

NANOTEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA ZDRAVLJENJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

NANOTECHNOLOGY- BASED APPROACHES FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

AVTORJI / AUTHORS:

dr. Sebastjan Nemeč, mag. farm.¹
doc. dr. Damijan Knez, mag. farm.²
izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.²
doc. dr. Slavko Kralj, mag. farm.^{1,2}

¹ *Institut Jožef Stefan, Odsek za sintezo materialov,
Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenija*

² *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: sebastjan.nemec@ijs.si



POVZETEK

Alzheimerjeva bolezen je neozdravljiva neurodegenerativna bolezen, za katero je značilno propadanje živčnih celic in izguba kognitivnih funkcij. Trenutno odobrena zdravila naslavljajo predvsem simptome bolezni. Številne nove potencialne zdravilne učinkovine, ki vplivajo tudi na potek bolezni, pa so se v kliničnih raziskavah izkazale kot sorazmerno neuspešne. S tem razlogom v središče raziskav prihajajo novi pristopi zdravljenja Alzheimerjeve bolezni, ki temeljijo na uporabi nanotehnologije. Izvedena je bila že vrsta raziskav, v katerih so proučevali vplive različnih nanodelcev na tarče, povezane z nastankom in razvojem te bolezni. Proučevali so učinke polimernih nanodelcev, nanodelcev zlata ter železovega oksida na samozdruževanje monomerov amiloida β in proteina tau v agregate, kot tudi uporabo omenjenih nanodelcev za razgradnjo že nastalih agregatov proteinov. Izsledki teh raziskav predstavljajo pomembno izhodišče za nadaljnje raziskave in razvoj nanotehnoloških pristopov za razgradnjo agregiranih proteinskih struktur in razvoj novih možnosti zdravljenja različnih bolezni, ki jih povezujemo s patološkim nastajanjem proteinskih agregatov.

KLJUČNE BESEDE:

Alzheimerjeva bolezen, amiloid β , nanodelci, nanotehnologija, protein tau

ABSTRACT

Alzheimer's disease is an incurable neurodegenerative disease characterized by the degeneration of neurons and the deterioration of cognitive functions. The currently approved drugs primarily address the symptoms of the disease and potential new drugs have been relatively unsuccessful in clinical trials. Due to the failure of these new agents, new approaches to treating Alzheimer's disease have come to the forefront of research, including approaches from the field of nanotechnology. There is already a number of studies where the effect of mainly polymer, gold, and iron oxide nanoparticles in preventing the self-aggregation of amyloid β monomers and tau protein is investigated. In addition, these nanoparticles are also being investigated for their ability to disaggregate already formed aggregates of amyloid β and tau protein. The available research

provides a baseline for further investigation of nanotechnological processes for the development of new treatment options for various diseases, in addition to Alzheimer's, that are associated with pathological protein aggregation.

KEY WORDS:

Alzheimer's disease, amyloid β , nanoparticles, nanotechnology, tau protein

1 UVOD

Kopičenje netopnih agregatov proteinov v tkivih povezuje mo z različnimi bolezenskimi stanji (1). Takšni netopni agregati so značilno prisotni tudi v različnih tkivih pri številnih neurodegenerativnih boleznih (2). Kljub intenzivnemu raziskovanju in iskanju novih potencialnih zdravilnih učinkovin v zadnjih desetletjih, trenutno razpoložljive terapevtske možnosti le omilijo simptome neurodegenerativnih bolezni in do določene mere upočasnijo njihovo napredovanje, medtem ko ne vplivajo na njihove vzroke ali razvoj bolezni. Vzrokov za nastanek agregatov, ki so lahko v tkivih tudi normalno prisotni, je več. Njihovo nastajanje je kompleksen proces, na katerega vpliva preplet različnih celičnih, (pato)fizioloških in okoljskih dejavnikov. Le-ti povzročijo nepravilnosti v konformaciji proteinov, kar vodi v njihovo agregiranje in kopičenje (3). Tak primer je Alzheimerjeva bolezen (AB), ki je neozdravljiva neurodegenerativna bolezen. Povezana je s poškodbami možganskega tkiva kot posledica počasi napredujočega propadanja nevronov ter porušenega ravnovesja izločanja živčnih prenašalcev. Eden izmed najzgodnejših znakov AB je izguba kratkoročnega spomina, nadaljnje propadanje živčnih celic pa poleg napredujočega upada kognitivnih sposobnosti privede tudi do zmanjšanja sposobnosti opravljanja najbolj osnovnih telesnih in življenjskih funkcij (3).

2 DIAGNOSTIKA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Diagnostika AB je kompleksna in temelji na več metodah. Običajno se postavljanje diagnoze prične s temeljitim zdrav-

niškim pregledom, kjer se za oceno stanja motenj v kognitivnih sposobnostih uporabljajo standardizirani testi, kot je kratek preizkus spoznavnih sposobnosti (angl. *Mini-Mental Status Examination*, MMSE) in lestvica za oceno kognitivnih sposobnosti bolnikov z AB (angl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive*, ADAS-Cog) (4–7). Poleg tega se za diagnostiko uporabljajo laboratorijske preiskave, ki temeljijo na določanju koncentracije amiloida β in proteina tau v cerebrospinalni tekočini (angl. *cerebrospinal fluid*, CSF), ter slikanje možganskega tkiva z magnetno resonanco in s pozitronsko emisijsko tomografijo z uporabo radioaktivnega označevalca ^{18}F fluorodeoksiglukoza (8). Pri bolnikih z AB je koncentracija amiloida β v CSF običajno nižja za približno polovico v primerjavi z osebami enake starosti brez znakov AB (9, 10). Koncentracija amiloida β v CSF se s staranjem fiziološko znižuje, kar naj bi bilo povezano z odlaganjem amiloida β v obliki netopnih amiloidnih plakov v možganskem tkivu. Koncentracija proteina tau v CSF je pri bolnikih z AB v večini primerov približno trikrat višja kot pri osebah enake starosti brez AB (9, 10).

3 HIPOTEZE O NASTANKU ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Uveljavljenih je več hipotez, ki opisujejo nastanek AB, med katerimi sta najširše sprejeti amiloidna hipoteza in hipoteza proteina tau. Amiloidna hipoteza predpostavlja, da nastanek in kopičenje agregatov amiloida β v možganskem tkivu povzroči napredujoč propad živčnih celic in razvoj značilne klinične slike AB (11, 12). Kopičenje agregatov amiloida β se pojavi zaradi prekomernega nastajanja monomerov amiloida β in zaradi motenj v odstranjevanju nastalih amiloidnih struktur. Monomeri amiloida β so neke vrste nukleacijska jedra, na katera se z nadaljnjim samozdruževanjem odloži še več monomerov. To vodi v nastanek kratkih topnih oligomerov, ki nadalje spontano rastejo v daljše fibrile amiloida β . Te zrele fibrile amiloida β so netopne frakcije, ki se odlagajo v možganskem tkivu v obliki večjih agregatov, t. i. amiloidnih plakov (13). Amiloidno hipotezo potrjujejo določene dedne mutacije genov, ki pri nosilcih teh mutacij povzročijo motnje v metabolizmu amiloida β in vodijo v pojav t. i. družinske oblike AB (14). Amiloidni plaki so značilno prisotni v možganskem tkivu pri večini bolnikov z AB (15). Ugotovili so, da ima tudi sicer skoraj polovica zdravih ljudi, starejših od 70 let, ki nimajo težav s spominom, v možganskem tkivu prisotne netopne amiloidne plake (15). Te

ugotovitve torej nakazujejo, da amiloidna hipoteza ne pojasni nastanka AB v celoti in da so verjetno še drugi mehanizmi vpleteni v nastanek te bolezni. Od svoje uveljavitve je bila amiloidna hipoteza glavno vodilo pri načrtovanju in usmerjanju raziskav na področju AB (16).

Zaradi neuspeha številnih kliničnih študij z učinkovinami, ki ciljajo različne terapevtske tarče v kaskadi reakcij nastanka in odlaganja amiloida β (17), so se amiloidni hipotezi pridružile še druge hipoteze nastanka AB (18). Ob bok amiloidni hipotezi so v zadnjih 20 letih postavili hipotezo proteina tau (19, 20). Tau je znotrajcelični protein, ki stabilizira strukturo mikrotubulov v citoskeletu živčnih celic. Vežavo proteina tau na mikrotubule nadzoruje stopnja fosforilacije tirozinskih aminokislinskih ostankov v strukturi tega proteina. Hiperfosforilacija proteina tau vodi v disociacijo letga z mikrotubulov. To zmanjša stabilnost mikrotubulov in povzroči njihovo razgradnjo ter posledično privede do okvar v aksonskem transportu. Hiperfosforiliran protein tau agregira in tvori netopne znotrajcelične pentlje, kar okvari znotrajcelični transport snovi in vodi v propad živčnih celic. Znotrajcelične pentlje proteina tau v možganskem tkivu so poleg agregatov amiloida β značilno prisotne pri AB. Količina prisotnih pentelj proteina tau sovпада s stopnjo napredovanja AB in stopnjo upada kognitivnih funkcij. Glede na obseg izvedenih raziskav in zbranih ugotovitev je danes hipoteza proteina tau sprejeta kot osnova mehanizma nastanka AB v enaki meri kot amiloidna hipoteza (21). Številne raziskave nakazujejo na povezave med amiloidnim prekursorskim proteinom (angl. *Amyloid Precursor Protein*, APP), agregati amiloida β in nastankom pentelj proteina tau. Povečana količina APP in agregatov amiloida β lahko pospeši fosforilacijo in samozdruževanje proteina tau ter nastanek znotrajceličnih pentelj proteina tau in posledično vodi v hitrejši propad živčnih celic (21).

4 ZDRAVILNE UČINKOVINE ZA ZDRAVLJENJE ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Odobrena in najbolj široko uporabljana zdravila, ki so na voljo za zdravljenje AB, vsebujejo zdravilne učinkovine, ki zgolj upočasnijo njeno napredovanje in izboljšajo kognitivne sposobnosti bolnikov predvsem v začetnih stadijih bolezni (22). Delujejo na podlagi povečanja prenosa signala med še delujočimi živčnimi celicami in zmanjševanja neravnovesja med živčnimi prenašalci, ki je posledica napredujočega propadanja nevronov. V klinični uporabi sta dve sku-

pini zdravilnih učinkovin, in sicer zaviralci holin esteraz in antagonisti receptorjev za prenašalec *N*-metil-D-aspartat (NMDA) (23). Zaviralci holin esteraz, kot so rivastigmin, donepezil in galantamin, zmanjšajo razgradnjo acetilholina in posledično povečajo njegovo koncentracijo v sinapsah ter tako ojačajo prenos signalov med še delujočimi živčnimi celicami, kar nekoliko izboljša umske sposobnosti bolnikov v zgodnjih stadijih AB. Druga skupina učinkovin, primer je memantin, zavira delovanje receptorjev NMDA. V možganskem tkivu bolnikov z AB je lahko prisotna višja koncentracija živčnega prenašalca glutamata kot pri ljudeh brez AB, kar je posledica okvarjenih mehanizmov odstranjevanja glutamata iz sinaps živčnih celic (24). Zadrževanje glutamata v sinapsah povzroči stalno aktivacijo receptorjev NMDA, kar privede do t. i. ekscitotoksičnosti in propada nevronov zaradi prekomerno povišane koncentracije kalcija v sinapsah živčnih celic. Učinkovina memantin zavira prekomerno aktivacijo receptorjev NMDA in tako upočasnjuje propad nevronov zaradi ekscitotoksičnosti. Omejitev pri uporabi obeh razredov zdravilnih učinkovin, ki sta danes v uporabi, so številni neželeni učinki (23, 24).

V kliničnih preskušanjih so številne nove potencialne zdravilne učinkovine, ki so bodisi male molekule, kratki peptidi ali specifična protitelesa, ki ciljajo različne stopnje v kaskadi reakcij nastanka in kopičenja amiloida β . Takšni primeri so (i) zaviralci sekretaz β in γ ter modulatorji sekretaz α in γ za zmanjšanje nastanka monomerov amiloida β , (ii) zaviranje agregiranja monomerov amiloida β s sciloinozitolom in (iii) specifični kratki peptidi za zaviranje agregacije amiloida β in razgradnjo amiloidnih plakov (25–31). V predkliničnih in kliničnih raziskavah so tudi številna monoklonska protitelesa, ki ciljajo in pospešijo odstranjevanje amiloida β iz možganskega tkiva bolnikov z AB (32). Dvema protitelesoma, adukanumab in lekanemab, je Ameriški urad za zdravila in prehrano (FDA) odobril uporabo za zdravljenje AB (33), medtem ko Evropska agencija za zdravila klinične uporabe ni odobrila (34). Zaradi slabe učinkovitosti zdravljenja AB in neželenih učinkov se je adukanumab leta 2024 umaknil s trga (35). Julija 2024 je FDA za zdravljenje AB odobril monoklonsko protitelo donanemab, ki je v kliničnih študijah učinkovito zavrlo napredovanje AB ter statistično pomembno izboljšalo kognitivne sposobnosti bolnikov (36).

Poleg učinkovin, ki vplivajo na amiloid β , so v različnih fazah kliničnih preskušanj tudi učinkovine z (i) delovanjem na hiperfosforilacijo proteina tau in nastanek znotrajceličnih pentelj proteina tau, (ii) kelatorji kovinskih ionov, (iii) protivnetne učinkovine in (iv) različne snovi z antioksidativnim delovanjem (37–40). Raziskave *in vitro* so pokazale tudi nevroprotektivno delovanje snovi, ki jih vnašamo s hrano,

kot so različni polifenoli, kvercetin, resveratrol in kurkumin (38–40). Kljub obetavnim rezultatom raziskav *in vitro* je pomembna pomanjkljivost navedenih snovi njihova nizka biološka uporabnost in omejeno prehajanje krvno-možganske pregrade (37–40).

5 IZBRANI NANOTEHNOLOŠKI PRISTOPI DELOVANJA NA AGREGATE PROTEINOV

Zaradi številnih neuspehov učinkovin v kliničnih preskušanjih, kljub njihovim vzpodbudnim rezultatom *in vitro*, prihajajo v ospredje raziskav alternativni pristopi zdravljenja AB. Del raziskav se je tako usmeril v razvoj nanotehnoloških pristopov za zaviranje samozdruževanja monomerov amiloida β in proteina tau v večje strukture in razgradnjo netopnih agregatov amiloida β na manjše strukture, kar bi lahko pospešilo njihovo izločanje iz možganskega tkiva (41, 42). V nadaljevanju so predstavljeni izbrani primeri nanotehnoloških pristopov, kjer izzive, povezane z zdravljenjem AB, naslavlja uporaba različnih vrst nanodelcev.

5.1 POLIMERNI NANODELCI

Uporaba polimernih nanodelcev je v biomedicinskih aplikacijah že dobro uveljavljena. Njihova priprava je natančno raziskana in se uspešno izvaja v industrijskem merilu. Primarno se polimerni nanodelci uporabljajo kot nanodostavni sistem zdravilnih učinkovin. V današnjem času se polimerni nanodelci proučujejo tudi za razvoj novih pristopov zdravljenja bolezni, kot je AB. Cabaleiro-Lago in sodelavci so v raziskavi *in vitro* dokazali, da polimerni nanodelci na osnovi zmesi poliakrilamidov zakasnjajo ter upočasnijo samozdruževanje monomerov amiloida β v kratke oligomere, pri čemer na nadaljnje podaljševanje že nastalih kratkih oligomerov v daljše oligomere in fibrile niso imeli vpliva (43). Ta fenomen so raziskovalci pripisali vezavi monomerov in oligomerov amiloida β na površino nanodelcev, kar je zmanjšalo možnosti samozdruževanja monomerov. S spreminjanjem razmerja med različnimi poliakrilamidi, iz katerih so pripravljali nanodelce, so vplivali na lastnosti površine nanodelcev, zlasti na njeno hidrofobnost. Dokazali so, da je zaviranje nastanka kratkih oligomerov učinkovitejše z nanodelci z manj hidrofobno površino zaradi več vodikovih vezi, ki se vzpostavijo med monomeri in kratkimi oligomeri amiloida β in površino nanodelcev. Jha in sodelavci so v podobni raziskavi *in vitro* uporabili nanodelce hitosana in

nanodelce na osnovi zmesi hitosana in kopolimera mlečne ter glikolne kisline (PLGA) (44). Nanodelci hitosana so upočasnili samozdruževanje monomerov amiloida β v oligomere amiloida β in inducirali segmentacijo že prisotnih fibril amiloida β . Nanodelci, pripravljene iz zmesi hitosana in PLGA, pa so v primerjavi z nanodelci hitosana šibkeje zavirali agregiranje monomerov amiloida β in razgradnjo fibril amiloida β , kar nakazuje na pomemben vpliv sestave in posledično lastnosti površine nanodelcev na učinkovitost razgradnje agregatov amiloida β (44).

Gao in sodelavci so v raziskavah *in vitro* ter *in vivo* na transgenih miših proučevali delovanje polimernih nanodelcev PLGA z oblogo na osnovi celične membrane eritrocitov (45). Na površino nanodelcev so vezali molekulo T807, ki je označevalec za slikanje s pozitronsko emisijsko tomografijo in selektivno cilja hiperfosforilirane proteine tau, v oblogo nanodelcev pa so vgradili kurkumin, ki ima antioksidativno in nevroprotektivno delovanje. V raziskavi *in vitro* na nevronih so pokazali selektivno vezavo hiperfosforiliranega proteina tau na nanodelce in zmanjšanje stopnje fosforilacije proteina. V nadaljevanju so proučevali porazdeljevanje nanodelcev pri miših kot tudi njihovo prehajanje skozi krvno-možgansko pregrado ter sočasno vrednotili sproščanje vgrajenega kurkumina. V možganskem tkivu miši so opazili zmanjšanje koncentracije hiperfosforiliranega proteina tau in zmanjšanje propada živčnih celic ter izboljšanje kognitivnih sposobnosti miši (45).

Saleem in sodelavci so proučevali nevroprotektivni učinek nanodelcev hitosana z vgrajenim krisinom na modelu AB z zarodki rib cebric (46). Krisin je flavon z antioksidativnim in nevroprotektivnim delovanjem, njegovo učinkovitost pa omejuje predvsem slabo prehajanje krvno-možganske pregrade. V raziskavi so krisin vgradili v nanodelce hitosana in tako povečali koncentracijo le-tega v možganskem tkivu zarodkov rib cebric. Dokazali so zaščitno delovanje krisina na nevrone pred nevrotoksičnimi učinki agregatov amiloida β , manjšo prisotnost agregatov amiloida β v možganskem tkivu, izboljšanje kognitivnih sposobnosti in spomina ter sinaptične funkcije na modelu AB (46).

Raziskave dokazujejo, da polimerni nanodelci vplivajo na procese fibrilacije in tvorbe agregatov amiloida β . Poleg tega lahko polimerni nanodelci razgrajujejo tudi že nastale agregate amiloida β v manjše topne frakcije. Učinkovitost zaviranja fibrilacije in razgradnje amiloida β je odvisna od interakcij med polimernimi nanodelci in strukturami amiloida β , pri čemer so te interakcije odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev. Te lastnosti lahko uravnavamo s kemijsko sestavo nanodelcev in funkcionalizacijo njihove površine. Nadalje, z vezavo ustreznih specifičnih afinitetnih li-



gandov na površino nanodelcev lahko dosežemo njihovo ciljno vezavo in tarčno učinkovanje na strukture amiloida β . Polimerni nanodelci so lahko tudi nanodostavni sistem za učinkovine z nevroprotektivnim delovanjem, ki sicer izkazujejo slabo biološko uporabnost (43–46).

5.2 NANODELCI IN NANOPALČKE ZLATA

Poleg polimernih nanodelcev se za preprečevanje agregacije amiloida β in proteina tau ter razgradnje fibril amiloida β proučujejo tudi anorganske nanodelce, kot so nanodelci zlata in železovega oksida. Nanodelci zlata, kot tudi nanopalčke zlata, se na področju AB proučujejo za razgradnjo agregatov amiloida β . Kogan in sodelavci so dosegli razgradnjo fibril amiloida β s fototermičnim učinkom nanopalčk zlata v raziskavi *in vitro* (47). Pri obsevanju nanopalčk zlata s svetlobo v bližnjem infrardečem območju le-te sproščajo toploto. Graf na sliki 1A prikazuje fluorescenco ThT amiloida β in nanopalčk zlata po osvetlitvi s svetlobo valovne dolžine 808 nm. Osvetlitev fibril amiloida β s svetlobo valovne dolžine 808 nm v prisotnosti nanopalčk zlata povzroči zmanjšanje intenzitete fluorescenc ThT, kar nakazuje razgrajevanje fibril amiloida β . Posnetka presečne elektronske mikroskopije (TEM) na sliki 1A prikazujeta fibrile amiloida β z adsorbiranimi nanopalčkami zlata. V nadaljnjih poskusih na nevronih *in vitro* so proučevali vpliv fibril amiloida β in vpliv fragmentov agregatov amiloida β na živost nevronov, pri čemer so ugotovili, da nanopalčke zlata niso zmanjšale živosti celic, fragmenti agregatov amiloida β pa so bili v primerjavi s zreliimi fibrilami amiloida β manj toksični. Poskusi so pokazali tudi, da razgradnja agregatov amiloida β , ki so jo dosegli z nanopalčkami zlata in osvetlitvijo z bližnjo infrardečo svetlobo, ni imela vpliva na živost celic (47). V podobni raziskavi so Lin in sodelavci dosegli toplotno razgradnjo fibril amiloida β z uporabo nanopalčk zlata z na površini vezanimi molekulami polietilenglikola in osvetlitvijo s pulzno lasersko svetlobo z valovno dolžino 800 nm (48). Graf na sliki 1B prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida β in nanopalčk zlata po izpostavitvi laserski svetlobi. Izpostavitve fibril amiloida β laserski svetlobi v prisotnosti nanopalčk zlata povzroči zmanjšanje fluorescenc ThT, kar nakazuje razgradnjo fibril amiloida β . Uporaba pulznega načina osvetlitve za razgradnjo fibril amiloida β je bila učinkovitejša od stalne osvetlitve. Avtorji raziskave so razgradnjo fibril amiloida β potrdili tudi z mikroskopijo na atomsko silo (slika 1B). Z raziskavami *in vitro* na nevronih so pokazali, da toksičnost nastalih fragmentov agregatov amiloida β ni večja od toksičnosti zrelih fibril amiloida β , hkrati pa je tok-

sičnost nastalih fragmentov agregatov bistveno manjša od toksičnosti topnih frakcij, t.i. oligomerov amiloida β . Rezultati raziskave dokazujejo, da toplotna razgradnja fibril amiloida β z nanopalčkami zlata ne privede do nastanka oligomerov amiloida β , ki izkazujejo večjo toksičnost na živčne celice v primerjavi s fragmenti agregatov amiloida β (48).

5.3 NANODELCI ŽELEZOVEGA OKSIDA

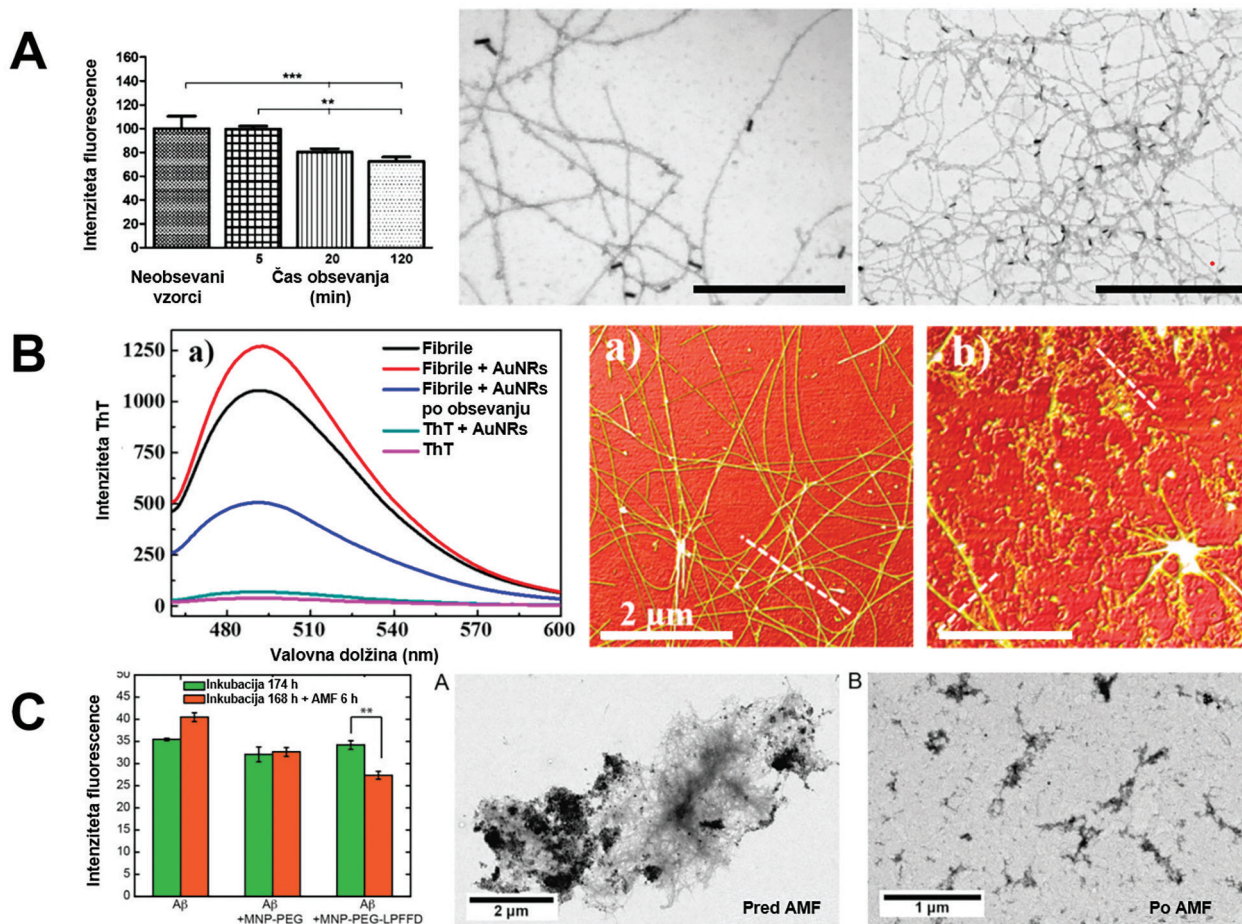
Nanodelci železovega oksida so se že uveljavili v klinični uporabi kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco in kot zdravilna učinkovina za zdravljenje določenih vrst anemij. Nanodelce železovega oksida odlikujejo nizka toksičnost, biokompatibilnost, dobra magnetna odzivnost in možnost raznolike funkcionalizacije njihove površine. Loynachan in sodelavci so v raziskavi dosegli toplotno razgradnjo fibril amiloida β na manjše koščke z uporabo magnetnih nanodelcev železovega oksida in uporabo magnetne hipertermije (49). Nanodelci železovega oksida se v izmeničnem magnetnem polju pri visoki frekvenci (> 100 kHz) segrejejo in posledično oddajajo toploto v bližnjo okolico. Selektivno ciljanje fibril amiloida β so raziskovalci v raziskavi dosegli z vezavo specifičnega kratkega peptida LPFFD na površino magnetnih nanodelcev. Dodatno so sterično stabilizacijo nanodelcev železovega oksida v disperziji dosegli z vezavo molekul polietilenglikola. Graf na sliki 1C prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida β in nanodelcev železovega oksida po izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju (oranžni stolpci). Zeleni stolpci prikazujejo fluorescenco ThT kontrolnih vzorcev z enako sestavo in brez izpostavitve izmeničnemu magnetnemu polju. Izpostavitve fibril amiloida β izmeničnemu magnetnemu polju v prisotnosti nanodelcev železovega oksida privede do zmanjšanja intenzitete fluorescenc ThT zaradi razgrajevanja fibril amiloida β . Avtorji raziskave so razgrajevanje amiloida β z nanodelci železovega oksida dodatno pokazali s TEM (slika 1C). V nadaljevanju raziskave *in vitro* so na nevronih proučevali nevrotoksičnost fibril v prisotnosti nanodelcev železovega oksida in izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju. Raziskave so pokazale, da razgradnja fibril amiloida β z magnetnimi nanodelci zmanjša celično smrt nevronov (49).

5.4 NANODELCI GRAFENA

Nanodelce grafena intenzivno proučujejo za uporabo v biomedicini zaradi njihovih številnih uporabnih lastnosti, kot so biokompatibilnost, kemijska stabilnost, protimikrobno in antioksidativno delovanje ter možnost enostavne

funkcionalizacije njihove površine (50). Prav tako se na področju AB proučuje učinek nanodelcev grafena na nastanek agregatov amiloida β in pentelj proteina tau. Zhu in sode-

lavci so pokazali zaviralni učinek nanodelcev grafena na nastanek pentelj proteina tau (51). Nanodelci grafena so prehajali krvno-možgansko pregrado in so preprečili sa-



Slika 1: Prikaz izbranih primerov intaktnih in razgrajenih struktur amiloida β z različnimi nanotehnološkimi pristopi. A) Graf prikazuje fluorescenco tioflavin T (ThT) amiloida β in nanopalčk zlata (AuNRs) po osvetlitvi s svetlobo pri 808 nm. Na posnetkih s presevnega elektronskega mikroskopa (TEM) so fibrile amiloida β z adsorbiranimi nanopalčkami zlata. Merilo: 500 nm. Prirjeno po (47). B) Graf prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida β in nanopalčk zlata po izpostavitvi laserski svetlobi. Posnetka z mikroskopom na atomsko silo (AFM) prikazujeta fibrile amiloida β pred izpostavitvijo laserski svetlobi (sredina) in ostanke fibril amiloida β po izpostavitvi laserski svetlobi (desno). Merilo: 2 μ m. Prirjeno po (48). C) Graf prikazuje fluorescenco ThT fibril amiloida β in nanodelcev železovega oksida z vezanim peptidom LPFFD (MNP-PEG-LPFFD) in brez (MNP-PEG) po izpostavitvi izmeničnemu magnetnemu polju (AMF). Posnetka TEM prikazujeta fibrile amiloida β z adsorbiranimi nanodelci železovega oksida pred in po izpostavitvi AMF. Merilo: 2 μ m (sredina) in 1 μ m (desno). Prirjeno po (49). **Figure 1:** Overview of selected examples of intact and disrupted amyloid β structures using various nanotechnological approaches. A) The chart shows thioflavin T (ThT) fluorescence of amyloid β and gold nanorods (AuNRs) samples after irradiation with light at 808 nm. The transmission electron microscope (TEM) images show amyloid β fibrils with attached gold nanorods. Scale bars: 500 nm. Adopted from (47). B) The chart shows ThT fluorescence of amyloid β fibrils after laser treatment in the presence of gold nanorods. The atomic force microscope (AFM) images show amyloid β fibrils before (middle) and after laser irradiation (right). Scale bars: 2 μ m. Adopted from (48). C) The chart shows the ThT fluorescence of amyloid β and iron oxide nanoparticles with (MNP-PEG-LPFFD) and without (MNP-PEG) surface-attached targeting peptides before and after exposure to an alternating magnetic field (AMF). The TEM images show amyloid β fibrils with attached iron oxide nanoparticles before and after exposure to AMF. Scale bars: 2 μ m (middle) and 1 μ m (left). Adopted from (49).



mozduževanje monomerov proteina tau in posledično nastanek pentelj proteina tau. Avtorji so tudi pokazali, da lahko nanodelci grafena razgradijo že nastale pentlje proteina tau s tvorbo interakcij π - π , ki se vzpostavijo med nanodelci grafena in proteinom tau v pentljah (51).

6 PREDNOSTI IN SLABOSTI UPORABE NANODELCEV NA PODROČJU ZDRAVLJENJA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

Dostava zdravilnih učinkovin in vstop nanodelcev v možgansko tkivo je svojevrsten izziv, saj možgansko tkivo obdaja krvno-možganska pregrada, ki jo lahko prehajajo plini, majhne in relativno lipofilne organske molekule in molekule, kot so na primer glukoza, peptidi in proteini, ki se preko pregrade prenašajo s specifičnimi prenašalci (52). Za potencialno uporabo nanodelcev pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni je pomemben njihov učinkovit prehod iz krvnega obtoka v centralni živčni sistem, kar pa krvno-možganska pregrada otežuje ali celo preprečuje (52). Na prehod nanodelcev preko krvno-možganske pregrade vpliva več dejavnikov, kot so njihova velikost in oblika ter lastnosti njihove površine (52, 53). Njihov prehod lahko izboljšamo z vezavo specifičnih molekul na površino nanodelcev, kot so različne površinsko aktivne snovi, apolipoproteini, transferin in specifični peptidi, ki omogočijo prehajanje pregrade s pomočjo specifičnih prenašalcev, ki so tam naravno prisotni (53). Druga možnost za doseganje terapevtske koncentracije nanodelcev v možganskem tkivu je njihova neposredna intrakranialna aplikacija, kar pa je zelo invaziven pristop (54). Prednosti polimernih nanodelcev so dobro raziskane metode njihove priprave in enostavne funkcionalizacije, medtem ko so zlasti nanopalčke zlata zanimive zaradi zmožnosti sproščanja toplote ob osvetlitvi z bližnjo infrardečo svetlobo, ki prodira globoko v človeško tkivo. Tako s polimernimi nanodelci kot tudi z nanopalčkami zlata so raziskovalci uspešno dosegli razgradnjo fibril in agregatov amiloida β oziroma preprečili združevanje monomerov amiloida β v fibrile in agregate. Magnetne nanodelce železovega oksida pa lahko brezstično usmerjamo na daljavo z zunanjim magnetnim poljem.

Kljub obetavnim rezultatom raziskav *in vitro* je uporaba nanodelcev v razvoju novih načinov zdravljenja AB še v začetni fazi. Glavni izzivi, ki jih bo potrebno nasloviti pred uporabo nanodelcev za zdravljenje AB, so: (i) izboljšanje dostave nanodelcev v možgansko tkivo, (ii) zagotavljanje varnosti

uporabe nanodelcev, (iii) ugotavljanje njihovega (dolgoročnega) vpliva na zdravje bolnikov, (iv) ugotavljanje prisotnosti morebitnih neželenih učinkov nanodelcev v netarčnih tkivih ter (iv) raziskave absorpcije, porazdeljevanja, metabolizma in izločanja nanodelcev iz telesa (določitev farmakokinetičnih lastnosti nanodelcev). Poleg tega bo potrebno vzpostaviti ustrezno regulativo, ki bo definirala fizikalno-kemijske parametre nanodelcev za uporabo pri zdravljenju AB in tudi drugih bolezni.

7 SKLEP

Uporaba nanodelcev se v zadnjih letih raziskuje kot perspektivni pristop zdravljenja AB. Dosedanje raziskave so pokazale, da lahko različni nanodelci zavirajo agregiranje amiloida β oziroma povzročijo razgradnjo že nastalih amiloidnih plakov v manjše fragmente. Trenutno so za namen razvoja novih terapij zdravljenja AB v središču raziskav polimerni nanodelci in nanodelci oziroma nanopalčke zlata. V številnih predkliničnih raziskavah so potrdili uspešno razgradnjo fibril amiloida β v manjše fragmente in pokazali, da so manjši fragmenti amiloida manj citotoksični za nevronske celice v primerjavi z zreliimi fibrilami amiloida β . Preostale vrste anorganskih nanodelcev so trenutno v raziskavah novih terapevtskih pristopov AB precej redko zastopane.

Kljub številnim odprtim izzivom je potencial uporabe nanodelcev za zdravljenje AB velik. Nadaljnje raziskave bodo verjetno usmerjene v razvoj novih vrst nanodelcev z ustrežno velikostjo, obliko, koloidno stabilnostjo in ustreznimi fizikalnimi lastnostmi za učinkovito preprečevanje agregacije amiloida β ali proteina tau in za doseganje učinkovite razgradnje plakov amiloida β ali pentelj proteina tau. Potrebne bodo nadaljnje poglobljene raziskave za boljše in celovitejše razumevanje interakcij med nanodelci in amiloidom β ali proteinom tau, kar bo osnova za doseganje večje učinkovitosti in varnosti uporabe nanodelcev za zdravljenje AB.

8 IZJAVA

Delo je nastalo s financiranjem s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike

Slovenije (ARIS) v okviru raziskovalnih programov P2-0089, P1-0208 in P1-0420, projektov ARIS J2-60047, J2-3043, J3-3079, J7-4420, L2-60141 in bilateralnih projektov ARIS BI-FR/23-24-PROTEUS-005 (PR-12039) in BI-RS/23-25-030 (PR-12782).

9 LITERATURA

1. Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci.* 1995;20(11):456–9.
2. Koo EH, Lansbury J, Kelly JW. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(18):9989–90.
3. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2021;7(1):1–21.
4. Clinic M. Learn how Alzheimer's is diagnosed [Internet]. Mayo Clinic. 2019. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>
5. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2021;8(3):371–86.
6. Arevalo-Rodriguez I, Smalagic N, Roqué-Figuls M, Ciapponi A, Sanchez-Perez E, Giannakou A, et al. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the early detection of dementia in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Jul 27;2021(7).
7. Kueper JK, Speechley M, Montero-Odasso M. The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations. A Narrative Review. *J Alzheimer's Dis.* 2018;63(2):423–44.
8. Ferreira LK, Busatto GF. Neuroimaging in Alzheimer's disease: Current role in clinical practice and potential future applications. *Clinics.* 2011;66:19–24.
9. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003 Oct;2(10):605–13.
10. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, Yamaguchi H, Urakami K, Park JM, et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1999;270(2):91–4.
11. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's Disease: The Amyloid Alzheimer's disease. *Science.* 1992;256(5054):184–5.
12. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry.* 2021;26(10):5481–503.
13. Ullah R, Park TJ, Huang X, Kim MO. Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery. *Ageing Res Rev.* 2021;71:101451.
14. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(1):1–21.
15. Kirkitadze MD, Bitan G, Teplow DB. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: The emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res.* 2002;69(5):567–77.
16. Karran E, Mercken M, Strooper B De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9).
17. Asher S, Priefer R. Alzheimer's disease failed clinical trials. *Life Sci.* 2022;306(March):120861.
18. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018;7(1):1–7.
19. Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem.* 2017;139:153–67.
20. Bejanin A, Schonhaut DR, La Joie R, Kramer JH, Baker SL, Sosa N, et al. Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain.* 2017;140(12):3286–300.
21. Bloom GS. Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):505–8.
22. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis.* 2020;12:117957352090739.
23. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain.* 2018;141(7):1917–33.
24. Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's Disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(4):1–16.
25. Cummings J, Lee G, Nahed P, Kamar MEZN, Zhong K, Fonseca J, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* 2022;8(1).
26. Kumar D, Ganeshpurkar A, Kumar D, Modi G, Gupta SK, Singh SK. Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead. *Eur J Med Chem.* 2018;148:436–52.
27. Panza F, Lozupone M, Solfrizzi V, Sardone R, Piccinini C, Dibello V, et al. BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(11):847–57.
28. F. Lichtenthaler S. Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(2):165–77.
29. Salloway S, Sperling R, Keren R, Porsteinsson AP, van Dyck CH, Tariot PN, et al. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology.* 2011 Sep 27;77(13):1253–62.
30. Neddenriep B, Calciano A, Conti D, Sauve E, Paterson M, Bruno E, et al. Short Peptides as Inhibitors of Amyloid Aggregation. *Open Biotechnol J.* 2012;5(1):39–46.
31. Stark T, Lieblein T, Pohland M, Kalden E, Freund P, Zangl R, et al. Peptidomimetics That Inhibit and Partially Reverse the Aggregation of A β 1-42. *Biochemistry.* 2017;56(36):4840–9.
32. Lacorte E, Ancidoni A, Zaccaria V, Remoli G, Taricotti L, Bellomo G, et al. Safety and Efficacy of Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Published and Unpublished Clinical Trials. *Journal of Alzheimer's Disease [Internet].* 2022 Mar 5;87(1):101–29.
33. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016;537(7618):50–6.



34. Aduhelm | European Medicines Agency [Internet]. www.ema.europa.eu. 2024 Jul 2; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/aduhelm>
35. Development and sale of Alzheimer's drug, aducanumab, ceased - Alzheimer's Research UK [Internet]. Alzheimer's Research UK. 2024. Available from: <https://www.alzheimersresearchuk.org/news/development-and-sale-of-alzheimers-drug-aducanumab-ceased/>
36. 4.Research C for DE and. FDA approves treatment for adults with Alzheimer's disease. FDA [Internet]. 2024 Jul 2; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-adults-alzheimers-disease>
37. Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(7):399–415.
38. Voulgaropoulou SD, van Amelsvoort TAMJ, Prickaerts J, Vingerhoets C. The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: A systematic review of pre-clinical and clinical studies. *Brain Res*. 2019;1725(June):146476.
39. Komorowska J, Wątroba M, Szukiewicz D. Review of beneficial effects of resveratrol in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *Adv Med Sci*. 2020;65(2):415–23.
40. Khan H, Ullah H, Aschner M, Cheang WS, Akkol EK. Neuroprotective effects of quercetin in alzheimer's disease. *Biomolecules*. 2020;10(1).
41. Gupta J, Fatima MT, Islam Z, Khan RH, Uversky VN, Salahuddin P. Nanoparticle formulations in the diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. *Int J Biol Macromol*. 2019;130:515–26.
42. Huang Y, Chang Y, Liu L, Wang J. Nanomaterials for modulating the aggregation of β -amyloid peptides. Vol. 26, *Molecules*. 2021.
43. Cabaleiro-Lago C, Quinlan-Pluck F, Lynch I, Lindman S, Minogue AM, Thulin E, et al. Inhibition of amyloid β protein fibrillation by polymeric nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2008;130(46):15437–43.
44. Jha A, Ghormade V, Kolge H, Paknikar KM. Dual effect of chitosan-based nanoparticles on the inhibition of β -amyloid peptide aggregation and disintegration of the preformed fibrils. *J Mater Chem B*. 2019;7(21):3362–73.
45. Gao C, Chu X, Gong W, Zheng J, Xie X, Wang Y, et al. Neuron tau-targeting biomimetic nanoparticles for curcumin delivery to delay progression of Alzheimer's disease. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):1–23.
46. Saleem S, Banerjee R, Rajesh Kannan R. Chrysin-Loaded Chitosan Nanoparticle-Mediated Neuroprotection in $A\beta$ 1–42 - Induced Neurodegenerative Conditions in Zebrafish. *ACS Chem Neurosci*. 2022 Jul 6;13(13):2017–34.
47. Adura C, Guerrero S, Salas E, Medel L, Riveros A, Mena J, et al. Stable conjugates of peptides with gold nanorods for biomedical applications with reduced effects on cell viability. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(10):4076–85.
48. Lin D, He R, Li S, Xu Y, Wang J, Wei G, et al. Highly Efficient Destruction of Amyloid- β Fibrils by Femtosecond Laser-Induced Nanoexplosion of Gold Nanorods. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7(12):1728–36.
49. Loynachan CN, Romero G, Christiansen MG, Chen R, Ellison R, O'Malley TT, et al. Targeted Magnetic Nanoparticles for Remote Magnetothermal Disruption of Amyloid- β Aggregates. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(14):2100–9.
50. Li J, Zeng H, Zeng Z, Zeng Y, Xie T. Promising Graphene-Based Nanomaterials and Their Biomedical Applications and Potential Risks: A Comprehensive Review. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021 Nov 8;7(12):5363–96.
51. Zhu R, Makwana KM, Zhang Y, Rajewski BH, Del Valle JR, Wang Y. Blocking tau transmission by biomimetic graphene nanoparticles. *J Mater Chem B*. 2023;11(31):7378–88.
52. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated Brain Drug delivery: Overcoming Blood–brain Barrier to Treat Neurodegenerative Diseases. *Journal of Controlled Release*. 2016 Aug;235:34–47.
53. Lombardo SM, Schneider M, Türeli AE, Türeli NG. Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2020 Jun 4;11(1):866–83.
54. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2007;81(1):53–60.