

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

ANETA PEŠKOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Nanočástice v léčbě neurodegenerativních onemocnění

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Aneta Pešková**
Osobní číslo: **C17201**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Nanočástice v léčbě neurodegenerativních onemocnění**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Charakteristiku, etiologii a patogenezí základních neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, frontotemporální lobární degenerace, prionová onemocnění atd.).
2. Možnosti ovlivnění výše uvedených onemocnění pomocí nanočástic. Prostup nanočástic přes hematoencefalickou bariéru. Typy nanočástic využitelných v léčbě neurodegenerativních onemocnění.
3. Zhodnocení terapeutického potenciálu nanočástic v léčbě neurodegenerativních onemocnění.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Nanočástice v léčbě neurodegenerativních onemocnění jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16. 6. 2021

Aneta Pešková

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce panu RNDr. Karlovi Královcovi, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky k této práci. Dále také za trpělivost a vstřícnost, které se mi od něj během zpracování mé bakalářské práce dostalo. Děkuji také své rodině a přátelům za jejich podporu během mého studia.

ANOTACE:

Tématem bakalářské práce jsou nanočástice v léčbě neurodegenerativních onemocnění a je rozdělena do tří hlavních kapitol. První kapitola se zabývá charakteristikou a etiopatogenezí Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, frontotemporální lobární degenerace a prionových onemocnění. Ve druhé kapitole jsou popsány různé typy nanočástic využitelných v léčbě neurodegenerativních onemocnění a možnosti ovlivnění jednotlivých onemocnění pomocí nanočástic. Část této kapitoly je věnována také popisu prostupnosti nanočástic přes hematoencefalickou bariéru. Poslední kapitola se zabývá zhodnocením terapeutického potenciálu nanočástic v léčbě neurodegenerativních onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA:

neurodegenerativní onemocnění, nanočástice, léčba, hematoencefalická bariéra

TITLE:

Nanoparticles in Treatment of Neurodegenerative Disease

ANNOTATION:

The topic of the bachelor thesis is Nanoparticles in Treatment of Neurodegenerative Disease and it is divided into three main chapters. The first chapter deals with the characteristics and etiopathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, frontotemporal lobar degeneration and prion diseases. The second chapter describes various types of nanoparticles useful in the treatment of neurodegenerative diseases and the possibilities of influencing individual diseases by using nanoparticles. A part of this chapter is also devoted to description of penetration of nanoparticles across the blood-brain barrier. The last chapter deals with the evaluation of the therapeutic potential of nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases.

KEYWORDS:

neurodegenerative diseases, nanoparticles, treatment, blood-brain barrier

Obsah

1. ÚVOD.....	10
2. NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ	11
1.1 Alzheimerova choroba	12
1.1.1 Charakteristika	12
1.1.2 Etiopatogeneze.....	12
1.2 Parkinsonova choroba	15
1.2.1 Charakteristika	15
1.2.2 Etiopatogeneze.....	16
1.3 Frontotemporální lobární degenerace	17
1.3.1 Charakteristika	17
1.3.2 Etiopatogeneze.....	17
1.4 Prionová onemocnění.....	18
1.4.1 Charakteristika	18
1.4.2 Etiopatogeneze.....	19
3. NANOČÁSTICE	22
1.5 Typy nanočástic	23
1.5.1 Kovové nanočástice	23
1.5.2 Kvantové tečky (QD).....	24
1.5.3 Nanočástice oxidu křemičitého.....	25
1.5.4 Nanočástice na bázi lipidů	25
1.5.5 Polymerní nanočástice	27
1.5.6 Další slibné nanomateriály.....	31
1.6 Prostup nanočástic přes hematoencefalickou bariéru	33
1.7 Možnosti ovlivnění jednotlivých onemocnění pomocí nanočástic	35
1.7.1 Alzheimerova choroba.....	35
1.7.2 Parkinsonova choroba.....	42
1.7.3 Frontotemporální lobární degenerace	44
1.7.4 Prionová onemocnění	46
4. TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL NANOČÁSTIC V LÉČBĚ NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	48
5. ZÁVĚR	49
6. POUŽITÁ LITERATURA	50

Seznam zkratek

APOE	apolipoprotein E
APP	amyloid prekurzor protein
MPTP	metyl-fenyl-tetra-hydropyridin
TSE	transmisivní spongioformní encefalopatie
PrP	prionový protein
PrP ^c	celulární prionový protein
PrP ^{Sc}	patologicky změněný prionový protein (scrapie – klusavka)
CJN	Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
AuNP	zlaté nanočástice
AgNP	stříbrné nanočástice
ROS	reaktivní formy kyslíku
QD	kvantové tečky (quantum dots)
MSC	mezenchymální kmenové buňky
HSC	hematopoetické kmenové buňky
PLA	poly (kyselina mléčná)
PLGA	poly (D,L – kyselina mléčná – glykolová)
PGA	poly (kyselina glykolová)
PACA	poly (akrylkyanoakrylát)
PBCA	poly (butylkyanoakrylát)
PCL	poly (ϵ -kaprolakton)
PEG	polyethylenglykol
NLC	nanostrukturované lipidové nosiče
SLN	pevné lipidové nanočástice
epSPC	ependymální kmenové progenitorové buňky

1. ÚVOD

Bakalářská práce se zabývá nanočásticemi a jejich využitím v léčbě neurodegenerativních onemocnění. Konkrétně se zaměřuje na Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, frontotemporální lobární degenerace a prionová onemocnění. Neurodegenerativní onemocnění postihuje čím dál více lidí a pravděpodobnost propuknutí některého z těchto onemocnění s věkem roste. Výrazným problémem je fakt, že není možné tyto chorobné stavy nijak vyléčit. Pacientům trpících určitou formou neurodegenerativního onemocnění je situace ulehčována pouze léčbou symptomatickou, kterou doprovází velké množství vedlejších účinků. Jedním z důvodů obtížné terapie těchto onemocnění je omezená propustnost terapeutik přes hematoencefalickou bariéru.

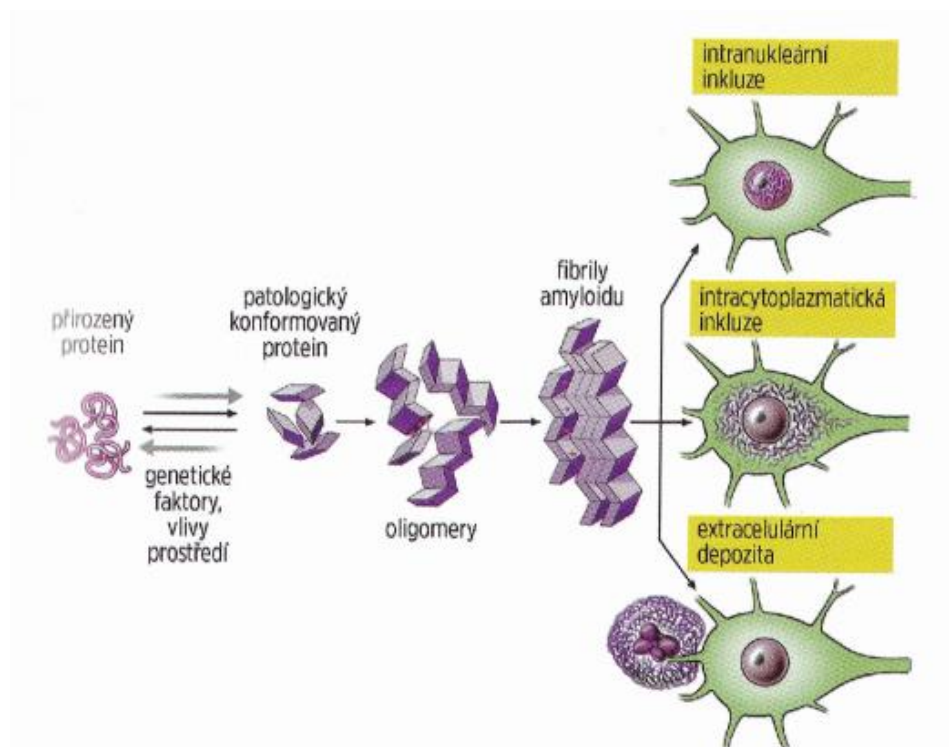
Nanočástice, které se vyznačují malou velikostí a specifickými vlastnostmi, tak představují inovativní způsob dopravy terapeutických látek přes hematoencefalickou bariéru. Mimo to dokážou také zvýšit účinnost léčiva a snížit jeho nežádoucí účinky.

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o neurodegenerativních onemocněních a zároveň podat přehled o možnostech terapeutického ovlivnění těchto onemocnění pomocí jednotlivých typů nanočástic.

2. NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

Neurodegenerativní onemocnění jsou patologické stavy, kdy dochází k poškození a následnému zániku specifických skupin neuronů. V současné době je nám známa celá řada těchto degenerací a jejich klinický obraz se liší v závislosti na selektivním postižení určité subpopulace neuronů. Patofyziologickou podstatou všech neurodegenerativních onemocnění je proteinopatie. Jedná se o ukládání specifického proteinu (charakteristického pro daný typ onemocnění) v mozkové tkáni v kombinaci s buněčnou smrtí (apoptózou). Dalším patogenetickým vlivem, způsobující neurodegeneraci, je produkce volných kyslíkových radikálů. Významnou roli zde hraje také genetická predispozice. Tyto čtyři faktory se uplatňují v různém podílu u všech neurodegenerativních onemocnění [1].

Stávající léčba se zakládá na zlepšení příznaků těchto onemocnění a tím ulehčit jejich průběh, ale není schopna je vyléčit. Největší překážkou, se kterou se léčiva setkávají je selektivita hematoencefalické bariéry, která výrazně omezuje počet terapeutických látek schopných dostat se do mozku, aby vyvolaly pozitivní účinek [2].



Obr. 1: Princip neurodegenerací: konformační změnou přirozeného proteinu vznikají fibrily amyloidogenního peptidu, ten následně vytváří depozita extracelulární nebo intracelulární, a to buď v cytoplasmě, či uvnitř jádra [1].

1.1 Alzheimerova choroba

1.1.1 Charakteristika

Jedná se o degenerativní onemocnění mozku, kdy dochází k odumírání neuronů a tím k rozvoji demence. Alzheimerova choroba je nejčastějším typem demence. Pod pojmem „demence“ rozumíme typ postižení, u kterého dochází k narušení všech kognitivních funkcí (paměti, řečových schopností, přemýšlení, samostatného rozhodování, pozornosti, prostorové orientace, aj.). Prvotním znakem Alzheimerovy choroby je ztráta paměti. Následně se rozvíjí poruchy další až nakonec postihne všechny z kognitivních funkcí [1, 3, 4].

Existují dvě formy Alzheimerovy choroby a to familiární (vrozená) a sporadická. Většina případů Alzheimerovy choroby je sporadických. Nejdůležitějším genetickým faktorem pro rozvoj Alzheimerova onemocnění je forma apolipoproteinu E (APOE). Autosomálně dominantní dědičnost má zhruba jen 1% případů. V současné době je léčba pouze symptomatická (inhibitory acetylcholinesterázy, memantin), která je schopna v určité míře život prodloužit, ale přesto toto onemocnění končí smrtí [1].

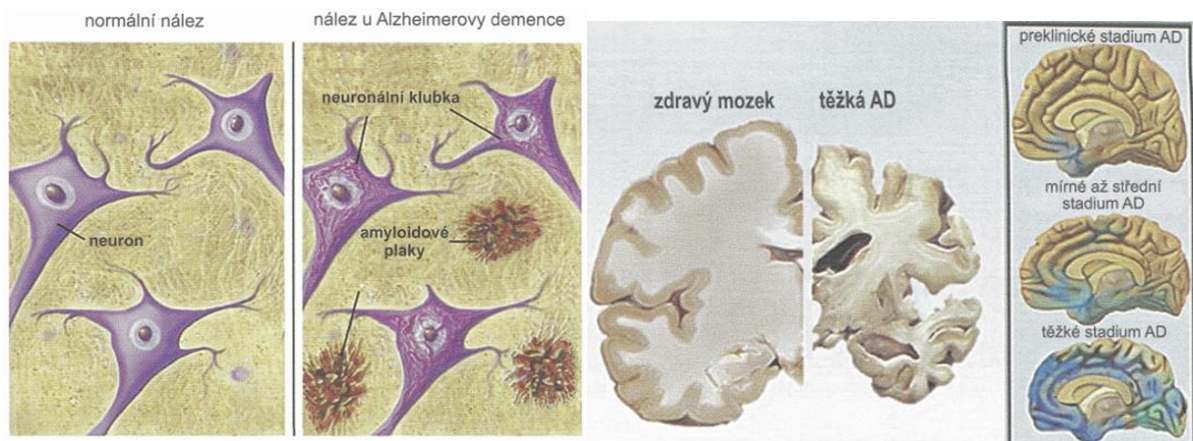
1.1.2 Etiopatogeneze

Vývoj Alzheimerovy choroby je velmi pozvolný a dlouhý. Ke změnám v mozku dochází mnoho let před projevením prvních symptomů. Před rozvojem demence může být diagnostikována tzv. mírná kognitivní porucha, kdy má dotyčný problémy s pamětí (vzhledem ke svým vrstevníkům), ale zatím se u něj nerozvinuly další příznaky. Následně se tato mírná kognitivní porucha vyvine v demenci [1, 3]. Přesná příčina vzniku Alzheimerovy choroby není doposud zcela objasněna, ale je známo několik hypotéz možné příčiny.

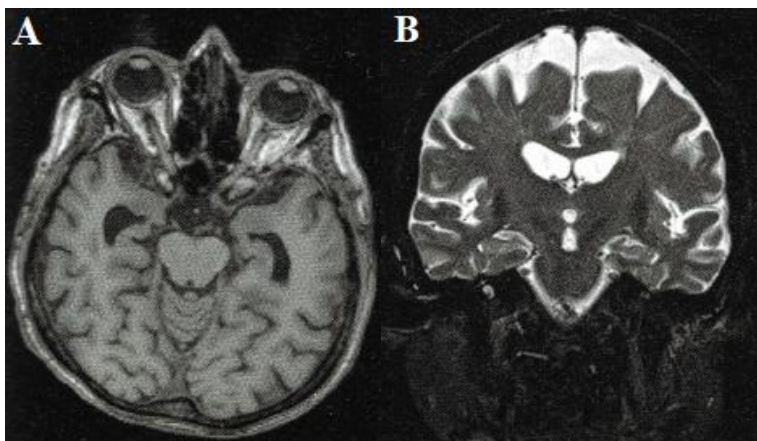
Amyloidová teorie vzniku Alzheimerovy choroby se zakládá na myšlence, že mimobuněčné amyloidové plaky jsou pro buňky toxické, a proto dochází k jejich odumírání [1, 5]. Nicméně byla vyvinuta protilátka, která pomáhá plaky odstraňovat z mozku, ale neměla žádný významný efekt na léčbu demence. Neboť vykazuje příznivé účinky pouze v prevenci vzniku amyloidních plaků, ale nikoliv jejich odstranění [6, 7]. Následující teorie zvažuje, že jsou pro buňky toxická jednotlivá vlákna amyloidu beta a ne amyloidní plaky jako takové [8]. Tau hypotéza vychází z hyperfosforylace proteinu tau, který se shromažďuje uvnitř buněk volně, aniž by se vázal k mikrotubulům, čímž zapříčiní jejich rozpad a následné odumírání buněk [1, 5].

Dalším iniciátorem vzniku Alzheimerovy choroby je tzv. oxidační stres. Oxidačním stresem se nazývá stav, kdy je narušena rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty za vzniku volných radikálů. Tyto volné radikály jsou schopny napadat a vázat se na různé makromolekuly, což může vést k poškození buněk a tkání. Alzheimerova choroba je jedna ze spousta onemocnění, která doprovází nadprodukce volných radikálů a může zde docházet k poškození funkce neuronů [5]. Existují dva hlavní typy volných radikálů: reaktivní formy kyslíku a reaktivní formy dusíku. Mezi reaktivní formy kyslíku patří například peroxidy, superoxid, hydroxylový radikál a singletový kyslík. Reaktivní formy kyslíku i dusíku se produkují v mozku v důsledku vystavení faktorům prostředí, jako je elektromagnetické záření či znečištění ovzduší průmyslovými prvky. Tyto vnější vlivy prostředí mohou vyvolat nadměrnou produkci reaktivních forem kyslíku a tím dojde k oxidačnímu stresu. Mohou urychlit progresi neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba, amyloidní laterální skleróza a Parkinsonova choroba, která je popsána podrobněji v následující podkapitole. Pokud výše reaktivních forem kyslíku není korigována antioxidanty, způsobuje významné reverzibilní, ale i nevratné poškození biologických molekul, včetně nukleových kyselin, lipidů a proteinů. Mezi další teorie příčiny vzniku Alzheimerovy choroby se mimo výše popsané řadí změny cholinergní neurotransmise, znečištění životního prostředí, genetické faktory, včetně mutací prekurzorového proteinu amyloidu a presenilinu, dysfunkce imunitního systému a další [9].

Alzheimerova choroba začíná ve spánkovém laloku, což má za následek prvotně postižení paměti na nedávné události [1, 3]. Velikost hipokampu a rychlost jeho zmenšování je adekvátním diagnostickým znakem. Následně se degenerace šíří do temenního a čelního laloku a ostatních částí mozku. U pacientů s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou se hodnotí míra atrofie, vlivem odumírání buněk, pomocí zobrazovacích metod. V mozku nemocných jedinců se nachází patologické útvary dvou druhů – amyloidní plaky (mimobuněčné shluky amyloidu beta) a neurofibrilární klubka (vnitrobuněčné agregáty proteinu tau) [1, 5].

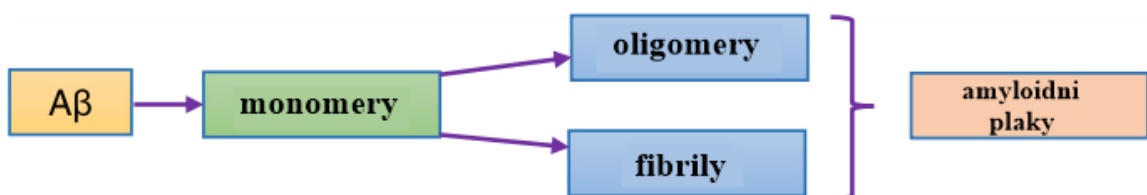


Obr. 2: Fyziologický stav neuronů a nálezn neuronálních klubek a amyloidových plaků u Alzheimerovy demence (vlevo) a nálezn na stav mozku zdravého jedince a jedince trpící Alzheimerovou chorobou od preklinického až po těžké stádium tohoto onemocnění (vpravo) [10].

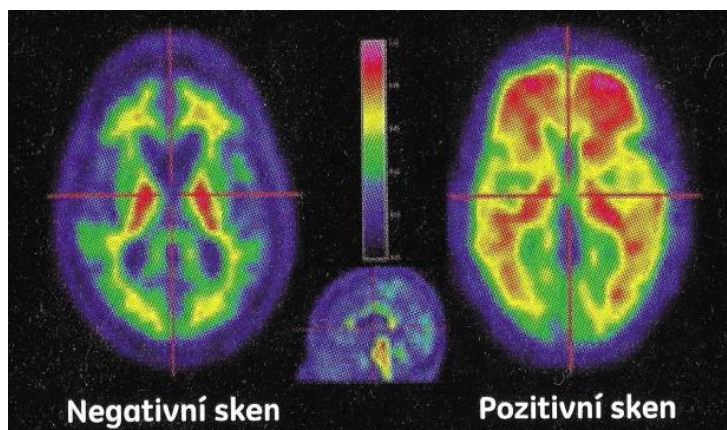


Obr. 3: A: Atrofie hypokampů, entorhinální kůry a temporálních pórů, B: pokročilá atrofie hypokampální a parientální části mozku [1].

Amyloid beta vzniká štěpením amyloid precursor proteinu (APP). V případě špatného štěpení vznikne jiná konformace amyloidu beta (β skládaný list) – vytvoření amyloidních plaků. Dále je amyloid beta štěpen APOE. Ke vzniku takových plaků dochází zřejmě z důvodu špatného štěpení APP, nebo se málo odbourává štěpením APOE. Změna konformace na β skládaný list může být potencována oxidačním stresem [1, 5].

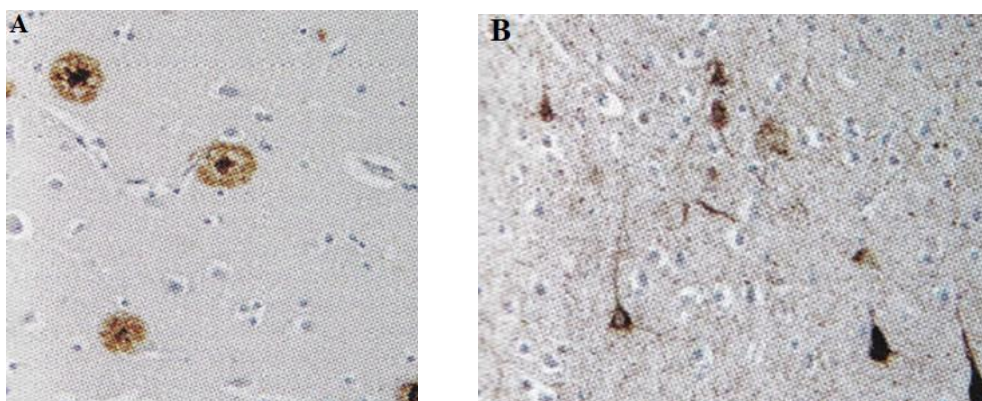


Obr. 4: Formace amyloidních plaků z amyloidu β [11].



Obr. 5: Barevný průkaz amyloidních plaků [1].

Neurofibrilární klubka jsou vnitrobuněčné shluky hyperfosforylovaného proteinu tau. Fyziologicky fosforylovaný protein tau slouží v buňce např. k aktivaci určitých enzymů, ale při mutaci proteinu tau dojde k jeho zvýšené fosforylaci a přestane se vázat k mikrotubulům, uvolní se a tvoří neurofibrilární klubka. Vedlejším efektem je rozpad mikrotubulů. Buňky ztrácí vlastní kostru a schopnost transportu látek uvnitř buňky – buněčná smrt [1, 5].



Obr. 6: A: Imunohistochemická reakce amyloidních plaků s protilátkou proti beta amyloidu v temporální kůře, B: Imunohistochemický průkaz neurofibrilárních klubek a jiných depozit hyperfosforylovaného proteinu tau [1].

1.2 Parkinsonova choroba

1.2.1 Charakteristika

Parkinsonova choroba je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění [12]. Dochází k zániku neuronů, konkrétně struktur substantia nigra nacházející se v mozkovém kmeni ve středním mozku. Poškození těchto struktur vede k nedostatku dopaminu

(neurotransmitter zodpovědný za přenos signálů mezi neurony). Projevuje se charakteristickou pohybovou poruchou, tzv. parkinsonským syndromem, který má tři zásadní projevy: akinezi, rigiditu (svalová ztuhlost) a třes. Těmto motorickým postižením mohou předcházet non-motorické projevy (porucha chování v REM spánku, ztráta čichu, deprese) [1, 12].

Onemocnění je ve valné většině sporadické. Léčba je pouze substituční – náhrada chybějícího dopaminu, a to buď podáním prekurzoru dopaminu (levodopa), nebo léků ze skupiny dopaminových agonistů [1, 13]. Podáváním substitučních léčiv a správnou rehabilitací lze zpomalit rozvoj Parkinsonovy choroby, ne ji však vyléčit [12].

1.2.2 Etiopatogeneze

Příčina zániku dopaminergních neuronů a tím vzniku Parkinsonovy choroby není doposud zcela jasná. Hovoříme tedy opět o hypotézách o faktorech, které by mohly vést k zániku těchto buněk [13]. Z největší části lze poškození dopaminergních neuronů přisuzovat oxidativnímu stresu stejně, jako v případě Alzheimerovy choroby. Dochází k nadměrnému hromadění volných radikálů. Ať už jejich nadprodukcí, či jejich nedostatečným odstraňováním a tyto volné radikály jsou pro buňky nebezpečné [5, 13].

Dalšími faktory pro potenciální vznik Parkinsonovy choroby jsou dědičnost, vliv prostředí a jejich součinnost. Za vlivy prostředí považujeme některé neurotoxické látky, např. metyl-fenyl-tetra-hydropyridin (MPTP), paraquat, rotenon aj [1, 13]. Hlavním znakem Parkinsonovy choroby je atrofie neuronových struktur v dopaminergním systému a tvorba Lewyho tělísek v regredujících neuronech [1].



Obr. 7: A: Makroskopický nález s pigmentací substantia nigra u zdravého jedince, B: pokročilé onemocnění – výrazná atrofie. Imunohistochemický průkaz Lewyho tělísek v substantia nigra vpravo [1].

1.3 Frontotemporální lobární degenerace

1.3.1 Charakteristika

Frontotemporální lobární degenerace postihuje frontální a temporální laloky mozku. Často dochází i k poškození parientální kůry a bazálních ganglií. Podkladem frontotemporální lobární degenerace je porucha metabolismu některých zásadních proteinů, které svou interakcí s neurony vedou k jejich apoptóze [1]. Klinicky můžeme frontotemporální lobární degenerace rozdělit na tyto skupiny:

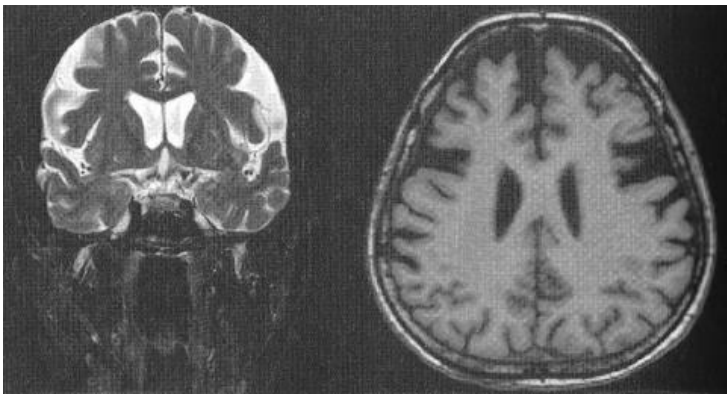
- Behaviorální varianta frontotemporální demence
- Primární progresivní afázie
- Kombinace demence a poruch hybnosti:
 - Kortikobazální degenerace
 - Supranukleární obrna
 - Amyotrofická laterální skleróza s demencí
- Nové neurodegenerace ze spektra frontotemporálních lobárních degenerací
 - Věkově vázaná tautopatie
 - Věkově vázaná astrogliopatie s depozity tau
 - Globulární gliové tautopatie
 - Chronická traumatická encefalopatie
 - Věkově vázaná limbická TDP-43 proteinopatie

Etiopatogeneticky lze frontotemporální lobární degenerace dělit na dvě skupiny: tautopatie a non-tau frontotemporální lobární degenerace.

1.3.2 Etiopatogeneze

Tauopatie je způsobená nefyziologickým metabolismem tau proteinů a jeho ukládáním v neuronech. Za fyziologického stavu se protein tau nachází v mozku v šesti izoformách kódovaných genem MAPT na 17. chromozomu. Patologicky dochází k hyperfosforylaci tohoto proteinu, což vede k tvorbě proteinových agregátů ve formě inkluzí a následné apoptóze neuronu. Non-tau frontotemporální lobární degenerace, jak už sám název vypovídá, je skupina degenerací bez přítomnosti agregátů proteinu tau. Příčinou jsou patologická inkluze obsahující depozita různých bílkovin [1].

Patologie frontotemporálních lobárních degenerací se skládá ze dvou hlavních patologických charakteristických markerů: inkluze hyperfosforylovaného tau proteinu v neuronech a gliových buňkách a inkluze obsahující transaktivní odpověď DNA vazebný protein 43 (TDP-43) [14]. Vyšetření mozku pacienta s frontotemporální lobární degenerací, pomocí zobrazovacích metod, obvykle vykazuje symetrickou fokální atrofii čelních nebo temporálních laloků, popřípadě atrofii obou částí. Makroskopická atrofie bazálních ganglií a ztráta pigmentace ze substantia nigra jsou pozorovány jen v některých případech [15].



Obr. 8: Atrofie obou frontálních laloků [1].

1.4 Prionová onemocnění

1.4.1 Charakteristika

Prionová onemocnění, jinými slovy transmisivní spongioformní encefalopatie (TSE), jsou poměrně vzácná neurodegenerativní onemocnění. Pojem „prion“ se rozumí malá bílkovinná infekční částice. Priony jsou tvořeny molekulou prionového proteinu (PrP) bez obsahu nukleové kyseliny. PrP^c je celulární prionový protein, který se fyziologicky nachází v mnoha tkáních u všech savců a je kódován prionovým genem PRNP. Funkce tohoto prionu však nebyla zcela objasněna, nicméně jeho posttranslační modifikací vzniká prostorově změněná molekula PrP^{Sc}, která se kumuluje v mozku [16, 17].

Nejběžněji se vyskytující formou TSE je Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN), kterou lze dále rozdělit na tři typy podle příčiny vzniku: sporadická, familiární a iatrogenní. Mezi familiární řadíme také Gerstmannův-Strausslerův-Scheinkerův syndrom a fatální familiární insomnie. Ačkoliv se klinické a patologické nálezy u těchto typů prionových

onemocnění překrývají, tak jejich rozpoznání může být užitečné při poskytování informací o očekávaném klinickém průběhu postiženému jedinci a jeho rodině. Mezi TSE patří také onemocnění kuru. Ve Velké Británii popsali novou variantu Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci (vCJN) [1, 18].

1.4.2 Etiopatogeneze

TSE je způsobená hromaděním patologicky změněného prionového proteinu (PrP^{Sc}) v mozkové tkáni vedoucí k zániku neuronů. PrP^{Sc} je abnormálně nefyziologicky poskládaná izoforma nativního prionového proteinu PrP^c. Mechanismus pro spuštění této formační změny není znám, ale jeho hromadění vede k neuronální degeneraci, astrocytární glióze a spongiformní změně, které vedou k fatální neurologické poruše [17, 19]. Genetické formy TSE jsou zapříčiněny mutací genu PRNP na 20. chromozomu. Při prionových onemocněních dochází k patologickým změnám jako je spongiformní dystrofie, numerická atrofie neuronů a sekundární reaktivní izomorfní astroglióza. Podkladem diagnózy je tedy neurohistologické vyšetření mozkové tkáně. Imunohistochemie a metoda Western blot nám ověří přítomnost prionů ve tkáni. Případně je možnost využití molekulárně genetické analýzy [1].

Sporadická Creutzfeldtova-Jakobova nemoc

Jedná se obecně o nejčastější formu TSE. Predispozicí pro vznik tohoto onemocnění je polymorfismus kodonu 129 prionového genu PRNP. U sporadické formy CJN se spongiformní dystrofie vyznačuje přítomností vakuol ve všech korových vrstvách neuropilu. Imunohistochemické vyšetření je založeno na principu využití protilátek dokazujících výskyt PrP^{Sc} [1].

Familiární (genetická) Creutzfeldtova-Jakobova nemoc

V České republice se jedná nejčastěji o mutaci E200K. Rozšířená je také mutace D178N v kombinaci s valinem na kodonu 129 [1].

Iatrogenní Creutzfeldtova-Jakobova nemoc

Iatrogenní, neboli náhodně přenesená CJN. K tomuto přenosu dochází lékařským zákrokem, konkrétně invazivním neurochirurgickým výkonem. Byl zaznamenán přenos např.

po transplantaci tvrdé pleny mozkové, rohovky, kontaminovaným durálním štěpem, krevní transfuzí a v neposlední řadě prostou nedostatečnou sterilizací chirurgických nástrojů. Tyto získané prionové nemoci jsou v současnosti méně časté, protože povědomí o riziku jejich přenosu přirozeně vedlo ke snaze takovým událostem zabránit [1, 20].

Gerstmann-Straussler-Scheinkerův syndrom

Ke vzniku Gerstmann-Straussler-Scheinkerova syndromu vede patogenní mutace v proteinu genu a je doprovázen agregáty chybně strukturovaných PrP se zvláštními biochemickými vlastnostmi. Gerstmann-Straussler-Scheinkerův syndrom je autozomálně dominantní porucha, kdy dochází k mutaci na kodonu 102 genu PRNP, což má za následek změnu aminokyseliny z prolinu na leucin (P102L). Takový typ mutace je pro toto onemocnění nejcharakterističtější, ale později bylo spojeno i s několika vzácnějšími mutacemi PrP v jiných kodonech [1, 20].

Fatální familiární insomnie

K fatální familiární insomnii dochází mutací D178N v kombinaci s methioninem na kodonu 129 [1, 21].

Kuru

Kuru je prvním lidským prionovým onemocněním. Dnes je to již historické onemocnění, které se vyskytovalo jako důsledek kanibalismu, ale má stále dopady na mnoho aspektů výzkumů neurodegenerace. Objev Kuru otevřel nové pohledy na humánní medicínu a byl klíčový v následném přenosu Creutzfeldt – Jakobovy choroby, která byla označena jako možný analog kuru na základě nespecifických neuropatologických nálezů [1, 22].

Nová varianta Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci

Původce nové varianty Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci je prakticky totožný s kmenem prionu bovinní spongiformní encefalopatie. Ke vzniku tohoto onemocnění u člověka dochází zřejmě alimentární cestou skrz maso hovězího dobytka, který byl nakažen bovinní spongiformní encefalopatií. V 90. letech byla varianta CJD identifikována jako jediná prionová choroba člověka s potvrzeným zoonotickým původem. U nové varianty vCJD je základním diagnostickým znakem velký počet floridních plaků v kůře mozku a mozečku a

pokročilá spongioformní dystrofie. Samozřejmě je zde i značný úbytek neuronů. K astroglióze dochází především v talamu, kůře mozku a mozečku. Imunohistochemicky jsme schopni prokázat perineuronální a axonální depozita ve striatu a shluky depozit PrP^{Sc} [1, 18].

3. NANOČÁSTICE

Nanotechnologie je rychle se rozvíjející oblast, která studuje a vyvíjí materiály s povrchovou strukturou a zvláštními chemickými a fyzikálními vlastnostmi v rozměru nanometru. Základní definicí se tedy vzhledem k samotnému názvu „nanočástice“ nabízí velikost těchto částic, která má být $\leq 100\text{nm}$. Některé nanočástice jsou však větší než 100nm , ale menší než 1000nm , a přesto jsou nazývány nanočásticemi. Zde hrají roli jejich zvláštní vlastnosti. Tyto zvláštní vlastnosti můžeme chápat například jako kombinaci určitých vlastností, které se za jiných okolností a při použití jiných materiálů vzájemně vylučují [23].

Většina nanočástic je velmi malých rozměrů na to, aby je bylo možné vidět pouhým okem, a dokonce je nezpozorujeme ani běžnými laboratorními mikroskopy. Nanočástice můžeme získat z přírodních zdrojů, ale je možné je vytvořit i synteticky. Na základě chemického složení je lze rozdělit do dvou skupin: organické materiály, kterými jsou lipozomy, dendrimery, uhlíkové nanotrubičky, emulze a další polymery a anorganické materiály, do kterých spadají kovy. Nanočástice je možné syntetizovat jak v různých velikostech, tak v různých tvarech [24].

Během posledních let bylo prokázáno, že nanočástice nabývají velkého potenciálu v lékařských aplikacích. Nanotechnologie může nabídnout inovativní metody vedoucí ke zvýšení účinnosti léčiv. Aplikace konvenčních terapeutických látek má jistá omezení, jako je neselektivita, nízká účinnost, špatná biodistribuce a nežádoucí vedlejší účinky. Nanočástice disponují multifunkčními vlastnostmi. Komponování terapeutických látek do nanostruktur může zpřesnit buněčné cílení a umožní podávání nižších terapeutických dávek a tím snížení nežádoucích účinků. Jedním z hlavních užitečných vlastností nanočástic je tedy jejich přesné zaměření, biokompatibilita a biologická dostupnost. Pochopením vlastností nanočástic a jejich interakcí s biologickým prostředím nám do budoucna umožní nové strategie léčby, prevence a diagnostiky mnoha nemocí, zejména těch neléčitelných, jako jsou neurodegenerativní onemocnění [24, 25, 26].

Podstatou využití nanočástic u neurodegenerativních onemocnění je usnadnění prostupu léčiva přes hematoencefalickou bariéru [27]. Potenciálem jejich aplikace je i podpora a aktivace diferenciaci neuronových buněk, či zvrácení neurologického poškození. Navzdory terapeutickému potenciálu nanočástic se ale také hovoří o jejich cytotoxicitě. Existují nanočástice, které mají inhibiční účinky na neurony. Mají tedy zcela opačný účinek. Nepodporují diferenciaci neuronů, ale způsobují jejich poškození. Důležitým faktorem je jak typ nanočástice, tak jejich velikost a tvar [24].

1.5 Typy nanočástic

Existují různé typy nanotechnologických materiálů, jako jsou nanočástice, nanovlákná, nanotrubice a nanogely. Liší se velikostí, vlastnostmi a funkcemi. Nanočástice jsou jednou z nejvýhodnějších struktur z důvodu malých rozměrů, obrovskému povrchu a poměru povrch-objem [28, 29]. Hlavní kategorie nanočástic, které je možné využít u neurodegenerativních onemocnění:

1.5.1 Kovové nanočástice

Kovové nanočástice mají schopnost projít přes hematoencefalickou bariéru. To může být využito pro dodání léčiva do CNS, jelikož kovové nanočástice mohou být potaženy různými ligandy, protilátky, či proteiny. Kovové nanočástice mají také potenciál při diagnostice onemocnění, kdy by mohly být využity jako zobrazovací činidla. Jejich syntézou jsme schopni ovlivnit funkci těchto nanočástic modulováním tvaru, velikosti, povrchového pokrytí a stability [29, 30].

Zlaté nanočástice (AuNP)

Zlaté nanočástice jsou momentálně jednou z největších nadějí pro zobrazování a léčbu CNS. Zlaté jádro, mající plasmonické vlastnosti, je ideální pro zobrazovací techniky. Zlato má povrchovou plasmonovou rezonanci, což je rezonance elektronů indukovaná elektromagnetickou vlnou, která je vytvořena dopadem světla na částici. Pomocí povrchové plasmonové rezonance absorbují AuNP světlo, které je buď rozptýleno, vyzařováno, využito k potlačení fluorescence nebo je uvolněno ve formě tepla. Tyto vlastnosti lze využít pro zobrazování *in vivo* prostřednictvím rentgenového záření nebo mikro-CT skenování. AuNP absorbují rentgenové záření lépe, než klasické kontrastní látky (jód), což umožňuje větší přesnost při vizualizaci nanočástic. Kromě využití jakožto zobrazovacích činidel byly AuNP upraveny tak, aby cílily a degradovaly agregáty β -amyloidu *in vitro*, a to způsobem konjugace zlatého jádra s APOE [29].

Nanočástice stříbra (AgNP)

Nanočástice stříbra byly zkoumány pro jejich schopnost prostoupit přes hematoencefalickou bariéru a tím vyvolat imunitní odpověď v mozku. Částice stříbra mají

přirozeně antibakteriální vlastnosti. Bylo prokázáno, že imunitní odpověď zvyšuje imunitní schopnost mikroglíí, což vede k expresi enzymů, které mají celkový protizánětlivý účinek a redukované formy kyslíku (ROS). Nicméně AgNP dodávané do mozku nescificky často způsobuje cytotoxicitu, zejména neuronů a inertní stříbro se může akumulovat. K účinné aplikaci AgNP při neurodegenerativním onemocnění je tedy potřeba specifické zaměření na individuální nervové systémy, buněčné typy nebo nanočástice potažené ligandy, které sníží jejich cytotoxicitu [29].

Nanočástice oxidů kovů

Oxid železno-železitý (Fe_3O_4), oxid ceričitý (CeO) a oxid zinečnatý (ZnO) jsou nanočástice vyvinuté ke zlepšení diagnostiky pomocí zobrazovacích technik a k terapii neurodegenerativního onemocnění formou snížení oxidačního stresu v mozku. Magnetické vlastnosti těchto nanočástic jsou užitečné zejména pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI). Nanočástice Fe_3O_4 mohou být rozděleny do dvou kategorií podle velikosti: supermagnetické Fe_3O_4 o průměru 50-150nm, které mohou být dále upraveny pro terapii neurodegenerativních onemocnění a ultravysoké superparamagnetické Fe_3O_4 o průměru 10-50nm, které se využívají jako kontrastní látky pro MRI. Supermagnetické Fe_3O_4 nanočástice potažené nervovým růstovým faktorem podporují růst a diferenciaci neuronů *in vitro*. Nanočástice CeO (nanoceria) a ZnO se využívají ke snížení ROS a nitrosativního stresu, které se podílejí na vývoji neurodegenerativních onemocnění. Nanočástice oxidu ceričitého jsou schopny redukce aniontů superoxidu, peroxidu vodíku a peroxynitritu převedením mezi Ce^{4+} a Ce^{3+} . Obdobně tomu je u nanočástic oxidu zinečnatého. Tyto kovy však stále představují určité riziko toxicity, tudíž jejich podávání musí být pod pečlivým dohledem [29].

1.5.2 Kvantové tečky (QD)

Kvantové tečky jsou fluorescenční polovodičové nanokrystaly, jejichž velikost se pohybuje od 2 do 10nm a většinou jsou potaženy nějakým ligandem. Mají dlouhodobou fotostabilitu a jsou celkově chemicky stabilní. Krystalické jádro těchto nanočástic je nejčastěji tvořeno selenidem kademnatým (CdSe), který je obklopen pláštěm sulfidu zinečnatého (ZnS), který podporuje jejich rozpustnost ve vodě. Základní struktura QD (CdSe) určuje emitovanou barvu, zatímco vnější vodný obal (ZnS) lze využít pro konjugaci biomolekul jako jsou peptidy,

bílkoviny nebo DNA. QD jsou užitečné jednak při sledování molekulárních reakcí probíhajících uvnitř buněk a tím umožňují monitorování dopaminergní neurotoxicity, tak pro sledování transplantované buňky. Pro lékařské použití jsou stále diskutovány, avšak z fluorescenčních látek se jeví jako nejslibnější kandidáti. [26, 29].

1.5.3 Nanočástice oxidu křemičitého

Nanočástice oxidu křemičitého jsou porézní materiály, jejichž povrch může být ještě upraven ke zvýšení funkčnosti, což z nich činí potenciální nosiče léčiv. Bylo prokázáno, že u octomilky jsou křemičité nanočástice schopny pronikat neurony *in vivo* bez cytotoxického efektu. U myši byly schopny překročit hematoencefalickou bariéru, což je dalším pozitivem v uvážení těchto nanočástic jakožto přínosu pro terapii neurodegenerativních onemocnění. Kromě dopravy léčivé látky do mozku mohou být křemičité nanočástice modifikovány tak, aby uvolňovaly ligand postupně po delší dobu [26, 29].

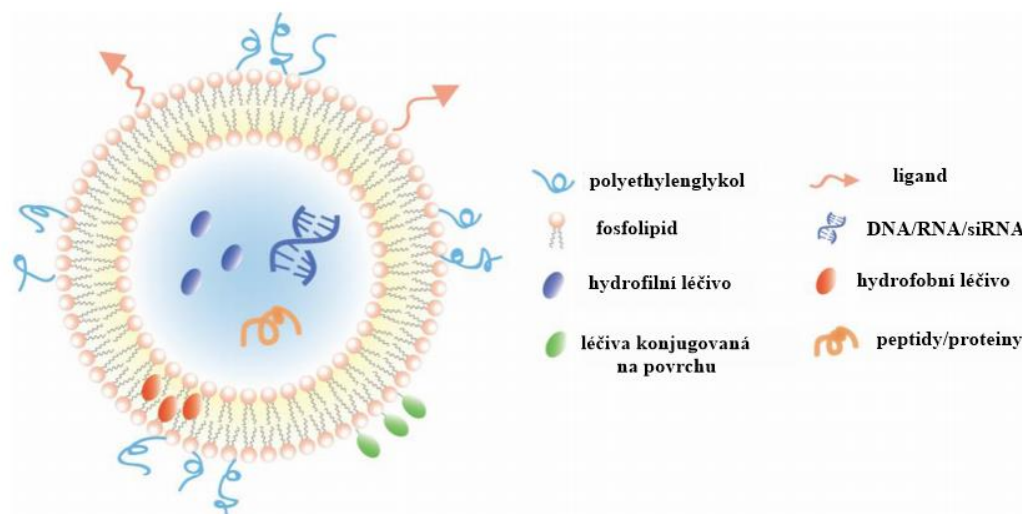
1.5.4 Nanočástice na bázi lipidů

Lipidy a další organické molekuly mají vyšší biokompatibilitu než anorganické molekuly. Vzhledem k tomu, že lipidy a další organické látky jsou přirozeně se vyskytujícími molekulami v buňkách organismu, nabízejí se jako ideální nosiče léků [29].

Liposomy

Liposomy jsou tvořeny aspoň jednou lipidovou dvojvrstvou a mají vodné jádro. Jsou tudíž schopny zapouzdřit jak hydrofilní, tak lipofilní sloučeniny, což z nich dělá výjimečné nanonosiče léků. Lipidová vrstva na povrchu částice může být během syntézy stabilizována na delší poločas přidáním cholesterolu nebo jiného sterolu, tím ovlivníme rychlost uvolňování léku. Terapie pomocí některých liposomů se zabudovaným cholesterolem již byly schváleny Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). PEGylací zvýšíme účinnost prostupu liposomů přes hematoencefalickou bariéru. Mimo to mohou být liposomy potažené ligandy, které zvýší jejich stabilitu nebo usnadní transport do mozku. Ligandem můžou být například proteiny, protilátky, nukleové kyseliny, sacharidy aj. a mohou dosahovat různého stupně pokrytí povrchu

liposomu. Nesmí však být ligand navázán způsobem, kterým by zakrýval epitop nanočástice, který je nezbytný pro jeho biologickou funkci [29].



Obr. 9: Schématické zobrazení typického liposomu [31].

Micely

Micely jsou lipidové monovrstvy o velikosti 5 až 100nm (jsou menší, než liposomy). Mají hydrofobní jádro a hydrofilní polární povrch. Jejich hydrofobní jádro může být naplněno léčivem, které by bylo za normálních podmínek *in vivo* nerozpustné. Pomocí malé micely se tak dostane přes hematoencefalickou bariéru [29].

Exosomy

Exosomy jsou membránové vezikuly vylučované buňkou. Lze je i syntetizovat *in vitro* z buněčné kultury a využít k léčbě neurodegenerativních onemocnění. Molekulární obsah exosomů se u pacientů s Alzheimerovou chorobou odchyluje od normy. Zdánlivá síla exosomů v patologii neurodegenerativních onemocnění vedla vědce k vytvoření systému buněčné terapie. Terapie pomocí mezenchymálních kmenových buněk (MSC) stimuluje angiogenezi a neurogenezi signální dráhy, které regulují plasticitu a opravu mozku. Exosomy mohou být konstruovány tak, aby obsahovaly specifické miRNA, které pomáhá v terapii neurodegenerací. Toho je možné docílit například kultivací MSC s extrakty z ischemické mozkové tkáně, kdy takové exosomy budou vylučovat velké množství miRNA. Exosomy produkované hematopoetickými kmenovými buňkami (HSC) mohou také procházet přes hematoencefalickou bariéru a zajistit tak dodávku potřebné látky (např. zmíněného miRNA) do

mozkové tkáně [29]. Obsah exosomů závisí na tkáních, kde jsou působně izolovány MSC a prostředí, ve kterém se nachází. Je zapotřebí tedy dalšího studia různých funkčních exosomálních vlastností. MSC různých zdrojů mají odlišné profily sekretomů, což naznačuje, že takový rozdíl v jejich sekrečním vzoru nebo odvozených vezikul může být specifický pro stav centrální nervové soustavy [32]. Exosomy jako nosiče léků nabízejí jednu hlavní výhodu a to takovou, že nedochází k jejich nežádoucí akumulaci v játrech a jsou schopny se vyhnout fagocytóze nebo degradaci makrofágy, protože jejich složení je přirozeně podobné buňkám vlastního těla [33]. Terapeutické exosomy mohou být také odvozeny z vlastních buněk pacienta ke snížení nebo eliminaci potenciální imunologické komplikace. Nejnovější poznatky naznačují, že exosomy obsahují jedinečný biologický náklad, který představuje fyziologický nebo patofyziologický stav jejich původního zdroje buněk [34].

Pevné lipidové nanočástice (SLN) a nanostrukturované lipidové nosiče (NLC)

Jednou z výhod SLN a NLC je jejich malá velikost, která jim umožňuje snadno proudit v krevním řečišti, aniž by je ničily makrofágy. Jsou vyrobeny z přírodních materiálů, díky čemuž jdou vysoce biokompatibilní, a tudíž neovlivňují extracelulární/intracelulární prostředí po jejich degradaci. Pro jejich výrobu není zapotřebí žádných organických rozpouštědel a vyznačují se nízkou imunogenicitou. Jsou jedním s nejlepších kandidátů na asistenci léčby chorob centrálního nervového systému. Ačkoliv tento typ nanočástic oplývá všemi těmito výhodami, vyznačuje se také nízkou účinností zapouzdření, což je pravděpodobně právě to omezení, které doposud neumožnila jeho masovou výrobu [35].

1.5.5 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice představují jednu z nejnovatивnějších neinvazivních možností aplikace léčiva. Hlavním cílem nanočástice je zprostředkovat terapeutickou molekulu, ať už jde o léky, proteiny nebo nukleové kyseliny a dostat ji přímo do cílového orgánu či tkáně. Polymerní nanočástice jsou vyrobeny z jednoduchých monomerů, které jsou přirozeně přítomny v těle, a proto se snadno vylučují, aniž by byly toxické [2]. Jako matrice pro dodání léčiv se využívají polymerní biomateriály přírodní, syntetické a jejich hybridní polymery. Polymerní nanočástice jsou biologicky odbouratelné materiály [36]. Společnými vlastnostmi polymerních nanočástic, které z nich činí užitečné nosiče léčiv je více možností

syntézy, poddajné fyzikální vlastnosti, vysoká stabilita, nízká imunoreaktivita, biologická dostupnost, a dlouhodobá cirkulace zapouzdřené látky. Mezi nejčastěji používané polymerní materiály patří poly (kyselina mléčná) (PLA), poly (D, L – kyselina mléčná – glykolová) (PLGA), poly (kyselina asparagová), poly (kyselina glykolová) (PGA), poly (butylkyanoakrylát) (PBCA) [29].

3.1.5.1. Syntetické polymery

Nanočástice PLA – PLA

Nanočástice PLA jsou hydrofobním biomateriálem, který je biologicky odbouratelný. Jeho monomerní jednotky kyseliny mléčné jsou bezpečným, tělu přirozeným, meziproductem metabolismu. PLA jsou potenciálními kandidáty na dodávku léčiv do mozku kvůli jejich nízké toxicitě a vysokému vychytávání mozgovými buňkami. PLA nanočástice byly schváleny FDA pro klinické použití [36]. Jejich povrch bývá často potažen hydrofilními molekulami polyethylenglykolu (PEG) ke zvýšení propustnosti skrz hematoencefalickou bariéru. Nanočástice PLA mohou být potaženy ligandem, tak být ligandem pro jiné nanočástice, například nanočástice oxidu křemičitého. Jejich povlak zlepšuje kinetiku uvolňování léčiva a také může iniciovat uvolnění léčiva pouze v daném specifickém prostředí. Potažením léčiva ligandem PLA dochází k ochraně nanočástice, dokud se nedostane do prostředí s vysokou koncentrací ROS, kdy dojde k degradaci tohoto povrchu a následně uvolnění léku na místo neurodegenerace [29].

Nanočástice PLGA – PLGA

PLGA se hydrolyzuje na kyselinu glykolovou a kyselinu mléčnou. Taková biokompatibilita je užitečná zejména pro dlouhodobé uvolňování léčiva [29]. Profil degradace a uvolňování léčiva může být ovlivněn změnami molekulové hmotnosti a molárním poměrem kyseliny mléčné ke kyselině glykolové. Tyto monomery jsou biokompatibilní a jsou fyzicky metabolizovány cyklem trikarboxylové kyseliny pro konečné vylučování plícemi. PLGA jako nanosíť je považován za produkt s minimální toxicitou při použití pro biomedicínské aplikace. Lze jej získat komerčně v různých poměrech uvedených monomerů. Každý z nich má své vlastní fyzické vlastnosti, kterými do polymeru přispívá. Kyselina mléčná je tuhá,

hydrofobní, pomalu degradující sloučenina. Naopak kyselina glykolová je tvárná, méně hydrofobní sloučenina s rychlejší degradací. PLGA si zachovává vlastnosti obou kopolymerů a mohou tak být tyto nanočástice různě přizpůsobeny. Úprava koncentrace kyseliny polymléčné v PLGA mění rozpustnost konečného polymeru. Studie zkoumající rychlost hydrolýzy PLGA prokázaly, že zvýšení poměru kyseliny glykolové ke kyselině mléčné zvyšuje hydrofilnost PLGA, což způsobuje jeho rychlejší degradaci. Obecně platí, že čím vyšší je obsah kyseliny glykolové v polymeru PLGA, tím je amorfnější a rychleji se odbourává. Vyjímkou je situace, kdy je poměr těchto monomerů 50:50. Tento stav vykazuje nejvyšší rychlost degradace vůbec. Zvýšení obsahu kyseliny glykolové zvyšuje smáčitelnost PLGA pro tenkovrstvé aplikace. Zvýšení obsahu kyseliny mléčné má své uplatnění při navrhování nosičů PLGA pro trvalé uvolňování. Tento typ nanočástic byl pro biomedicínské aplikace schválen FDA [36, 37, 38].

PLGA je hydrofobní polymer a je proto detekován RES a pokud není nijak upraven, je vázán fagocyty k eliminaci játry nebo slezinou a odstraněn před doručením požadované látky na cílové místo. Je tedy nutná jeho povrchová úprava. Jednou z možností úprav je povlak z hydrofilní skupiny polyethylenglykolu. Biologicky odbouratelné dodávací systémy založené na polymeru PLGA byly využity při zobrazování, diagnostice a léčbě nemocí. Nanočástice PLGA mohou být potaženy různým typem léčiv, jako jsou proteiny, peptidy, geny a protirakovinné léky. Nicméně proteinové a peptidové léky jsou citlivé na vysoké teploty a kyselé prostředí a jejich dlouhodobým vystavením kyselým vedlejším produktům PLGA může snížit jejich stabilitu a biologickou dostupnost po degradaci tohoto polymeru. Je tedy důležité znát fyzikálně chemické vlastnosti použitých proteinů nebo peptidů [36, 37].

Nanočástice PCL

Poly (ϵ -kapolakton) (PCL) je biologicky odbouratelný polyester, který zvyšuje flexibilitu různých materiálů, jako je například PLA. PCL degraduje pomaleji než PLA, a proto je vhodný na výrobu lešení buněčných struktur a nanočástic pro dlouhodobé uvolňování léčiv [36].

Nanočástice PACA a PBCA

Nanočástice poly (akrylkyanoakrylátu) (PACA) jsou schopny z klinického hlediska zlepšit některé vlastnosti léčiv. Snižují dávku léku a jeho vedlejší účinky na organismus. Nejslibnější výhodou PACA nanočástic je schopnost překonat multidrogovou rezistenci, čehož

se dá využít u léčby chemoterapeutickými látkami. Nanočástice poly (butylkyanoakrylátu) (PBCA) mohou být také potaženy ligandem. Například PBCA potažené P80 spouští receptorem zprostředkovanou endocytózu nanočástic a jejich penetraci do mozku. PEGylace PBCA nanočástic je další způsob, který lze využít při podávání terapeutických látek do mozku, jelikož PEGylované nanočástice jsou schopné pronikat přes hematoencefalickou bariéru, a tak pronikat do mozku. Ale bohužel tento typ nanočástic má jistá omezení v klinickém použití. Vedlejší produkty, které jsou výsledkem PBCA degradace, mohou poškodit CNS. Kromě toho bylo také prokázáno, že tento druh nanonosiče není vhodným kandidátem k léčbě chronických onemocnění z důvodu krátkého trvání farmakologického účinku [36].

3.1.5.2. Přírodní polymery

Nanočástice HSA

HSA je ve vodě rozpustný protein, který v organismu zvyšuje rozpustnost mastných kyselin s dlouhým řetězcem, napomáhá transportu iontů a sloučenin, jako jsou léky a hormony a reguluje osmotický tlak v krevním oběhu. Tyto vlastnosti z něj činí potenciálně vhodného kandidáta pro podání léčiva [36].

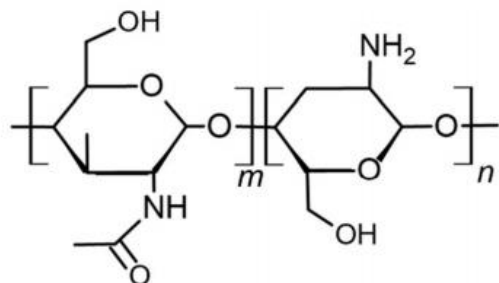
Želatina

Želatina je vedlejším produktem denaturovaného a částečně hydrolyzovaného kolagenu, který je značně využíván v tkáňovém inženýrství a při podávání terapeutik. Želatina je ceněná jako biomateriál, který využívá svých schopností snadného přilnutí k buňce. V současnosti se želatina a její směsi využívají v potravinářském a zdravotnickém průmyslu. Želatina je netoxická, biologicky odbouratelná a bioaktivní, což z ní dělá vhodného nosiče pro dodávku léků [36].

Chitosan

Chitosan je ve vodě rozpustný kationtový polysacharid, který se vyznačuje biokompatibilitou a je biologicky odbouratelný. Nealergenní a netoxické vlastnosti z něj dělají vhodnou volbou pro aplikační systémy ve farmaceutických aplikacích. Chitosan má schopnost

učinit epitelové buňky propustnými. Chitosan ve srovnání s jinými biologicky odbouratelnými polymery spočívá v tom, že může sám působit jako terapeutické činidlo při léčbě neurodegenerativních onemocnění [36, 39].



Obr. 10: Chemická struktura chitosanu [39].

1.5.6 Další slibné nanomateriály

Hydrogely

Hydrogely jsou makroskopické polymerní sítě obsahující velké množství vody. Hydrogel je schopen měnit své fyzikální vlastnosti v závislosti na prostředí. Forma gelu může významně ovlivnit chování buněk. Mezi přírodní hydrogely patří například kyselina hyaluronová, xyloglukan, kolagen, alginát sodný a želatina. Do syntetických řadíme polyakrylamid a PEG. Hydrogely byly hojně zkoumány pro jejich využití v terapii neurodegenerací. Poskytují příznivé prostředí pro transplantaci buněk a uvolňují terapeutické látky po mnoho týdnů po transplantaci. Hydrogely také umožňují kultivaci nervových buněk ve 3D, což lépe simuluje *in vivo* podmínky. Vysoký obsah vody, pórovitost a měkká konzistence hydrogelů umožňuje transport kyslíku, živin a rozpustných faktorů, díky čemuž jsou lepšími simulanty živé tkáně než jiné biomateriály. Menší alternativou k hydrogelům jsou nanogely, které lze použít k zapouzdření léků a jejich prostup přes hematoencefalickou bariéru. Nanogely se většinou syntetizují pomocí foto (UV) nebo chemického zesíťování, které vede k tvorbě kovalentních vazeb mezi danými polymery a vytvoření tak vysoce stabilní sítě [28, 29].

Nanovláknna

Nanovláknna slouží k napodobení vláknité struktury mozkové tkáně, čehož je dosaženo elektrostatickým zvlákňováním různých polymerních materiálů. Výhodou elektrostatického zvlákňování je jeho jednoduchost, reprodukovatelnost a rozmanitost při výrobě nanovláken s různými průměry a funkcemi. Nanovláknna jsou optimální bioaktivní matricí pro připojení buněk, nakládání molekul s cílem zlepšení regenerace tkání. Nanovláknna zabudovaná do různých nativních proteinů hrají zásadní roli ve funkcích MSC a jejich diferenciaci na nervové buňky. Nanovláknna mohou být ze syntetických materiálů, ale lze je vytvářet i z přírodních sloučenin. Do nanovláken je možno zakomponovat jak proteiny, tak léky, či jejich kombinaci, čímž dosáhneme synergického účinku při nervové regeneraci [28].

Uhlíkové nanomateriály

Nervová tkáň má jedinečnou vlastnost vytvářet a přenášet elektrické podněty. Elektrické podněty jsou v současné době považovány za slibné nástroje pro regeneraci nervové tkáně jinou cestou než chemickou. Zde se nabízí díky svým vynikajícím fyzikálním, chemickým a mechanickým vlastnostem materiály na bázi uhlíku (grafen, uhlíkové nanotrubičky (CNT)). CNT jsou listy grafitu ve tvaru válcových trubek s průměrem 0,4-2nm a s délkami od stovek nanometrů až po mikrometry. Dělí se na jedностěnné (SWCNT), víceštěnné (MWCNT) a fullereny C60 [26]. Stejně jako grafen jsou schopny vést elektrické podněty. Používají se tedy zejména jako přísady do biomateriálů, aby poskytovaly vodivost. U CNT však dochází k bezpečnostním problémům, způsobujících oxidační stres, produkci volných radikálů aj. Tyto komplikace je třeba překonat, aby bylo možné využít CNT při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Grafen se obvykle používá jako bioaktivní nosný materiál, ale může být také použit pro propojení neuronů. Aby se zlepšila adheze buněk k substrátu, je třeba grafen potáhnout vrstvou jako je laminin, kolagen, Matrigel a poly-L-lysin. Pomocí uhlíkových materiálů jsme schopni zajistit vodivost bez vnější stimulace, což je zásadní pro tkáňové inženýrství [28].

Nanočástice selenu

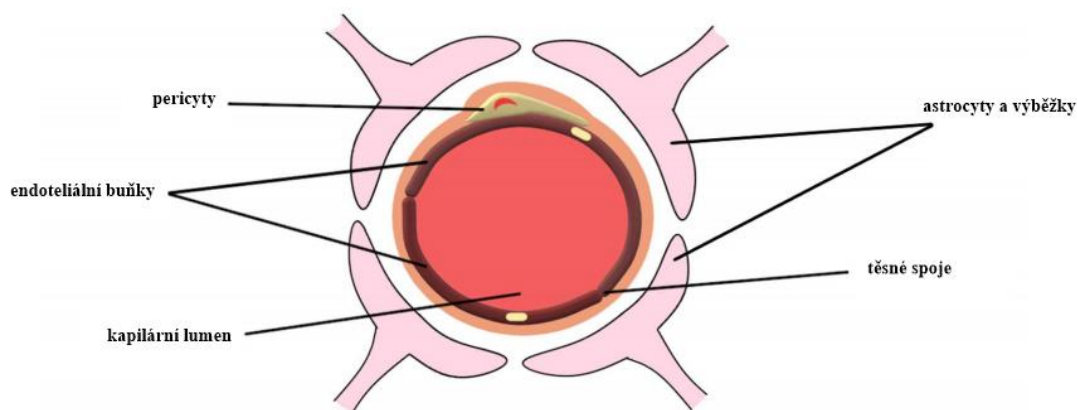
Selen je nezbytným stopovým prvkem v našem těle. V závislosti na koncentraci může mít selen terapeutické nebo toxické účinky. Vysoké dávky selenu podporují množení rakovinných buněk a má neurotoxické účinky. Nízké a střední dávky selenu inhibují množení

rakovinných buněk a mají terapeutické účinky na neurologické nemoci včetně Alzheimerovy choroby. Antioxidační a protizánětlivé účinky selenu byly pozorovány *in vitro* s použitím buněčných linií a *in vivo* na zvířecích modelech. Nicméně výsledky účinků selenu a jeho použití formou nanočástic na léčbu neuronových onemocnění jsou v rozporu. Úspěšnost léčby přírodními antioxidanty je obecně nízká. Proto je zapotřebí vývoje nových nanočástic s diagnostickými nebo terapeutickými vlastnostmi ke zlepšení detekce a léčby neurologických onemocnění. V současnosti existují některé nově syntetizované selenoproteiny a nanočástice selenu, které mají pozoruhodné fyziologické vlastnosti. Vzhledem k vysoké účinnosti a nízké systémové toxicitě těchto částic mohou sloužit jako alternativy konvenčních terapeutických léků k léčbě neurologických onemocnění [9].

1.6 Prostup nanočástic přes hematoencefalickou bariéru

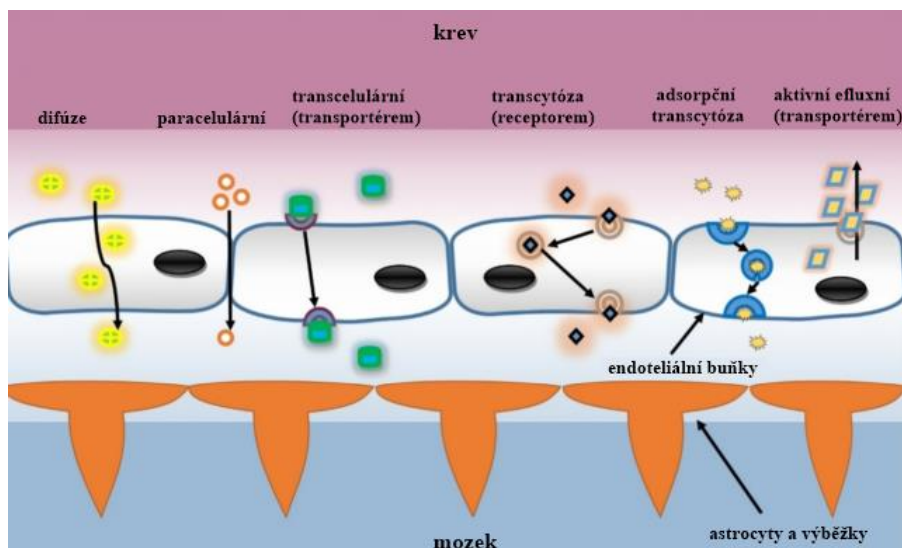
Hematoencefalická bariéra chrání centrální nervový systém před poškozením cizími látkami z krevního oběhu. Přestože je hematoencefalická bariéra zásadní ochranou mozku před cizími látkami, jeho struktura je hlavní překážkou dodávky léků do mozku pro léčbu onemocnění centrální nervové soustavy. Většina léků, která se v dnešní době podává je aplikována intravenózně, kde látky čelí retikuloendoteliálnímu systému, který je odstraňuje z krevního řečiště. Bylo také prokázáno, že tento způsob podání léčiva souvisí se systémovou distribucí a vedlejšími účinky a snižuje účinnost léčiva a jeho biologickou dostupnost. Dodávka léčiva pomocí nanočástic odstranila některé tyto problémy. Za méně problémovou cestu podání léčiva se v současnosti jeví jeho intranasální aplikace spolu s využitím nanočástic. Hematoencefalickou bariérou neprojdou například ve vodě rozpustné molekuly, proteiny, peptidy, geny a antibiotika s molekulovou hmotností nad 500 Da. Nanočástice s takovými molekulovými hmotnostmi jsou schopny hematoencefalickou bariérou projít, jelikož využívají rozdílný poměr stran a jinou prostorovou geometrii [36, 40].

Tato speciální bariéra se skládá z různých druhů buněk a těmi jsou endoteliální buňky, pericyty, astrocyty a mikroglie. Endotelové buňky hematoencefalické bariéry mají jiné vlastnosti než endotelové buňky v periférii. Odlišují se zejména vysokým obsahem mitochondrií a změnou pinocytické aktivity. Prostory mezi endotelovými buňkami vyplňují transmembránové proteiny. Pericyty jsou umístěny na vnitřní mozkové membráně a jsou pokryty bazální laminou a proteiny. Astrocyty a jejich výběžky jsou připevněny ke stěnám kapilár a pomáhají udržovat kapilární strukturu [36, 40].



Obr. 11: Hlavní komponenty struktury hematoencefalické bariéry [41].

Hematoencefalická bariéra omezuje penetraci léčiva do mozku, tudíž je jednou z hlavních klinických překážek při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Momentálně existují dvě možné strategie: paracelulární a transcelulární transport pro pasivní nebo aktivní překročení hematoencefalické bariéry. Dočasným narušením bariéry transcytózou a využitím nanonosičů je možné usnadnit dodávku molekul do centrální nervové soustavy. Molekuly používají aktivní efluxní transportéry, transportéry zprostředkované nosičem a receptory zprostředkované transportéry k překročení hematoencefalické bariéry. Nanotechnologické systémy pro dodávání léčiv jsou výkonnou metodou pro transport léčiv do mozku. Nanočástice se používají v různých formách a lék je zachycen buď uvnitř této matrice, nebo na jejím povrchu. Nanočástice díky svým vlastnostem proniknou kapilárami, buňky je absorbují a léčivo se uvolní do jejich kompartmentu nebo cytoplazmy [36, 40].



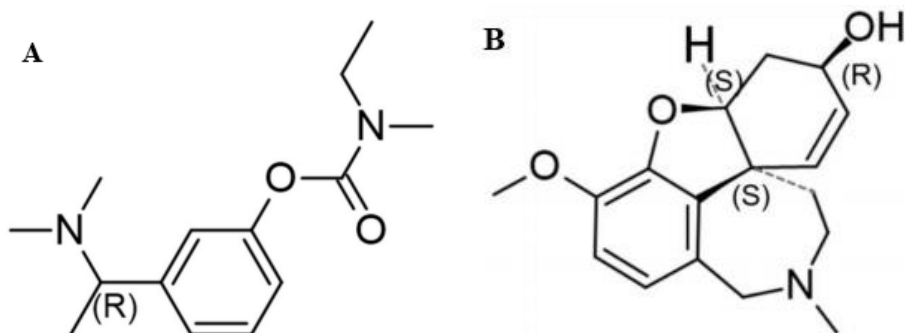
Obr. 12: Různé mechanismy transportu přes hematoencefalickou bariéru [30].

1.7 Možnosti ovlivnění jednotlivých onemocnění pomocí nanočástic

1.7.1 Alzheimerova choroba

Léčba Alzheimerovy choroby se zakládá pouze na zmírnění příznaků nemoci a tím v určité míře ke zkvalitnění života pacienta. Jsou známy dva faktory brzdící pokrok v léčbě tohoto onemocnění. Zaprvé, příčina vzniku Alzheimerovy choroby není dodnes zcela známa. Zadruhé, hematoencefalická bariéra omezuje účinnost léku [42]. Léky používané v současné době při léčbě Alzheimerovy choroby (rivastigmin, galantamin, donepezil, memantin) se podávají orálně. Žádný z těchto léků neprokázal schopnost léčit nebo zastavit progresi onemocnění. Donepezil, galantamin a rivastigmin jsou inhibitory acetylcholinesterázy, které zvyšují dostupnost acetylcholinu na synapsích a memantin je nekompetitivní antagonist N-methyl-d-asparátu, který moduluje otevření vápníkového kanálu [28]. Orální způsob podání léčiva je pro pacienta pohodlný, ale vyvolává nežádoucí účinky v důsledku jeho působení na periferní tkáň vlivem nedostatečné selektivity. Inhibitory acetylcholinesterázy vyvolávají nevolnost a v některých případech až zvracení, což může vést k přerušení léčby. Tyto nežádoucí okolnosti je možné vyřešit navržením nosičů léků schopných prostoupit hematoencefalickou bariérou do centrální nervové soustavy v účinné dávce a s minimálními vedlejšími účinky. Nanočástice představují slibný způsob dodání terapeutických sloučenin do mozku. Se zaměřením na Alzheimerovu chorobu byly nanočástice navrženy jak k léčbě, tak k diagnostice tohoto onemocnění. Terapeutická role může být dosažena vnitřními vlastnostmi nanočástic,

nebo jejich použitím formou nosiče léčiva, které je k povrchu nanočástice připojeno určitým procesem modifikace [30, 43].



Obr. 13: A: Chemická struktura rivastigminu, B: chemická struktura galantaminu [39].

Zlaté nanočástice (AuNP) mají protizánětlivé a antioxidační vlastnosti, proto by mohly být vhodným kandidátem pro získání pozitivních účinků v léčbě Alzheimerovy choroby. Při výzkumu byla jako model Alzheimerovy choroby zvolena intracerebroventrikulární aplikace kyseliny okakaové (100 μ g) laboratorním potkanům. O 24 hodin později bylo některým těmto potkanům aplikováno 20nm AuNP (2,5mg/kg) každých 48 hodin po dobu 21 dní. Kyselina okakaová zvyšuje hladinu fosforylace proteinu tau v kůře a hipokampu, zatímco léčba AuNP ji udržovala v normě. Nanočástice zlata také zabránily oxidačnímu stresu (konkrétně hladiny sulfhydrylu a dusitanu) v mozkových strukturách indukovaných kyselinou okakaovou. Kromě toho kyselina okakaová modulovala aktivitu ATP syntázy a nanočástice zlata udržovala fyziologickou mozkovou mitochondriální funkci. Antioxidační kapacity byly kyselinou okakaovou výrazně sníženy a AuNP v mozku obnovily antioxidační stav, jež zahrnuje superoxid dismutázu, aktivitu katalázy a hladiny glutathionu. Dlouhodobá léčba zlatými nanočásticemi indukovaného poškození mozku kyselinou okakaovou zabránila neurozánětům, modulaci mitochondriálních funkcí a poruchám kognitivních funkcí vyvolaných tímto modelem Alzheimerovy choroby, což nám umožňuje uvažovat, že by nanočástice zlata mohly být slibnou léčbou neurodegenerací způsobených těmito patologickými změnami. Tento výzkum se ukázal jako bezpečná a efektivní cesta léčby, nicméně je zde stále potřeba uvažovat a zkoumat možnou toxicitu vyvolanou zlatem. V tomto případě nanočástice zlata nevykazovaly žádné škodlivé účinky, a to pravděpodobně díky vhodně zvolené velikosti těchto částic. Použití nanočástic menších rozměrů s vyšší koncentrací by způsobilo větší škody jak na periferních tkáních, tak v mozku [44].

Hromadí se důkazy naznačující spojitost mezi nedostatkem selenu ve vzorcích séra a ztráty kognitivních funkcí u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Objevuje se velký zájem o

studium role selenu a selenoproteinů v neurodegenerativních chorobách včetně Alzheimerovy choroby. Selenoproteiny jsou proteiny obsahující selen ve formě aminokyseliny – selenocystein. Selenoproteiny jsou exprimovány hlavně v lidském mozku a pravděpodobně se podílí na antioxidačních procesech, které jsou klíčovým faktorem prevence nástupu a progresu Alzheimerovy choroby. Existuje jen málo zpráv o možnosti využití selenu pro léčbu Alzheimerovy choroby, nicméně jeho nízká hladina spolu s aktivitou glutathion peroxidázy by mohly být novým diagnostickým markerem Alzheimerovy choroby. Byla zkoumána účinnost sérového albuminu jako nanočásticového nosiče pro dodání R-flurbiprofenu a léčbu Alzheimerovy choroby a výsledky ukázaly, že by tyto typy nanočástic mohly být potenciálními terapeutickými činidly pro zlepšení mitochondriální dysfunkce u Alzheimerovy choroby [9, 36].

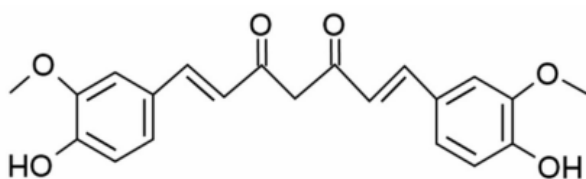
Nanočástice oxidu ceričitého mají podle některých zpráv potenciální katalytickou antioxidační roli v Alzheimerově chorobě. Jejich aplikací je možno dosáhnout zvýšení hladin antioxidačních enzymů jako glutathion peroxidázy, katalázy a superoxid dismutázy nehledě na pokles nadměrné produkce reaktivních forem kyslíku. Sníženého množství amyloidních plaků, jejich toxicitě a oxidačního stresu v kortikálních neuronech bylo docíleno pomocí nanočástic oxidu ceričitého, který je schopen regulovat mitochondriální funkce. Z čehož můžeme usoudit, že nanočástice CeO_2 mají ochranné účinky proti oxidačnímu stresu u Alzheimerovy choroby, kterých dosahují podporou aktivity antioxidačních enzymů [9].

Byly vyrobeny a vyzkoušeny nanočástice superparamagnetického oxidu železa spojené s fluorescenční látkou blízké infračervenému spektru na bázi fenolthiazinu. Experiment byl proveden *in vivo* v mozcích transgenních myší s úspěšným výsledkem zobrazení amyloidních plaků. Nanočástice oxidu železnato-železitého jsou nadějnou možností pro diagnostiku pomocí zobrazovacích technik Alzheimerovy choroby. Nanočástice ZnO jsou toxické pro různé tkáně, včetně mozku. Je jen omezené množství zpráv o tom, jak přesně ZnO ovlivňuje aktivitu enzymu glutathion peroxidázy. Studovali se účinky ZnO na oxidační stres a zánět ve vzorcích mozku myší. Intraperitoneální aplikace ZnO nanočástic snížily aktivity enzymů superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy, ale hladiny malondialdehydu byly zvýšeny. Nanočástice bohaté na kovy mají schopnost stimulovat produkci ROS a generovat zánět. Což má příznivé účinky v rakovinných buňkách, ale při léčbě neurodegenerativních onemocněních jako je Alzheimerova choroba musí být těmito oxidačními účinkům zabráněno, a to obohacením těchto nanočástic antioxidanty, jako je selen a nanočástice selenu pokryté flavonoidy, jež byly zavedeny pro léčbu Alzheimerovy choroby. Z této studie vyplývá, že selen a flavonoidy obohacující nanočástice jsou důležitými kandidáty na vývoj léků k léčbě

Alzheimerovy choroby. U takto upravených nanočástic se enzymové aktivity zvyšují, což vede ke snížení ROS a jsou tak vhodným kandidátem pro diagnostiku a léčbu Alzheimerovy choroby [9, 45]. Obdobně je to u magnetických nanočástic potažených oxidem křemičitým [46]. Dalším vhodným kandidátem jsou QD, které jsou potažené peptidem tak, aby vytvářely agregáty s amyloidními plakami *in vivo* a umožňují tak diagnostiku a obraz progresu Alzheimerovy choroby [29, 47].

Podobným způsobem mohou být liposomy potažené peptidy jako H102, které štěpí beta listy. Na krysích modelech s Alzheimerovou chorobou tyto liposomy H102 zlepšily prostorovou paměť a inhibovaly tvorbu amyloidních plaků. Mimo to také zvýšily enzymatickou aktivitu, která podporovala přežití buněk. Účinnost léku se měří rychlostí absorpce do krevního řečiště. Byla hodnocena účinnost erythropoetinu v kombinaci s lipidovými nanočásticemi pro možnost prevence Alzheimerovy choroby. Toto spojení se osvědčilo při obnově paměti díky jeho přínosnému vlivu na metabolismus kyslíku a energie v mozku. V nanoměřítku byly použity léky k usnadnění léčby Alzheimerovy choroby. Vývojář vytvořil látku, do které zakomponoval rhodamin B. Zkoumané parametry zahrnovaly velikost částic, dispergovatelnost, potenciál zeta, rychlost odezvy pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací, termická analýza a stabilita. Rivastigmin je využíván jako podpůrná léčba Alzheimerovy choroby a funguje jako nevratný inhibitor acetylcholinesterázy. V tomto případě použitím rivastigmin-hydrogen-tartátu nabitého tokoferol sukcinitem na pevné lipidové nanočástici. Po provedení počátečních zkoušek ke stanovení optimální velikosti částic byla měření dále optimalizována a potvrzena [29, 45, 47].

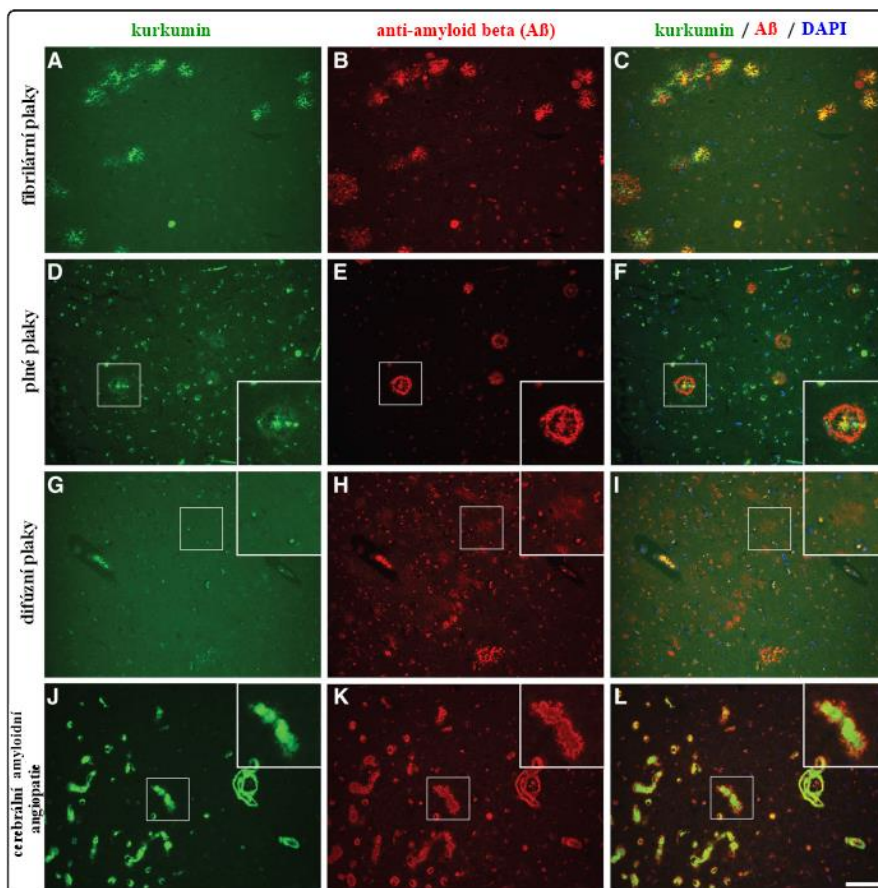
Nanoterapie byly vyvinuty tak, aby překročily hematoencefalickou bariéru. Kurkumin je účinný přírodní anti-myeloid, protizánětlivé a antiapoptotické činidlo pro mnoho neurodegenerativních stavů. Zakomponování kurkuminu do micel zvyšuje jeho biologickou dostupnost a plazmatickou koncentraci ve srovnání s kurkuminem volným, což by mohlo významně zlepšit kurkumin jako léčebnou látku pro Alzheimerovu chorobu [29, 47]. Další možností jsou exosomy odvozené od MSC exprimující vysoké hladiny amyloid β degradujícího enzymu – neprilysin, což vede ke snížení amyloidních plaků v mozku a tím má dopad na progresi onemocnění [32].



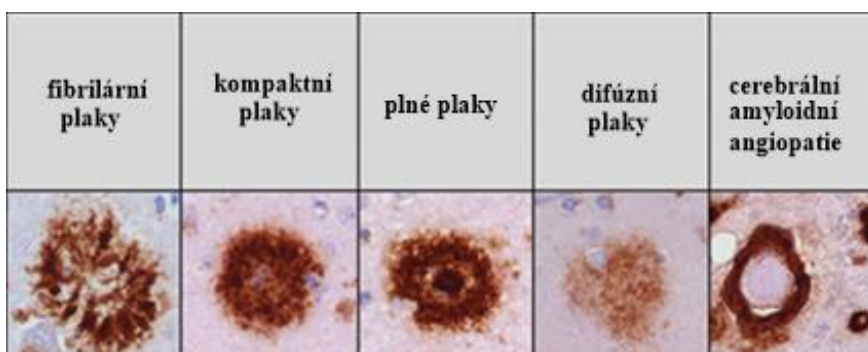
Obr. 14: Chemická struktura kurkuminu [39].

Bylo testováno i použití APOE – PBCA nanočástic jako systém dodání kurkuminu k inhibici amyloidních plaků a s tím souvisejícího oxidačního stresu. APOE – PBCA nanočástice zvýšily stabilitu kurkuminu a jeho prodloužené uvolňování. Výsledky ukázaly, že antiapoptotická aktivita APOE – kurkumin – PBCA byla zvýšena 2-3 krát ve srovnání s kurkuminem – PBCA nanočásticemi. Z čehož vyplývá, že kombinace APOE – kurkumin – PBCA nanočástice může významně zvýšit absorpci léčiva přes hematoencefalickou bariéru [36].

Biokompatibilní polymery PLGA mohou být plněny látkami a jejich rychlost uvolňování lze řídit. Proběhla analýza terapeutických účinků DBP – PLGA nanočástic na myších nadměrně exprimujících amyloid β . Dibutylftalát (DBP) byl navázán na nanočástice PLGA a byly analyzovány vlastnosti této kombinace. Agregaci amyloidních plaků *in vitro* thioflavin-t-testem pomocí DBP – PLGA nanočástic bylo výrazně zabráněno. Akumulace amyloidních plaků, neurozánět, ztráta neuronů a kognitivních funkcí u amyloid β nadměrně exprimujících myší byly podstatně sníženy intravenózní aplikací DBP – PLGA nanočástic. Byla brána v úvahu i možnost kombinace nanočástic PLGA se selenem a kurkuminem. Technika mikroskopické fluorescence vizualizovala přesný vztah Se – PLGA nanočástic nabitými kurkuminem k amyloidním plakům. U lézí typických pro Alzheimerovu chorobu, jež pro experiment poskytli transgenní myši, může spojení Se – PLGA – kurkumin poskytovat lepší terapeutickou účinnost. PEGylované nanočástice PLGA obsahující memantin zajistí jak průchod léčiva přes hematoencefalickou bariéru, tak jeho účinnost ve formě redukce amyloidních plaků a zánětlivých procesů s tím související [36, 45].



Obr. 15: Mikroskopická fluorescence značená pomocí kurkuminu a anti-amyloidu beta ($A\beta$) v mozku postiženém Alzheimerovou chorobou. A-C: hipokampus, D-I: temporální kůra, J-L: okcipitální kůra zobrazující překrývání a rozdíly. DAPI = fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-fenylindol, rozlišení $100\mu\text{m}$ [48].

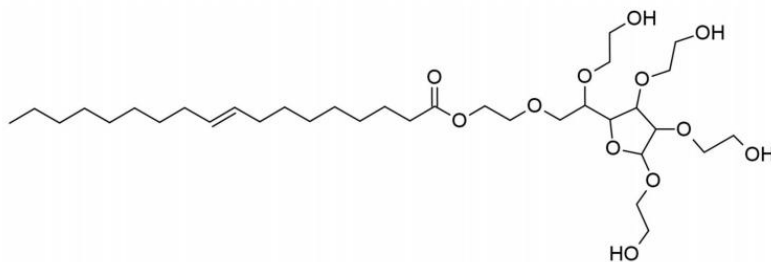


Obr. 16: Imunohistochemické zobrazení různých typů amyloidních plátek a cerebrální amyloidní angiopatie pro srovnání [48].

Byli vyvinuty i PEGylované PLA nanočástice pro léčbu Alzheimerovy choroby. Zvláštním postupem ve výzkumu bylo využití cílicích peptidů k těmto PLA nanočásticím. Jeden byl specifický pro interakce s hematoencefalickou bariérou a druhý vykazoval velkou

afinitu k peptidu amyloidu beta. Díky vynikajícímu účinku cílení na amyloid beta jak *in vitro*, tak *in vivo* mohou být tyto nanočástice považovány za cenný systém cílení pro diagnostiku a terapii Alzheimerovy choroby [2].

Rivastigmin je reverzibilní inhibitor anticholinesterázy široce používaný k léčbě mírných a středně závažných případů Alzheimerovy choroby. Výhodou rivastigminu je schopnost využití acetylcholinesterázy i butyrylcholinesterázy. Jeho mínusem je krátký plazmatický poločas (1,5h), relativně nízká biologická dostupnost a omezená penetrace přes hematoencefalickou bariéru kvůli jeho hydrofilní povaze. Navíc se při jeho užívání dostávají nežádoucí účinky různého typu. S cílem vyvinout optimalizovanou, biologicky odbouratelnou a biokompatibilní formulaci rivastigminu bylo navrženo zapouzdření této aktivní farmaceutické složky do chitosanu pomocí metody ionotropní gelace. Experiment se prováděl na laboratorních myších a potkanech vykazující příznaky amnézie vyvolané skopolaminem. Tato studie *in vivo* potvrdila, že enkapsulace rivastigminu v nanonosících chitosanu potažených polysorbátem 80 značně snížila biochemické a hematologické nežádoucí účinky léčiva a zejména zvýšila jeho maximální tolerovanou dávku (z 1,5mg/kg na 2mg/kg). Biodistribuce rivastigminu zapouzdřeného v chitosanu byla po intravenózním podání experimentálním myším analyzována pomocí HPLC. Bylo zjištěno, že zapouzdřením léčiva do chitosanu zvyšuje mozkovou koncentraci rivastigminu o 56 % ve srovnání s volnou formou léčiva. Bylo také zjištěno, že zavedením léčiva do chitosanu a navíc potaženého polysorbátem 80 se zvýšila koncentrace rivastigminu o 330 %. Galantamin je reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy. Ačkoliv má galantamin vysokou biologickou dostupnost, tak jeho podání způsobuje závažné vedlejší účinky. S úmyslem snížit vedlejší účinky byl galantamin zapouzdřen do nanočástic chitosanu ionotropní gelací. Bylo zjištěno, že nanoformulace galantamin – chitosan zvyšuje účinek inhibice aktivity acetylcholinesterázy v mozku ve srovnání s orálním a intranasálním podáním roztoku galantaminu aplikovaný v ekvivalentních dávkách. Galantamin má krátký plazmatický poločas (1,9h) u potkanů. Metoda enkapsulace může prodloužit působnost galantaminu, což může nejen přispět ke zlepšení inhibice acetylcholinesterázy, ale také umožnit méně častý režim dávkování. V posledním desetiletí několik studií prokázalo potenciál chitosanu i chitoooligosacharidů a jejich derivátů pro zlepšení příznaků Alzheimerovy choroby pomocí řady mechanismů. I když se ukázalo, že nanočástice chitosanu jsou schopné sami o sobě zamezit agregaci amyloidních plaků a její negativní důsledky, tak je velmi náročné přijít na návrh účinného cílení na cerebrovaskulární amyloidní depozity [39].



Obr. 17: Chemická struktura polysorbátu 80 [39].

1.7.2 Parkinsonova choroba

Současné farmakologické způsoby léčby Parkinsonovy choroby mají za cíl obnovit dopaminergní stimulaci ve striatu. Avšak tento způsob léčby je opět provázen spoustou vedlejších účinků v důsledku dodávky dopaminu do extrastriálních oblastí, variabilitou jejich absorpce a transportu přes hematoencefalickou bariéru a nefyziologické kontinuální uvolňování dopaminu a jeho účinku na dopaminové receptory v bazálních gangliích. U pacientů se často objevují kognitivní problémy vyvolané levodopou jako je dyskineze a nepředvídatelná fluktuace. Všechny tyto faktory spolu s některými neuropsychiatrickými rysy Parkinsonovy choroby mají významný dopad na kvalitu života pacienta. Levodopa je prekurzorem dopaminu a byla vyvinuta v šedesátých letech a dodnes je nejúčinnějším terapeutickým činidlem pro Parkinsonovu chorobu. Mezitím byly na trhu i jiné dopaminergní léky, včetně inhibitorů metabolismu dopaminu i agonistů dopaminových receptorů, ale ty jsou obecně hůře snášeny a méně účinné. Existuje tedy naléhavá potřeba výzkumu vhodných a bezpečných možností vedoucích ke zlepšení léčby Parkinsonovy choroby [49]. Jednou z uvažovaných eventualit je zaměření na schopnosti nanočástic.

V průběhu let bylo předloženo několik studií léčby Parkinsonovy choroby, z nichž řada zahrnovala použití různých léků zapouzdřených v pevných lipidových nanočásticích (SLN) a nanostrukturovaných lipidových nosičích (NLC), včetně apomorfinu. V jedné ze studií byl apomorfin zapouzdřen ve třech různých formulacích: SNL, NLC a lipidové emulze. V závislosti na typu nanostruktury, velikosti, povrchovém náboji se účinnost zapouzdření a profil uvolňování lišil. Přičemž lipidové emulze poskytovaly nejlepší výsledky týkající se prodlouženého uvolňování. Bioluminiscenční experimenty *in vivo* na mozku samců krys s použitím sulforhodaminu B prokázaly, že se NLC mohou v mozku výrazně hromadit ve srovnání se SNL a lipidovou emulzí. Další studie byla zaměřena na proveditelnosti orálního podání apomorfinu pomocí SLN. Pokusy *in vivo* prokázaly, že SLN zlepšily biologickou

dostupnost apomorfínu a byly schopny dodat lék do mozkového striata, což značí potenciál v jejich použití jako doručovacích systémů pro apomorfin prostřednictvím orálního podávání. Cílem zapouzdření ropinirolu, komerčního léčiva, do hybridních polymer-lipidových nanočástic bylo doručování ropinirolu intranazální cestou a závěr byl příznivý, protože tyto hybridní nanočástice vykazovaly dobré mukoadhezivní vlastnosti bez významného poškození nosní sliznice. Proběhly srovnávací studie komerční formulace ropinirolu a jeho spojení s polymer-lipidovými nanočásticemi. S využitím polymer-lipidových nanočástic je zapotřebí menší množství léčiva k dosažení stejného terapeutického účinku jako komerční lék samotný [35].

Exosomy odvozené od MSC zachránily degeneraci dopaminergních neuronů *in vitro* modelech Parkinsonovy choroby, a proto představují potenciální regenerační léčbu této poruchy. Jak již bylo zmíněno v kapitole o nanočásticích, jedním z nejběžnějších obsahů exosomů je přítomnost genetického materiálu, jako jsou miRNA. Četná onemocnění, včetně Parkinsonovy choroby vykazují dysregulaci genové exprese, konkrétně na úrovni miRNA. Výměna genetického materiálu, jako je miRNA, prostřednictvím exosomů může skutečně podporovat neurogenezi, funkční zotavení a snižovat neurozáněť na zvířecích modelech. Kromě zapojení do patofyziologie Parkinsonovy choroby, byly také identifikovány miRNA odvozené z exosomů jako potenciální nástroj pro diagnostiku biomarkerů a cílené terapie [32].

Účinnost nanočástic CeO₂ byla zkoumána na několika neurodegenerativních poruchách. Nanočástice CeO₂ prokázaly slibnou úroveň neuroprotektce. Tradiční antioxidanty se pokusily zmírnit patologické změny v Parkinsonově chorobě, ale s omezeným úspěchem kvůli špatným schopnostem překročit hematoencefalickou bariéru. Experimentovalo se dodáním různých dávek CeO₂ nanočástic (0,1, 0,5 a 1mg/kg) do modelu Parkinsonovy choroby indukované 6-hydroxydopaminem. Neurobiochemické poruchy byly téměř zvráceny dávkou 0,5mg/kg CeO₂ nanočástic, zatímco dávka 0,1mg/kg nebyla dostatečná. Nanočástice Fe₃O₄ nesoucí deriváty N-isopropylakrylamidu, shRNA a nervový růstový faktor také prokázaly efektivní nápravy v mozku modelu Parkinsonovy choroby [31]. Nanočástice Fe₃O₄ potažené molekulami kyseliny olejové a absorbované shRNA snížily expresi α -synukleinu, potlačily jeho toxické účinky na buňky a zamezily tak apoptóze buněk indukovanou α -synukleinem [50].

Jedna ze studií potvrdila, že nervový růstový faktor vázaný na nanočástice PBCA se zapouzdřením léčiva levodopa procházejí hematoencefalickou bariérou a zmírňují základní příznaky Parkinsonovy choroby. PEGylované nanočástice PLGA o velikosti 70nm s konkrétní látkou Schisantherin A byly použity na modelech Parkinsonovy choroby v larvách zebrafish (Dánio pruhované), kde zapouzdření Schisantherinu A do nanočástic poskytlo jeho

prodlouženou cirkulaci v krevním řečišti a následné zvýšené vychytávání mozku. Spojení PEGylovaných nanočástic PLGA se Schisantherinem A bylo označeno jako potenciálně efektivní pro léčbu Parkinsonovy choroby. Bylo zjištěno, že nanočásticová dodávka Schisantherinu A byla mnohem účinnější než jeho podání samostatně. Kromě toho jejich použití vykazovalo silné neuroprotektivní účinky *in vivo* v modelech zebrafish i v buněčných kulturách [51]. Vyvinutím aplikačního systému skládající se z PLGA nanočástic naplněných ropinirolem došlo ke zvrácení příznaků podobných Parkinsonově chorobě v testovaném zvířecím modelu. Jiný přístup zahrnoval použití funkcionalizovaných PLGA nanočástic k vyhledání lysozomů a obnovení jejich poškozené funkce [2].

Stejně jako u Alzheimerovy choroby i zde má svůj význam spojení nanočástic s kurkuminem. Nanoforma kurkuminu může významně snížit oxidační stres a apoptózu buněk v mozku jedinců postižených Parkinsonovou chorobou. Výsledky výzkumu na myších ukázaly, že enkapsulací kurkuminu do nanočástic se zvýšila biologická dostupnost léčiva a mozek měl ochranný účinek proti oxidačnímu stresu. Provedená studie na bázi bovinního sérového albuminu (BSA) odhalila, že lze nano-kurkumin považovat za potenciální terapeutickou strategii proti oxidopaminu (6-OHDA) indukované buněčné smrti v SH-SY5Y buněčné linii ztvárňující model Parkinsonovy choroby. Bylo vyhodnoceno, že buněčná smrt může být důsledkem oxidačního stresu, vzniku volných kyslíkových radikálů a využití zakomponování kurkuminu do nanočástic zabraňuje odumírání buněk svými antioxidantními vlastnostmi [52].

1.7.3 Frontotemporální lobární degenerace

K léčbě frontotemporální lobární degenerace nejsou k dispozici žádné schválené léky modifikující onemocnění. Léčba je zaměřena především na zvládnání symptomů chování. Používají se selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Abnormality chování lze léčit nízkými dávkami atypických antipsychotik. U těch je ale třeba postupovat velmi opatrně u léčby starších pacientů, kdy je při použití antipsychotik zvýšené riziko úmrtí v důsledku srdečních příhod, pádů a infekcí. Inhibitory cholinesterázy nejsou prospěšné a mohou zhoršit pozorované abnormality chování u pacientů s frontotemporální lobární degenerací. Memantin nezlepšuje příznaky a ani nezpomaluje progresi tohoto onemocnění [53]. Doposud neexistuje žádná schválená farmakologická léčba. Je potřeba dále rozvíjet znalosti o základních molekulárních a genetických příčinách frontotemporální lobární degenerace. Konkrétně vytvoření neuroprotektivních léků pro pacienty s rizikem rozvoje frontotemporální lobární

degenerace by mohlo pomoci oddálit nástup onemocnění. Charakterizace různých proteinopatií, včetně tau a TDP-43 vedlo k rozvoji klinických pokusů zaměřených na tyto molekulární abnormality [54]. Obecně nejznámějším typem frontotemporální lobární degenerace je amyotrofická laterální skleróza, na jejíž léčbu se v současné době zaměřují některé výzkumy, které berou v úvahu využití nanočástic.

Terapie pomocí MSC je považována za jeden z nejperspektivnějších přístupů léčby neurodegenerativních onemocnění jako je amyotrofická laterální skleróza. Jedna ze studií naznačuje, že superparamagnetické nanočástice oxidu železa mohou být sledovacím prvkem účinnosti terapie kmenovými buňkami pro amyotrofickou laterální sklerózu [55].

Bylo prokázáno, že FM19G11 (hypoxický indukibilní faktor) indukuje samoobnovu a proliferaci ependymálních kmenových progenitorových buněk (epSPC). Modulace proliferace epSPC může tedy představovat potenciální strategii, která má působit proti neurodegeneraci jako je amyotrofická laterální skleróza. Na výzkum byly využity transgenní myši G93A-SOD1 modelující amyotrofickou laterální sklerózu. FM19G11 je hydrofobní povahy, což ztěžuje léčbu volným lékem. Zde nastupuje využití nanočástic zlata jakožto nosiče tohoto faktoru. FM19G11 se ukázal mnohem účinnější, pokud je dodáván jako součást formulace AuNP. Samotné AuNP, bez ligandu FM19G11 neměly žádný účinek na proliferaci epSPC, nebyly příznivé z hlediska zvýšené buněčné proliferace ani nepříznivé z hlediska nanotoxicity. Dodávka FM19G11 zprostředkovaná AuNP umožnila dodat buňkám koncentrovanější dávku. Tyto důkazy mohou otevřít nové možnosti pro vývoj terapie založené na využití AuNP pro dodávku terapeutické látky a tím zpomalení neurodegenerace a progresu onemocnění u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou [56].

Exosomy mohou zprostředkovat ochranu neuronů a vývoj, regeneraci nervů a synaptické plasticity. Uvádí se, že exosomy dodávají regulační prvky na místo neurologického poranění, která na místě pomáhají při syntéze bílkovin a regeneraci tkání. Exosomy byly zvláště využívány i proti takovým patologiím, jako je amyotrofická laterální skleróza. Ukázalo se, že právě exosomy odvozené z mezenchymálních kmenových buněk přinášejí tkáňové ochranné účinky. Zdá se, že i exosomy cirkulující v krvi mají významné účinky na imunitní odpovědi, které nesou důsledky pro neurodegenerativní a neurozánětlivé chorobné stavy, jako je amyotrofická laterální skleróza. Tato neurodegenerace přednostně ovlivňuje horní a dolní motor neuronu v mozkové kůře a míše a je doprovázena neurozánětlivou reakcí včetně aktivace mikroglie v centrálním nervovém systému a další zapojení periferního imunitního systému. Studie z roku 2016 prokázaly sníženou zánětlivou sekreci cytokinů po exosomální stimulaci v periferních monocytech. Kromě toho exosomální TDP-43 zvyšovalo aktivaci monocytů.

Periferní monocyty jsou schopné vstoupit do CNS ve stavu onemocnění amyotrofickou laterální sklerózou. Kolektivní důkazy naznačují, že exosomy představují životaschopný cíl pro zmírnění progresu onemocnění, patologie a symptomů charakterizující amyotrofickou laterální sklerózu [34].

Adapalen, jako většina retinoidů, je špatně rozpustný ve vodě, což dosud bránilo účinnému podávání tohoto léčiva *in vivo*. Při řešení tohoto problému bylo navrženo řešení zapouzdření adapalenu do PEGylovaných PLA nanočástic. K výzkumu bylo použito míchání polymerů nanočástic PLGA a PEG – PLA s optimalizovanými vlastnostmi. Konkrétně bylo použito 50mg polymeru (PEG – PLA ku PLGA smíchané v poměru 6:4) a 2mg adapalenu. Výsledky výzkumu ukázaly, že intravenózní podávání adapalenu zapouzdřeného v těchto nanočásticích aktivovalo retinoidovou signalizaci v CNS. Pravidelné podávání této nanoformy adapalenu vedlo ke zlepšení motorického výkonu, prodloužené životnosti a neuroprotekcí u myších modelů SOD1-G93A. Tato studie představuje novou cestu léčby amyotrofické laterální sklerózy pomocí nanočástic PLA/PLGA [57].

1.7.4 Prionová onemocnění

Prionová onemocnění jsou vzácná. Jsou hlášeny 1,5-2 případy na milion lidí ročně. Přesto jsou vždy fatální a ani po uplynutí třech desetiletí po objevu prionů, jakožto příčin Creutzfeldt-Jakobovy choroby a jiných přenosných spongioformních encefalopatií, stále neexistuje účinná léčba [58]. Počáteční terapeutické strategie zvažovaly útlum genu PrPc. To bylo dobře snášeno zvířaty, kromě drobných poruch spánkového cyklu a elektrofyzologie hipokampu. Protože je však PrPc spojen s neuroprotekcí, předpokládá se, že potlačením genu PrPc u člověka by došlo k excitotoxicitě. RNA aptamery na bázi se mohou vázat s PrPc, aby se zabránilo jeho přeměně na PrPSc. Aptamerová RNA musí být konjugována s nanočásticemi, aby došlo k prostupu přes hematoencefalickou bariéru. Liposomy, dendrimery, PEGylované polykyanoakrylátové nanočástice byly schopny proniknout do mozku a sleziny klusavkou infikovaných zvířat, avšak jejich schopnost dodávat terapeutický náklad a způsob interakce s vlákny PrPSc jsou zpochybňovány [59].

Polyallylamin (+) a polystyrensulfonát (-), dvě rozdílně nabitě polyaminy, jež byly experimentálně navázány na povrch AuNP. Takto upravené AuNP transportovány přes hematoencefalickou membránu narušily amyloidy PrPSc a zmírnily toxicitu u buněk infikovaných klusavkou. AuNP potažené polyallylaminem prodloužily inkubační dobu a

zpozdily tak nástup onemocnění u infikovaných myší. Interakce nanočástic s PrP byly zkoumány pro diagnostické aplikace. AuNP nebo AgNP s ligandem aptamery RNA specificky interagují s PrP^{Sc} a shromažďují je na svých površích. Vazba PrP a nanočástic konjugovanými aptamerem RNA indukuje řízenou agregaci, kterou lze snímat pomocí rozptylu rezonančního světla kovu [59].

Nanomateriály, jako jsou dendrimery mohou vykonávat příslušnou aktivitu a bránit přeměně PrP^C na PrP^{Sc}. Vzhledem k vysoké afinitě aminových skupin k prionům byly dendrimery fosforu na svém povrchu zdobeny terciárními aminy. Takto upravené dendrimery vykazovaly inhibiční účinek na generaci prionů. Dendrimery mohou být také užitečné pro diagnostiku prionových infekcí. Metodou ELISA jsme obvykle schopni určit, zda je původcem choroby prion, ale tato metoda má jistá omezení, protože nedokáže rozlišovat mezi prionovými řetězci. Dendrimery jsou schopné rozlišovat mezi různými typy prionů. Jiná studie se zabývala vyvinutím elektrochemického biosenzoru obsahující vícevrstevné uhlíkové nanotrubičky, modifikované dendrimery a aptamery pro detekci prionu. Tyto studie prokázaly, že citlivost prionu na konkrétní dendrimer by mohla být použita k diagnostice a předpovědi průběhu nemoci, popřípadě zpomalení progresu onemocnění [60].

4. TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL NANOČÁSTIC V LÉČBĚ NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Všechny neurodegenerativní onemocnění jsou spojeny s poškozením nervového systému na různé úrovni. Byly vyvinuty různé typy nanočástic, které byly otestovány a prokázaly slibný přínos v diagnostice a léčbě neurodegenerativních onemocnění. Pokroky v oblasti nanotechnologií představují revoluci v úspěšném přenosu léčiv přes hematoencefalickou bariéru. Nanočástice s obsahem léčiv vykazují nadějně výsledky zejména v léčbě Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. Nanočástice mohou být současně využity ke sledování a zobrazení buněk. Podávání léků formou nanočástic se prokázalo být lepší alternativou ve srovnání s konvenčním režimem léčení [11, 30].

Pro efektivní využití nanočástic v terapii neurodegenerativních onemocnění je zapotřebí dlouhodobé systematické zkoumání jejich bezpečnosti a toxicity. Nanočástice zajišťující vyšší účinnost léčiva a schopnost opravit poškozené neurony s minimálním množstvím vedlejších účinků jak *in vitro*, tak *in vivo* jsou velkým příslibem pro pacienty s neurodegenerativním onemocněním [24, 30].

5. ZÁVĚR

Práce podává detailní přehled o etiopatogenezi základních neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, frontotemporální lobární degenerace a prionová onemocnění. Zároveň se práce věnuje jednotlivým typům nanočástic využitelných v terapii těchto onemocnění. Doposud provedené studie ukázaly velký potenciál nanočástic v léčbě jednotlivých neurodegenerativních onemocnění. Jedná se zejména o jejich využití jako nosiče léčiv přes hematoencefalickou bariéru. K širšímu využití nanočástic je však zapotřebí ještě další výzkum zaměřený na jejich efektivitu a potenciální toxicitu, což přispěje k nalezení efektivní léčby neurodegenerativních onemocnění.

6. POUŽITÁ LITERATURA

1. Rusina R., Matěj R., Bartoš A., Bělohávek O., Bezdíček O., Buncová M, Cséfalvay P. Z., Gregor V., Holmerová I., Hort J., Johanidesová S., Keller J., Laczó J., Nikolai T., Peřinová P., Peškeová M., Rektorová I., Ridzoň P., Roth J., Růžička E., Storey K., Straková E., Šonka K., Špeciánová Š., Uhrová T., Vyhnálek M., Vyhnálková E., Vyšata O., Zumrová A., Neurodegenerativní onemocnění, 2. vydání, Praha, Mladá fronta, 2019; s. 447.
2. Calzoni E., Cesaretti A., Polchi A., Di Michele A., Tancini B., Emiliani C., Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies, *Journal of functional biomaterials*, 2019; **10** (1): 4.
3. Čechová K., Mazancová A. F., Marková H., Hort J., Cerman J., Lerch O., Sheardová K., Šumec R., Maková T., Andresová J., Příhodová A., Babej S., Dostálová L., Růžička V., Vaňková H., V bludišti jménem Alzheimer: na co v ordinaci nezbývá čas, 1.vydání, Praha, Management Press, 2019; s. 432.
4. Mace N. L., Rabins P. V., Alzheimer: rodinný průvodce péčí o nemocné s Alzheimerovou chorobou a jinými demencemi, 6. vydání, Praha, TRITON, 2017; s. 427.
5. Chmátalová Z., Skoumalová A., Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky, *Klinická Biochemie a Metabolismus*, Praha, 2014; **22** (43): 189–195.
6. Demattos R. B., Lu J., Tang Y., Racke M. M., Delong C. A., Tzaferis J. A., Hole J. T., Forster B. M., McDonnell P. C., Liu F., Kinley R. D., Jordan W. H., Hutton M. L., A Plaque-Specific Antibody Clears Existing β -amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Mice, *Neuron*, 2012; **76** (5): 908-920.
7. Tucker S. M. F., Borchelt D. R., Troncoso J. C., Limited Clearance of Pre-Existing Amyloid Plaques After Intracerebral Injection of A β Antibodies in Two Mouse Models of Alzheimer Disease, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2008; **67** (1): 30-40.
8. Hoogerhout P., Kamphuis W., Brugghe H. F., Sluijs J. A., Timmermans H. A. M., Westdijk J., Zomer G., Boog C. J. P., Hol E. M., van den Dobbelsteen G. P. J. M., A Cyclic Undecamer Peptide Mimics a Turn in Folded Alzheimer Amyloid β and Elicits Antibodies against Oligomeric and Fibrillar Amyloid and Plaques, *Public Library of Science one*, 2011; **6** (4): 19110.

9. Nazıroğlu M., Muhamad S., Pecze L., Nanoparticles as potential clinical therapeutic agents in Alzheimer's disease: focus on selenium nanoparticles, *Expert review of clinical pharmacology*, 2017; **10** (7): 773-782.
10. Zvěřová M., Alzheimerova demence, 1. vydání, Praha, Grada, 2017; s.108.
11. Siddiqi K. S., Husen A., Sohrab S. S., Yassin M. O., Recent Status of Nanomaterial Fabrication and Their Potential Applications in Neurological Disease Management, *Nanoscale research letters*, 2018; **13** (1): 231.
12. Kozáková R., Podpůrná a paliativní péče u pacientů s Parkinsonovou nemocí, 1. vydání, Praha, Grada, 2020; s. 128.
13. Bonnet A. M., Hergueta T., Parkinsonova choroba: rady pro nemocné a jejich blízké, 1. vydání, Praha, Portál, 2012; s. 160.
14. Li Y-Q., Tan M-S., Yu J-T., Tan L., Frontotemporal Lobar Degeneration: Mechanisms and Therapeutic Strategies, *Molecular Neurobiology*, 2016; **53** (9): 6091-6105.
15. Cairns N. J., Bigio E. H., Makenzie I. R. A., Neumann M., Lee V. M-Y., Hatanpaa K. J., White 3rd C. L., Schneider J. A., Grinberg L. T., Halliday G., Duyckaerts C., Lowe J. S., Holm I. E., Tolnay M., Okamoto K., Yokoo H., Murayama S., Woulfe J., Munoz D. G., Dickson D. W., Ince P. G., Trojanowski J. Q., Mann D. M. A., Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration, *Acta Neuropathologica*, 2007; **114** (1): 5-22.
16. Yokoyama T., Mohri S., Prion Diseases and Emerging Prion Diseases, *Current Medicinal Chemistry*, 2008; **15** (9): 912-6.
17. Mackenzie G., Will R., Creutzfeldt-Jakob disease: recent developments, *F1000Research*, 2017; **6**: 2053.
18. Zerr I., Schmitz M., Adam M. P., Ardinger H. H., Pagon R. A., Wallace S., Bean L. JH., Mirzaa G., Amemiya A., Genetic Prion Disease, *GeneReviews®*, Seattle (WA): University of Washington, 2003.
19. Acquatella-Tran Van Ba I., Imberdis T., Perrier V., From Prion Diseases to Prion-Like Propagation Mechanisms of Neurodegenerative Diseases, *International Journal of Cell Biology*, 2013; **2013**: 975832.
20. Nonno R., Angelo Di Bari M., Agrimi U., Pirisinu L., Transmissibility of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome in rodent models: New insights into the molecular underpinnings of prion infectivity, *Prion*, 2016; **10** (6): 421-433.

21. Chen C., Dong XP., Epidemiological characteristics of human prion diseases, *Infectious diseases of poverty*, 2016; **5** (1): 47.
22. Liberski P. P., Gajos A., Sikorska B., Lindenbaum S., Kuru, the First Human Prion Disease, *Viruses*, 2019; **11** (3): 232.
23. Lan Z., Yang W-X., Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier, *Nanomedicine*, 2012; **7** (4): 579-96.
24. Khan F. A., Almohazey D., Alomari M., Almofty S. A., Impact of nanoparticles on neuron biology: current research trends, *International Journal of Nanomedicine*, 2018; **13**: 2767-2776.
25. Guido C., Maiorano G., Gutiérrez-Millán C., Cortese B., Trapani A., D'Amone S., Gigli G., Palamà I.E., Erythrocytes and Nanoparticles: New Therapeutic Systems, *Applied Sciences*, 2021; **11** (5): 2173.
26. Yetisgin A. A., Cetinel S., Zuvin M., Kosar A., Kutlu O., Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications, *Molecules*, 2020; **25** (9): 2193.
27. Luo S., Ma C., Zhu M-Q., Ju W-N., Yang Y., Wang X., Application of Iron Oxide Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Neurodegenerative Diseases With Emphasis on Alzheimer's Disease, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2020; **14**: 21.
28. Bordoni M., Scarian E., Rey F., Gagliardi S., Carelli S., Pansarasa O., Cereda C., Biomaterials in Neurodegenerative Disorders: A Promising Therapeutic Approach, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; **21** (9): 3243.
29. Vissers C., Ming G-L., Song H., Nanoparticle technology and stem cell therapy team up against neurodegenerative disorders, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019; **148**: 239-251.
30. Ramanathan S., Archunan G., Sivakumar M., Selvan S. T., Fred A. L., Kumar S., Gulyás B., Padmanabhan P., Theranostic applications of nanoparticles in neurodegenerative disorders, *International Journal of Nanomedicine*, 2018; **13**: 5561-5576.
31. Niu X., Chen J., Gao J., Nanocarriers as a powerful vehicle to overcome blood-brain barrier in treating neurodegenerative diseases: Focus on recent advances, *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 2019; **14** (5): 480-496.

32. Vilaça-Faria H., Salgado A. J., Teixeira F. G., Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?, *Cells*, 2019; **8** (2): 118.
33. Ha D., Yang N., Nadithe V., Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges, *Acta pharmaceutica Sinica. B.*, 2016; **6** (4): 287-296.
34. Sarko D. K., McKinney C. E., Exosomes: Origins and Therapeutic Potential for Neurodegenerative Disease, *Frontiers in neuroscience*, 2017; **11**: 82.
35. Tapeinos C., Battaglini M., Ciofani G., Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases, *Journal of controlled release*, 2017; **264**: 306-332.
36. Shakeri S., Ashrafizadeh M., Zarrabi A., Roghanian R., Afshar E. G., Pardakhty A., Mohammadinejad R., Kumar A., Thakur V. K., Multifunctional Polymeric Nanoplatforms for Brain Diseases Diagnosis, Therapy and Theranostics, *Biomedicines*, 2020; **8** (1): 13.
37. Essa D., Kondiah P. P. D., Choonara Y. E., Pillay V., The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020; **8**: 48.
38. Han F. Y., Thurecht K. J., Whittaker A. K., Smith M. T., Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading, *Frontiers in pharmacology*, 2016; **7**: 185.
39. Manek E., Darvas F., Petroianu G. A., Use of Bioable, Chitosan-Based Nanoparticles in the Treatment of Alzheimer's Disease, *Molecules*, 2020; **25** (20): 4866.
40. Dong X., Current Strategies for Brain Drug Delivery, *Theranostics*, 2018; **8** (6): 1481-1493.
41. Teleanu D. M., Chircov C., Grumezescu A. M., Volceanov A., Teleanu R. I., Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology, *Pharmaceutics*, 2018; **10** (4): 269.
42. Wong K. H., Riaz M. K., Xie Y., Zhang X., Liu Q., Chen H., Bian Z., Chen X., Lu A., Yang Z., Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; **20** (2): 381.

43. de la Torre C., Ceña V., The Delivery Challenge in Neurodegenerative Disorders: The Nanoparticles Role in Alzheimer's Disease Therapeutics and Diagnostics, *Pharmaceutics*, 2018; **10** (4): 190.
44. Dos Santos Tramontin N., da Silva S., Arruda R., Ugioni K. S., Canteiro P. B., de Bem Silveira G., Mendes C., Silveira P. C. L., Muller A. P., Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage in Alzheimer's Disease Model, *Molecular neurobiology*, 2020; **57** (2): 926-936.
45. Abbas M., Potential Role of Nanoparticles in Treating the Accumulation of Amyloid-Beta Peptide in Alzheimer's Patients, *Polymers (Basel)*, 2021; **13** (7): 1051.
46. Karthivashan G., Ganesan P., Park S. Y., Kim J. S., Choi D. K., Therapeutic strategies and nano-drug delivery applications in management of ageing Alzheimer's disease. *Drug delivery*, 2018; **25** (1): 307-320.
47. Kassem L. M., Ibrahim N. A., Farhana S. A., Nanoparticle Therapy Is a Promising Approach in the Management and Prevention of Many Diseases: Does It Help in Curing Alzheimer Disease?, *Journal of Nanotechnology*, 2020; **2020**: 8147080.
48. den Haan J., Morrema T. H. J., Rozemuller A. J., Bouwman F. H., Hoozemans J. J. M., Different curcumin forms selectively bind fibrillar amyloid beta in post mortem Alzheimer's disease brains: Implications for in-vivo diagnostics, *Acta neuropathologica communications*, 2018; **6** (1): 75.
49. Stoker T. B., Barker R. A., Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease, *F1000Research*, 2020; **9**: F1000 Faculty Rev-862.
50. Islam S.U., Shehzad A., Ahmed M. B., Lee Y S., Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders, *Molecules*, 2020; **25** (8): 1929.
51. Naqvi S., Panghal A., Flora S. J. S., Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs, *Frontiers in neuroscience*, 2020; **14**: 494.
52. Yavarpour-Bali H., Ghasemi-Kasman M., Pirzadeh M., Curcumin-loaded nanoparticles: a novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders, *International journal of nanomedicine*, 2019; **14**: 4449-4460.
53. Bang J., Spina S., Miller B. L., Frontotemporal dementia, *Lancet*, 2015; **386** (10004): 1672-1682.

54. Bott N. T., Radke A., Stephens M. L., Kramer J. H., Frontotemporal dementia: diagnosis, deficits and management, *Neurodegenerative disease management*, 2014; **4** (6): 439-454.
55. Luo S., Ma C., Zhu M-Q., Ju W-N., Yang Y., Wang X., Application of Iron Oxide Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Neurodegenerative Diseases With Emphasis on Alzheimer's Disease, *Frontiers in cellular neuroscience*, 2020; **14**: 21.
56. Marcuzzo S., Isaia D., Bonanno S., Malacarne C., Cavalcante P., Zacheo A., Laquintana V., Denora N., Sanavio B., Salvati E., Andreozzi P., Stellacci F., Krol S., Mellado-López M., Mantegazza R., Moreno-Manzano V., Bernasconi P., FM19G11-Loaded Gold Nanoparticles Enhance the Proliferation and Self-Renewal of Ependymal Stem Progenitor Cells Derived from ALS Mice, *Cells*, 2019; **8** (3): 279.
57. Medina D. X., Chung E. P., Teague C. D., Bowser R., Sirianni R. W., Intravenously Administered, Retinoid Activating Nanoparticles Increase Lifespan and Reduce Neurodegeneration in the SOD1^{G93A} Mouse Model of ALS, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020; **8**: 224.
58. Aguzzi A., Lakkaraju A. K. K., Frontzek K., Toward Therapy of Human Prion Diseases, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2018; **58**: 331-351.
59. Ke P. C., Sani M-A., Ding F., Kakinen A., Javed I., Separovic F., Davis T. P., Mezzenga R., Implications of peptide assemblies in amyloid diseases, *Chemical Society reviews*, 2017; **46** (21): 6492-6531.
60. Ortega M. Á., Guzmán Merino A., Fraile-Martínez O., Recio-Ruiz J., Pekarek L., G Guijarro L., García-Honduvilla N., Álvarez-Mon M., Buján J., García-Gallego S., Dendrimers and Dendritic Materials: From Laboratory to Medical Practice in Infectious Diseases, *Pharmaceutics*, 2020; **12** (9): 874.