proLékaře.cz | 24.4.2024

Nanočástice jako nosiče léků přes hematoencefalickou bariéru – naděje pro léčbu neurodegenerativních onemocnění v budoucnosti?

Nanoparticle-based Drug Delivery Systems Crossing Blood-brain Barrier – Hope for Future Treatment of Neurodegenerative Disorders?

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.
Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

M. Filipová[1], R. Rusina[2,3], K. Holada[1]

[1] Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK v Praze
[2] Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd, 1. LF UK a VFN v Praze
[3] Neurologické oddělení, Thomayerova nemocnice v Praze

✉
doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.
Ústav imunologie a mikrobiologie
1. LF UK v Praze
Studničkova 7
128 00 Praha 2
e-mail: karel.holada@lf1.cuni.cz

Přijato k recenzi: 15. 6. 2015
Přijato do tisku: 19. 11. 2015

Souhrn
Neurodegenerativní onemocnění, mezi něž patří např. Alzheimerova a Parkinsonova nemoc, se kvůli své neustále se zvyšující prevalenci a nedostupnosti efektivní léčby staly jedním z nejpalčivějších problémů moderní medicíny. Ačkoli existují látky s potenciálním terapeutickým účinkem, hematoencefalická bariéra vytváří účinnou překážku pro transport léků do centrálního nervového systému. Naději pro vyřešení tohoto problému přinesl nástup nanotechnologií umožňujících přípravu částic s přesně navrženými vlastnostmi pro překročení hematoencefalické bariéry. Širokému využití nanočástic pro transport léků brání nedostatečné zmapování jejich biologických vlastností a bezpečnostních rizik. Pokrok v této oblasti společně s rostoucím porozuměním patogenezi neurodegenerativních onemocnění by v budoucnu mohl vést k nalezení jejich efektivní léčby.

Abstract
Due to the continually rising prevalence and lack of effective therapy, neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, are among the most serious problems of modern medicine. Even though promising compounds with potential therapeutic effect have been developed, blood-brain barrier impedes their transport to the central nervous system. Nanotechnologies produce particles with properties that enable them to cross the blood-brain barrier and thus provide hope in solving this problem. Wide utilization of nanoparticles for transportation of drugs is prevented by our limited knowledge of their biological properties and their safety profile. Further developments in this field together with increasing understanding of the pathogenesis of neurodegeneration may lead to development of effective therapy in the future.

Klíčová slova
hematoencefalická bariéra – dendrimery – lipozómy – nanotuby – uhlík – nanočástice – neurodegenerativní onemocnění

Key words
blood-brain barrier – dendrimers – liposomes – nanotubes – carbon – nanoparticles – neurodegenerative diseases

Práce vznikla za přispění grantu Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR (Kontakt II – LH12014) a Ministerstva zdravotnictví ČR (IGA MZ NT 14145-3).

Poděkování patří Dr. Janu Šimákovi a Dr. Silvii Lacerdě (CBER, FDA, White Oak, USA) za pomoc s konfokální mikroskopií a přípravou fluorescenčně značených M60COOH.

proLékaře.cz | 24.4.2024

Úvod

Neurodegenerativní onemocnění se vyznačují masivním odumíráním neuronů spojeným s akumulací patologické formy proteinu specifického pro konkrétní onemocnění v mozkové tkáni (Alzheimerova nemoc – beta-amyloid a hyperfosforylovaný protein tau, Parkinsonova nemoc – alfa-synuklein, Creutzfeldtova-Jakobova choroba – prionový protein PrP^{TSE}, frontotemporální lobární degenerace – tau protein nebo protein TDP-43, aj.).

Abnormální protein vzniká změnou konformace nativního proteinu, při níž dochází k nahrazení sekundární proteinové struktury obsahující alfa šroubovice (helixy) strukturou beta skládaného listu. Vytváří se „cross beta helikální" struktura, která je rezistentní vůči proteolytickému štěpení a agreguje za vzniku amyloidových fibril [1,2]. Pokud se během vzniku a následné kontroly kvality proteinů v endoplazmatickém retikulu (ER) vyskytne špatně sbalený, nesbalený nebo abnormální protein, dochází ke spuštění dráhy degradace spojené s ER (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation; ERAD). Chaperon BiP (immunoglobulin heavy-chain binding protein) rozpozná špatně sbalené, popř. abnormální proteiny a umožní jejich transport do cytozolu, kde jsou ubikvitinovány a degradovány v proteazómu. Neodstraní-li tato dráha abnormální proteiny, dochází k jejich akumulaci, stresu ER a aktivaci dráhy buněčné odpovědi na nesbalené proteiny (Unfolded Protein Response; UPR).

Aktivace části nebo celé této dráhy byla shodně pozorována u Alzheimerovy nemoci (AN), Parkinsonovy i Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci [3]. U AN v této dráze hraje zřejmě důležitou úlohu karboxy-terminální fragment-β (C99, též CTFβ), který vzniká štěpením prekurzorového proteinu beta-amyloidu a inhibuje ERAD dráhu a proteazomální degradaci, což vede k jeho transportu do lyzozomu. Pokud dojde i k poškození lyzozomu, jsou abnormální proteiny transportovány na buněčný povrch [4–6] a dochází ke vzniku amyloidových plak, které jsou barvitelné pomocí Kongo červeně nebo thioflavinu T [7,8]. Současný výzkum naznačuje, že nejvíce toxické jsou pro buňky oligomery abnormálního proteinu, ale přesný mechanizmus jejich toxicity není znám [9,10].

S narůstajícím stárnutím populace se výrazně zvyšuje výskyt zejména AN, pro kterou, stejně jako pro další neurodegenerativní onemocnění, neexistuje kauzální léčba. Symptomatickou terapii AN zahrnují inhibitory acetyl-cholinesterázy (donepezil, rivastigmin nebo galantamin) a nekompetitivní antagonisté N-metyl-D-aspartátových (NMDA) glutamátových receptorů (memantin). K nadějným (ale zatím rutinně nedostupným) strategiím léčby AN patří inhibitory β- a γ-sekretázy, inhibitory zabraňující tvorbě amyloidových agregátů či imunoterapie cílená proti beta-amyloidu (Aβ42), anebo proteinu tau. Při léčbě Parkinsonovy nemoci slouží jako léky první volby levodopa prostupující přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do mozku, kde je dekarboxylována na dopamin. Problémy s využitím těchto léků souvisí především s účinností transportu přes HEB, nežádoucími účinky (trávicí obtíže u inhibitorů acetylcholinesterázy, levodopou indukované dyskineze, možná toxicita vůči nervovým buňkám) nebo zvýšenou rychlostí odstraňování z krevního oběhu [11–14]. Naději pro řešení těchto problémů představují cíleně modifikované nanočástice sloužící jako distributory léků přes HEB [15–17].

Struktura HEB a hlavní transportní mechanizmy

Centrální nervový systém (CNS) je od zbytku organizmu oddělen HEB, která udržuje stálé vnitřní prostředí a zároveň brání vniku cizorodých a potenciálně škodlivých látek. HEB je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, které jsou mezi sebou spojeny těsnými a adherentními spoji. Endotelové buňky jsou v apikální části mezibuněčného prostoru propojeny do tzv. těsného spoje prostřednictvím transmembránových proteinů: klaudinů, okludinů a cytoplazmatických proteinů. V bazolaterální části mezibuněčného prostoru dochází k propojení buněk pomocí proteinů kadherinu, integrinů a s nimi asociovaných proteinů za vzniku adherentního spoje. Těsný spoj spolu s adherentním určují fyzickou bariérovou funkci HEB a jejich narušení vede ke zvýšené propustnosti HEB pro cizorodé látky. Do vrstvy endotelových buněk vybíhají pericyty a axonální patky astrocytů, jež spolu s endotelovými buňkami určují, pro které molekuly bude HEB propustná a pro které nikoliv [18–20].

Výsledkem těchto interakcí je semi-permeabilní bariéra, která propouští pouze:

a) malé molekuly (O_2, CO_2, H_2O);
b) malé, lipofilní molekuly o maximální velikosti 400–600 Da (steroidní hormony jako kalcitriol, aj.), které volně difundují přes plazmatickou membránu endotelových buněk [21,22].

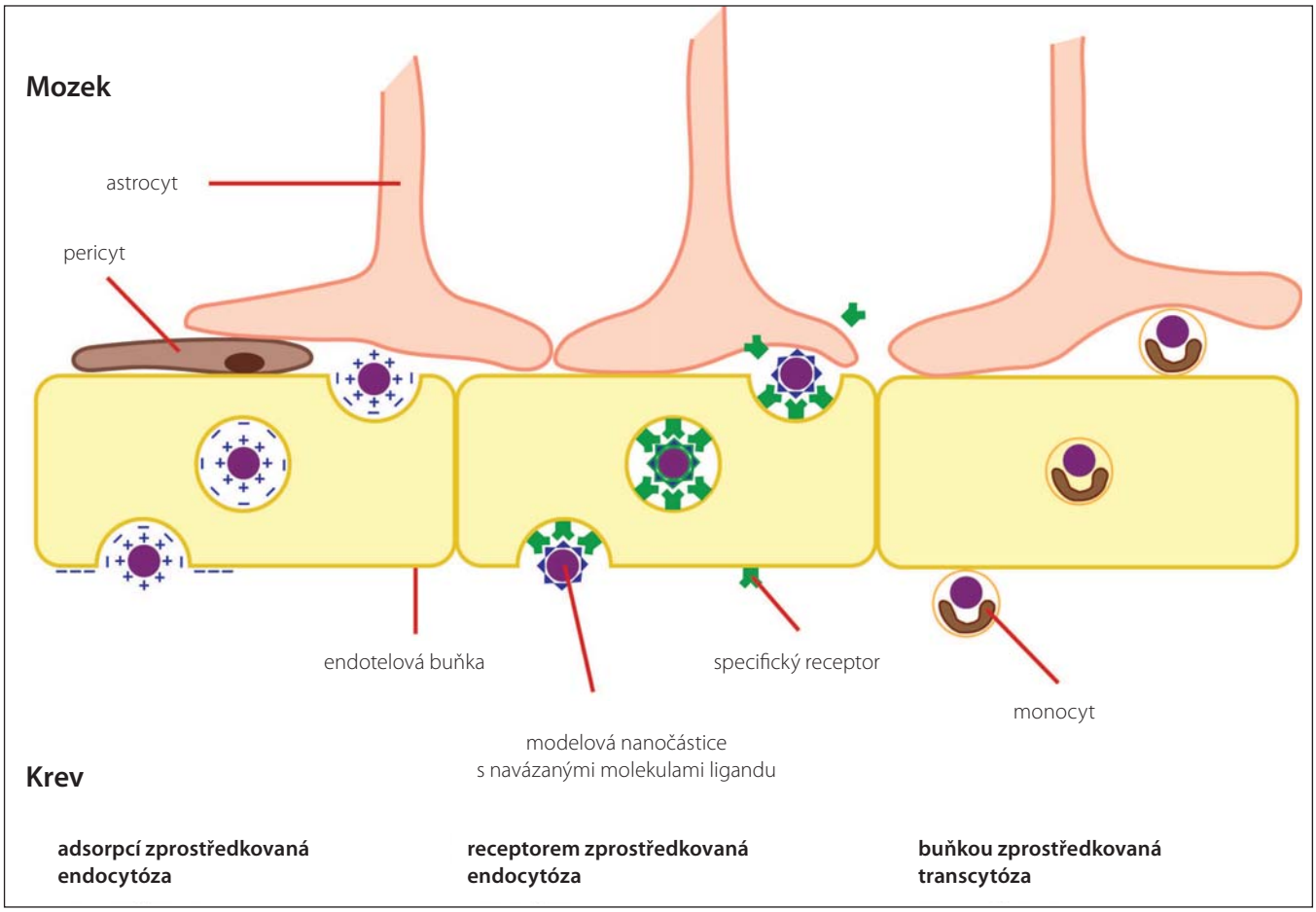
Pro ostatní molekuly, které nesplňují tyto podmínky a jsou nezbytné pro zajištění výživy CNS, existují přenašeče. Transport glukózy zajišťují přenašeče rodiny GLUT (-1, -3, -4, -5 ad.) usnadněnou difúzí. Přenašeče pro některé aminokyseliny, organické kyseliny nebo nukleotidy jsou obvykle spřaženy s transportem specifických iontů. Makromolekuly (inzulin, transferin ad.) bývají transportovány receptorem zprostředkovanou transcytózou přes cytoplazmu endotelových buněk. Export odpadních produktů metabolizmu nebo molekul, které by v nadměrném množství mohly fungovat neurotoxicky (glutamát), či různých cizorodých látek zajišťují specifické přenašeče z rodiny ABC proteinů obsahující ATP vazebnou kazetu. Patří sem transportéry skupiny ABCA (např. ABCA1 – zajišťuje odstraňování cholesterolu ad.) [23 24], ABCB (ABCB1 – p-glykoprotein 1, který je odpovědný za export xenobiotik, steroidů ad.), ABCC, ABCG (ABCG2 – protein rezistence rakoviny prsu (Breast Cancer Resistance Protein; BCRP) zajišťující rovněž export xenobiotik, flavonoidů či porfyrinů) atd. [25]. Přenos organických aniontů a kationtů zajišťuje skupina transportérů rozpuštěných látek (Solute Carrier; SLC), mezi které patří transportéry organických kationtů (Organic Cationt Transporter; OCT) a transportéry organických aniontů OAT, které odpovídají za vstup a výstup živin, neurotransmiterů, metabolitů a toxinů z resp. do buněk [26,27].

Tento propracovaný systém přenašečů aktivně transportuje většinu léků procházejících přes HEB zpět do krve a je hlavní příčinou problému cílené dopravy léků do CNS a tvoří základ tzv. mnohočetné lékové rezistence. Po dlouhou dobu byl CNS považován za kompletně imunoprivilegovaný orgán. Nejnovější výzkumy však odhalily přítomnost lymfatických cév, které přemosťují HEB a umožňují vstup imunitních buněk z těla do CNS [28]. To ale nemění nic na faktu, že překonání komplexního systému HEB je velká výzva pro současný výzkum zaměřený na cílený transport léků do CNS.

Nanočástice – koncept trojského koně

Limitovaná propustnost HEB pro řadu léků, které nesplňují požadavky pro transport do CNS (velikost nad 400 Da, nedostatečná hydrofobicita aj.), vede ke snaze o navržení alternativní strategie transportu. Jednou z možností je využití nanočástic jako tzv. trojského koně. V tomto konceptu dojde k připojení

proLékaře.cz | 24.4.2024



Obr. 1. Možné cesty prostupu nanočástic přes HEB.

Fig. 1. Possible ways of nanoparticle penetration through the blood-brain barrier.

nebo zabalení léku do nanočástice s cíleně navrženými vlastnostmi umožňujícími přechod přes HEB. V dalším kroku se nanočástice s lékem dostávají do cílových buněk, kde následně dojde k uvolnění léku do tkáně.

Agregace nanočástic a jejich interakce s proteiny v organizmu

Nanočástice jsou definovány jako velmi malé částice, jejichž jeden rozměr je menší než 100 nm. Hydrofobicita mnohých nanočástic (uhlíkové nanotuby, některé dendrimery aj.) snižuje jejich rozpustnost ve vodných roztocích a v tělních tekutinách. To má za následek jejich agregaci a tvorbu shluků. Minimalizace tvorby shluků a zvýšení rozpustnosti lze dosáhnout zavedením funkčních skupin, např. -COOH, $-NH_2$, $-SO_3H$, na povrch nanočástic nebo jejich spojením s neiontovými kopolymery (pluronický F108, F127 aj.), které často snižují jejich toxické vlastnosti při dlouhodobém působení v okolí buněk [29–31].

Po vstupu nanočástic do krevního řečiště nebo po jejich aplikaci do CNS dojde na základě elektrostatických a hydrofobních sil k navázání proteinů a dalších makromolekul krevní plazmy, resp. mozkomíšního moku na jejich povrch. Slabě navázané proteiny jsou vytěsňovány jinými a postupně se ustaluje jejich skladba za vzniku stabilního proteinového obalu, tzv. tvrdé korony. Konkrétní zastoupení jednotlivých proteinů v tvrdé koroně závisí ve větší míře na povrchových vlastnostech nanočástic, v menší míře pak na jejich velikosti [32]. Mezi nejvíce zastoupené proteiny krevní plazmy, např. u korony uhlíkových nanotub, patří fibrinogen, lidský sérový albumin, apolipoprotein A a imunoglobulin G [33].

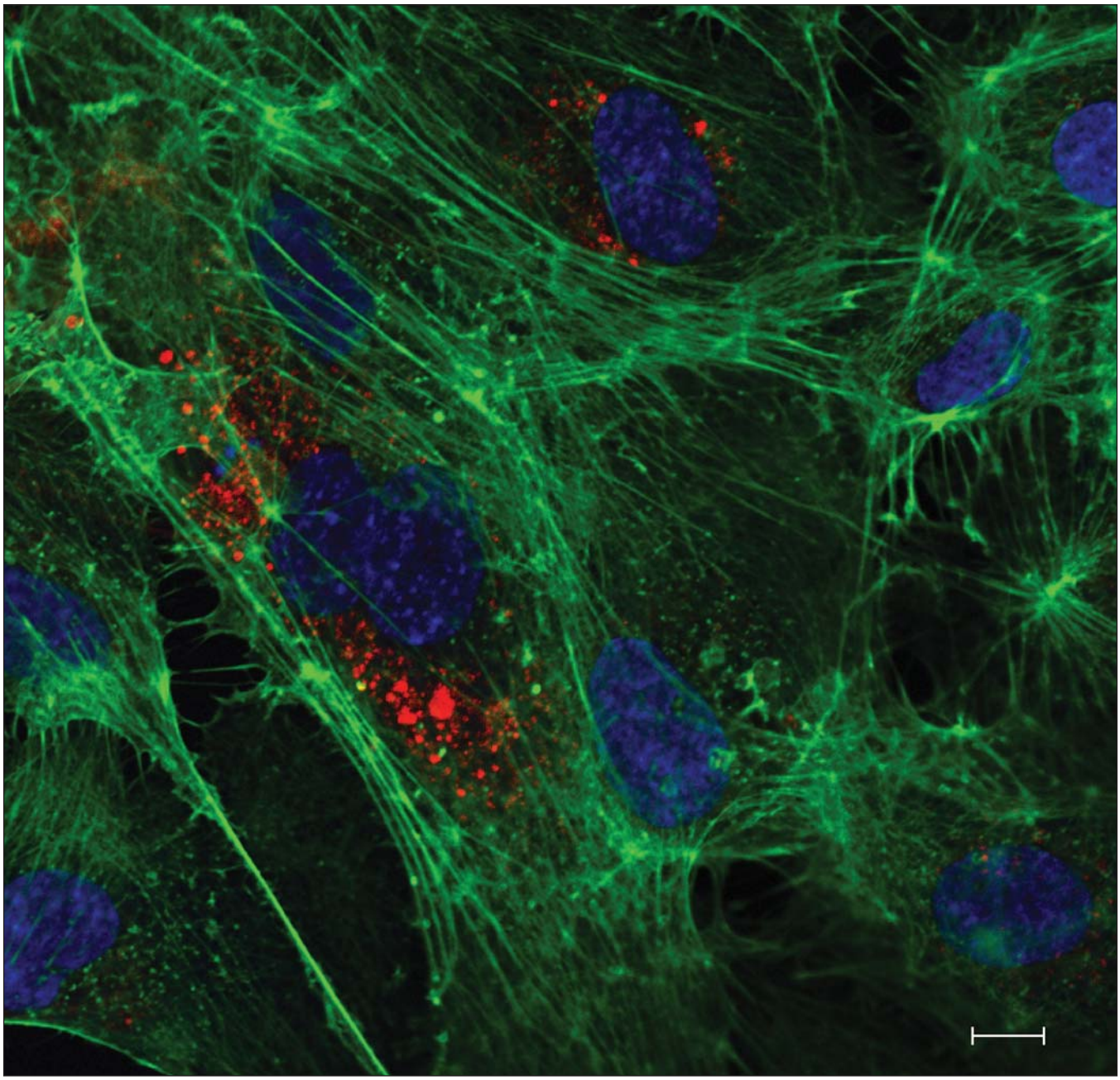
Nabalováním dalších proteinů na vrstvu tvrdé korony vzniká tzv. měkká korona, jejíž složení se postupnou asociací a disociací proteinů ustálí do dynamické rovnováhy a dosáhne téměř stabilního složení [34]. Vznik proteinové korony a interakci nanočástic s proteiny krevní plazmy lze omezit funkcionalizací a inkubací nanočástic s ve vodě rozpustnými polymery, jako je polyetylenglykol (PEG) [35,36]. Složení proteinové korony do velké míry ovlivňuje výsledky interakce nanočástic s buňkami a studium vlivu změn složení proteinové korony při průchodu HEB na funkční vlastnosti nanočástic představuje důležitý krok v jejich použití pro cílený transport léků do mozku.

Prostup nanočástic přes HEB

S přihlédnutím k architektuře a bariérové funkci HEB ovlivňuje celková velikost nanočástice nesoucí lék mechanizmus prostupu do CNS. Mezi možné cesty patří receptorem zprostředkovaná endocytóza (specifický ligand se váže na specifický receptor), adsorpcí zprostředkovaná endocytóza (pozitivní náboj ligandu interaguje s negativním nábojem na povrchu plazmatické membrány) a buňkou zprostředkovaná transcytóza (nanočástice jsou neseny monocytem či makrofágem; obr. 1) [37].

Atraktivní je využití receptorem zprostředkované endocytózy [38,39]. Buňky HEB exprimují specifické receptory pro

proLékaře.cz | 24.4.2024



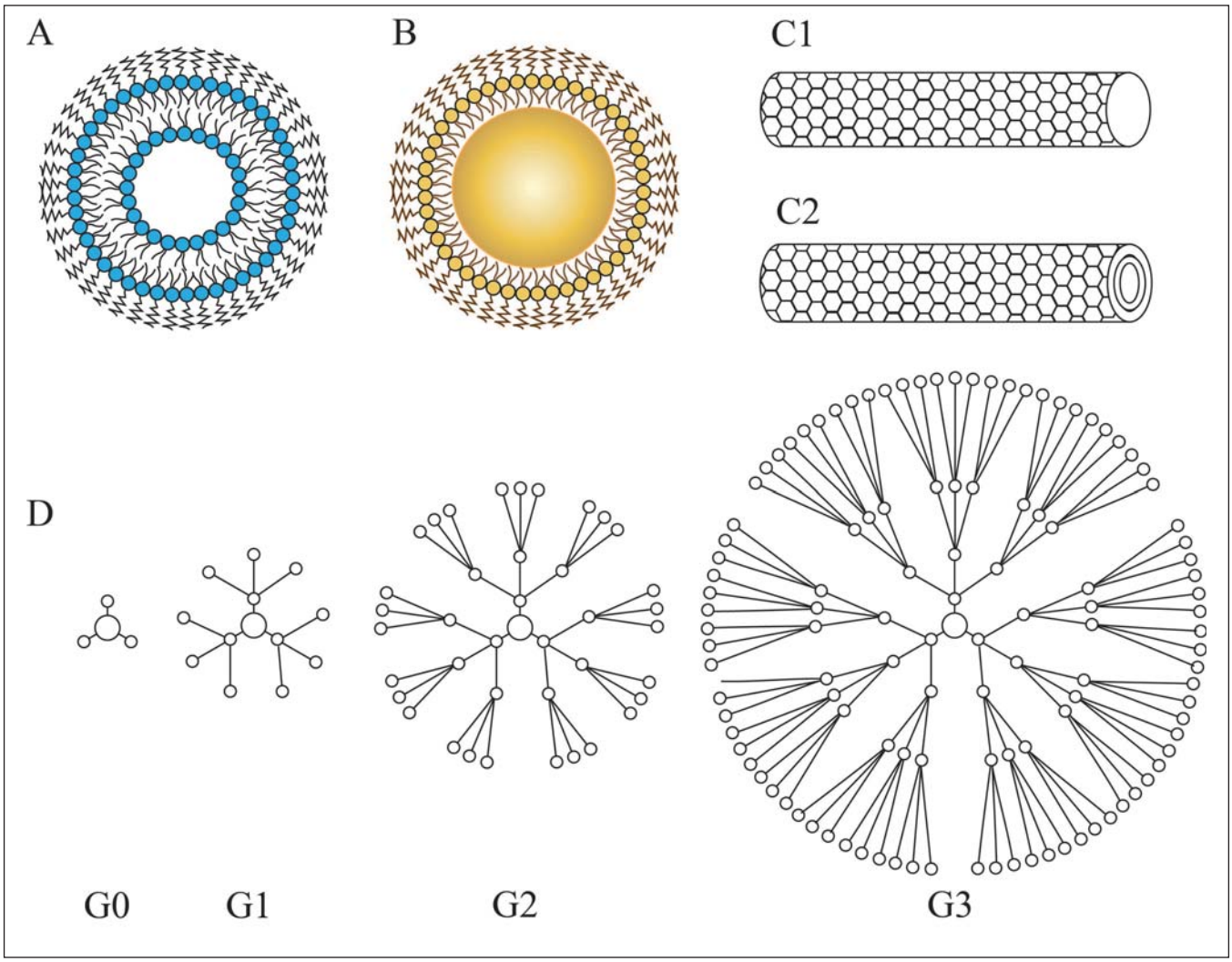
Obr. 2. Perinukleární lokalizace uhlíkových nanotub M60COOH v lidských endotelových buňkách HUVEC, které slouží jako model HEB [47].
Fig. 2. Perinuclear localization of the M60COOH carbon nanotubes in human endothelial cells (HUVEC) that serve as a model of the blood-brain barrier [47].

Červeně – fluorescenčně značené karboxylované uhlíkové nanotuby, modře – buněčná jádra značená TO-PRO-3, zeleně – aktinový cytoskelet značený faloidinem konjugovaným s Alexa Fluor 488. Obrázek byl zhotoven na konfokálním mikroskopu Zeiss 710 LSM za využití planachromatického objektivu s olejovou imerzí 40×/1,4. Měřítko: 10 µm.

transport molekul uplatňujících se v metabolizmu CNS, jako je transferinový, inzulinový nebo lipoproteinový receptor [40]. Navázáním specifických ligandů na povrch nanočástic lze docílit receptorem zprostředkované endocytózy nanočástice a její následné transcytózy endotelovými buňkami [41,42].

Některé typy nanočástic se však po endocytóze hromadí v perinukleární oblasti endotelových buněk (obr. 2), nedokončují transcytózu a jsou buňkou směrovány do lyzozomu, kde nastává odbourávání funkčních skupin, dokud se neodhalí nefunkcionalizované jádro. Toto jádro buňky problematicky štěpí a vznikají toxické efekty [43] (příkladem mohou být uhlíkové nanotuby [39,44]). Dochází k indukci apoptózy a autofágie, při níž jsou nanotuby exportovány z buňky v autofagických váčcích [45]. Navázání IgG na nanočástice vede k jejich zvýšené fagocytóze buňkami imunitního systému, což nepříznivě ovlivňuje cirkulaci nanočástic v krevním řečišti [46]. Tento problém může být řešen např.

proLékaře.cz | 24.4.2024



Obr. 3. Typy nanočástic.
Fig. 3. Types of nanoparticles.

A) Lipozom: modře – hydrofilní hlavičky fosfolipidů, vně lipozomu navázány molekuly polyetylenglykolu.

B) Pevná lipidová nanočástice: žluté jádro (tvořeno glyceridy a vosky s vysokou teplotou tání) obalené jednu vrstvou fosfolipidů, vně fosfolipidů navázány molekuly polyetylenglykolu.

C1) Jednovrstevná uhlíková nanotuba.

C2) Vícevrstevná uhlíková nanotuba.

D) Dendrimery: G0–G3 generace, jádro tvořeno iontem kovu, koncové skupiny na povrchu dendrimerů udávají náboj molekuly.

konjugací nanočástic s PEG. PEG konjugované lipozómy neváží opsoniny z krve, a to jim umožňuje delší setrvání v krevním oběhu [47].

Uvolnění léku z nanočástice a její degradace

Po dosažení buněk cílové oblasti mozku je zapotřebí, aby došlo k uvolnění léku z nanočástice a její degradaci, popř. transportu zpět do krevního řečiště a vyloučení z těla bez poškození organizmu.

Společnou destinací většiny typů nanočástic je endozomální-lyzozomální systém, který degraduje buňce vlastní i cizorodé částice a je místem, v němž obvykle dochází k uvolnění léku z nanočástice [30,49,50]. Rychlost uvolňování léku se liší podle typu nanočástic a způsobu navázání léku. Např. u polymerních nanočástic závisí na prosté difúzi, která je ovlivněna složením polymeru a vlastnostmi léku. Kontrolované uvolňování léku může být zajištěno jeho uvolňováním spolu s degradací molekul polymerního obalu. Tak se lék může postupně uvolňovat i několik dní [51].

Po odhalení vlastního povrchu nanočástic tedy může docházet buď k jejich biodegradaci (např. lipozomy), nebo k destabilizaci a následné destrukci lyzozomu (např. uhlíkové nanotuby [30]) či k transportu ven z buňky (např. polymerní nanočástice [52]) a dalšímu postupu krevním řečištěm.

Nanočástice využitelné pro přenos léků přes HEB

Lipozomy

Lipozomy vznikají z lipidů a fosfolipidů, které se na základě van der Waalsových sil a hydrofobních interakcí za specifických podmí-

proLékaře.cz | 24.4.2024

nek (pH, teplota, polarita média) spontánně uspořádávají do dvojvrstvy [53–55].

Jejich výhoda spočívá v lipidovém materiálu, který je základním stavebním kamenem biologických membrán a je dobře odbouratelný. Nevýhodou těchto struktur je poměrně nízká stabilita, která může být zvýšena zavedením PEG do fosfolipidové dvojvrstvy (obr. 3A) [56]. Lipozomy nesoucí lék proti nádoru a konjugované s protilátkou proti transferinovému receptoru byly schopny prostoupit přes HEB a hromadit se v mozkové tkáni [57].

Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice vznikají z lipidových nanoemulzí se zakomponovanými glyceridy a vosky s vysokou teplotou tání (obr. 3B). Při pokojové teplotě dochází k jejich přechodu z tekutého stavu do pevného. Pro svou přirozenou hydrofobicitu musejí být hydrofilizovány např. PEG, polyvinyl alkoholem či chitozanem, čímž se minimalizuje nespecifická vazba proteinů a snižuje se jejich vychytávání RES.

Mezi výhody tohoto typu nanočástic patří fyzická stabilita a rozpustnost, kapacita pro přenos velkého množství léku a jeho pomalé uvolňování, nízká vazba opsonínů a nízký vliv na tvorbu trombů [58]. Pevné lipidové nanočástice konjugované s antidepresivním lékem venlafaxinem zvyšovaly transport tohoto léku do mozku bez indukce produkce p-glykoproteinu 1, který je odpovědný za intenzivní odstraňování venlafaxinu z mozku [59].

Dendrimery

Dendrimery jsou vysoce větvené polymery, které se připravují postupnou syntézou, při níž se k jádru váží další vrstvy větvených monomerů. Jádro dendrimerů může být tvořeno např. etylendiaminem (PAMAM dendrimery) [60] nebo iontem kovu (Cu^{2+}, Pd^{2+}, Pt^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{3+} nebo Mn^{2+} [61]). Počet vrstev větvených monomerů obalujících jádro se nazývá generace (G0, G1, G2 a vyšší; obr. 3D). Tyto vrstvy jsou zakončeny „koncovou skupinou", kterou může být aminová skupina propůjčující dendrimerům polykationtový náboj (PAMAM dendrimery), karboxylová skupina, peptid (peptidové dendrimery), aj. [62]. Například lék doxorubicin používaný pro léčbu nádorů neprochází přes HEB, protože je exportován z mozku p-glykoproteinem. Pokud byl doxorubicin konjugován s PAMAM dendrimery, zvyšovala se jeho akumulace v mozku až šestkrát (ve srovnání s volným doxorubicinem) [63].

Široké spektrum typů koncových skupin patří mezi největší výhody dendrimerů. Naopak jejich nevýhodou je vyšší toxicita stoupající s počtem vrstev (generací) [64].

Uhlíkové nanotuby

Uhlíkové nanotuby se díky svým výborným elektrickým vlastnostem dají využít v medicíně jako nanosenzory či nanosondy [65–67]. Vznikají z jednovrstevné formy grafitu zvané grafén. Grafénový plát lze srolovat buď v jedné vrstvě za vzniku jednovrstevných nanotub (SWCNT; obr. 3C1), nebo ve více vrstvách, které jsou koncentricky uspořádány jedna do druhé za vzniku mnohovrstevných nanotub (MWCNT; obr. 3C2). Průměr nanotub kolísá od 10 do 100 nm a délka může dosáhnout až několik mikrometrů.

Uhlíkové nanotuby mají tyčinkovitý tvar, na jehož povrchu a dovnitř dutiny lze navázat velké množství molekul léku a transportovat je do mozku [44,68]. Karboxylované MWCNT modifikované PEG s konjugovaným ligandem angiopep-2 pro LRP receptor (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein) dokáží prostoupit HEB a dopravit navázaný lék do cílového místa v mozku [69]. Přes tyto výhody uhlíkových nanotub nejsou stále uspokojivě vyřešeny problémy s jejich možnou toxicitou. Nemodifikované nanotuby mohou na svůj povrch adsorbovat životně důležité enzymy, jako je např. acetylcholinesteráza [68]. Navíc jsou obtížně degradovatelné a jejich hromadění v buňce může vést k jejímu poškození [44,70]. Například u krevních destiček zvyšují MWCNT prostup vápenatých iontů přes plazmatickou membránu a poškozují je [71,72]. Zavedení funkčních skupin, které naruší strukturu nanotub, může přispět k jejich účinnější degradaci vnitrobuněčnými enzymy [43].

Uplatnění nanočástic v léčbě neurodegenerativních onemocnění

Současný stav výzkumu zaměřeného na využití nanočástic pro transport léků přes HEB ukazuje první úspěchy snah o transport nanočástic do cílových míst v mozku. Zhang et al využili tzv. dvojitého značení neboli zavedení dvou peptidů do povrchu polymerních nanočástic. První peptid byl složen ze specifické sekvence aminokyselin zvyšující prostup nanočástic přes HEB. Druhý peptid nesl specifickou sekvenci pro vazbu na $A\beta_{1-42}$ v amyloidových depozitech. Takto připravené nanočástice byly schopny *in vivo* projít přes HEB a vázat se na amyloidové plaky [73]. Nanočástice však nebyly konjugovány s molekulou léku. V tomto případě pak vznikají další možnosti postupu výzkumu. První možností je pro dvojité značení použít nanočástice, které samy dokáží pracovat s patologickou formou abnormálního proteinu. Mezi takové nanočástice patří např. PAMAM a polypropyleniminové (PPI) dendrimery, které umí nejen inhibovat formování struktury beta skládaného listu [74], ale také účinně brání tvorbě fibril vzniklých agregací některých forem alfa-synukleinu, beta-amyloidu a prionového proteinu. Navíc rozrušují již vzniklé amyloidové fibrily [74,75]. Na druhou stranu při rozrušování amyloidových fibril alfa-synukleinu nedocházelo k jejich rozkladu na jednotlivé monomery, ale na jinou formu nerozpustných amorfních agregátů [74]. Podobně by mohly fungovat i uhlíkové nanotuby, neboť bylo ukázáno, že SWCNT na sebe dokáží nabalovat beta skládané listy molekul beta-amyloidu [76].

Druhou možností může být zakomponování molekul léku do vnitřku nanočástice a následné obalení nanočástic receptory pro dvojité značení. K tomuto účelu by mohly být vhodné třeba pevné lipidové nanočástice, ve kterých inkubací s tekutými lipidy vznikají nepřesnosti v krystalové struktuře. Tyto „mezery" lze vyplnit molekulami léku, a zvýšit tak kapacitu nanočástice pro jejich množství. Tekuté lipidy navíc umožňují lepší rozpouštění lipofilních léků než pevné lipidy [58]. Konjugace nanokapsulí s lipidovým jádrem a konjugovaným indometacinem, který snižuje aktivaci mikroglií vzniklou v reakci na poranění (v tomto případě na akumulaci amyloidových depozitů), vedla po aplikaci beta-amyloidu ($A\beta_{1-42}$) do transgenních myší pro AN ke snížení projevů zánětu a snížení aktivace mikroglií [77]. Konjugace SWCNT s acetylcholinem a jejich aplikace do žaludku myší vedla k transportu acetylcholinu do mozku a zvyšovala schopnost myší s AN učit se, a to až na úroveň zdravých jedinců [44].

Nanočástice lze také využít jako přenašeče malých inhibičních RNA schopných blokovat expresi genů zodpovědných za některé z dědičných forem neurodegenerativních onemocnění. Problém malých RNA je nízká účinnost transfekce. Transfekce buněk a následná inhibice genů byla výrazně zvýšena, pokud jsou malé RNA transportovány do buněk prostřednictvím PAMAM dendrimerů [78,79].

Přes tyto povzbudivé výsledky bude zavedení nanočástic do běžné klinické praxe

proLékaře.cz | 24.4.2024

ještě nějakou chvíli trvat, především z důvodu nedořešené otázky jejich možné toxicity. Aplikace nanočástic ve zvířecích modelech byla často spojena s nežádoucími účinky, jako je genotoxicita, poškození plic a kardiovaskulárního systému. Kromě toho zbývá ještě dořešit i technické otázky efektivní konjugace molekul léku s nanočásticemi a zavádění ligandů/receptorů do jejich povrchu [80–82].

Závěr

Současný výzkum v oblasti neurověd přináší řadu nových poznatků o příčinách vzniku neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova, Parkinsonova nebo Creutzfeldtova-Jakobova nemoc. Vzrůstající porozumění mechanizmům patogeneze těchto chorob by mělo vyústit ve vytvoření kauzálních terapeutických přístupů. Nedávné výsledky prokázaly, že transport léků přes HEB za pomocí nanočástic je možný, a to i pro takové léky, které ji za normálních podmínek nejsou schopné překročit. Nanočástice se tak mohou stát klíčovou součástí budoucí účinné terapie. Další výzkum zaměřený na snížení jejich toxicity a snazší biodegradaci by měl vést k jejich brzkému využití v klinické praxi.

Literatura

1. Volles MJ, Lansbury PT jr. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. Biochemistry 2003;42(26):7871–8.

2. Williams TL, Serpell LC. Membrane and surface interactions of Alzheimer's Abeta peptide – insights into the mechanism of cytotoxicity. FEBS J 2011;278(20):3905–17. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08228.x.

3. Halliday M, Mallucci GR. Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: a new approach to therapy. Neuropharmacology 2014;76(A):169–74. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.034.

4. Bustamante HA, Rivera-Dictter A, Cavieres VA, et al. Turnover of C99 is controlled by a crosstalk between ERAD and ubiquitin-independent lysosomal degradation in human neuroglioma cells. PLoS One 2013;8(12):e83096. doi: 10.1371/journal.pone.0083096.

5. Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. Chloroquine-induced endocytic pathway abnormalities: cellular model of GM1 ganglioside-induced Abeta fibrillogenesis in Alzheimer's disease. FEBS Lett 2006;580(30):6972–6.

6. Matej R, Rohan Z, Holada K, et al. The contribution of proteinase-activated receptors to intracellular signaling, transcellular transport and autophagy in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 2015;12(1):2–12.

7. Mao X, Guo Y, Wang C, et al. Binding modes of thioflavin T molecules to prion peptide assemblies identified by using scanning tunneling microscopy. ACS Chem Neurosci 2011;2(6):281–7. doi: 10.1021/cn200006h.

8. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. Cell 2012;148(6):1188–203. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.022.

9. Khurana V, Elson-Schwab I, Fulga TA, et al. Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of tau in vivo. PLoS Genet 2010;6(7):e1001026. doi: 10.1371/journal.pgen.1001026.

10. Armstrong RA, Cairns NJ, Ironside JW, et al. Does the neuropathology of human patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease reflect haematogenous spread of the disease? Neuroscience Letters 2003;348(1):37–40.

11. Korabecny J, Musilek K, Zemek F, et al. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine-new tacrine derivate with cholinergic properties. Bioorg Med Chem Lett 2011;21(21):6563–6. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.08.042.

12. Telting-Diaz M, Lunte CE. Distribution of tacrine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats using in vivo microdialysis sampling. Pharm Res 1993;10(1):44–8.

13. Du F, Qian ZM, Zhu L, et al. L-DOPA neurotoxicity is mediated by up-regulation of DMT1-IRE expression. PLoS One 2009;4(2):e4593. doi: 10.1371/journal.pone.0004593.

14. Carta M, Carlsson T, Kirik D, et al. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. Brain 2007;130(7):1819–33.

15. Reichman WE. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. Ann Gen Hosp Psychiatry 2003;2(1):1.

16. Sharma S, Lohan S, Murthy RS. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery. Drug Dev Ind Pharm 2014;40(7):869–78. doi: 10.3109/03639045.2013.789051.

17. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, et al. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. Nanomedicine 2010;6(1):144–52. doi: 10.1016/j.nano.2009.04.001.

18. Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. Neuron 2010;68(3):409–27. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.043.

19. Nuriya M, Shinotsuka T, Yasui M. Diffusion properties of molecules at the blood-brain interface: potential contributions of astrocyte endfeet to diffusion barrier functions. Cereb Cortex 2013;23(9):2118–26. doi: 10.1093/cercor/bhs198.

20. Saint-Pol J, Vandenhaute E, Boucau MC, et al. Brain pericytes ABCA1 expression mediates cholesterol efflux but not cellular amyloid-beta peptide accumulation. J Alzheimers Dis 2012;30(3):489–503. doi: 10.3233/JAD-2012-112090.

21. Banks WA. Brain meets body: the blood-brain barrier as an endocrine interface. Endocrinology 2012;153(9):4111–9. doi: 10.1210/en.2012-1435.

22. Pardridge WM. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. J Neurochem 1998;70(5):1781–92.

23. Do TM, Ouellet M, Calon F, et al. Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier. Mol Cell Biochem 2011;357(1–2):397–404. doi: 10.1007/s11010-011-0910-6.

24. Loscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. NeuroRx 2005;2(1):86–98.

25. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, et al. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Curr Drug Metab 2010;11(7):603–617.

26. Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, et al. Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 2000;294(1):73–9.

27. Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, et al. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. Mol Endocrinol 2002;16(10):2283–96.

28. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature 2015;523(7560):337–41. doi: 10.1038/nature14432.

29. Vittorio O, Raffa V, Cuschieri A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. Nanomedicine 2009;5(4):424–31. doi: 10.1016/j.nano.2009.02.006.

30. Wang X, Xia T, Duch MC, et al. Pluronic F108 coating decreases the lung fibrosis potential of multiwall carbon nanotubes by reducing lysosomal injury. Nano Lett 2012;12(6):3050–61. doi: 10.1021/nl300895y.

31. Granite M, Radulescu A, Pyckhout-Hintzen W, et al. Interactions between block copolymers and single-walled carbon nanotubes in aqueous solutions: a small-angle neutron scattering study. Langmuir 2011;27(2):751–9. doi: 10.1021/la103096n.

32. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(38):14265–70. doi: 10.1073/pnas.0805135105.

33. De Paoli SH, Diduch LL, Tegegn TZ, et al. The effect of protein corona composition on the interaction of carbon nanotubes with human blood platelets. Biomaterials 2014;35(24):6182–94. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.067.

34. Darabi Sahneh F, Scoglio C, Riviere J. Dynamics of nanoparticle-protein corona complex formation: analytical results from population balance equations. PLoS One 2013;8(5):e64690. doi: 10.1371/journal.pone.0064690.

35. Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. Nat Nanotechnol 2013;8(2):137–43. doi: 10.1038/nnano.2012.237.

36. Sugiyama I, Sadzuka Y. Change in the character of liposomes as a drug carrier by modifying various polyethyleneglycol-lipids. Biol Pharm Bull 2013;36(6):900–6.

37. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. Adv Drug Deliv Rev 2012;64(7):640–65. doi: 10.1016/j.addr.2011.11.010.

38. Pollock S, Antrobus R, Newton L, et al. Uptake and trafficking of liposomes to the endoplasmic reticulum. Faseb Journal 2010;24(6):1866–78. doi: 10.1096/fj.09-145755.

39. Albertazzi L, Serresi M, Albanese A, et al. Dendrimer internalization and intracellular trafficking in living cells. Mol Pharm 2010;7(3):680–8. doi: 10.1021/mp9002464.

40. Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. Pharm Res 2007;24(9):1759–71.

41. Gao JQ, Li Q, Li LM, et al. Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubincin liposomes. Biomaterials 2013;34(22):5628–39.

42. Salvati E, Re F, Sesana S, et al. Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid-beta peptide: the chemical design affects the permeability across an in vitro model. Int J Nanomedicine 2013;8:1749–58. doi: 10.2147/IJN.S42783.

43. Kotchey GP, Hasan SA, Kapralov AA, et al. A natural vanishing act: the enzyme-catalyzed degradation of carbon nanomaterials. Acc Chem Res 2012;45(10):1770–81. doi: 10.1021/ar300106h.

44. Yang Z, Zhang Y, Yang Y, et al. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. Nanomedicine 2010;6(3):427–41.

45. Orecna M, De Paoli SH, Janouskova O, et al. Toxicity of carboxylated carbon nanotubes in endothelial cells is attenuated by stimulation of the autophagic flux with the release of nanomaterial in autophagic vesicles. Nanomedicine 2014;10(5):939–48. doi: 10.1016/j.nano.2014.02.001.

46. Kagan VE, Konduru NV, Feng W, et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase in-

proLékaře.cz | 24.4.2024

duce less pulmonary inflammation. Nat Nanotechnol 2010;5(5):354–9. doi: 10.1038/nnano.2010.44.
47. Sugiyama I, Sadzuka Y. Change in the character of liposomes as a drug carrier by modifying various polyethyleneglycol-lipids. Biol Pharm Bull 2013;36(6):900–6.
48. Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2011;71(1):113–28.
49. Saovapakhiran A, D'Emanuele A, Attwood D, et al. Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization. Bioconjug Chem 2009;20(4):693–701. doi: 10.1021/bc8002343.
50. Li R, Wang X, Ji Z, et al. Surface charge and cellular processing of covalently functionalized multiwall carbon nanotubes determine pulmonary toxicity. ACS Nano 2013;7(3):2352–68. doi: 10.1021/nn305567s.
51. Kanthamneni N, Chaudhary A, Wang J, et al. Nanoparticulate delivery of novel drug combination regimens for the chemoprevention of colon cancer. Int J Oncol 2010;37(1):177–85.
52. He B, Jia Z, Du W, et al. The transport pathways of polymer nanoparticles in MDCK epithelial cells. Biomaterials 2013;34(17):4309–26. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.100.
53. Huang P, Lian F, Wen Y, et al. Prion protein oligomer and its neurotoxicity. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2013;45(6):442–51. doi: 10.1093/abbs/gmt037.
54. Ramos-Cabrer P, Campos F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. Int J Nanomedicine 2013;8:951–60. doi: 10.2147/IJN.S30721.
55. Qiu L, Jing N, Jin Y. Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method. Int J Pharm 2008;361(1–2):56–63. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.010.
56. Loew M, Forsythe JC, McCarley RL. Lipid nature and their influence on opening of redox-active liposomes. Langmuir 2013;29(22):6615–23. doi: 10.1021/la304340e.
57. Huwyler J, Wu D, Pardridge WM. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(24):14164–9.
58. Uner M, Yener G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. Int J Nanomedicine 2007;2(3):289–300.
59. Zhou Y, Zhang G, Rao Z, et al. Increased brain uptake of venlafaxine loaded solid lipid nanoparticles by overcoming the efflux function and expression of P-gp. Arch Pharm Res 2015;38(7):1325–35. doi: 10.1007/s12272-014-0539-6.
60. Perez AP, Romero EL, Morilla MJ. Ethylendiamine core PAMAM dendrimers/siRNA complexes as in vitro silencing agents. Int J Pharm 2009;380(1–2):189–200. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.035.
61. Crooks RM, Zhao M, Sun L, et al. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications to catalysis. Acc Chem Res 2001;34(3):181–90.
62. Chaplot SP, Rupenthal ID. Dendrimers for gene delivery – a potential approach for ocular therapy? J Pharm Pharmacol 2014;66(4):542–56. doi: 10.1111/jphp.12104.
63. Cui DM, Xu QW, Gu SX, et al. PAMAM-drug complex for delivering anticancer drug across blood-brain barrier in vitro and in vivo. Afr J Pharm Pharmacol 2009;3(5):227–33.
64. El-Sayed M, Ginski M, Rhodes C, et al. Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. J Control Release 2002;81(3):355–65.
65. Kim JH, Patra CR, Arkalgud JR, et al. Single-molecule detection of H(2)O(2) mediating angiogenic redox signaling on fluorescent single-walled carbon nanotube array. ACS Nano 2011;5(10):7848–57. doi: 10.1021/nn201904t.
66. Ou Z, Wu B. A novel nanoprobe based on single-walled carbon nanotubes/photosensitizer for cancer cell imaging and therapy. J Nanosci Nanotechnol 2013;13(2):1212–6.
67. Shirsat MD, Sarkar T, Kakoullis J jr, et al. Porphyrins-functionalized single-walled carbon nanotubes chemiresistive sensor arrays for VOCs. J Phys Chem C Nanomater Interfaces 2012;116(5):3845–50.
68. Cui T, Zhang L, Wang XZ, et al. Uncovering new signaling proteins and potential drug targets through the interactome analysis of Mycobacterium tuberculosis. Bmc Genomics 2009;10:118. doi: 10.1186/1471-2164-10-118.
69. Ren J, Shen S, Wang D, et al. The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angiopep-2. Biomaterials 2012;33(11): 3324–33. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.025.
70. Nagai H, Okazaki Y, Chew SH et al. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108(49):E1330–8. doi: 10.1073/pnas.1110013108.
71. Semberova J, Lacerda SH, Simakova O, et al. Carbon nanotubes activate blood platelets by inducing extracellular Ca2+ influx sensitive to calcium entry inhibitors. Nano Lett 2009;9(9):3312–7. doi: 10.1021/nl901603k.
72. Lacerda SH, Semberova J, Holada K, et al. Carbon nanotubes activate store-operated calcium entry in human blood platelets. ACS Nano 2011;5(7):5808–13. doi: 10.1021/nn2015369.
73. Zhang C, Wan X, Zheng X, et al. Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. Biomaterials 2014;35(1):456–65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.063.
74. Rekas A, Lo V, Gadd GE, et al. PAMAM dendrimers as potential agents against fibrillation of alpha-synuclein, a Parkinson's disease-related protein. Macromol Biosci 2009;9(3):230–8. doi: 10.1002/mabi.200800242.
75. Klajnert B, Cangiotti M, Calici S, et al. EPR study of the interactions between dendrimers and peptides involved in Alzheimer's and prion diseases. Macromol Biosci 2007;7(8):1065–74.
76. Fu Z, Luo Y, Derreumaux P, et al. Induced beta-barrel formation of the Alzheimer's Abeta25-35 oligomers on carbon nanotube surfaces: implication for amyloid fibril inhibition. Biophys J 2009;97(6):1795–803. doi: 10.1016/j.bpj.2009.07.014.
77. Bernardi A, Frozza RL, Meneghetti A, et al. Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules reduce the damage triggered by Abeta1-42 in Alzheimer's disease models. Int J Nanomedicine 2012;7:4927–42. doi: 10.2147/IJN.S35333.
78. Nam HY, Nam K, Hahn HJ, et al. Biodegradable PAMAM ester for enhanced transfection efficiency with low cytotoxicity. Biomaterials 2009;30(4):665–73. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.013.
79. Kim TI, Baek JU, Zhe Bai C, et al. Arginine-conjugated polypropylenimine dendrimer as a non-toxic and efficient gene delivery carrier. Biomaterials 2007;28(11):2061–7.
80. Park K. Facing the truth about nanotechnology in drug delivery. Acs Nano 2013;7(9):7442–7. doi: 10.1021/nn404501g.
81. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. Int J Nanomedicine 2008;3(2):133–49.
82. Araujo F, Shrestha N, Granja PL, et al. Safety and toxicity concerns of orally delivered nanoparticles as drug carriers. Expert Opin Drug MetabToxicol 2015;11(3):381–93. doi: 10.1517/17425255.2015.992781.