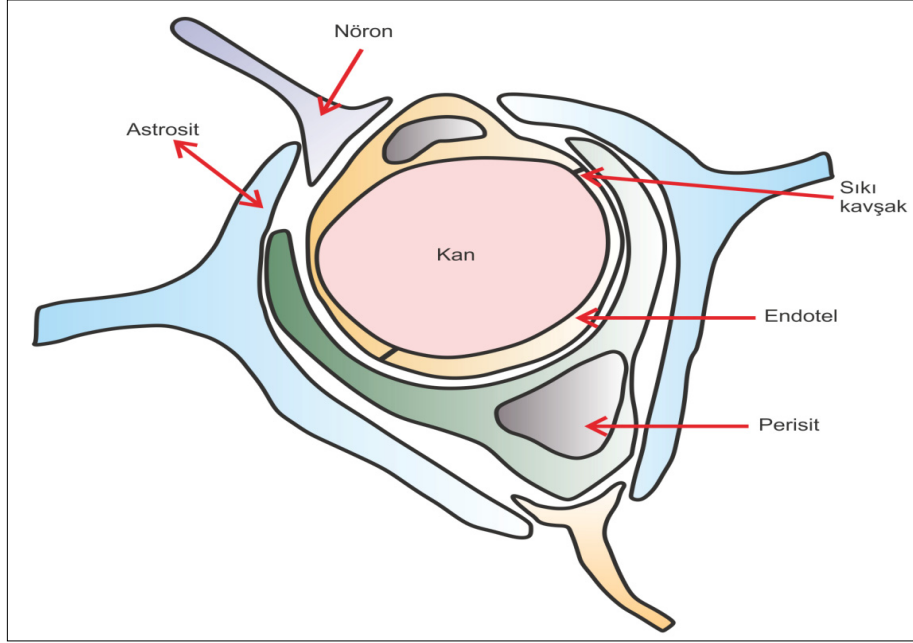
Oral uygulanan MSS ilaçlarının hedefe ulaşmasında absorpsiyon, dağılım (beyindeki dağılımı içeren), metabolizma ve eliminasyon (ADME) gibi farmakokinetik etkenler etkilidir. Bu nedenle, bir ilacın hedef bölgesinde etkili ve güvenli konsantrasyonda bulunmasını sağlamak üzere, ADME parametrelerinin ilaç geliştirme çalışmalarının ilk aşamasında ayrıntılı olarak incelenmesi gerekir [13,21,22]. ADME parametrelerinin belirlenmesinde in silico yöntemler kullanılabilir. Kullanılan in silico yöntemlerin önceden valide edilmiş ve in vivo sonuçlar ile kombine edilmiş olması önemlidir [23].

Merkezi Sinir Sisteminde Yer Alan Kompartmanlar ve Engeller

Beyin için zararlı bileşiklerin kandan beyne geçişini engelleyen ve beyin yapısal ve işlevsel bütünlüğünün korunmasını sağlayan başlıca üç engel (Kan-Beyin Engeli; KBE, Kan-Beyin Omurilik Sıvısı-Engeli; K-BOS-E, Araknoid Epitel; AE) bulunmaktadır [24-30].

Birçok molekülün normal serum konsantrasyonları, glutamat, glisin ve potasyum gibi iyonlar beyin için toksiktir [31]. Bu moleküllere ek olarak, diğer küçük moleküllerin %98'inin ve peptitler-proteinler, monoklonal antikorlar, nükleik asitler ve antisens oligonükleitler gibi büyük moleküllerin de %100'ünün beyne geçişi bu engeller tarafından önlenmektedir [32-36]. Paul Ehrlich 1885'te beyinde seçici geçirgen bir yapı olduğunu keşfederken, kan-beyin engeli teri-

mi 1900’de M. Lewandowsky tarafından ilk defa kullanılmıştır [37]. Kapiler endotel hücreleri (ECs), astrositler, perisitler, nöronlar ve mikroglialardan oluşan KBE şematik olarak Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. KBE'nin şematik gösterimi

KBE, K-BOS-E'nden 5000 kat daha büyük bir yüzey alanına sahiptir. Bu nedenle, beyin parankimasındaki sinaptik bağlantıları aydınlatan ve tampon etkiye neden olan beyin ekstrasellüler sıvısı (ESS) ve kan arasındaki en önemli engel olarak kabul edilir [20,24,38,39]. KBE'ni periferik endotellerden ayıran özellikler; endotel hücreleri arasında boşlukların (fenestrasyonlar) bulunmaması, sıkı kavşakların (tight junctions) bulunması, pinositik veziküllerin az sayıda olması ve çok sayıda mitokondri bulunmasıdır [40-43]. K-BOS-E, kan ve BOS arasında arayüz olan koroid pleksusun epitel hücreleri arasında lokalize olmuş, BOS'na bakan sıkıca birleşmiş epitel hücreler tarafından oluşturulmuş bir engeldir [44-46]. Araknoid epitel, dura altında yer alan ve MSS'ni tamamen kaplayan, fakat beyne ilaç taşınmasında önemli bir role sahip olmayan bir engeldir [24-30]. İnsan beynindeki kılcıl damarlar toplam 650 km uzunluğa ve 1 ml hacme sahiptir [24,27]. MSS fizyolojik özellikleri türe göre farklılıklar göstermektedir [47]. İnsan, sıçan ve fare MSS'nin bazı fizyolojik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. MSS'nin türe bağlı fizyolojik özellikleri

Parametre	İnsan	Rat	Fare
Vücut ağırlığı (g) [47,48]	70000	250	20
Beyin ağırlığı (g) [47,48]	1400	1,8	0,36
Relatif beyin ağırlığı	0,02	0,0072	0,018
Kapiler yüzey alanı (cm ² /g beyin)	143 [49]	140 [50]	240 [18]
Beyin ESS üretim hızı (µL/dk/g beyin)	0,11-0,14 [51,52]	0,11-0,28 [25]	VY
ESS devir hızı (s) [53]	20-27	10-24	VY
BOS üretim hızı (µL/dk/g beyin)	0,29 [47,54]	1,22 [47,57]	1,03 [47,58]
BOS devir hızı (s) [53]	6	2	2
Serebral kan akımı (ml/100 g beyin/dk)	50-60 [59,60]	105-110 [61,62]	120 [63-65]

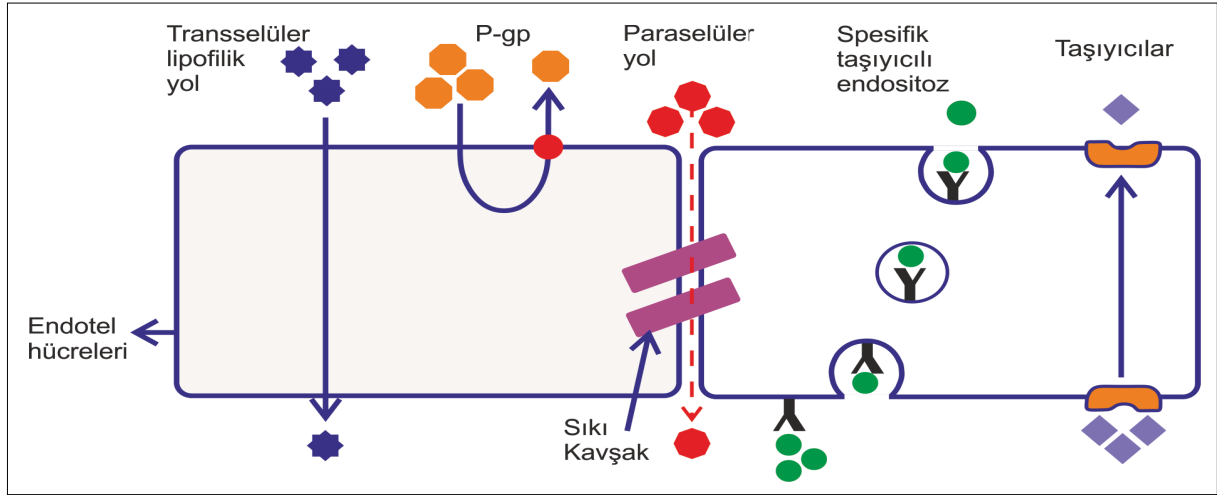
VY: Veri yoktur.

Kan ve Beyin Arasında İlaç Konsantrasyonunun Dengelenme Hızı

MSS penetrasyon hızı, beyne taşınan ilaç miktarından bağımsızdır [35,64,65]. MSS penetrasyon hızını etkileyen etkenler; serebral kan akım hızı (F) ve ilacın KBE permeabilitesidir [36]. Klasik farmakokinetik ilkelerine göre, bu iki faktörden biri doku penetrasyonu sürecinde hız-kısıtlayıcı basamak haline gelebilir [66]. Perfüzyonu etkileyen BOS değişiklikleri de MSS penetrasyon hızını etkilemektedir [67].

Permeabilite (P)

Bir ilacın KBE'nden geçme hızı ile ilgilidir ve gastrointestinal kanal absorpsiyon çalışmalarında kullanılanlara benzer yöntemlerle ölçülür. Küçük moleküllerin permeabilitesi, membran özellikleri ve ilacın fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra gastrointestinal kanaldaki ölçüm yöntemlerine göre de değişebilir. Bu nedenle, MSS permeabilitesi ölçümlerinde KBE'nin membran özellikleri önem arz etmektedir [68-69]. Bir bileşiğin KBE'ni geçebilmesi için efluks pompaları ile sınırlı olabilen pasif transselüler difüzyon, taşıyıcı aracılı alım, kolaylaştırılmış difüzyon ve daha çok büyük moleküller için adsorptif veya reseptör aracılı transsitoz gibi çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır [70]. KBE'nden geçiş mekanizmaları Şekil 2'de gösterilmiştir.



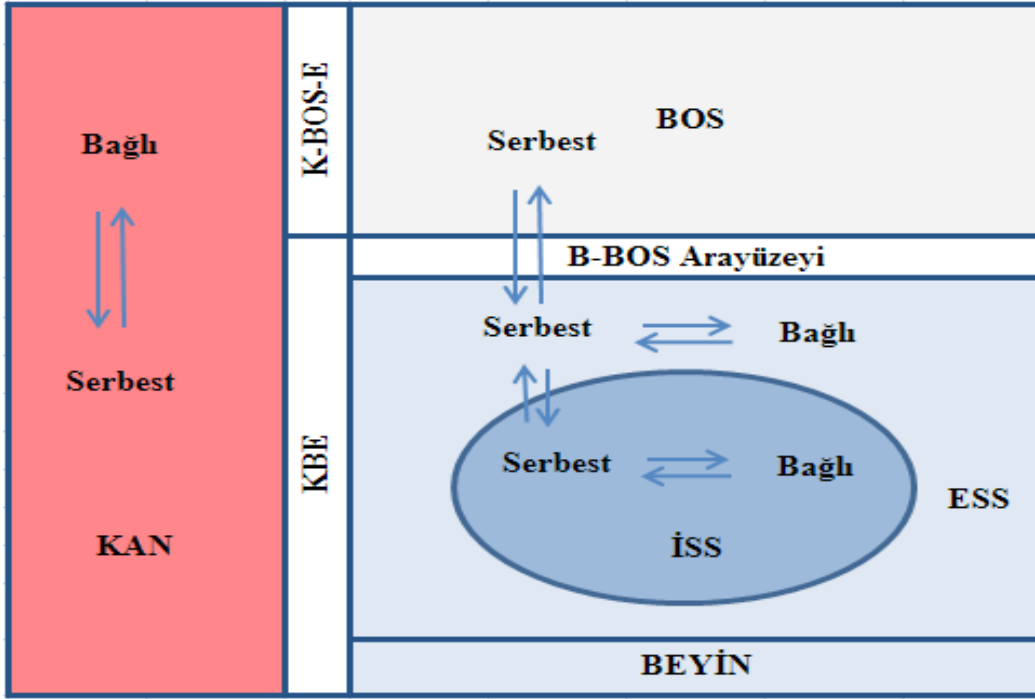
Şekil 2. KBE'nden geçiş mekanizmaları

Periferik dokularda ilaç penetrasyonu sırasında önemli bir role sahip olan paraselüler difüzyon, MSS'de sıkı kavşakların kompleks yapısı nedeni ile sınırlıdır [68,69,71,72]. Beyin kapilerlerinde pinositoz yoktur, değişim genellikle transselüler yoldan olur. Sadece yağda çözünebilen maddeler KBE'ni geçebilirken, polar moleküller ve küçük iyonların KBE'ni geçmesi mümkün değildir [73]. Mannitol ve sükrözün beyin permeabilitesi çok düşük iken, alkol yüksek permeabilitesi nedeniyle KBE'ni pasif transselüler mekanizma ile geçmektedir [74-83].

İlacın KBE'ni geçme yeteneği; molekül ağırlığı, lipofilitesi, polarite ve hidrojen bağlama kapasitesi gibi moleküler özellikleri ile yakından ilişkilidir. Bu özelliklerin hepsi göz önünde bulundurularak, ilaçların KBE'ni geçme özellikleri, oral absorpsiyon için kullanılan Lipinski Kuralları ile açıklanabilir [36,74,81,84-88]. Genelde, molekül ağırlığı 400-500 Da'dan daha az olan, lipofilik bileşikler kandan endotelial hücre membranına kolaylıkla geçebilmektedir [74,89,90].

KBE'nden aktif transport genellikle konsantrasyon gradyanına karşı hücre içine ve dışına adenozin trifosfat (ATP) bağımlı kaset (ABC) taşıyıcılar ve çözünür taşıyıcılar [SLC] aracılığıyla gerçekleşmektedir [91-93]. P-glikoprotein (P-gp), meme kanseri direnç proteini (BCRP) ve çoklu ilaç direnci proteinleri (MRPs) başlıca aktif ABC taşıyıcılardır [94-96]. SLC taşıyıcılar veya sekonder aktif taşıyıcılar çeşitli enerji bağlama mekanizmalarını kullanarak membranlar arasından ilaç, metabolit ve iyon gibi maddelerin transportunu sağlayan membran proteinleridir. Bunlar amino asitler, nükleozitler, glikoz, yağ asitleri, mineraller ve vitaminler gibi maddelerin hücre içine alımından sorumludur [97-100].

Kan, beyin intrasellüler sıvısı (İSS), beyin ekstrasellüler sıvısı (ESS) ve beyin omurilik sıvısında (BOS) ilaç dağılımı Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Kan,beyin ve BOS'nda ilaç dağılımı

Farmakokinetik çalışmalarda genellikle referans olarak toplam plazma konsantrasyonunun kullanılması nedeniyle, ilaç farmakodinamiği araştırmalarında, farmakokinetik verilerin yorumlanmasını sağlamak için plazma proteinlerine bağlanmanın tespit edilmesi önemlidir [10]. Serbest ilaçlar KBE boyunca beyin ESS'nda dengelenir. Hücreler arası boşlukta, beyin hücre membranları boyunca ve hücrelerin içinde bağlı ve serbest ilaç arasında denge vardır. Bu dengelenme çok yavaş olursa verilen ilacın dağılımı için hız kısıtlayıcı basamak olacaktır. Düşük KBE permeabilitesine sahip ilaçlar için hız kısıtlayıcı basamak, KBE taşınmasının kendisi ya da beyin dokusu içindeki ilaç moleküllerinin difüzyonudur [101].

KBE penterasyonunu belirlemek için kullanılan in vitro, in vivo ve in siliko yöntemler Tablo 2'de belirtilmiştir [18,30,102,103].

Tablo 2. KBE penetrasyonu ölçüm yöntemleri

İn Vivo [30]	İnvazif	Beyin Alım İndeksi (BUI) Beyin Efluks İndeksi (BEI) İn Situ Beyin Perfüzyonu İntravenöz Enjeksiyon Tekniği İntraserebral Mikrodiyaliz Kantitatif Otoradyografi (QAR) BOS Örnekleme
	İnvazif Olmayan	Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) Tek Foton Işımasının Bilgisayarlı Tomografisi (SPECT)
İn Vitro [18,102]	Hücre Temelli Olan	İzole Beyin Kapillerleri Primer veya Düşük Pasajlı Beyin Kapiller Endotel Hücre Kültürleri Ölümsüz Beyin Endotel Hücreleri Beyin Endotel Hücre Kültürleri İnsan Epitelyal Kolorektal Adenokarsinoma Hücre Hattı (Caco-2) Madin-Darby Köpek Böbrek (MDCK) Hücre Hattı İnsan İdrar Kesesi Karsinoması Hücre Hattı (ECV 304)/C6 Hücre Hattı
	Hücre Temelli Olmayan	Hareketsizleştirilmiş Yapay Membran (IAM) Paralel Yapay Membran Permeabilitesi Yöntemi (PAMPA)
İn Siliko [103]	İstatistiksel	Lineer Lineer Olmayan
	Mekanik	Lineer Lineer Olmayan

İnfluks klerensi (Kin, Clin) ve Permeabilite yüzey alanı değeri (PS değeri)

Bir ilacın KBE'nden taşınma hızı, permeabilite yüzey alanı değeri (PS değeri) ya da influks klerensi (K_{in} , Cl_{in}) ile hesaplanmakta [77,103,104] ve her iki parametre de $\mu\text{l}/\text{dk}/\text{g}$ beyin ya da $\mu\text{l}/\text{s}/\text{g}$ beyin olarak ölçülmektedir [11,84,105-107]. İnfluks klerensi ölçümünde, beyin alım indeksi (BUI; in vivo karotid arter enjeksiyonu olarak da adlandırılır) [108], in situ beyin perfüzyonu yöntemi [39,109], intravenöz enjeksiyon tekniği [77,103] ve mikrodiyalizi [110-116] içeren in situ ve in vivo yöntemler kullanılmaktadır. BUI ya da karotid arter enjeksiyon yöntemi başlangıç zaman noktalarında (5-15 sn) beyin dokularındaki toplam ilaç konsantrasyonu için veri sağlar [10,28] ve Eşitlik 1'de gösterildiği gibi hesaplanır. Bir bileşiğin bağıl alımı referansla karşılaştırılarak BUI değeri ile gösterilir [108,117,118].

$$BUI = 100 \times \frac{[^{14}\text{C}/^3\text{H}] \text{ doku}}{[^{14}\text{C}/^3\text{H}] \text{ tuz}}$$

Eşitlik 1

Bu eşitlikte BUI değeri su, ^3H işaretli su (^3H işaretli suda NaCl) ve ^{14}C işaretli bileşik için 100'dür. BUI ve in situ beyin perfüzyonu gibi yöntemler ilaç uygulanmasından sonraki erken zaman noktalarında beyindeki toplam ilaç miktarını ölçen hızlı tekniklerdir [119]. İn situ beyin perfüzyonu tekniği sadece KBE permeabilitesini ölçen bir tekniktir. İntravenöz enjeksiyon, BUI ve in situ beyin perfüzyonu yöntemlerinin sakıncası toplam beyin ve toplam kan konsantrasyonlarının ölçülmesidir. Genel olarak, bağlanmamış ilacın KBE'ni geçtiği ve farmakolojik yanıtı ortaya çıkardığı kabul edildiğinden, KBE'nin her iki tarafında da serbest ilaç konsantrasyonlarını değerlendiren in vivo beyin mikrodializi yöntemi en uygun yöntem olarak görülmektedir [10].

Efluks klerensini ölçmek için, beyin efluks indeksi (BEI) [119], mikrodializ ve toplam beyin konsantrasyonlarının ölçüm verilerinin kombinasyonu kullanılır [105,120-128]. Toplam beyin konsantrasyonlarına dayanan efluks parametreler, tek başına beyin parenkimasındaki ilacın eliminasyon hız sabitini (yarı ömrü) göstermektedir.

İnfluks ve efluks klerens ölçümündeki bu yöntemlerden bazılarında araştırmacının çeşitli varsayımlar yapması gerekir. İntrakarotid arter enjeksiyonu, in situ beyin perfüzyonu ve intravenöz enjeksiyon tekniklerinde; çalışma sırasında KBE boyunca transportun tek yönlü olduğu, çoklu geçiş yöntemlerinde (in situ beyin perfüzyonu ve iv enjeksiyon teknikleri); KBE penetrasyonunun en yavaş basamak olduğu ve sonraki dağılıma süreçlerinin daha hızlı olacağı varsayılmaktadır [101,125-128].

İnfluks ve efluks klerensleri maddelerin KBE'nden beyin içine ve dışına net transport kapasitesini ifade etmektedir. Aktif influks, pasif transport ile karşılaştırıldığında permeabilite klerensini artırırken, lüminal tarafta P-gp veya Abcg2 gibi efluks taşıyıcıların varlığı permeabiliteyi azaltmaktadır. Beyin ESS yığın akışı ve beyin içindeki metabolizma yoluyla eliminasyon da efluks klerensine katkıda bulunmaktadır [10].

İn vivo yöntemlerden olan in situ beyin perfüzyonu deneyleri ile hayvan modelinde permeabilitenin hızlı bir şekilde belirlendiği bildirilmiştir. Aktif taşıyıcıların etkisini incelemek için genetik olarak modifiye edilmiş farelerde de çalışmalar gerçekleştirilebilir [129]. Mdr1a (++) ve Mdr1a (-/-) fareler karşılaştırıldığında, P-gp varlığında K_{in} (CL_{in})'nin azaldığı açık bir şekilde görülebilir. Bu nedenle K_{in} (CL_{in}) KBE için net influks klerensini tanımlamaktadır [11].

MSS penetrasyon hızını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri, sistemik uygulamayı takiben beyindeki ilaç miktarının belirlenmesine bağlıdır [130]. Eşitlik 2 K_{in} (CL_{in})'ni belirlemek için kullanılabilir.

$$K_{in} = \frac{A_{beyin}}{AUC_{plazma}} \quad \text{Eşitlik 2}$$

Burada A_{beyin} , beyindeki ilaç miktarını ve AUC_{plazma} plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alanı temsil eder. Temel kapiler akış prensiplerini uygulayan Renkin-Crone eşitliğine [Eşitlik 3] dayanarak PS ve K_{in} arasındaki ilişki tanımlanabilir [104,131,132].

$$K_{in} = F \times [1 - e^{-PS/F}] \quad \text{Eşitlik 3}$$

Bu eşitliğin altında yatan kapiler akış modeli MSS penetrasyon oranı intrinsik permeabilite çok yüksek olsa bile, serebral kan akım hızından daha yüksek olamaz. Bu nedenle, K_{in} 'nin üst sınırı (yüksek permeabiliteli bileşikler için) F'dır ve alt sınır (düşük permeabiliteli bileşikler için) PS'dır. Eşitlikteki F değeri serebral kan akım hızı ya da perfüzyon akış hızını ifade etmektedir [47]. PS, hem aktif influks hem de efluks taşıyıcılardan etkilenir ve beyin içindeki bağlanmış ilaç fraksiyonu hakkında bilgi sağlamaktadır [10,83]. Düzenli in vivo farmakokinetik çalışmaları izleyen K_{in} verilerini oluşturmak için deney düzeneği, K_{in} 'ni in vivo tahminde PS üründen daha kullanışlı bir hale getirmektedir [12].

Görünür permeabilite katsayısı (P_{app})

Günümüzde, tek hücre tabakaları veya membranlardaki in vitro deneyler görünür permeabilite katsayısını (P_{app}) belirlemek için kullanılır. Bir ilacın P_{app} değeri deney tasarımından bağımsızdır, bu nedenle deneyler arasındaki permeabilite parametrelerini karşılaştırmak için kullanılır. Permeabilite, P_{app} ile ifade edilir ve Eşitlik 4 uyarlanarak hesaplanmaktadır [133-138].

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{C_0 \times S} \quad \text{Eşitlik 4}$$

Burada dQ/dt , zamana bağlı ilaç miktarındaki değişimi, C_0 , verici bölmedeki başlangıç ilaç konsantrasyonunu ve S , tek tabaka yüzey alanını ifade etmektedir.

P_{app} deneylerinde genellikle maddenin duyarlılığını değerlendirmek için iki yönde çalışılarak efluks oranı (ER) Eşitlik 5 ile belirlenir:

$$ER = \frac{P_{app}(B - A)}{P_{app}(A - B)} \quad \text{Eşitlik 5}$$

KBE'ni tamamen taklit eden bir in vitro hücre kültürü modeli henüz geliştirilmemiş olmasına rağmen, MSS'ne yönelik ilaç geliştirme çalışmaları sırasında permeabilitenin hesaplanmasında MDR1-MDCK hücre hatları çok yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [18,28,30,70,139,140]. Sığır beyin mikrodamar endotel hücreleri (BBMEC)-astrosit kokültürü modelinin, KBE'ni çok iyi taklit eden ve tahmin kalitesi yüksek bir model olduğu belirtilmiştir [28,141]. Permeabilite çalışmalarında genel olarak, P_{app} değerlerinin yaklaşık 100 nm/s ya da daha büyük ve ER değerlerinin yaklaşık 1 ya da 2-3 den daha aşağıda olması yüksek permeabilite göstergesi olarak belirlenmektedir. Geçmişte yapılan çalışmalarda aday moleküllerin MSS penetrasyon hızına daha fazla önem verilirken, günümüzde özellikle kronik MSS hastalıklarına yönelik geliştirilen moleküllerin MSS penetrasyon derecesinin daha önemli bir parametre olduğu kabul edilmektedir [10].

İlaç adaylarının KBE permeabilitelerinin saptanabilmesi için son 10 yılda bir çok in vitro, in vivo ve in siliko model geliştirilmiştir. Yapılan bir çok araştırma ile in siliko deneyler, in vitro hücre modelleri ve in vivo yöntemlerle aday moleküllerin permeabilite değerleri karşılaştırmıştır [7,18-20,26,130,141-153]. Ancak bu modellerin hepsinin hem üstünlükleri hem de sınırları bulunmaktadır. İn vitro modeller, tarama çalışmalarında in vivo modellerden daha yüksek verime ancak daha düşük tahmin değerine sahiptir. Primer beyin endotel hücreleri, in vivo KBE'ni en iyi şekilde taklit eder, ancak çalışma sırasında bir çok proteinin ekspresyon düzeyleri ve işlevleri in vitro olarak azalır ve sürekli olarak taze beyin dokusundan izolasyona ihti-

yaç olduğu için yoğun bir çalışma gerektirir. Bunun aksine, ölümsüz hücre hatları kolaylıkla kullanılır ve devam ettirilir fakat pasajlama sırasında protein ekspresyon özellikleri değişebilir. Bu yöntemlerin hiçbiri tek başına insanda ilaçların KBE penetrasyonu gibi karmaşık bir süreci yeteri kadar tespit edemez. Bu nedenle, bir ilaç adayının KBE'nden geçişinin değerlendirilmesi için in vitro, in vivo ve in siliko modellerin kombinasyonlarına ihtiyaç vardır [154].

Kan ve Beyin Arasında İlaç Konsantrasyonunun Dengelenme Derecesi

Toplam beyin/toplam plazma konsantrasyonu oranı ($K_{p,beyin}$, logBB) ve bağlanmamış beyin/bağlanmamış plazma konsantrasyonu oranı ($K_{p,uu,beyin}$) beyne ilaç taşınma derecesini belirlemek için kullanılan terimlerdir. $K_{p,beyin}$ ilacın beyin penetrasyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir parametredir (Eşitlik 6) [66,155]. İlacın beyne taşınmasını hesaplamak için, ilacın beyin konsantrasyonu genellikle kan konsantrasyonu ile oranlanmıştır [10]:

$$K_{p,beyin} = \frac{AUC_{top,beyin}}{AUC_{top,plazma}} \quad \text{Eşitlik 6}$$

Burada $AUC_{top,beyin}$ ve $AUC_{top,plazma}$ sırasıyla beyindeki ve plazmadaki toplam (bağlı ve bağlanmamış) konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alanı temsil eder.

$K_{p,beyin}$ 'e etki eden faktörler; ilacın plazma proteinlerine özgül olmayan şekilde bağlanması, ilacın beyin dokusuna özgül olmayan şekilde bağlanması ve KBE'nden taşınma hız ve derecesi olarak sıralanabilir [8,9,14,16,19,156-158]. Bazı araştırmacılar, $K_{p,beyin}$ 'in ilacın beyin dokusuna ve plazma proteinlerine ilgisinden etkilenmesi nedeniyle KBE permeabilitesini yansıtmadığını savunmaktadır [10]. Beynin yüksek lipid içeriğine sahip olması nedeniyle ilaç moleküllerinin lipofilitesindeki artışın KBE'nden geçişi artırarak $K_{p,beyin}$ değerinde artışa yol açması (ilaç lipidizasyon tuzağı) beklenir. Ancak yüksek $K_{p,beyin}$ değerine sahip bileşiklerde hayvan modellerinde potans artırılmasına rağmen daha yüksek etkinlik elde edilememiştir. Bu durum ilaç molekülünün lipofilitesindeki artışın, KBE ile birlikte ilacın vücuttaki diğer organlara penetrasyonunun da benzer şekilde artması, ilacın plazma yarı ömrü ve AUC değerinin değişmesiyle ilgilidir [3,19,104,156,159-163].

Çalışmalarda beyindeki bağlanmamış ilaç konsantrasyonları incelendiğinde, toplam konsantrasyon artışının aktif bölge konsantrasyonları ile çok yakından ilişkili olmadığı ve her zaman daha fazla bağlanmamış konsantrasyonlara yol açmadığı tespit edilmiştir [8,9,14,19,156,157]. İlacın toplam beyin/plazma konsantrasyonları oranına göre MSS penetrasyonunun değerlendirilmesi yanıltıcı olabilmektedir [3,161]. Farmakolojik olarak aktif ilaç, KBE boyunca dengelenmeyle beyin ESS'ndeki bağlanmamış ilaç konsantrasyonları ölçülerek incelenebilir [10]. $K_{p,uu,beyin}$ partiyon katsayısı beyin ESS ve plazmadaki bağlanmamış ilaç konsantrasyonu oranıdır (Eşitlik 7) [158,161,164-166].

$$K_{p,uu,beyin} = \frac{AUC_{u,beyin ESS}}{AUC_{u,plazma}} \quad \text{Eşitlik 7}$$

Beyin ESS'ndaki serbest ilaç konsantrasyonunun, kandaki bağlanmamış konsantrasyona oranı partisyon katsayısı ($K_{p,uu,beyin}$) olarak adlandırılmakta olup, kandaki proteinlere bağlanma veya beyin dokusu bileşenlerine bağlanmadan bağımsızdır [167]. $K_{p,uu,beyin}$ ilacın özgül olmayan bağlanmasından etkilenmediği için doğrudan KBE'nden taşınmanın dengelenmesini yansıtan bir parametredir. $K_{p,beyin}$ özgül olmayan bağlanmayı da içerdiği için yorumlamak zordur. $K_{p,uu,beyin}$ bir ilacın KBE'nden taşınma özelliklerini yansıtır, bu nedenle plazmada ve beyindeki bağlanmamış konsantrasyonları arasında bir bağlantı olarak doğrudan kullanılabilir [12]. $K_{p,uu,beyin}$ değeri, ilacın hedef bağlanma özellikleri ile bir araya getirildiğinde, gerekli plazma konsantrasyonları ve böylece farmakolojik başarı için dozu tahmin etmek mümkün olabilmektedir [10].

Buradaki $AUC_{u,beyin,ESS}$, beyin ESS'ndeki bağlanmamış ilaç için konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alanı, $AUC_{u,plazma}$, plazmadaki bağlanmamış ilaç için konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alanı, $f_{u,beyin}$ beyin homojenatındaki serbest ilaç fraksiyonunu ve $f_{u,plazma}$ plazmadaki serbest ilaç fraksiyonunu ifade etmektedir. Ayrıca $f_{u,plazma}$ ve $f_{u,beyin}$ değerleri denge diyalizi ile in vitro olarak kolaylıkla ölçülebilir [158,164]. $K_{p,uu,beyin}$ Eşitlik 8'de gösterildiği gibi, AUC ve f_u değerlerinin bir fonksiyonu olarak verilebilir [166].

$$K_{p,uu,beyin} = \frac{AUC_{tot,beyin}}{AUC_{tot,plazma}} \times \frac{f_{u,beyin}}{f_{u,plazma}} \quad \text{Eşitlik 8}$$

Son olarak, $K_{p,uu,beyin}$ Eşitlik 9'da gösterildiği gibi, $K_{p,beyin}$, $f_{u,plazma}$ ve $f_{u,beyin}$ değerlerinden hesaplanmaktadır.

$$K_{p,uu,beyin} = K_{p,beyin} \times \frac{f_{u,beyin}}{f_{u,plazma}} \quad \text{Eşitlik 9}$$

Reseptörleri beyin ESS'nda olan bir ilacın farmakodinamik profili ile en yakın ilişkili parametre $K_{p,uu,beyin}$ 'dir. İlgili reseptörler hücre içindeyse, daha ileri araştırmalar gerekebilir [10]. $K_{p,uu,beyin}$ değeri KBE genelinde pasif ve aktif taşınmanın net sonucu olarak somut bir değer verir. Eşitlik 9'a göre, düşük $K_{p,uu,beyin}$ değerinin plazmaya düşük özgül olmayan bağlanma, beyne yüksek bağlanma veya düşük $K_{p,beyin}$ değeri nedeniyle olabileceği görülmektedir. $K_{p,uu,beyin}$ influks ve efluks klerensleri oranıdır ve Eşitlik 10 ve 11 ile ifade edilebilir.

$$K_{p,uu,beyin} = \frac{C_{u,ss,beyin,ESS}}{C_{u,ss,plazma}} = \frac{CL_{iç}}{CL_{dış}} \quad \text{Eşitlik 10}$$

$$K_{p,uu,beyin} = \frac{CL_{pasif} + CL_{akt_alım} - CL_{akt_efluks}}{CL_{pasif} - CL_{akt_alım} + CL_{akt_efluks} + CL_{yığın_akış} + CL_{metabolizma}} \quad \text{Eşitlik 11}$$

Buradaki $C_{u,ss,beyin,ESS}$, beyin ESS'ndeki serbest kararlı durum ilaç konsantrasyonunu, $C_{u,ss,plazma}$, plazmadaki serbest kararlı durum ilaç konsantrasyonunu, CL_{pasif} , $CL_{alım}$ ve CL_{efluks} , sırasıyla KBE'ndeki pasif difüzyon, aktif alım ve efluks transport klerensini temsil eder. $CL_{yığın_akış}$

beyinden BOS'na ESS yığın akışı ve $CL_{\text{metabolizma}}$, KBE'ndeki beyin metabolik klerensidir [25,35,144,168,169].

Beyin mikrodializi yöntemi, ilacın serbest beyin konsantrasyonunu ($K_{p,uu,beyin}$) belirlemek için kullanılan doğrudan bir yaklaşımdır [10,127,144,167]. Kararlı durumda beyin ESS ile kan arasındaki bağlanmamış ilaç konsantrasyonu oranı ($K_{p,uu,beyin}$) pasif taşıma ve aktif influks/efluksa göre KBE'nde ilacın nasıl bir yol izleyeceğinin doğrudan nicel açıklamasını verebilmektedir [10].

Eşitlik 11, aktif efluks, beyin metabolik klerensi ve ESS yığın akışının beyin penetrasyon derecesini azalttığını göstermektedir. Permeabilitesi düşük olan ilaçlar için $CL_{\text{yığın akış}} K_{p,uu,beyin}$ 'i azaltmada etkin bir rol oynayabilir. Tahmini yığın akış klerensi yaklaşık 0.2–0.3 $\mu\text{L}/\text{dk}/\text{g}$ beyin'dir [25,168-170].

$K_{p,uu,beyin}$ değerinin bire yakın olması pasif difüzyon ile benzer influks ve efluks klerensi oranlarını gösterirken, bu değer birden büyük olması, influks sürecinin, birden küçük olması ise aktif efluks transportu, beyin parankimasında metabolizma veya yığın akış süreçleri gibi eliminasyon süreçlerinin daha önemli rol oynadığını düşündürmektedir [10,127,144,167,171].

İlacın Beyin İçi Dağılımı

İlacın beyin içi dağılımını belirlemek için $V_{u,beyin}$ ve $f_{u,beyin}$ parametrelerinin ölçülmesi gerekmektedir. Mikrodializ ve beyin kesiti teknikleri $V_{u,beyin}$ değerini, beyin homojenatı tekniği $f_{u,beyin}$ değerini belirlemek için kullanılan tekniklerdir [119,121,164,172,173]. Beyin mikrodializi tekniğinde Eşitlik 12 kullanılmaktadır.

$$V_{u,beyin} = \frac{A_{\text{top,beyin.içer.kan}} - V_{\text{kan}} \times C_{\text{tot,kan}}}{C_{u,beyinESS}} \quad \text{Eşitlik 12}$$

Bu eşitlikte $A_{\text{top,beyin.içer.kan}}$ kan dahil olmak üzere, beyin dokusunun bir gramındaki ilaç miktarını, V_{kan} beyin dokusundaki kan hacmini, $C_{\text{top,kan}}$ kandaki toplam ilaç konsantrasyonunu ve $C_{u,beyinESS}$ beyin ESS'ndeki serbest ilaç konsantrasyonunu göstermektedir [10,173]. $A_{\text{top,beyin.içer.kan}}$ ilacın görünür hacminde ($V_{u,beyin}$) çözünen önceden belirlenmiş bir miktarını göstermektedir. Görünür hacmin en düşük değeri beyin ESS'sinin gerçek hacmi yani 0.2 mL/g beyin'dir [174,175]. İlacın büyük bir kısmının beyin hücrelerinde dağılması halinde (özellikle de hücre içeriğine bağlandığında) daha yüksek bir $V_{u,beyin}$ değeri elde edilebilir.

Beyin kesiti tekniğine göre, $V_{u,beyin}$ Eşitlik 13 kullanılarak hesaplanabilir. Burada A_{slice} beyin kesitinin bir gramındaki ilaç miktarı ve C_{tampon} tampondaki ilaç konsantrasyonudur [119,172,176,177].

$$V_{u,beyin} = \frac{A_{\text{slice}}}{C_{\text{tampon}}} \quad \text{Eşitlik 13}$$

Beyin homojenatı tekniği özellikle ilaç taşınması çalışmalarında $f_{u,beyin}$ değerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde kısaca, taze veya dondurulmuş beyin ho-

mojenatı fosfat tamponlu tuz (PBS) içerisinde seyreltilmekte ve daha sonra diyaliz membranı boyunca dengelenmektedir [14,35,178]. $f_{u,beyin}$ Eşitlik 14 ile hesaplanabilir:

$$\text{Seyreltilmemiş-}f_{u,beyin} = \frac{1/D}{([1/f_{u,D}]-1)+1/D} \quad \text{Eşitlik 14}$$

Eşitlik 14'te D, beyin homojenatı seyreltme faktörünü ve $f_{u,D}$ seyreltilmiş beyin homojenatındaki bağlanmamış ilaç fraksiyonunu ifade etmektedir.

Hücre içi serbest ilaç konsantrasyonunu doğrudan belirleyecek teknik henüz geliştirilememiştir. Bu nedenle, hücre içi ilaç dağılımını belirlemek için mikrodiyaliz, beyin kesiti ($V_{u,beyin}$) ve beyin homojenatı ($f_{u,beyin}$) ve tekniklerinin sonuçlarının kombinasyonu kullanılmaktadır [4,158,165,166,177]. $K_{p,uu,hücre}$ İSS/ESS serbest ilaç konsantrasyonu oranını açıklamakta ve Eşitlik 15 ve 16 kullanılarak hesaplanabilmektedir [158,165,166,172].

$$K_{p,uu,hücre} = f_{u,beyin} \times V_{u,beyin} \quad \text{Eşitlik 15}$$

$$K_{p,uu,hücre} = \frac{C_{u,hücre}}{C_{u,beyin ESS}} \quad \text{Eşitlik 16}$$

Daha sonra, beynin hücre içi kompartmanlarındaki serbest ilaç konsantrasyonu ($C_{u,hücre}$) Eşitlik 17 yardımı ile belirlenebilir [179].

$$C_{u,hücre} = C_{u,plazma} \times K_{p,uu,beyin} \times K_{p,uu,hücre} \quad \text{Eşitlik 17}$$

$K_{p,uu,hücre}$ değeri, MSS hücre içini hedefleyen ilaçlar için $C_{u,hücre}$ değerini göstermektedir [4,166,177]. Bunun yanı sıra, Liu ve ark. [36], bir ilacın beyne giriş hızını ölçmek için intrinsik beyin dengelenme yarı ömrü ($t_{1/2 eq,in}$) ile bir yöntem geliştirmişlerdir [Eşitlik 18].

$$t_{1/2 eq,in} = \frac{V_{beyin} \times \ln 2}{PS \times f_{u,beyin}} \quad \text{Eşitlik 18}$$

Eşitlik 22'de V_{beyin} beyin dokusunun fizyolojik hacmidir. Dengeye ulaşma zamanı KBE permeabilitesi ve beyin dokusuna bağlanma afinitesi tarafından belirlenir [36,106,180,181].

2. Sonuç

Güvenli ve etkili MSS ilaçlarının keşfi ve geliştirilmesi oldukça zor ve karmaşık süreçleri içermektedir. İlaç keşfinde doz ve farmakolojik aktivite arasındaki ilişkiyi kontrol eden faktörlerin bilinmesi pre-klinik ve klinik çalışmalarda başarılı ilaç adaylarının seçiminde anahtar rol oynar. Son yıllarda çeşitli in vitro, in vivo ve in siliko yöntemler aracılığıyla beyin dağılımının hız ve derecesini etkileyen faktörlerin anlaşılması ve başarı olasılığının öngörülmesinde önemli

gelişmeler olmuştur. İlacın dozu, maruziyet süresi ve etkililiği arasında ilişki kurmak için KBE permeabilitesi ve beyin dokusuna bağlanma kapasitesinin bir bütün olarak değerlendirilmesi gerekir. Yaş, beslenme, yaşam tarzı, stres ve hastalıkların (santral ve periferik hastalıklar) KBE fonksiyon değişikliklerine neden olarak ilaç tedavisine yanıtı etkileyebileceği de unutulmamalıdır. Toplam beyin konsantrasyonu yaygın olarak kullanılmasına rağmen, yapılan çalışmalar beyindeki bağlanmamış ilaç konsantrasyonunun araştırılmasının önemli olduğunu göstermektedir. Farmakokinetik ve farmakodinamik açıdan daha iyi bir maruziyet-etkinlik ilişkisi kurabilmek için toplam konsantrasyonlardan bağlanmamış konsantrasyonları ayırabilen entegre yaklaşımlar kullanılmalıdır. Aday ilaçların in siliko yöntemlerle test edilerek küçük bir gruba indirgenmesi, bu gruba in vitro yöntemlerle eleme yapılarak elemeleri başarıyla geçen adayların in vivo yöntemlerle test edilmesiyle maliyet ve iş yükü azaltılabilir. Aday ilacın beyindeki serbest konsantrasyonu, penetrasyon ve dağılım özelliklerinin in vitro, in vivo ve in siliko yöntemler kombine edilerek araştırılmasıyla, uygun fizikokimyasal, farmakolojik ve farmakokinetik özelliklere sahip yeni ilaç molekülleri geliştirilerek klinik başarı artışı sağlanabilecektir. Gelecekte beyin lenfatik sistemi üzerinde yapılacak araştırmaların gizli kalmış birçok özelliği ortaya çıkaracağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Hurko O, Ryan J: Translational research in central nervous system drug discovery. *Neurotherapeutics* 2005, 2(4):671-682.
2. Pangalos MN, Schechter LE, Hurko O: Drug development for CNS disorders: Strategies for balancing risk and reducing attrition. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007, 6(7):521-532.
3. Reichel A: Addressing central nervous system (CNS) penetration in drug discovery: Basics and implications of the evolving new concept. *Chemistry & Biodiversity* 2009, 6(11):2030-2049.
4. Zlokovic BV: The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008, 57(2):178-201.
5. Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, et al: The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology* 2011, 21(9):655-679.
6. Pardridge WM: Drug and gene delivery to the brain: The vascular route. *Neuron* 2002, 36(4):555-558.
7. Hammarlund-Udenaes M, Bredberg U, Fridén M: Methodologies to assess brain drug delivery in lead optimization. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2009, 9(2):148-162.
8. Hammarlund-Udenaes M: Active-site concentrations of chemicals – Are they a better predictor of effect than plasma/organ/tissue concentrations? *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2010, 106(3):215-220.
9. Loryan I, Sinha V, Mackie C, Van Peer A, Drinkenburg W, Vermeulen A, et al: Mechanistic understanding of brain drug disposition to optimize the selection of potential neurotherapeutics in drug discovery. *Pharmaceutical Research* 2014, 31(8):2203-2219.
10. Hammarlund-Udenaes M, Fridén M, Syvänen S, Gupta A: On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharmaceutical Research* 2008, 25(8):1737-1750.
11. Hammarlund-Udenaes M. Pharmacokinetic Concepts in Brain Drug Delivery. In: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG (eds), *Drug Delivery to the Brain*. Springer, Berlin, Germany. 2014:127-161.

12. Reichel A. Pharmacokinetics of CNS Penetration. In: Li Di EHK (eds), *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*. John Wiley & Sons, New York, USA. 2015:10-16.
13. Reichel A: The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Current Drug Metabolism* 2006, 7(2):183-203.
14. Summerfield SG, Lucas AJ, Porter RA, Jeffrey P, Gunn RN, Read KR, et al: Toward an improved prediction of human in vivo brain penetration. *Xenobiotica* 2008, 38(12):1518-1535.
15. Summerfield S, Dong K: In vitro, in vivo and in silico models of drug distribution into the brain. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 2013, 40(3):301-314.
16. Liu X, Cheong J, Ding X, Deshmukh G: Use of cassette dosing approach to examine the effects of p-glycoprotein on the brain and cerebrospinal fluid concentrations in wild-type and p-glycoprotein knockout rats. *Drug Metabolism and Disposition* 2014, 42(4):482-491.
17. Dennison JE, Andersen ME, Clewell HJ, Yang RSH: Development of a physiologically based pharmacokinetic model for volatile fractions of gasoline using chemical lumping analysis. *Environmental Science & Technology* 2004, 38(21):5674-5681.
18. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, et al: In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicology In Vitro* 2005, 19(3):299-334.
19. Summerfield SG, Read K, Begley DJ, Obradovic T, Hidalgo IJ, Coggon S, et al: Central nervous system drug disposition: The relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007, 322(1):205-213.
20. Abbott NJ, Dolman DEM, Patabendige AK: Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain. *Current Drug Metabolism* 2008, 9(9):901-910.
21. Summerfield S, Jeffrey P: Discovery DMPK: Changing paradigms in the eighties, nineties and noughties. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2009, 4(3):207-218.
22. Reichel A. Integrated Approach to Optimizing CNS Penetration in Drug Discovery: From the Old to the New Paradigm and Assessment of Drug-Transporter Interactions. In: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG(eds), *Drug Delivery to the Brain*. Springer, Berlin, Germany. 2014: 339-374.
23. Wold S: Validation of QSAR's. *Quantitative Structure-Activity Relationships* 1991, 10(3):191-193.
24. Begley D, Brightman M. Structural and Functional Aspects of the Blood-Brain Barrier. In: Prokai L, Prokai-Tatrai K (eds), *Peptide Transport and Delivery into the Central Nervous System*. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 2003:39-78.
25. Abbott NJ: Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: Significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International* 2004, 45(4):545-552.
26. Abbott NJ: Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today: Technologies* 2004, 1(4):407-416.
27. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E: Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006, 7(1):41-53.
28. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck M-P, et al: Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007, 6(8):650-661.
29. Abbott NJ: Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2013, 36(3):437-449.

30. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcão A: Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2014, 87(3):409-432.
31. Risau W. *Molecular Biology of Blood-Brain Barrier Ontogenesis and Function*. In: Ito U (eds), *Brain Edema IX*. Springer, Berlin, Germany. 1994:109-112.
32. Pardridge WM: CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *Journal of Neurochemistry* 1998, 70(5):1781-1792.
33. Kreuter J: Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Current Medicinal Chemistry -Central Nervous System Agent* 2002, 2(3):241-249.
34. Begley DJ: Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: The problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics* 2004, 104(1):29-45.
35. Liu X, Chen C: Strategies to optimize brain penetration in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2005, 8(4):505-512.
36. Liu X, Smith BJ, Chen C, Callegari E, Becker SL, Chen X, et al: Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: An experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005, 313(3):1254-1262.
37. Jain KK. *An Overview of Drug Delivery to the CNS*. In: Jain KK (eds), *Drug Delivery to the Central Nervous System*. Humana Press, New York City, USA. 2010: 1-13.
38. Copur T, Oner L. *Drug Delivery to the Brain: Pharmacokinetic Concepts*. In: Gürsoy-Ozdemir Y, Bozdog-Pehlivan S, Sekerdag E (eds), *Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors: Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier*. Elsevier, (In Press 2017).
39. Wong A, Ye M, Levy A, Rothstein J, Bergles D, Searson PC: The blood-brain barrier: An engineering perspective. *Frontiers in Neuroengineering* 2013, 6(7):1-22.
40. Kim SY, Buckwalter M, Soreq H, Vezzani A, Kaufer D: Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia* 2012, 53(Supplement 6):37-44.
41. Wardlaw JM, Doubal FN, Valdes-Hernandez M, Wang X, Chappell FM, Shuler K, et al: Blood–brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease. *Stroke* 2013, 44(2):525-527.
42. Tega Y, Akanuma S, Kuba Y, Terasaki T, Hosaya K: Blood-to-brain influx transport of nicotine at the rat blood brain barrier: Involvement of a pyrilamine-sensitive organic cation transport process. *Neurochemistry International* 2013, 62(2):173-181.
43. Kaffashi A. *Malign gliomların tedavisi için lipit ile işlevselleştirilmiş PLGA nanopartiküllerinin tasarımı, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2013.
44. Reiber H, Felgenhauer K: Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clinica Chimica Acta* 1987, 163(3):319-328.
45. Segal M: The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2000, 20(2):183-196.
46. Pardridge WM: Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2012, 32(11):1959-1972.

47. Deo AK, Theil F-P, Nicolas J-M: Confounding parameters in preclinical assessment of blood–brain barrier permeation: An overview with emphasis on species differences and effect of disease states. *Molecular Pharmaceutics* 2013, 10(5):1581-1595.
48. Davies B, Morris T: Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research* 1993, 10(7):1093-1095.
49. Pardridge WM: Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002, 1(2):131–139.
50. Ganesh K, Quentin RS, Mitsuhiko H, Jagan P, Mark WD: Brain uptake, pharmacokinetics, and tissue distribution in the rat of neurotoxic N-butylbenzenesulfonamide. *Toxicological Sciences* 2007, 97(2):253-264.
51. Begley DJ, Khan EU, Rollinson C, Abbott J. The Role of Brain Extracellular Fluid Production and Drug Transport to the Brain. In: Begley DJ, Bradbury MW, Kreuter J (eds), *The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to CNS*. Marcel Dekker, Inc, New York, USA. 2000: 93–108.
52. Kimelberg HK: Water homeostasis in the brain: Basic concepts. *Neuroscience* 2004, 129(4):851-860.
53. Westerhout J, Danhof M, De Lange ECM: Preclinical prediction of human brain target site concentrations: Considerations in extrapolating to the clinical setting. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 100(9):3577-3593.
54. Johanson CE, Duncan JA, 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD: Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Research* 2008, 5:10.
55. Cserr H: Potassium exchange between cerebrospinal fluid, plasma, and brain. *Journal of Physiology Legacy Content* 1965, 209(6):1219-1226.
56. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman A S, Manley G T: Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *The FASEB Journal* 2005, 19(1):76–78.
57. Eyal S, Ke B, Muzi M, Link JM, Mankoff DA, Collier AC, et al: Regional p-glycoprotein activity and inhibition at the human blood–brain barrier as imaged by positron emission tomography. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2010, 87(5):579-585.
58. Stange K, Greitz D, Ingvar M, Hindmarsh T, Sollevi A: Global cerebral blood flow during infusion of adenosine in humans: Assessment by magnetic resonance imaging and positron emission tomography. *Acta Physiologica Scandinavica* 1997, 160(2):117-122.
59. Harashima H, Sawada Y, Sugiyama Y, Iga T, Hanano M: Analysis of nonlinear tissue distribution of quinidine in rats by physiologically based pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1985, 13(4):425-440.
60. Linde R, Hasselbalch SG, Topp S, Paulson OB, Madsen PL: Global cerebral blood flow and metabolism during acute hyperketonemia in the awake and anesthetized rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2006, 26(2):170-180.
61. Sheng H, Laskowitz DT, Mackensen GB, Kudo M, Pearlstein RD, Warner DS: Apolipoprotein E deficiency worsens outcome from global cerebral ischemia in the mouse. *Stroke* 1999, 30(5):1118–1124.
62. Itoh Y, Esaki T, Cook M, Qasba P, Shimoji K, Alroy J, Brady RO, Sokoloff L, Moore DF: Local and global cerebral blood flow and glucose utilization in the alpha-galactosidase A knockout mouse model of Fabry disease. *Journal of Neurochemistry* 2001, 79(6):1217–1224.

63. Jay TM, Lucignani G, Crane AM, Jehle J, Sokoloff L: Measurement of local cerebral blood flow with [¹⁴C] iodoantipyrine in the mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1988, 8(1):121-129.
64. Hammarlund-Udenaes M, Paalzow L, de Lange EM: Drug equilibration across the blood-brain barrier-pharmacokinetic considerations based on the microdialysis method. *Pharmaceutical Research* 1997, 14(2):128-134.
65. Syvänen S, Xie R, Sahin S, Hammarlund-Udenaes M: Pharmacokinetic consequences of active drug efflux at the blood-brain barrier. *Pharmaceutical Research* 2006, 23(4):705-717.
66. Rowland MT: *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins 2011:159-176.
67. Bulat M, Živković B. Neurochemical Study of the Cerebrospinal Fluid. In: Marks N, Rodnight R (eds), *Research Methods in Neurochemistry*. Springer, Berlin, Germany. 1978:57-89.
68. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P: Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS ONE* 2008, 3(2):1-8.
69. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A: Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015, 38:2-6.
70. Palmer AM, Alavijeh MS: Overview of experimental models of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology* 2013, 7-15.
71. Vorbodt AW, Dobrogowska DH: Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: Electron microscopist's view. *Brain Research Reviews* 2003, 42(3):221-242.
72. Bhowmik A, Khan R, Ghosh MK: Blood brain barrier: A challenge for effectual therapy of brain tumors. *BioMed Research International* 2015: 2015-2020.
73. Kaya M, Becker AJ, Gürses C: Blood-brain barrier, epileptogenesis, and treatment strategies in cortical dysplasia. *Epilepsia* 2012, 53(6):31-36.
74. Fischer H, Gottschlich R, Seelig A: Blood-brain barrier permeation: Molecular parameters governing passive diffusion. *The Journal of Membrane Biology* 1998, 165(3):201-211.
75. Crone C: The permeability of brain capillaries to non-electrolytes. *Acta Physiologica Scandinavica* 1965, 64(4):407-417.
76. Ferguson R, Woodbury D: Penetration of ¹⁴C-inulin and ¹⁴C-sucrose into brain, cerebrospinal fluid, and skeletal muscle of developing rats. *Experimental Brain Research* 1969, 7(3):181-194.
77. Ohno K, Pettigrew K, Rapoport S: Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1978, 235(3):299-307.
78. Hitchcock SA, Pennington LD: Structure-brain exposure relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006, 49(26):7559-7583.
79. Kreuter J: Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 47(1):65-81.
80. Gabathuler R: Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease* 2010, 37(1):48-57.
81. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, 23(1-3):3-25.

82. Chen Y, Liu L: Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64(7):640-665.
83. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN: Drug targeting to brain: A systematic approach to study the factors, parameters and approaches for prediction of permeability of drugs across BBB. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2013, 10(7):927-955.
84. Gratton JA, Abraham MH, Bradbury MW, Chadha HS: Molecular factors influencing drug transfer across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1997, 49(12):1211-1216.
85. Kelder J, Grootenhuys PJ, Bayada D, Delbressine LC, Ploemen J-P: Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharmaceutical Research* 1999, 16(10):1514-1519.
86. Lipinski CA: Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000, 44(1):235-249.
87. Abraham MH: The factors that influence permeation across the blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2004, 39(3):235-240.
88. Fu XC, Wang GP, Shan HL, Liang WQ, Gao JQ: Predicting blood–brain barrier penetration from molecular weight and number of polar atoms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008, 70(2):462-466.
89. Pardridge W: The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *Neurotherapeutics* 2005, 2(1):3-14.
90. Seelig A: The role of size and charge for blood–brain barrier permeation of drugs and fatty acids. *Journal of Molecular Neuroscience* 2007, 33(1):32-41.
91. Higgins CF, Gottesman MM: Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences* 1992, 17(1):18-21.
92. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KLR, Pollack GM: Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of p-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2001, 21(7):778-796.
93. Kimura Y, Kodan A, Matsuo M, Ueda K: Cholesterol fill-in model: Mechanism for substrate recognition by ABC proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007, 39(5-6):447-452.
94. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC: Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1989, 37(2):159-164.
95. Tsuji A, Terasaki T, Takabatake Y, Tenda Y, Tamai I, Yamashita T, et al: P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sciences* 1992, 51(18):1427-1437.
96. Löscher W, Potschka H: Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology* 2005, 76(1):22-76.
97. Jardetzky O: Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 1966, 211(5052):969-970.
98. Saier MH: A Functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000, 64(2):354-411.
99. Forrest LR, Krämer R, Ziegler C: The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2011, 1807(2):167-188.
100. Schlessinger A, Khuri N, Giacomini KM, Sali A: Molecular modeling and ligand docking for solute carrier (SLC) transporters. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2013, 13(7):843-856.

101. Xie R, Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M: Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: Involvement of probenecid-sensitive transport. *British Journal of Pharmacology* 2000, 131(8):1784-1792.
102. Mensch J, Oyarzabal J, Mackie C, Augustijns P: In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 98(12): 4429-4468.
103. Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD: Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1983, 3(1):1-7.
104. Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR: An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1984, 247(3):484-493.
105. Smith QR. A Review of Blood-Brain Barrier Transport Techniques. In: Nag S (eds), *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols*. Humana Press, New York City, USA. 2003:193-208.
106. Zhao R, Kalvass JC, Pollack G: Assessment of blood-brain barrier permeability using the in situ mouse brain perfusion technique. *Pharmaceutical Research* 2009, 26(7):1657-1664.
107. Dagenais C, Avdeef A, Tsinman O, Dudley A, Beliveau R: P-glycoprotein deficient mouse in situ blood-brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 38(2):121-137.
108. Oldendorf WH: Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Research* 1970, 24(2):372-376.
109. Gross P, Sposito N, Pettersen S, Fenstermacher J: Differences in function and structure of the capillary endothelium in gray matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. *Journal of Vascular Research* 1986, 23(6):261-270.
110. Hammarlund-Udenaes M: The use of microdialysis in CNS drug delivery studies: Pharmacokinetic perspectives and results with analgesics and antiepileptics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000, 45(2):283-294.
111. Benveniste H, Hüttemeier PC: Microdialysis—theory and application. *Progress in Neurobiology* 1990, 35(3):195-215.
112. de Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Research Reviews* 1997, 25(1):27-49.
113. de Lange EC, De Boer A, Breimer DD: Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000, 45(2):125-148.
114. de Lange EC, de Boer BA, Breimer DD: Microdialysis for pharmacokinetic analysis of drug transport to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 36(2):211-227.
115. Elmquist WF, Sawchuk RJ: Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical Research* 1997, 14(3):267-288.
116. Kehr J: A survey on quantitative microdialysis: Theoretical models and practical implications. *Journal of Neuroscience Methods* 1993, 48(3):251-261.
117. Oldendorf WH: Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Experimental Biology and Medicine* 1974, 147(3):813-816.
118. Pardridge WM: Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* 1977, 28(1):103-108.

119. Kakee A, Terasaki T, Sugiyama Y: Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1996, 277(3):1550-1559.
120. Wang Y, Sawchuk RJ: Zidovudine transport in the rabbit brain during intravenous and intracerebroventricular infusion. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1995, 84(7):871-876.
121. Wang Y, Welty DR: The simultaneous estimation of the influx and efflux blood-brain barrier permeabilities of gabapentin using a microdialysis-pharmacokinetic approach. *Pharmaceutical Research* 1996, 13(3):398-403.
122. Deguchi Y, Nozawa K, Yamada S, Yokoyama Y, Kimura R: Quantitative evaluation of brain distribution and blood-brain barrier efflux transport of probenecid in rats by microdialysis: Possible involvement of the monocarboxylic acid transport system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997, 280(2):551-560.
123. Deguchi Y, Inabe K, Tomiyasu K, Nozawa K, Yamada S, Kimura R: Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. *Pharmaceutical Research* 1995, 12(12):1838-1844.
124. Deguchi Y, Yokoyama Y, Sakamoto T, Hayashi H, Naito T, Yamada S, et al: Brain distribution of 6-mercaptopurine is regulated by the efflux transport system in the blood-brain barrier 1. *Life Sciences* 2000, 66(7):649-662.
125. Bouw MR, Gårdmark M, Hammarlund-Udenaes M: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats—a microdialysis study. *Pharmaceutical Research* 2000, 17(10):1220-1227.
126. Tunblad K, Hammarlund-Udenaes M, Jonsson EN: Influence of probenecid on the delivery of morphine-6-glucuronide to the brain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 24(1):49-57.
127. Boström E, Simonsson US, Hammarlund-Udenaes M: In vivo blood-brain barrier transport of oxycodone in the rat: Indications for active influx and implications for pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Drug Metabolism and Disposition* 2006, 34(9):1624-1631.
128. Tunblad K, Hammarlund-Udenaes M, Jonsson EN: An integrated model for the analysis of pharmacokinetic data from microdialysis experiments. *Pharmaceutical Research* 2004, 21(9):1698-1707.
129. Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann J-M: Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a p-glycoprotein-deficient mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2000, 20(2):381-386.
130. Liu X, Tu M, Kelly RS, Chen C, Smith BJ: Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metabolism and Disposition* 2004, 32(1):132-139.
131. Crone C: The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the 'Indicator Diffusion' method. *Acta Physiologica Scandinavica* 1963, 58(4):292-305.
132. Smith Q, Samala R: In Situ and In Vivo Animal Models. In: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG (eds), *Drug Delivery to the Brain*. Springer, Berlin, Germany. 2014:199-211.
133. Poulin P, Theil FP: Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. I. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 91(1):129-156.
134. Poulin P, Theil FP: Prediction of pharmacokinetics prior to In Vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 91(5):1358-1370.

135. Rodgers T, Leahy D, Rowland M: Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: Predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, 94(6):1259-1276.
136. Rodgers T, Rowland M: Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: Predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 95(6):1238-1257.
137. Krämer SD, Lombardi D, Primorac A, Thomae AV, Wunderli-Allenspach H: Lipid-bilayer permeation of drug-like compounds. *Chemistry & Biodiversity* 2009, 6(11):1900-1916.
138. Quignot N: Modeling bioavailability to organs protected by biological barriers. In *Silico Pharmacology* 2013, 1(1):1-9.
139. Wilhelm I, Krizbai IA: In vitro models of the blood–brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Molecular Pharmaceutics* 2014, 11(7):1949-1963.
140. Abbott NJ, Dolman DE, Yusof SR, Reichel A. In *Vitro Models of CNS Barriers*. In: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG (eds), *Drug Delivery to the Brain*. Springer, Berlin, Germany. 2014:163-197.
141. Di L, Kerns EH, Bezar IF, Petusky SL, Huang Y: Comparison of blood–brain barrier permeability assays: In situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 98(6):1980-1991.
142. Bickel U: How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *Neurotherapeutics* 2005, 2(1):15-26.
143. Levin VA: Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *Journal of Medicinal Chemistry* 1980, 23(6):682-684.
144. Fridén M, Winiwarter S, Jerndal G, Bengtsson O, Wan H, Bredberg U, et al: Structure–brain exposure relationships in rat and human using a novel data set of unbound drug concentrations in brain interstitial and cerebrospinal fluids. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 52(20):6233-6243.
145. Fan Y, Unwalla R, Denny RA, Di L, Kerns EH, Diller DJ, et al: Insights for predicting blood-brain barrier penetration of CNS targeted molecules using QSPR approaches. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2010, 50(6):1123-1133.
146. Mensch J, Jaroskova L, Sanderson W, Melis A, Mackie C, Verreck G, et al: Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 395(1–2):182-197.
147. Mensch J, Melis A, Mackie C, Verreck G, Brewster ME, Augustijns P: Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2010, 74(3):495-502.
148. Avdeef A: How well can in vitro brain microcapillary endothelial cell models predict rodent in vivo blood–brain barrier permeability? *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 43(3):109-124.
149. Avdeef A, Sun N: A new in situ brain perfusion flow correction method for lipophilic drugs based on the pH-dependent Crone-Renkin Equation. *Pharmaceutical Research* 2011, 28(3):517-530.
150. Chen H, Winiwarter S, Fridén M, Antonsson M, Engkvist O: In silico prediction of unbound brain-to-plasma concentration ratio using machine learning algorithms. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2011, 29(8):985-995.
151. Broccatelli F, Larregieu CA, Cruciani G, Oprea TI, Benet LZ: Improving the prediction of the brain disposition for orally administered drugs using BDDCS. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012, 64(1):95-109.

152. Di L, Artursson P, Avdeef A, Ecker GF, Faller B, Fischer H, et al: Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. *Drug Discovery Today* 2012, 17(15–16):905-912.
153. Lanevskij K, Japertas P, Didziapetris R: Improving the prediction of drug disposition in the brain. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2013, 9(4):473-486.
154. Jouyban A, Somaieh S. Blood brain barrier permeation. In: Acree W (eds), *Toxicity and Drug Testing*. InTech, Rijeka, Croatia. 2012:3-24.
155. Pardridge WM: Log(BB), PS products and in silico models of drug brain penetration. *Drug Discovery Today* 2004, 9(9):392-393.
156. Kalvass JC, Olson ER, Cassidy MP, Selley DE, Pollack GM: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of seven opioids in p-glycoprotein-competent mice: Assessment of unbound brain EC₅₀ and correlation of in vitro, preclinical, and clinical data. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007, 323(1):346-355.
157. Watson J, Wright S, Lucas A, Clarke KL, Viggers J, Cheetham S, et al: Receptor occupancy and brain free fraction. *Drug Metabolism and Disposition* 2009, 37(4):753-760.
158. Fridén M, Gupta A, Antonsson M, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M: In vitro methods for estimating unbound drug concentrations in the brain interstitial and intracellular fluids. *Drug Metabolism and Disposition* 2007, 35(9):1711-1719.
159. Redzic Z: Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Similarities and differences. *Fluids and Barriers of the CNS* 2011, 8(1):3.
160. Gründer G, Hiemke C, Paulzen M, Veselinovic T, Vernaleken I: Therapeutic plasma concentrations of antidepressants and antipsychotics: Lessons from PET imaging. *Pharmacopsychiatry* 2011, 44(6):236-248.
161. Summerfield SG, Jeffrey P: In vitro prediction of brain penetration – a case for free thinking? *Expert Opinion on Drug Discovery* 2006, 1(6):595-607.
162. Jeffrey P, Summerfield S: Assessment of the blood–brain barrier in CNS drug discovery. *Neurobiology of Disease* 2010, 37(1):33-37.
163. Doğan SS, Çaban S, Çapan Y: Brain drug targeting strategies. *Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy* 2013, 33(2):231-250.
164. Cory Kalvass J, Maurer TS: Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: Implications for rational drug discovery. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 2002, 23(8):327-338.
165. Maurer TS, DeBartolo DB, Tess DA, Scott DO: Relationship between exposure and nonspecific binding of thirty-three central nervous system drugs in mice. *Drug Metabolism and Disposition* 2005, 33(1):175-181.
166. Fridén M, Bergström F, Wan H, Rehngrén M, Ahlin G, Hammarlund-Udenaes M, et al: Measurement of unbound drug exposure in brain: Modeling of pH partitioning explains diverging results between the brain slice and brain homogenate methods. *Drug Metabolism and Disposition* 2011, 39(3):353-362.
167. Gupta A, Chatelain P, Massingham R, Jonsson EN, Hammarlund-Udenaes M: Brain distribution of cetirizine enantiomers: Comparison of three different tissue-to-partition coefficients: K_p, K_{p,u}, and K_{p,uu}. *Drug Metabolism and Disposition* 2006, 34(2):318-323.
168. Cserr HF, Cooper DN, Milhorat TH: Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus. *Experimental Eye Research* 1977, 25 (Supplement 1):461-473.

169. Rosenberg GA, Kyner WT, Estrada E: Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1980, 238(1):42-49.
170. Cserr HF, Patlak CS. Secretion and Bulk Flow of Interstitial Fluid. In: Bradbury MB(eds), *Physiology and Pharmacology of the Blood-Brain Barrier*. Springer, Berlin, Germany. 1992:245-261.
171. Jeffrey P, Summerfield SG: Challenges for blood-brain barrier (BBB) screening. *Xenobiotica* 2007, 37(10/11):1135-1151.
172. Fridén M, Ducrozet F, Middleton B, Antonsson M, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M: Development of a high-throughput brain slice method for studying drug distribution in the central nervous system. *Drug Metabolism and Disposition* 2009, 37(6):1226-1233.
173. Fridén M, Ljungqvist H, Middleton B, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M: Improved measurement of drug exposure in the brain using drug-specific correction for residual blood. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2010, 30(1):150-161.
174. Nicholson C, Phillips JM: Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *The Journal of Physiology* 1981, 321(1):225-257.
175. Nicholson C, Syková E: Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences* 1998, 21(5):207-215.
176. Becker S, Liu X: Evaluation of the utility of brain slice methods to study brain penetration. *Drug Metabolism and Disposition* 2006, 34(5):855-861.
177. Loryan I, Hammarlund-Udenaes M. *Drug Discovery Methods for Studying Brain Drug Delivery and Distribution*. In: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG (eds), *Drug Delivery to the Brain*. Springer, Berlin, Germany. 2014:271-316.
178. Di L, Umland JP, Chang G, Huang Y, Lin Z, Scott DO, et al: Species independence in brain tissue binding using brain homogenates. *Drug Metabolism and Disposition* 2011, 39(7):1270-1277.
179. Liu X, Van Natta K, Yeo H, Vilenski O, Weller PE, Worboys PD, et al: Unbound drug concentration in brain homogenate and cerebral spinal fluid at steady state as a surrogate for unbound concentration in brain interstitial fluid. *Drug Metabolism and Disposition* 2009, 37(4):787-793.
180. Kielbasa W, Stratford RE: Exploratory translational modeling approach in drug development to predict human brain pharmacokinetics and pharmacologically relevant clinical doses. *Drug Metabolism and Disposition* 2012, 40(5):877-883.
181. Ball K, Bouzom F, Scherrmann JM, Walther B, Declèves X: Development of a physiologically based pharmacokinetic model for the rat central nervous system and determination of an in vitro–in vivo scaling methodology for the blood–brain barrier permeability of two transporter substrates, morphine and oxycodone. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 101(11):4277-4292.