

Nanotehnologija u neuroznanosti

Dragičević, Diana

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:881481>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Diana Dragičević

Nanotehnologija u neuroznanosti

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Diana Dragičević

Nanotehnologija u neuroznanosti

Završni rad

Mentor rada: doc. dr. sc. Jelena Ban

Završni rad obranjen je dana: 16.04.2019.

Pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Jelena Ban
2. prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić

Rad ima 47 stranica, 7 slika, 2 tablice i 42 literaturna navoda

SAŽETAK

Nanotehnologija je široko područje znanosti koje obuhvaća različite discipline, poput medicine, robotike ili farmacije. U posljednjih 20 godina primjena nanotehnologije i nanomaterijala u znanosti doživjela je eksponencijalan rast. Izuzetno važno područje primjene nanotehnologije je u neuroznanosti, a kritični osvrti na literaturu su veoma važni zbog toga što objedinjuju najnovije podatke iz tog područja.

Nanočestice su jedan od primjera primjene nanotehnologije kojim znanstvenici proučavaju i otkrivaju nove podatke o zbivanjima unutar mozga. Na temelju novih saznanja stvaraju se lijekovi kojima bi se u budućnosti mogle tretirati zasad neizlječive neurodegenerativne bolesti. Nadalje, u istraživanju ispostave lijekova, nanočestice se koriste kao prijevozno sredstvo lijeku kako bi ga dovele na točno određeno mjesto koje treba tretirati. Jedna od velikih prednosti koje nanotehnologija pruža istraživanjima u neuroznanosti jest mogućnost prolaska nanočestica kroz krvno-moždanu barijeru te razne vrste nanočestica koje bi mogle poslužiti kao prijenosnici lijekova. One mogu biti sačinjene od jedne vrste materijala ili biti kombinacija različitih materijala za što bolju prolaznost kroz krvno-moždanu barijeru. Također, nanočestice mogu poslužiti kao podloga za rast matičnih stanica ili mogu služiti kao prijenosnici za dostavu molekula do matičnih stanica i ciljano usmjeravanje njihove diferencijacije.

Jedno od novijih otkrića u neuroznanosti jest razumijevanje važnosti neuroinflamacije u nastanku i razvoju bolesti. Neuroinflamacija je tek nedavno postala predmetom istraživanja i to kada je dokazano da igra veliku ulogu u patogenezi neurodegenerativnih bolesti. Također, uključena je u nastup sekundarne ozljede nakon moždanog udara ili traumatske ozljede mozga te se zbog toga provode mnoga istraživanja u svrhu tretiranja kronične

neuroinflamacije mozga. U tu svrhu se mogu koristiti obrađene nanočestice koje omogućuju prijenos aktivne supstance do ciljanog mjesta u mozgu.

Iako je nanotehnologija procvala u zadnjih 20 godina, još uvijek postoje ozbiljni nedostaci koji predstavljaju prepreku u njenoj primjeni u kliničke svrhe. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi nanočestice postale sigurna i učinkovita metoda za prijenos lijekova do ciljanog mjesta. Naglasak bi se trebao staviti na *in vivo* istraživanja u zdravim („wild type“) životinjama koje imaju netaknutu krvno-moždanu barijeru.

Ključne riječi: nanočestice, krvno-moždana barijera, neuroinflamacija, matične stanice, dostava lijeka

SUMMARY

Nanotechnology is a wide area that encompasses various disciplines, such as medicine, robotics or pharmacy. In the last 20 years the use of nanotechnology and nanomaterials has exponentially grown. Extremely important area of nanotechnology application is in neuroscience and reviews such as this are important as they gather the latest data from this area.

Nanoparticles are one of the examples of nanotechnology application by which scientists study and discover new data about events in the brain. Based on these new findings, we can begin to make drugs that would treat so far incurable neurodegenerative diseases. Next, regarding the research of drug delivery, nanoparticles are used as the vehicles for the drug meant to deliver the drug to the exact place that needs to be treated. One of the main advantages of nanotechnology in neuroscience is the ability of nanoparticles to cross the blood-brain barrier and various species of nanoparticles that could serve as drug carriers. They can be made of a single material, or of a combination of several materials for an easier blood-brain barrier crossing. Also, nanoparticles can serve as a base for stem cell growth or they can act as a carrier to deliver molecules to the stem cells and aim their differentiation to a specific lineage.

One of the recent discoveries in neuroscience is the importance of neuroinflammation in the appearance and development of the disease. Neuroinflammation just recently became the topic of research because of the evidence suggesting its key role in pathogenesis of neurodegenerative diseases. It is also involved in the development of secondary injury after the stroke or a traumatic brain injury, which is why scientists are researching means of manipulating chronic neuroinflammation. Engineered nanoparticles can be used for that purpose for they serve as a transport of active substances to the target site in the brain.

Although nanotechnology has bloomed in the last 20 years, there are still serious disadvantages that slow down its clinical applications. More research is needed to make nanoparticles safe and effective method for transport of drugs to a target site. Main point should be *in vivo* research on healthy (“wild type”) animals that have an intact blood-brain barrier.

Keywords: nanoparticles, blood-brain barrier, neuroinflammation, stem cells, drug delivery

POPIS KRATICA

- AD** – Alzheimerova bolest (eng. Alzheimer's Disease)
- ALS** – amiotrofična lateralna skleroza (eng. Amyotrophic Lateral Sclerosis)
- AMT** – transport posredovan adsorpcijom (eng. Adsorptive-Mediated Transport)
- BBB** – krvno-moždana barijera (eng. Blood-Brain Barrier)
- BDNF** - moždani neurotrofni faktor (eng. Brain-Derived Neurotrophic Factor)
- CCL2** – eng. C-C motif Chemokine Ligand 2
- CCL5** – eng. C-C motif Chemokine Ligand 5
- CMT** – transport posredovan nosačima (eng. Carrier protein-Mediated Transport)
- CNS** – središnji živčani sustav (eng. Central Nervous System)
- CNTs** – ugljične nanocjevčice (eng. Carbon Nanotubes)
- CPP** – peptid koji prodire u stanicu (eng. Cell Penetrating Peptide)
- CS** – chitosan (eng. Chitosan)
- CSF** – cerebrospinalna tekućina (eng. Cerebro Spinal Fluid)
- Cur** – kurkumin (eng. Curcumin)
- CVD** – taloženje kemijskih para (eng. Chemical Vapor Deposition)
- DAMPs** – molekularni uzorci povezani s opasnošću (eng. Danger-Associated Molecular Patterns)
- DS** – dekstran sulfat (eng. Dextran Sulfate)
- ECM** – izvanstanični matriks (eng. ExtraCellular Matrix)
- ENPs** – inženjirane nanočestice (eng. Engineered Nanoparticles)
- ESC** – embrionalne matične stanice (eng. Embryonic Stem Cells)
- FUS** – fokusirani ultrazvuk (eng. Focused Ultrasound)

GAP43 – protein povezan s rastom (eng. Growth Associated protein 43)

GDNF – glijalni neurotrofni faktor (eng. Glial cell-Derived Neurotrophic Factor)

GFAP – eng. Glial Fibrillary Acidic Protein

GO – grafenov oksid (eng. Graphene Oxide)

GRM – materiali srodni grafenu (eng. Graphene Related Materials)

IGF1 – faktor rasta nalik inzulinu 1 (eng. Insulin-like Growth Factor 1)

ICM – unutaranja masa stanica (eng. Inner-Cell Mass)

IL-10 – interleukin 10

IL-12 – interleukin 12

IL-1 β – interleukin 1 β

IN - intranazalno

IP - intraperitonealno

iPSCs – inducirane pluripotentne matične stanice (eng. induced Pluripotent Stem Cells)

IV - intravenozno

Lf – laktoferin (eng. Lactoferrin)

LPs – liposomi (eng. Liposomes)

MHC II – glavni kompleks podudarnosti tkiva (eng. Main Histocompatibility Complex II)

MNPs – magnetske nanočestice (eng. Magnetic Nanoparticles)

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirin (eng. 1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)

NLC – nanostrukturirani lipidni nosači (eng. Nanostructured Lipid Carriers)

NO – dušikov oksid (eng. Nitric Oxide)

NPs – nanočestice (eng. Nanoparticles)

OL – odoranalektin (eng. odoranalectin)

PAMPs – molekularni uzorci povezani s patogenima (eng. Pathogen-Associated Molecular Patterns)

PD – Parkinsonova bolest (eng. Parkinson's Disease)

PEG – polietilen glikol (eng. Polyethylene glycol)

PEI – polietilenimin (eng. polyethyleneimine)

PET – tomografija emisije pozitrona (eng. Positron Emission Tomography)

P-gp – P-glikoprotein (eng. P-glycoprotein)

PIP – piperin (eng. Piperine)

PLGA – polilaktid-poliglikolid (eng. polylactide-polyglycolide)

PRRs – receptori koji prepoznaju molekularne uzorke (eng. Pattern Recognition Receptors)

RES – retikuloendotelni sustav (eng. Reticulo-Endothelial System)

RMT – transport posredovan receptorima (eng. Receptor-Mediated Transport)

ROS – reaktivne kisikove vrste (eng. Reactive Oxygen Species)

siRNA – kratka ometajuća RNA (eng. short interfering RNA)

TAT – transaktivator transkripcije (eng. TransActivator of Transcription)

TGF β – transformirajući faktor rasta β (eng. Transforming Growth Factor β)

TNF α – faktor nekroze tumora α (eng. Tumor Necrosis Factor α)

TuJ1 – β -tubulin klase III specifičan za neurone (eng. neuron-specific class III β -tubulin)

URO - urocortin

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. SVRHA RADA	5
3. TEMATSKA POGLAVLJA.....	6
3.1. Krvno-moždana barijera.....	6
3.2. Neuroinflamacija	10
3.3. Matične stanice	14
3.4. Nanoprijenosnici	16
3.4.1. Liposomi	16
3.4.2. Polimerne micelle	16
3.4.3. Nanočestice.....	17
3.4.4. Dendrimeri.....	17
3.4.5. Nanomaterijali bazirani na ugljiku	18
3.4.6. Inženjirane nanočestice (ENPs).....	21
3.4.7. Magnetne nanočestice (MNPs)	21
3.5. Oplemenjivanje nanoprijenosnika	23
3.5.1. Optimizacija veličine i naboja	23
3.5.2. Modifikacije površine	23
3.6. Primjene nanomaterijala	26
3.6.1. Diferencijacija matičnih stanica.....	26
3.6.2. Dijagnostičko oslikavanje	29
3.6.3. Inženjering tkiva i regenerativna medicina	30
3.7. Metode i rezultati	32

3.7.1. Sprječavanje neuroinflamacije	32
3.7.2. Usmjeravanje diferencijacije matičnih stanica	35
3.8. Nedostatci primjene nanočestica	39
4. ZAKLJUČAK.....	41
5. LITERATURA	43

1. UVOD

Mozak se odavno smatrao kompleksnijim od svemira, a ipak ovaj spektakularni dio „organske mašinerije“ beskrajno fascinira znanstvenike i kliničare. Ukoliko se dogode smetnje u mozgu, nastaju komplikacije u fizičkim, motornim, psihološkim i kognitivnim funkcijama. Stoga je dugotrajni cilj znanstvenika i kliničara razumjeti kako središnji živčani sustav (eng. Central Nervous System – CNS) funkcionira te razviti terapije za popravak ovog zamršenog sustava nakon ozljeda uzrokovanih bolestima ili povredama. [1]

Svjetska Zdravstvena Organizacija (eng. World Health Organization - WHO) je 2006. godine objavila izvješće o poremećajima mozga te njihovih budućih utjecaja na javno zdravstvo. Prema tome izvješću, poremećaji mozga čine 12% sveukupnih smrti u svijetu.[2] Moždani udar je drugi najčešći uzrok smrti u svijetu, a demencija sedmi.[3] Demencija je kronični i progresivni sindrom karakteriziran ozbiljnim kognitivnim oštećenjima koji premašuju kognitivne promjene vezane uz proces normalnog starenja.[4] Alzheimerova bolest (eng. Alzheimer disease – AD) je najčešći tip demencije i općenito svih neurodegenerativnih bolesti. AD je odgovorna za preko 50% slučajeva demencije i zahvaća preko 24 milijuna ljudi u svijetu.[5] Važno je napomenuti da se broj smrti uzrokovanih demencijom udvostručio između 2010. i 2015. godine (u 2015. zabilježeno je 1,54 milijun smrti u svijetu). Ta brojka će se nastaviti povećavati zbog starenja populacije i povećane incidencije tih patologija. Neurodegenerativne bolesti uključuju širok raspon stanja u kojima su neuroni progresivno oštećeni i/ili umiru. Neuroni se ne mogu dijeliti, pa stoga ne mogu biti zamijenjeni.

Uzroci i patogeneza većine neurodegenerativnih bolesti su još uvijek nepotpuno razumljive. Najveći faktor rizika za većinu ovih bolesti se smatra ljudska dob. Neurodegenerativne bolesti koje uključuju AD i Parkinsonovu bolest (eng. Parkinson's disease – PD) se povećavaju eksponencijalno kada

ljudi dosegnu dob od 60 godina. To je također istinito za amiotrofičnu lateralnu sklerozu (eng. Amyotropic lateral sclerosis – ALS).[6] Međutim, još uvijek ne postoji tretman za izlječenje ili barem zaustavljanje napredovanja većine poremećaja mozga (osim u određenim slučajevima epilepsije, depresije, šizofrenije i kronične boli), a oni koji i postoje u većini slučajeva nastoje ublažiti neizbježno.

U nadolazećim godinama potrebno je ostvariti inovativne pristupe dostave lijeka u CNS jer patologije poput moždanog udara i neurodegenerativnih bolesti postaju važno medicinsko i socijalno pitanje zbog starenja svjetske populacije i time povezanih ekonomskih troškova terapija i skrbi. Dosadašnji farmakološki tretmani se baziraju na sistemskoj dostavi aktivnih i efektivnih supstanci čiji su učinci ozbiljno limitirani slabim farmakodinamičkim svojstvima i ograničenjima u isporuci lijeka zbog krvno moždane barijere (eng. Blood Brain Barrier – BBB).[2] Od lijekova kandidata koji ciljaju mozak, 98% ih ne prolazi BBB. [3] Prevladavanje BBB te valjano dostavljanje lijeka u CNS je stoga prvi uvjet za učinkovitu terapiju.[2]

Nanotehnologija kao pojam je prvi put upotrijebljen u radu profesora Noria Taniguchija 1974. godine. Tada je nanotehnologija bila definirana kao proizvodna tehnologija za postizanje posebno visoke preciznosti i ultra-finih dimenzija, npr. preciznost i finoća na razini jednog nanometra. Nanotehnologija je doživjela svoj procvat u devedesetim godinama prošlog stoljeća. Tijekom godina definicije nanotehnologije su se mijenjale kako je znanost napredovala.[3] No, kao općenita definicija priznato je da je nanotehnologija znanost dizajniranja, stvaranja i korištenja struktura i uređaja čije su veličine i oblici stvoreni na nanometarskoj skali koja uključuje veličine od otprilike 1 nm do 100 nm.[7] Razvojem znanosti i tehnologije, postalo je moguće precizno proizvoditi i obrađivati materijale nanometarskih dimenzija.[3]

Prednosti nanotehnologije uključuju potencijal za stvaranjem topivijih i stabilnijih struktura, nanočestica (eng. Nanoparticles – NPs), s kapacitetom translokacije kroz stanične barijere čime se pojačava efikasnost njihove dostave i smanjuju nuspojave. Nanotehnologija ima razne primjene u biomedicinskim područjima, poput slikovne dijagnoze (eng. imaging) i ciljane dostave lijekova u mozak. Česti zahtjevi kod nanosustava uključuju: mali čestični promjer, ne-toksičnost, biorazgradivost i biokompatibilnost, ciljanje i prolaznost kroz BBB, ne izazivanje upale, mogućnost izbjegavanja retikuloendotelnog sustava (eng. Reticulo-Endothelial System – RES) te stabilnost i dugo vrijeme cirkulacije u krvi.[7]

U medicini, dizajniranje „pametnih“ prenosioca lijekova ili „pametnih“ NPs je tehnologija u razvoju od iznimne važnosti budući da je njihova veličina usporediva s onom od stanica ($<100\mu\text{m}$), virusa ($<450\text{nm}$), proteina ($<100\text{nm}$) i gena (dužina $<100\text{nm}$). Stoga, otvara se mogućnost manipulacije temeljnih bioloških procesa.[2]

Tradicionalni tretmani za poremećaje CNS-a predstavljaju brojne izazove, stoga je cilj moderne medicine i neuroznanosti razviti nove alate koji nadmašuju trenutno stanje tehnologije za oslikavanje, dostavu lijeka, regeneraciju neurona te električno očitavanje i snimanje. Od razvitka brojnih materijala baziranih na ugljiku, nanotehnologija je uvelike utjecala na brojne primjene, uključujući: dostavu lijekova, gena i proteina, prelazak BBB i doseg ugroženih područja u mozgu; neuro-regenerativne tehnike za uspostavljanje komunikacije između stanica nakon ozljede povezujući dvodimenzionalne (2D) ili trodimenzionalne (3D) strukture (eng. scaffolds) s neuralnim stanicama; nadziranje i moduliranje neuronske aktivnosti visoko senzitivnim elektrodama za snimanje te grafenskim platformama za električnu lokalnu stimulaciju.[8]

Danas se nanotehnologija i njezini proizvodi koriste na masovnom tržištu za proizvode poput kozmetike, hrane ili tekstila te u farmaceutskoj industriji za cjepiva i lijekove. Sve više i više izvješća upozorava o toksičnosti nanočestica i drugih nanotehnoloških proizvoda. No, važno je napomenuti da se u sklopu istraživanja uvijek provode studije toksičnosti.[3] Toksičnost se ispituje do sitnih pojedinosti kako bi se utvrdilo je li farmaceutski proizvod prikladan i siguran za uporabu.

2. SVRHA RADA

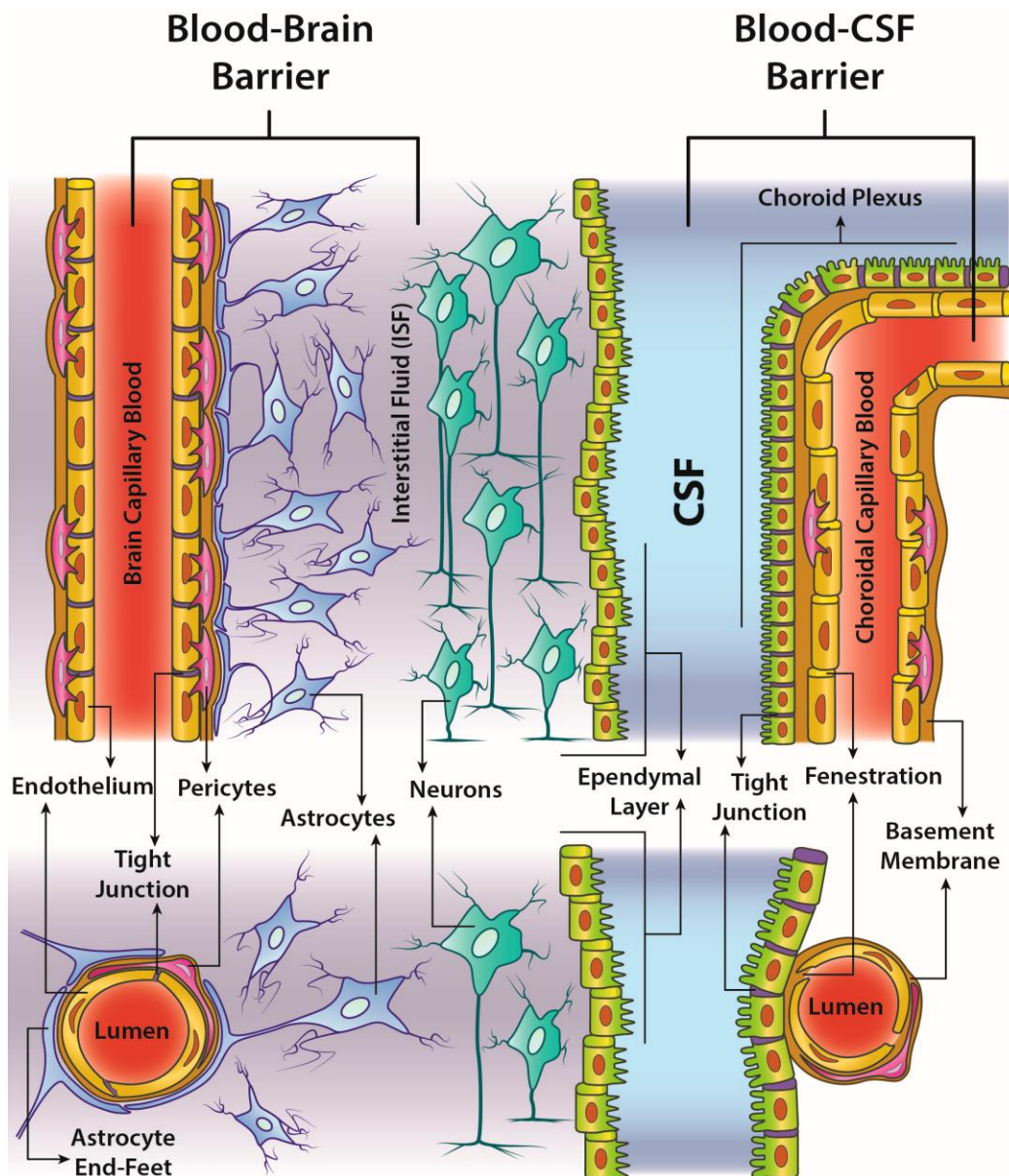
Svrha ovoga rada jest objediniti postojeće podatke o mogućoj primjeni nanotehnologije u neuroznanosti. Nanotehnologija je naziv za tehnologiju koja se bavi proizvodnjom čestica visoke točnosti i finih dimenzija, tj. na red veličine nanometra. Takve čestice imaju iznimnu mogućnost primjene u neuroznanosti, posebice zbog postojanja krvno-moždane barijere. Nanočestice su pokazale izniman uspjeh prelaska krvno-moždane barijere te su se stoga počela provoditi istraživanja dostave lijeka u mozak putem nanočestica. Do sada su otkrivene mnoge vrste nanočestica koje bi mogle poslužiti za svrhu prijenosnika lijeka.

Kritični osvrti na literaturu su posebno važni budući da znanost neprekidno napreduje te se stalno otkrivaju nove stvari i pristupi. Objediniti najnovije rezultate u određenom području je od iznimne važnosti i velike pomoći drugim znanstvenicima u tom polju.

3. TEMATSKA POGLAVLJA

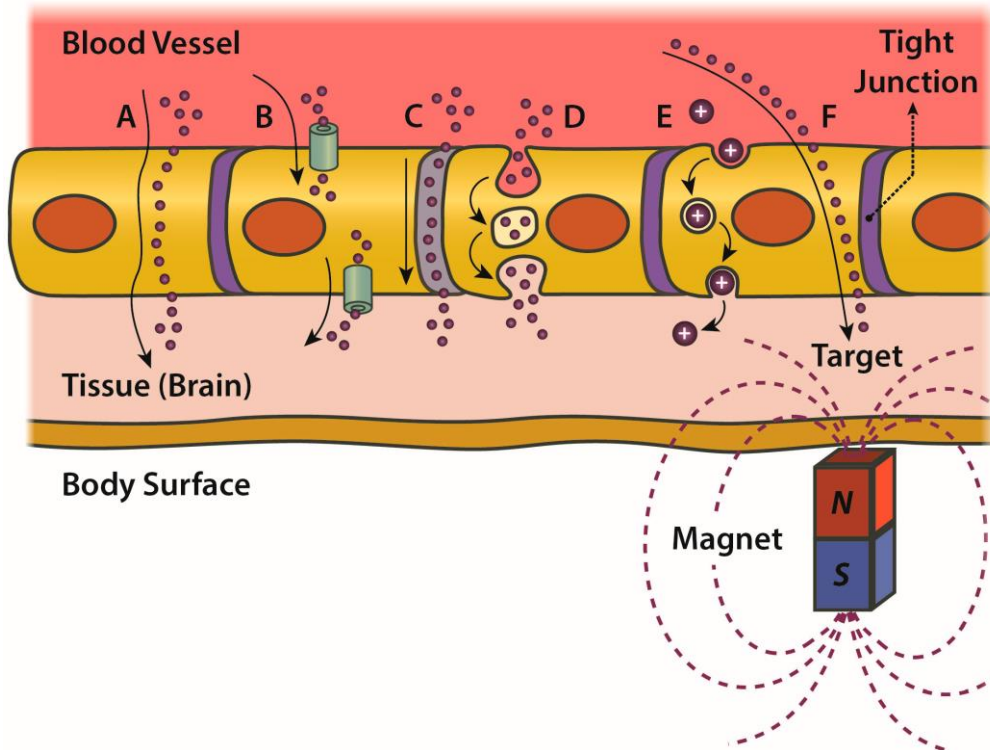
3.1. Krvno-moždana barijera

Usprkos površini od otprilike 20 m² koju čine 100 milijardi kapilara koje opskrbljuju ljudski mozak[9], mnoge supstance imaju jako ograničenu difuziju iz krvi u neurone zbog postojanja krvno-moždane barijere (BBB) i krvno-Cerebrospinalne tekućinske barijere (eng. blood-Cerebro Spinal Fluid – CSF) (Slika 1).[2] Mozak se nalazi u šupljini koja se ne može rastezati te zato ne podržava pojavu edema koja se povezuje s upalnim reakcijama.[3] Dodatno, neuroni kao post-mitotičke stanice su izuzetno osjetljivi na sve poremećaje pa stoga prolaz molekula u i iz mozga mora biti precizno kontroliran. To je funkcija BBB koja je neupitno najnepropusnija krvna barijera u ljudskom tijelu. Ova fiziološka barijera odjeljuje parenhim mozga od periferne cirkulacije krvi. Sastavljena je od jednog sloja endotelnih stanica okruženih debelom bazalnom membranom, od pericita te od astrocitnih izdanaka tzv. stopala. Glavna anatomska karakteristika endotelnih stanica BBB jest da su one zapečaćene skupa uskim spajanjima (eng. tight junctions), stoga tvoreći ne-fenestrirane kapilare, za razliku od krvnih žila u skoro svakom drugom dijelu tijela.[3] Uska spajanja između endotelnih stanica moždanih kapilara su jedno od najvažnijih strukturnih i anatomskih karakteristika BBB.[8] Posljedica toga jest da je prolaz molekula između endotelnih stanica izuzetno reduciran. Kao što je spomenuto, uloga ove barijere jest da štiti mozak te se može smatrati prvom linijom obrane od npr. patogena i toksina iz krvi.[3]



Slika 1: Usporedba strukturi BBB i barijere krv-likvor. **(Lijevo)** BBB odvaja lumen moždanih kapilara od moždanog parenhima. Glavni doprinos BBB svojstvu smanjene permeabilnosti dolazi od uskih spajanja između endotelinih stanica koje oblažu kapilare. Neurovaskularna jedinica sadrži pericite, bazalnu membranu koja okružuje pericite i endotelne stanice te izdanke obližnjih astrocita. **(Desno)** Krvno-CSF barijera se nalazi u koroidnom spletu svake komore u mozgu. Za razliku od endotela u moždanom parenhimu, kapilare koroidnog spleta nemaju uska spajanja te su fenestrirane. Međutim, koroidni splet je cjelokupno ograničen jednim slojem usko spojenih epitelinih stanica. Ovaj specifični epitel je u direktnom nastavku ependimalnog sloja koji okružuje komoru. Stoga, za razliku od BBB, krvno-CSF barijera se nalazi na epitelnoj razini, dok kapilare relativno propuštaju male molekule i s time omogućuju brzu dostavu vode kroz krvotok u epitelne stanice za proizvodnju CSF u koroidnom spletu. Iako u principu obje barijere služe istoj obrambenoj svrsi za CNS, njihove posebne strukture omogućavaju izmjenu različitih supstanci između krvotoka i mozga. **(Gornji dio)** Pogled odozgora; **(Donji dio)** Presjek. Preuzeto iz: [2] F. D'Agata et al., "Magnetic nanoparticles in the central nervous system: Targeting principles, applications and safety issues," *Molecules*, vol. 23, no. 1, pp. 1–25, 2018.

Funkcija BBB-a je da bude ekstremno selektivni filter, limitirajući makromolekularni i stanični promet te sprječavanje nekontroliranog pristupa patogena, toksina, hormona i perifernih imunih stanica. Usprkos tomu, BBB dozvoljava otpremanje nutrijenata u cerebralni parenhim te eliminaciju otpada kroz sisteme aktivnog transporta. BBB je skoro pa vodootporna barijera te ju samo mali broj molekula, npr. malih lipofilnih i hidrofobnih spojeva kao što su O₂ i CO₂, može proći. Dodatni stupanj poteškoća uzrokuje P-glikoprotein (eng. P-glycoprotein – P-gp) koji pripada skupini ABC transportera.[3] Ovaj izuzetno efikasni obrambeni mehanizam dopušta iznimke samo za one elemente koji su potrebni za funkcioniranje mozga (npr. glukoza i aminokiseline) propuštajući ih kroz četiri glavna puta kroz BBB: pasivna difuzija (prolaze samo O₂ i CO₂ i mali lipo-solubilni spojevi), transport posredovan nosačima (eng. Carrier protein-Mediated Transport - CMT), transport posredovan receptorima (eng. Receptor-Mediated Transport - RMT) i transport posredovan adsorpcijom (eng. Adsorptive-Mediated Transport - AMT) (Slika 2).[2] Kod paracelularnog transporta, uska spajanja djeluju kao „čuvari“ i reguliraju paracelularnu difuziju agenata otopljenih u vodi.[8] CMT obično dopušta prijelaz barijere malim nutrijentnim molekulama (<500 Da); primjer su transporter za glukoza, aminokiseline, nukleozide i kolin. RMT općenito funkcionira kod velikih peptida i proteina (>600 Da); primjer su procesi endocitoze potaknuti receptorima za inzulin i transferin. AMT se odvija kada je pozitivno nabijeni spoj u mogućnosti inducirati izraženu i lokaliziranu disrupciju integriteta plazmine membrane; primjer su kationizirani albumin ili sintetičke nanočestice premazane molekulama poput chitosana (CS).[2] CS je polisaharid sastavljen od nasumično distribuiranih β-(1-4) vezanih D-glukozamina (deacetilirane jedinice) i N-acetil-D-glukozamina (acetilirane jedinice), s posebnim svojstvima kao što su biorazgradivost, biokompatibilnost i sigurnost.[3]



Slika 2: Shematsko nabranjanje mnogih puteva kroz koje spoj može proći BBB, ovisno o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima. **(A)** Lijekovi mogu proći barijeru jednostavnom pasivnom difuzijom ako su dovoljno topljivi u lipidima (ili su modificirani prikladnim kemijskim modifikacijama da budu lipofilni); **(B)** CMT omogućuje ulaz mnogim esencijalnim spojevima poput glukoze i aminokiselina u endotelnu citoplazmu, a onda ih otpušta u mozak na vanjskoj strani. Dodatno, razvijeni su umjetni spojevi koji imitiraju te endogene ligande kako bi iskoristili mehanizme CMT-a; **(C)** Lijekovi ili čak NPs mogu ući u mozak kroz paracelularnu rutu samo kada su uska spajanja prekinuta. Posebice, BBB permeabilnost može biti kratkotrajno inducirana na nekoliko načina: lokalnim rastom temperature (38-39°C), osmotskim alteracijama (npr. infuzija hipertonične otopine manitola), aktivacijom adozinskih receptora, elektromagnetskim radijacijama ili bombardiranjem fokusiranog ultrazvuka (eng. Focused Ultrasound – FUS); **(D)** Vezanje specifičnih liganada na receptore koji posreduju endocitozu (npr. receptori za transferin i inzulin) omogućuje unos velikih spojeva i NPs koji su prikladno funkcionalizirani; **(E)** Ako spoj ima dovoljan kationski naboj, on može inducirati lokalizirano elektrostatsko ometanje membranskih fosfolipida što rezultira AMT-om; **(F)** Ako lijek nose NPs koje izražavaju magnetska svojstva, lokalizirano magnetsko polje, stvoreno vanjskim elektromagnetom, može biti upotrijebljeno za stvaranje usmjeravajuće sile koja omogućava prolaz NPs iz krvotoka u ciljanu regiju mozga (kroz obje paracelularnu i transcelularnu rutu) Preuzeto iz: [2] F. D’Agata et al., “Magnetic nanoparticles in the central nervous system: Targeting principles, applications and safety issues,” *Molecules*, vol. 23, no. 1, pp. 1–25, 2018.

3.2. Neuroinflamacija

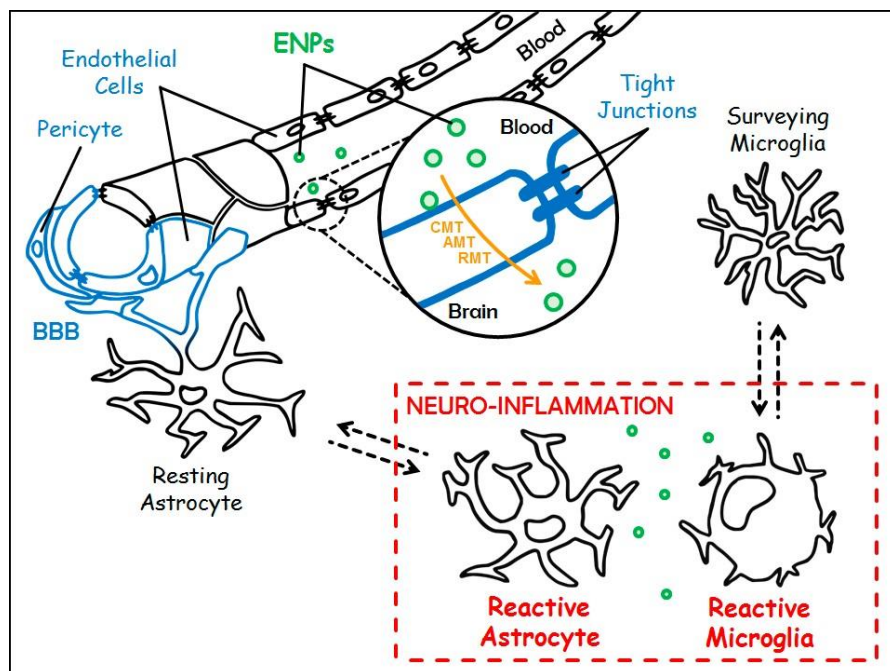
Upala je fiziološki obrambeni proces organizma u odgovoru na bilo koji tip oštećenja tkiva. Mozak se odavna smatrao „imunološki privilegiranim mjestom“ zbog njegove fizičke izolacije od periferije preko BBB. Usprkos tome, mozak još uvijek može potaknuti upalnu reakciju. Nekoliko stimulansa može potaknuti upalni odgovor u CNS-u, tzv. neuroinflamaciju (upalu). Ti stimulansi uključuju molekularne uzorke povezane s patogenima (eng. Pathogens-Associated Molecular Patterns – PAMPs) i molekularne uzorke povezane s opasnošću (eng. Danger-Associated Molecular Patterns – DAMPs). DAMPs mogu biti fizikalno—ili kemijski—inducirana oštećenja stanica ili endogeni čimbenici poput modificiranih molekula našeg organizma. PAMPs i DAMPs prepoznaju receptori koji prepoznaju uzorke (eng. Pattern Recognition Receptors – PRRs), a ispoljeni su na imunokompetentnim stanicama unutar parenhima mozga. U imunokompetentne stanice ubrajaju se većinom mikroglia te u manjoj količini astrociti i makrofagi koji se nalaze u koroidnom spletu, meningama i perivaskularnim prostorima. Obično, u uvjetima homeostaze, mikroglia se naziva „nadzirućim stanicama“ (eng. surveying cells), a astrociti „mirnim stanicama“ (eng. resting cells).[10] Mikroglia i astrociti pripadaju obitelji glijalnih stanica koja uključuje i oligodendrocite. Osim njihove imunološke funkcije, mikroglia igra ključnu ulogu u razvoju i homeostazi CNS-a.[3] Astrociti, najbrojnije glijalne stanice, doprinose raznim funkcijama neurona, uključujući stvaranje sinapsi i plastičnosti, energetske metabolizmu te sinaptičkoj homeostazi neurotransmitera i iona. Štoviše, procesi astrocita su usko povezani sa sinaptičkom pukotinom, gdje su aktivno uključeni u prijenos i skladištenje sinaptičke informacije. Također, sudjeluju u održavanju BBB te imaju važnu funkciju u zaštiti neurona i njihovom preživljenju nakon ozljede.[11]

Nakon prepoznavanja signala opasnosti, imunokompetentne stanice potiču nizvodnu signalnu kaskadu koja vodi do aktivacije puteva koji omogućuju razvoj upalnog odgovora. Ovisno o intenzitetu upalnog odgovora, može doći do procesa infiltracije perifernih imunih stanica (limfocita, dendritičkih stanica i monocita). Upalni odgovor je dinamičan i organiziran proces koji se, shematski, događa u dva koraka:

- (I) Prvi korak je pokrenut kad mikroglia prepozna signale opasnosti te je njihova svrha otkloniti element koji je potaknuo signale opasnosti. Karakteriziran je ekspresijom antigen prezentirajućih molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti razreda II (eng. major histocompatibility complex II - MHC II) i kostimulacijskim molekulama (CD80, CD86) te sekrecijom pro-upalnih citokina ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-12, itd.), kemokina (CCL2, CCL5, itd.), dušičnog oksida (NO) i reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Svi su potrebni za otklanjanje uzroka oštećenja;
- (II) Nakon toga dolazi do faze rezolucije upale karakterizirane sekrecijom protuupalnih molekula (među ostalima, protuupalnih citokina IL-10 i TGF- β) i faktora za popravak tkiva. Ova faza omogućuje zaustavljanje akutne faze upale te time započinje cijeljenje oštećenog tkiva i povratak u homeostazu. Velika razlika u odnosu na sistemski upalni odgovor je da ova faza rezolucije posredovana od mikroglia promovira i neuroprotekciju i neuroreparaciju. U jednu ruku, neuroprotekcija je posredovana kroz sintezu neurotrofnih faktora poput faktora rasta nalik inzulinu 1 (eng. Insulin-like Growth Factor - IGF1), moždanog neurotrofnog faktora (eng. Brain-Derived Neurotrophic Factor - BDNF) i glijalnog neurotrofnog faktora (eng. Glial cell-Derived Neurotrophic Factor - GDNF).

Dokle god je koordinirana, kratkotrajna i dobro regulirana akutna neuroinflamacija je korisna. Međutim, u slučaju neravnoteže, npr. u slučaju dugotrajnog ili prejakog stvaranja faktora koji izazivaju upalu ili poremećaja mehanizama rezolucije neuroinflamatornog procesa, neuroinflamacija postaje

kronična. U ovom trenutku, mikroglia i astrociti podlažu morfološkim, fenotipskim i funkcionalnim modifikacijama te su nazvane „reaktivna mikroglia“ i „reaktivni astrociti“ (Slika 3). Posljedice ove kroničnosti su produljeno otpuštanje upalnih i oksidativnih medijatora, s razarajućim učincima na parenhim mozga i potencijalnu degeneraciju neurona te smanjenje produkcije neurotrofnih i neuroprotektivnih faktora. Time je kronična neuroinflamacija štetna i dovodi do oštećenja neurona i nepovratne ozljede tkiva.



Slika 3: Ciljanje kronične neuro-inflamacije s inženjiranim nanočesticama (eng. engineered nanoparticles - ENPs). Krvno-moždana barijera (BBB) u plavom se sastoji od jednog sloja endotelnih stanica (zapečaćene uskim spajanjima) okruženog pericitima i astrocitnim stopalima. Pri kroničnoj neuroinflamaciji, mirni astrociti i nadziruća mikroglia se prebacuju u reaktivno stanje (crveno). Podešene ENPs (zeleno) mogu proći BBB ili kroz CMT, AMT ili RMT (narančasto), a prolaze kako bi liječili kroničnu neuro-inflamaciju. Preuzeto iz: [3] R. Poupot, D. Bergozza, and S. Fruchon, "Nanoparticle-based strategies to treat neuro-inflammation," Materials (Basel)., vol. 11, no. 2, 2018.

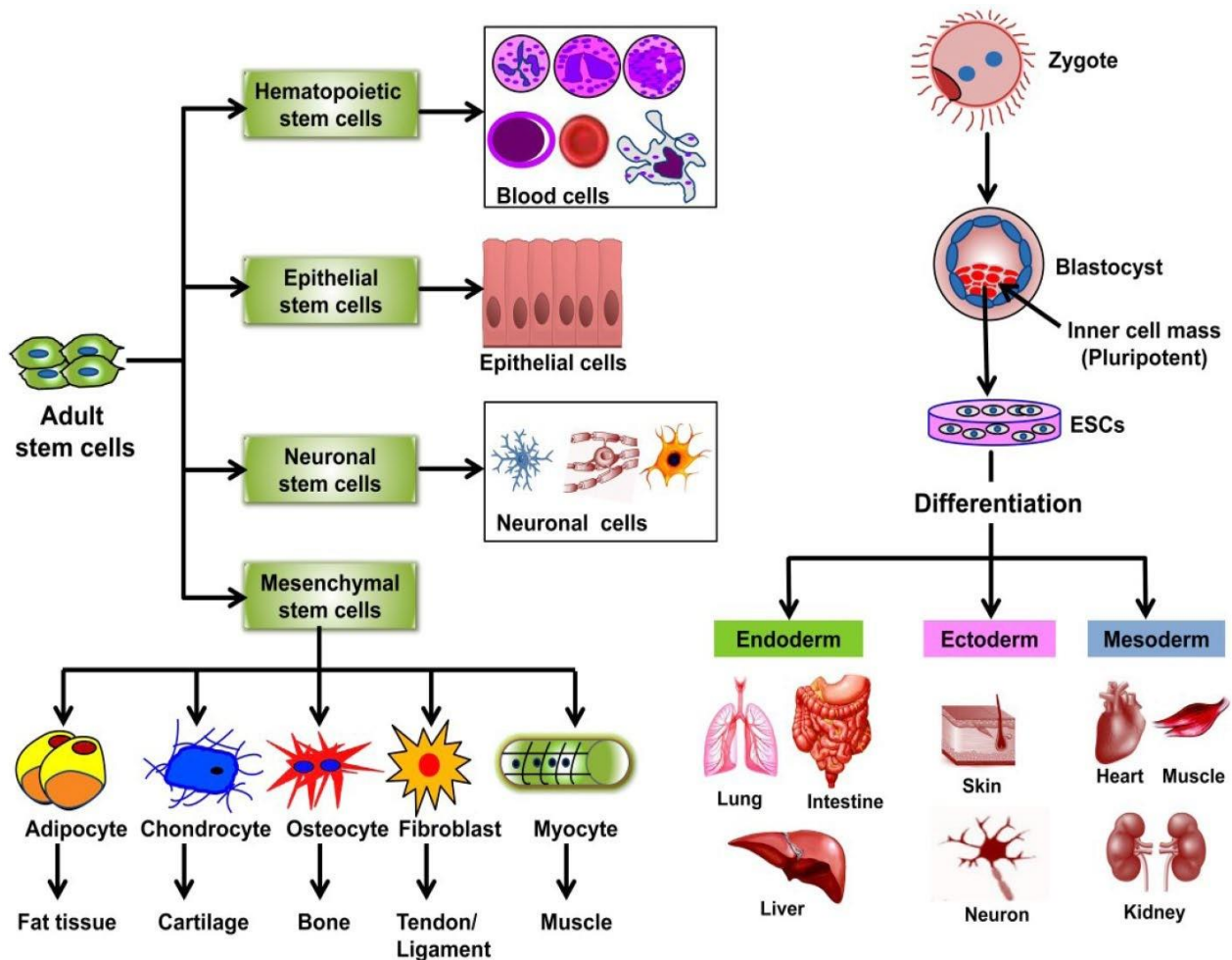
Znanstvena zajednica je prepoznala kroničnu neuroinflamaciju kao ključnu komponentu u skoro svim neurološkim poremećajima, bilo kao izazivajući (primarni) ili kao sekundarni faktor. U bilo kojem slučaju, neuroinflamacija aktivno sudjeluje u ozljedi mozga time što zapljuskuje parenhim mozga nizom upalnih i oksidativnih molekula koje su toksične za neurone. Za neuroinflamaciju se danas zna da igra ulogu u patogenezi neurodegenerativnih bolesti poput AD, PD i ALS. Neuroinflamacija je također važna pri nastanku sekundarne ozljede nakon moždanog udara i traumatske ozljede mozga. Kod ovih patologija, šteta može biti pozamašna te se razvija tijekom duljeg vremena, što dovodi do neurološkog poremećaja.[3]

3.3. Matične stanice

Matične stanice su funkcionalno definirane kao stanice koje imaju kapacitet samoobnove i sposobnost stvaranja diferenciranih stanica. Drugim riječima, matične stanice mogu stvarati stanice kćeri identične stanici majci (samoobnova), kao i producirati potomstvo s ograničenim potencijalom (diferencirane stanice).[12] Matične stanice mogu potencijalno diferencirati u sva tri embrionalna zametna listića, poimence ektoderm, mezoderm i endoderm.[13] Daljnji funkcionalni parametar koji bi trebao biti uključen u definiciju matičnih stanica jest potentnost, tj. potencijal stvaranja diferenciranog potomstva. Postoje tri tipa matičnih stanica: embrionalne, adultne i inducirane pluripotentne matične stanice.[12] Embrionalne matične stanice potiču iz unutarnje stanične mase (eng. Inner Cell Mass – ICM) rastuće blastociste, imaju pluripotentna svojstva i stvaraju ektoderm, mezoderm i endoderm. Adultne matične stanice se mogu naći u koštanoj srži, koži, mozgu i raznim drugim odraslim ili fetalnim organima ili tkivima te su multipotentne, što im omogućuje diferencijaciju u specifične stanične linije koje su nalik tkivu ili organu iz kojeg su potekle.[13] Inducirane pluripotentne matične stanice (eng. Induced Pluripotent Stem Cells – iPSCs) mogu biti napravljene iz pacijentovih somatskih stanica reprogramirajući ih specifičnim transkripcijskim faktorima. Mogu se smatrati i stanicama nalik embrionalnim matičnim stanicama, a imaju mogućnost stvoriti stanice iz sva tri zametna listića, čime se zaobilaze etička pitanja vezana uz manipulaciju ljudskih embrija. Prednosti potonjih su i to što specifične iPSCs dobivene od istog pacijenta osiguravaju prostor za staničnu terapiju bez rizika imunološke reakcije koja dolazi s terapijom.[14]

Stoga, kompletnija funkcionalna definicija matičnih stanica uključuje opis njihovog kapaciteta replikacije i potentnosti. Podrijetlo ili loza matičnih stanica je jako dobro poznata za embrionalne matične stanice, ali podrijetlo adultnih matičnih stanica je manje jasno. Istraživanja o razvoju

hematopoetskog sustava su pokazala da prisutnost diferenciranih stanica ne govori o tome gdje ili kada su odgovarajuće adultne matične stanice nastale.[12]



Slika 4: Shematski prikaz koji objedinjuje tipove i potencijal diferencijacije embrionalnih i adultnih matičnih stanica. Matične stanice potencijalno diferenciraju u tri embrionalna zametna listića: ektoderm, endoderm i mezoderm.

Preuzeto iz: [13] A. A. Dayem et al., "The potential of nanoparticles in stem cell differentiation and further therapeutic applications," *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 12, pp. 1550–1560, 2016.

3.4. Nanoprijenosnici

Nanoprijenosnici su čestice malih veličina koje se koriste za kontroliranu dostavu lijekova koji su uklopljeni unutar nanoprijenosnika te adsorbirani ili konjugirani na njihovu površinu. Razni materijali se mogu upotrijebiti za nanoprijenosnike poput liposoma, micela, polimernih nanočestica, nanočestica baziranih na lipidima, dendrimera i nanomaterijala baziranih na ugljiku. Modificirane NPs uključuju velik raspon različitih materijala. Mnoge nisu napravljene od samo jednog materijala te se ne mogu svrstati u gornje kategorije. Takve NPs nazivamo inženjiranima (eng. engineered).[7]

3.4.1. Liposomi

Liposomi (eng. Liposomes – LPs) su mikroskopske vezikule koje se sastoje od fosfolipidnog ili sličnog amfipatskog lipidnog dvosloja (Slika 5).[15] LPs su sustav dostave s kapacitetom oblaganja velikog broja lijekova i slikovnih agenata. Bili su prva generacija novih prijenosnika za dostavu lijeka. Struktura LPs omogućava dostavu tereta u vodenim odjeljcima ili ugrađenog u lipidni dvosloj. Najvažnije svojstvo liposomalnih nanoprijenosnika je zaštita od razgradnje i optimizacija farmakokinetičkih svojstava obloženog lijeka u svrhu poboljšanja terapijske efikasnosti uz smanjenje štetnih efekata koji se povezuju s administracijom lijeka. LPs imaju mnoge prednosti u odnosu na nanoprijenosnike koji omogućuju dostavu lijeka; one uključuju njihovu veličinu, amfipatski karakter, netoksičnost, neimunogeničnost, potpunu biorazgradivost i strukturno prilagodljivu prirodu. Ograničenja LPs uključuju brzu sistemsku eliminaciju, brzu metaboličku razgradnju fosfolipida, problem stabilnosti LPs nakon produženog skladištenja i njihovu nemogućnost pružanja produljenog otpuštanja lijeka.[7]

3.4.2. Polimerne micelle

Polimerne micelle su samostvarajuće koloidne disperzije veličine virusa s hidrofobnom jezgrom i hidrofilnim omotačem (Slika 5). Većina ovih amfifilnih

polimera su biorazgradivi i biokompatibilni. Polimerne micelle su manje od bilo kojih drugih nanosustava dostave lijeka, poput LPs. U usporedbi s LPs, polimerne micelle je lakše proizvesti, a imaju veću fizičku stabilnost i mogućnost produljenog otpuštanja lijeka. Prednosti polimernih micela uključuju stabilnost u cirkulaciji plazme, sposobnost izbjegavanja RES i realizacije površinskih modifikacija s ciljnim ligandima. Micelle su odlični prenosici farmaceutika zbog njihove sposobnosti da otapaju hidrofobne lijekove, spriječe razgradnju lijeka, povećaju svoju topljivost u vodi, produže vrijeme cirkulacije u krvi, biokompatibilnosti te manje štetnih nuspojava.[7]

3.4.3. Nanočestice

Nanočestice (NPs) su koloidni sustavi s kompaktnom strukturom gdje je terapijski agent ili zarobljen unutar koloidnog matriksa ili nanosen na površinu čestice konjugacijom ili adsorpcijom. Termin NP uključuje nanosfere i nanokapsule (Slika 5).[7] NPs imaju nekoliko jedinstvenih fizičkih svojstva ovisnih o njihovoj nanostrukтури. Na primjer, velika površina NPs može nositi terapijske agente za dostavu lijeka. Njihova inertna priroda ih čini idealnim prijenosnicima za razne lijekove i molekule. Dodatno, NPs mogu uhvatiti lijek i zaštititi ga od razgradnje u cirkulaciji te posljedično smanjiti količinu lijeka koju je potrebno administrirati.[16] Prednosti NPs u odnosu na LPs su: jednostavniji proces stvaranja, bolja fizička stabilnost te efikasnije produljeno otpuštanje lijeka koje može biti primijenjeno kod liječenja kroničnih bolesti. Ovi nanoprijenosnici se mogu klasificirati kao polimerne nanočestice ili nanočestice bazirane na lipidima.[7]

3.4.4. Dendrimeri

Dendrimeri su svestrane i veoma razgranate strukture koje se sastoje od ponavljajućih monomernih jedinica koje su spojene na i oko središnje jezgre (Slika 5). Površina dendrimera se može jednostavno funkcionalizirati zbog dostupnosti višestrukih reaktivnih funkcionalnih grupa koje pojačavaju biološku aktivnost. Ovi nanoprijenosnici su nedavno procijenjeni za dostavu

lijeka u CNS zato jer uvećavaju permeabilnost BBB na lijekove i druge terapijske agente. Molekule lijeka se mogu uklopiti u unutrašnjost dendrimera ili biti konjugirane na površinske grupe. Konjugacija proba za fluorescentnu i magnetnu rezonancu na terminalne aminske funkcije dendrimera omogućuje sintezu polimernih slikovnih agenata koje se koriste za dijagnostičke svrhe.[7]

3.4.5. Nanomaterijali bazirani na ugljiku

Nanomaterijali bazirani na ugljiku (eng. Carbon-based nanomaterials) su potencijalni kandidati za razne primjene u medicini, poput dostave lijeka i oslikavanja, a oni uključuju grafen, ugljične nanocjevčice, grafenov oksid (eng. Graphene oxide - GO), fullerene i nanodijamante. Nanomaterijali bazirani na ugljiku imaju osobita električna, optička, termalna i mehanička svojstva te su privukli poveliku pažnju u nanomedicini zadnjih godina. Oni posjeduju izuzetna intrinzična fizikalno-kemijska svojstva koja bi potencijalno mogla biti iskorištena na mnoge načine.[17]

3.4.5.1. Grafen

Grafen je jednoslojna ili višeslojna ploča od sp^2 -vezanih atoma ugljika čvrsto upakiranih u dvodimenzionalnu ćeliju nalik na saće, debljine od samo 0,34 nm.[18] Grafen je istovremeno najtanji (debljine od samo jednog atoma) i najjači spoj. Štoviše, lagan je, fleksibilan i transparentan, električno i toplinski provodljiv što otvara mogućnosti uporabe u širokom spektru primjena, npr. tintama za 3D-printanje, baterijama, optičkim i elektrokemijskim sensorima, skladištenju energije i medicini. Neki od aspekata materijala srodnih grafenu (eng. Graphene related materials – GRM) koji su od značajnog interesa za buduće primjene u neuroznanosti jesu: dostava gena i lijekova preko grafenskih nanoprijenosnika, interakcija s BBB te neuralna regeneracija, snimanje i stimulacija na 2D i 3D grafenskim kompozitima.

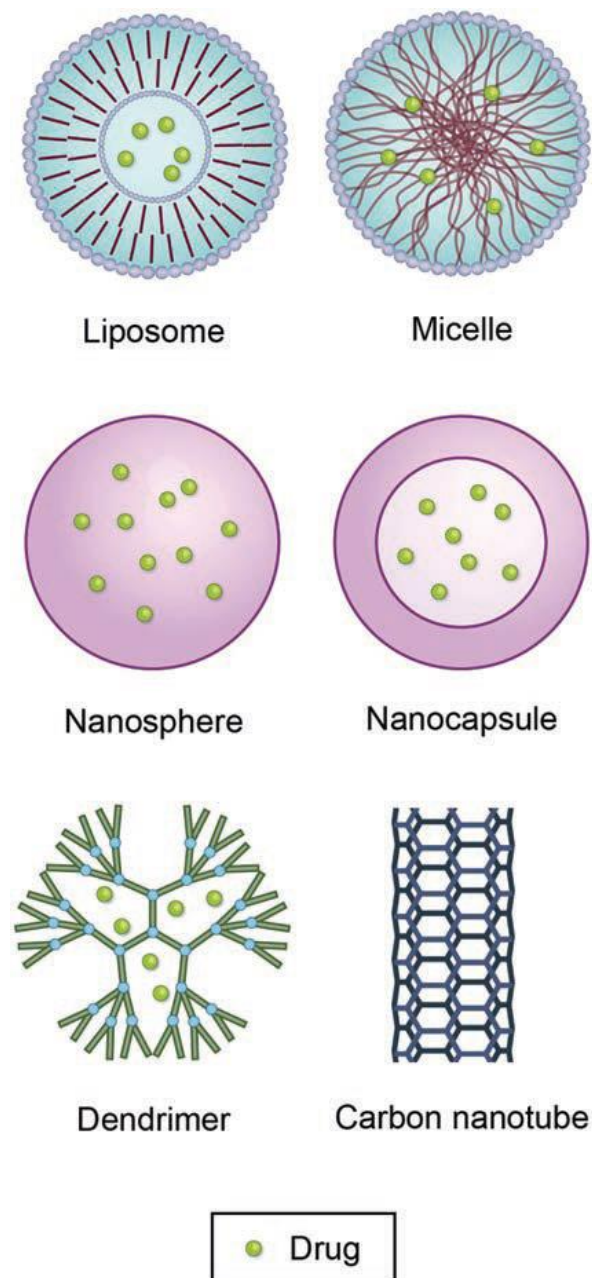
Glavno ograničenje primjena grafena u neuroznanosti je njegova vrlo niska akumulacija u parenhimu mozga nakon intravenske injekcije. Nakon što je unesen intravenski, grafen će se susresti s ionima, lipidima i proteinima, što rezultira nakupljanjem materijala i formacijom biomolekularne korone koja bi mogla utjecati na distribuciju grafena i izazvati upalnu reakciju.[8] Biokorona označava slojeve biomolekula koje adsorbiraju na površinu NPs u biološkom okolišu. Sastav biokorone je ovisan o fizikalno-kemijskim svojstvima nanočestice kao i identitetom biološkog okoliša.[17] Nadalje, nanoploče mogu biti fagocitirane od strane makrofaga, potičući tako aktivaciju i oslobađanje proupalnih citokina. Posljednje, ali ništa manje važno, grafenske nanoploče mogu se radije akumulirati u RES nego u ciljanom tkivu.

Oplemenjivanje površine grafena bi moglo ublažiti većinu nedostataka. Fizikalno-kemijska svojstva grafenskih nanoploča mogu biti podešena prema većem stupnju biokompatibilnosti.[8] Velika dostupna površina i mogućnost konjugacije različitih molekula na njegovu površinu čine grafen prikladnim materijalom za držanje i prenošenje lijekova, gena, antitijela i proteina.[19] Dodatno, moguće je modificirati njegovu kemijsku strukturu dodavanjem funkcionalnih grupa poput amino, karboksilne, hidroksilne, alkil halogene ili azidne grupe.[20] Zbog njegovog jedinstvenog fluorescentnog, fotoakustičnog i magnetsko rezonantnog profila, nekoliko je studija istražilo mogućnost uklapanja nanočestica baziranih na grafenu za povećanje *in vivo* vizualizacije moždanih tumora i unaprjeđenje molekularnih antitumorskih strategija za ciljanje tumora. [8]

3.4.5.2. Ugljične nanocjevčice

Ugljične nanocjevčice (eng. Carbon Nanotubes – CNTs) su cilindrične strukture formirane s grafitnim listićima s promjerom u nanometarskoj skali i s desecima stotina mikrometara u dužinu, s ogromnom površinom i odličnom električnom i toplinskom provodljivošću (Slika 5). CNTs su originalno netopljive. Potrebno je unaprijediti njihova svojstva te time i smanjiti njihove

nuspojave, procesom funkcionalizacije.[7] Međutim, nekoliko studija je dokazalo da su nanomaterijali bazirani na ugljiku ipak podložni biorazgradnji.[21] Te studije su ukazale na ključnu ulogu urođenog imunskog sustava u enzimskoj „probavi“ nanomaterijala baziranih na ugljiku. Imunosni sustav štiti tijelo od stranih uljeza te su potrebna dodatna istraživanja koja će potvrditi opažaju li imunokompetentne stanice nanomaterijale bazirane na ugljiku kao patogene.[17]



Slika 5: Shematski prikaz različitih nanoprijenosnika upotrjebljenih za tretman CNS poremećaja. Uključuje: liposome, micle, nanočestice – nanosfere i nanokapsule, dendrimere i ugljične nanocjevčice. Preuzeto iz: [7] A. Domínguez, B. Suárez-Merino, and F. Goñi-de-Cerio, "Nanoparticles and Blood-Brain Barrier: The Key to Central Nervous System Diseases," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 766–779, 2014.

3.4.6. Inženjirane nanočestice (ENPs)

Zahvaljujući njihovim osobitim fizikalno-kemijskim svojstvima, visokoj kemijskoj stabilnosti, mogućnosti da uklope u sebe široki raspon i hidrofилnih i hidrofobnih lijekova te visokoj razini funkcionalizacije, inženjirane nanočestice (eng. Engineered Nanoparticles – ENPs) su jedna od najobčavajućih strategija za prelaženje BBB.[22] ENPs su otvorile nove mogućnosti za dostavu lijeka u CNS. Postoji nekoliko strategija pomoću kojih ENPs mogu doći do moždanog parenhima te se mogu grupirati u neinvazivne metode i invazivne metode. Različite strategije i kriteriji bi trebali biti uzeti u obzir pri dizajniranju ENPs za penetraciju u mozak. Prilagođavanje ENPs, npr. spajajući ciljne ligande za koje se zna da olakšavaju prelazak BBB, je čini se ključan korak. ENPs mogu pristupiti cerebralnom parenhimu, ciljati specifičnu staničnu populaciju i dostaviti svoj teret za dijagnostičke i/ili terapijske svrhe.

Nekoliko stvari se mora imati na umu pri razvoju i dizajniranju ENPs za tretman CNS poremećaja. Prvo, razne funkcionalizacije ENPs mogu biti implementirane za povećanje njihove sposobnosti da pređu BBB ili njihov transport iz nosa u mozak. Čak je moguće kombinirati nekoliko tipova prilagodbi kako bi se poboljšalo uspješno ciljanje CNS-a. Drugo, nekoliko načina administracije može biti predviđeno za dostavu ENPs u parenhim mozga. To su: peritonealna, intravenozna ili intranazalna administracija. Posljednje, eksperimenti ne bi trebali biti izvođeni samo *in vitro* nego bi obavezno trebali uključivati testiranja *in vivo*. [3]

3.4.7. Magnetne nanočestice (MNPs)

NPs koje pokazuju magnetna svojstva se nazivaju magnetnim nanočesticama (eng. Magnetic Nanoparticles – MNPs). Njihova mogućnost stvaranja privremenih pora u staničnim membranama—kao što je slučaj u endotelu BBB—u svrhu poboljšanja ciljanja i dostave se naziva magnetoporacija. MNPs se već koriste za mnoge biomedicinske primjene: magnetno povećanje kontrastnih agenata, magnetska hipertermija i grijanje,

magnetsko označavanje i odvajanje i magnetski vektori. MNPs su najčešće stvoreni kao koloidni ferrofluidi – suspenzija magnetnih nanočestica u vodenim tekućinama s koncentracijom od otprilike 10^{15} - 10^{17} čestica/mL.[23] Njihova stabilnost ovisi o ravnoteži između sila—van der Waalsovih, dipol-dipol, steričkih, termalnih i elektrostatskih—između čestica i okolnih molekula otapala.

Važna prednost MNPs u poboljšanju dostave lijeka jest njihova mogućnost dugotrajne cirkulacije u krvi. Povećanje učinkovitosti dostave lijeka na cilj postignuto dodavanjem magnetske energije koristeći NPs osjetljive na magnetna polja se detaljno istražuje posljednjih godina. Ideja je stara gotovo 60 godina, ali se potrebna tehnologija tek nedavno razvila.

Dostava lijeka uz pomoć magnetskih polja se naziva magnetno ciljanje lijeka. Kada se uzima u obzir intravenozna administracija, karakteristike MNPs (veličina, oblik, površinski naboj, premaz i magnetska svojstva) moraju biti specifično skrojene za planiranu kliničku primjenu. Posebno, optimalna veličina i većina magnetskih svojstava MNPs jako ovise o fiziološkim karakteristikama mete. U ljudskom mozgu, radna udaljenost i sigurnosna ograničenja snage magnetnog polja, limitiraju primjenu MNPs u kliničke svrhe. Magnetno ciljanje bi moglo biti učinkovitije za ciljanje meta pri površini tijela te u područjima sporijeg protoka krvi. Mnoge tehničke poteškoće se još moraju riješiti prije nego li je moguće započeti rutinsku primjenu u kliničke svrhe na ljudskim pacijentima.[2]

3.5. Oplemenjivanje nanoprijenosnika

Posljednjih godina je učinjen velik napredak kod novih koloidnih sustava za dostavu lijeka, no, nekoliko tipova nanoprijenosnika je razvijeno za dostavu lijeka u CNS, a nisu u mogućnosti proći BBB. Prema tim sustavima, dugotrajna cirkulacija u krvi ne osigurava učinkovito prevladavanje BBB te je potrebno dodati svojstva na prijenosnike kako bi osigurali da lijekovi za CNS dođu na pravo mjesto u svojoj aktivnoj formi. Za suočavanje s ovim problemom, moguće je provesti ili optimizaciju veličine i naboja ili modificirati površinu nanoprijenosnika.[7]

3.5.1. Optimizacija veličine i naboja

Nanoprijenosnici su vrlo lako opsonizirani te su udaljeni iz cirkulacije prije nego li su obavili svoju funkciju. Opsonizacija jest proces oblaganja patogena ili strane čestice protutijelima kako bi ih učinili primamljivijima makrofazima te kako bi ih oni lakše fagocitirali. Fizikalno-kemijska svojstva su ključna za stabilnost nanoprijenosnika, kao i za njegovu biodistribuciju i efikasnost. Čestice koje imaju promjer od otprilike 100 nm uglavnom pokazuju produljeno vrijeme u cirkulaciji krvi. BBB je anionska barijera za koju se vjeruje da zaustavlja sve anionske molekule, dok kationske molekule poboljšavaju permeabilnost BBB neutralizacijom naboja. Iz ovog razloga, pozitivni naboj površine NPs promiče njihove elektrostatske interakcije s negativno nabijenim površinama stanica, što dovodi do povećanog endotelnog staničnog unosa.[7]

3.5.2. Modifikacije površine

Višestranost sustava dostave koji se baziraju na nanotehnologiji dozvoljava funkcionalizaciju nanoprijenosnika konjugacijom specifičnih biomolekula na površinu nanoprijenosnika (Slika 6). Ove modifikacije površine mogu znatno olakšati transport preko BBB. Također, poznato je da ovaj proces igra ključnu ulogu u toksičnosti nanoprijenosnika. Funkcionalizacija zahtijeva temeljno znanje ciljanog organa i njegovih mehanizama transporta.[7]

3.5.2.1. Pegilacija (eng. Pegylation)

Najčešće upotrjebljen polimer za kemijsku modifikaciju površine nanoprijenosnika jest polietilen glikol (PEG), fleksibilna, nisko toksična molekula koja je topljiva u vodi. PEG se često upotrebljava kao polimer koji štiti površinu nanoprijenosnika zato jer ima više prednosti poput odlične topljivosti u vodenim otopinama, visoku fleksibilnost polimernih lanaca, nisku toksičnost, imunogenost i antigenost. Stabilnost nanoprijenosnika je porasla s PEGilacijom, izbjegavši tako njegovu degradaciju tijekom sistemske cirkulacije.[7]

3.5.2.2. Surfaktanti (eng. Surfactants)

Funkcionalnost površine NPs utječe na interakcije nanočestica s biološkim stanicama. Hidrofilni surfaktanti kombinirani s PEG jedinicom se upotrebljavaju za premazivanje nanoprijenosnika kako bi ispunili njihovu sposobnost prolaza BBB. Efflux transporteri su odgovorni za slabu prodornost pojedinih CNS lijekova u mozak. Misli se da su surfaktanti sposobni inhibirati efflux transportere P-gp.[7]

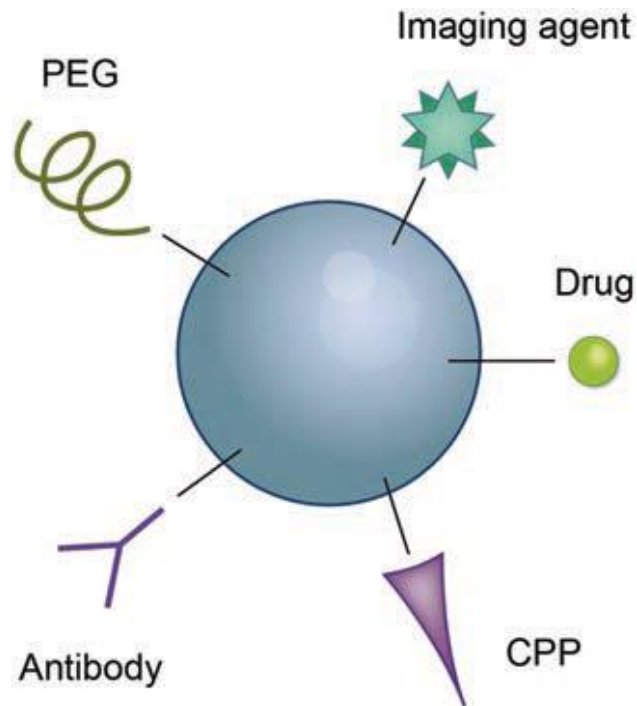
3.5.2.3. Ciljanje (eng. Targeting)

Nanoprijenosnici se mogu aktivno naciľjati kako bi se povećala njihova akumulacija na specifičnom patološkom mjestu. Aktivno ciljanje na mozak se može postići tako da se na vanjsku površinu nanoprijenosnika nanese ligandi poput peptida, antitijela, fragmenata antitijela i proteina, koji se specifično vežu za stanične receptore na oboljelim tkivima ili stanicama u mozgu. Jedan od pristupa je modificirati površinu nanoprijenosnika koji sadrži lijek konjugirajući ga s antitijelom koje je posebno specifično za mozak.[7]

3.5.2.4. Slikovni agenti (eng. Imaging Agents)

Fluorescentne molekularne probe (poput fluorescentnih boja i proteina) se opsežno upotrebljavaju za označavanje raznih bioloških jedinki uključujući biomolekule (poput proteina, peptida i oligonukleotida), stanice i

presjeke tkiva. Glavna primjena ovih specifičnih molekularnih proba je *in vivo* oslikavanje s primjenom u dijagnozi bolesti mozga. [7]



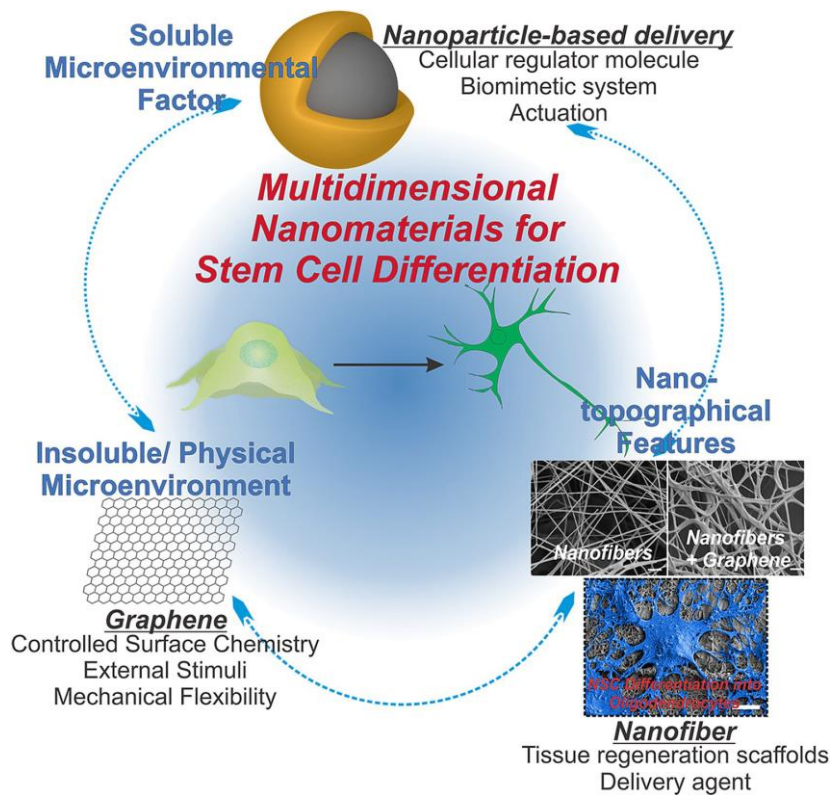
Slika 6: Površinske modifikacije nanoprijenosnika uključuju nanošenje lijeka, PEGilaciju, aktivno ciljanje antitijelima, peptid koji probija u stanicu (eng. cell penetrating peptide – CPP) i kontrastne slikovne agente (za slikovne dijagnoze)
Preuzeto iz: [7] A. Domínguez, B. Suárez-Merino, and F. Goñi-de-Cerio, "Nanoparticles and Blood-Brain Barrier: The Key to Central Nervous System Diseases," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 766–779, 2014.

3.6. Primjene nanomaterijala

3.6.1. Diferencijacija matičnih stanica

Nanomaterijali pružaju jedinstvenu fizičku veličinu, površinsku kemiju, provodljivost i topografski mikrookoliš za regulaciju diferencijacije matičnih stanica preko multidimenzionalnih pristupa za olakšanje dostave gena te interakcije stanica-stanica i stanica-izvanstanični matriks (eng. Extracellular matrix – ECM). Nanomaterijali su po prirodi vrlo prilagodljivi, omogućuju nam efikasnu i dinamičku kontrolu nad diferencijacijom matičnih stanica preko samo biofizičkih svojstava nanomaterijala. Suptilne promjene u fizičkom mikrookolišu poput orijentacije površinskih materijala, sastava ECM proteina i oblika, mogu značajno utjecati na terapijski potencijal matičnih stanica.

Pristupi bazirani na nanotehnologiji za selektivno usmjeravanje regeneracije bazirane na matičnim stanicama uključuju: topive mikrookolišne faktore (eng. soluble microenvironmental factors), netopivi fizički mikrookoliš (eng. insoluble physical microenvironment) i nano-topografska svojstva (eng. nano-topographical features) (Slika 7). Topivi mikrookoliš uključuje faktore rasta, citokine i kemokine povezane s nanomaterijalima i dostavljene matičnim stanicama. Netopivi fizički mikrookoliš predstavljaju biokemijski signali koji kroz proteine ECM-a modificiraju adheziju i usmjeravaju rast stanica. Posljednje, nano-topografska svojstva opisuju fizičke i topografske znakove koje nanomaterijal osigurava matičnoj stanici. Pristupi bazirani na nanotehnologiji pružaju fizikalno-kemijsku kontrolu potrebnu za diferencijaciju matičnih stanica u stanične linije od interesa.



Slika 7: Ilustrativni dijagram koji predstavlja multidimenzionalne nanomaterijale: topive mikrookolišne faktore, netopivi fizički mikrookoliš i nano-topografska svojstva. Preuzeto iz: [1] S.-T. D. Chueng, L. Yang, Y. Zhang, and K.-B. Lee, "Multidimensional nanomaterials for the control of stem cell fate," *Nano Converg.*, vol. 3, no. 1, p. 23, 2016.

Regulatorne molekule poput faktora rasta i signalnih molekula su faktori s ključnom sposobnošću regulacije matičnih stanica. Međutim, nedostatak regulatornih molekula koje se prirodno pojavljuju u ljudskom organizmu je to što imaju kratak polu-život u cirkulaciji i brzu stopu *in vivo* razgradnje. Ovi nedostaci skupa s niskom difuznošću čine pravu primjenu terapije matičnim stanicama neučinkovitom zbog neefikasne dostave i nespecifične distribucije. Zahvaljujući svojim intrinzičnim svojstvima, nanomaterijali mogu omogućiti produljeno otpuštanje faktora rasta za efektivno tretiranje matičnih stanica iznad praga koncentracije.

Dodatno, gensko manipuliranje bazirano na NPs se pokazalo kao alternativna strategija za usmjeravanje diferencijacije matičnih stanica. Svestranost NPs također omogućuje ciljanu dostavu genskih molekula u stanice. Doziranje malih molekula i genska manipulacija su jednako važne za

ciljanu diferencijaciju matičnih stanica u tkivnom inženjeringu i regenerativnoj medicini.

Transkripcijski faktori su ključni regulatori bazičnih staničnih procesa te su odgovorni za vitalne funkcije stanice. Stoga, modulirajući ekspresiju specifičnih gena, tj. ključnih transkripcijskih faktora, može se utjecati na diferencijaciju matičnih stanica.

Osim signala putem topivih molekula, NPs pružaju i mehaničke stimulanse odgovorne za diferencijaciju matičnih stanica, formiranje tkiva i regeneraciju organa. Nedavno je dokazano kako udaljena magnetska aktivacija osigurava mehaničku stimulaciju bioloških stanica.[24] Mehaničkom stimulacijom, integrinski receptori na fokalnim adhezijama stanica aktiviraju biokemijske stanične procese, utječu na morfologiju te čak i na epigenetsku kromosomsku aktivnost. S razvojem magnetskih nanočestica (MNPs), magnetska aktivacija na staničnoj ili čak na receptorskoj razini može aktivirati različite mehanosenzore koji postoje u staničnoj membrani. Preko jednostavne površinske funkcionalizacije, NPs se mogu vezati na površinu stanica i utjecati na funkciju stanice ili pak usmjeriti diferencijaciju matičnih stanica s vanjskim magnetskim poljem.

Prilikom diferencijacije matičnih stanica dolazi do istovremenog primanja i vršenja sila na ECM proteine koji ih okružuju. Stoga, mehanička svojstva iz ECM igraju važnu regulatornu ulogu u biologiji matičnih stanica. Štoviše, fizičke stimulacije (npr. električne, mehaničke i fotokemijske stimulacije) iz supstrata mogu pružiti dodatni utjecaj na proces diferencijacije matičnih stanica. Razvijene su razne vrste organskih i neorganskih struktura, netopivih fizičkih mikrookoliša, koje mogu imitirati ECM kako bi imale preciznu kontrolu nad tvrdoćom, površinskom topografijom i razgradnjom.

Od otkrića grafena, u zadnjem desetljeću velik interes je fokusiran na 2D i 3D strukturirane nanomaterijale. Visoka mehanička fleksibilnost

grafenskih struktura bi mogla omogućiti dovoljnu toleranciju mehaničkog stresa za regeneraciju tkiva. Štoviše, visoka električna provodljivost grafenskih struktura dozvoljava električnu stimulaciju, nadziranje i detekciju diferenciranih neurona ili kardiomiocita. Grafen može poslužiti kao provodljivi supstrat i prenijeti električne signale do neuralnih stanica u kulturi te efikasno modulirati ponašanje neuralnih stanica. Neuralna mreža se može uspješno formirati, a dokazana je povišena frekvencija živčanih impulsa na grafenskim filmovima.[1],[8]

3.6.2. Dijagnostičko oslikavanje

Dijagnostičko molekularno oslikavanje je relativno nova disciplina koja koristi probe, poznate kao biomarkeri, za mjerenje bioloških procesa na molekularnoj razini, omogućavajući vizualizaciju događaja u živom organizmu bez uzrokovanja štete. Posljedično, tehnike neuroslikanja su postale sve važnije u procjenjivanju bioloških i fizioloških svojstava neuroloških poremećaja. Najčešće tehnike molekularnog oslikavanja uključuju metode bazirane na X-zrakama poput radiografije, ultrazvuka, nuklearne medicine s tomografijom emisije pozitrona (eng. positron emission tomography – PET) i nekoliko metoda optičkog oslikavanja. Ograničenja ove tehnike su pretjerana difuzija kontrastnih agenata u ne-patološka područja te njihov kratki poluživot. Kako bi riješili ovaj problem, slikovni agenti se mogu uklopiti unutar nanočestice skupa s lijekom, što omogućuje neinvazivno nadziranje dostave lijeka u CNS. Sposobnost ciljanja nanočestica pruža im mnogo prednosti u usporedbi s konvencionalnim kontrastnim agentima te im može omogućiti precizniju detekciju.[7],[17]

Nanomaterijali bazirani na ugljiku, poput CNTs se intenzivno istražuju za višestruke slikovne modele uključujući fluorescentno, fotoakustično i Raman slikanje. Metalofulereni se istražuju kao kontrastni agenti za MR više od desetljeća.[17] Intrinzička svojstva grafena u vidljivom i infracrvenom području spektra ga čine privlačnim alatom za biooslikavanje *in vitro* i *in vivo*.

Specifično za primjene u CNS, *in vivo* studije su pokazale da PEG-GO i njegovi derivati administrirani intrakranijalno mogu biti oslikani u mozgu preko dvofotonske mikroskopije. Preko ove tehnike oslikavanja, 3D mapa distribucije može biti rekonstruirana u moždanom parenhimu zbog visoke penetracije fluorescentnog signala PEG-GO kompozita u tkivo mozga. Ovi obećavajući rezultati bi mogli dovesti do uporabe grafena kao dijagnostičkog alata za oslikavanje moždanih tumorskih lezija, posebice ako je materijal projektiran s biomolekulama koje specifično ciljaju tumorske stanice.[8]

3.6.3. Inženjering tkiva i regenerativna medicina

Inženjering tkiva je termin koji opisuje proces formiranja novog tkiva kako bi se zamijenio oštećeni organ ili tkivo. Smatra se alternativnom metodom ponovnog uspostavljanja funkcije oštećenog tkiva ili organa nakon neuspjeha konvencionalnih lijekova i metoda. Nestašica donora i imunosno odbacivanje genetski nesrodnih transplantanata su velika prepreka u transplantaciji tkiva i organa.[13]

Inženjering tkiva cilja povratiti funkcionalnost oštećenog tkiva u kombinaciji s prikladnim biomaterijalima. Strukture koje imaju slična kemijska i fizikalna svojstva kao ECM osiguravaju prikladan trodimenzionalni mikrookoliš za spajanje stanica te stvaranje specifičnih tkiva i organa i zbog toga predstavljaju ključ tkivnog inženjeringa i regenerativne medicine. Nekolicina novih nanomaterijala se koriste kao strukture za kulture matičnih stanica i njihovu diferencijaciju u različite stanične linije.[13]

Što se tiče živčanog sustava, aktivni i dinamični uređaji koji se mogu implantirati su vrlo povoljni jer omogućavaju istovremeno stimuliranje i snimanje električne aktivnosti neuralnih stanica.[8] Nanomaterijali bazirani na ugljiku se pojavljuju kao potencijalni kandidati za razvoj sintetičkih struktura u tkivnom inženjeringu. CNTs pružaju nekoliko sličnih karakteristika ECM-u, okolišu u kojem stanice fiziološki migriraju i proliferiraju kako bi stvorili tkiva i

organe. Nanodijamanti se ponašaju kao platforma za rast neurona, dok hibridne strukture GO i silica nanočestice promoviraju rast i usmjeravanje ljudskih neuralnih matičnih stanica.[17] Intrinzična svojstva grafena se mogu iskoristiti za dizajniranje grafenskih uređaja za neuronska sučelja, zbog toga što grafen može pojačati optička, električna i mehanička svojstva mješavine nanostrukture. Najčešće primjene grafenskih struktura u nanomedicini uključuju stvaranje struktura za *in vivo* neuronsku regeneraciju, stimulaciju i snimanje, kao i za reguliranu dostavu lijeka.[8]

Tehnologija nanovlakana pruža potencijalno rješenje za određene terapije, poput tretmana za opekline i rane, regeneracije tkiva i organa i raznih degenerativnih poremećaja u biomedicinskom inženjeringu. Bioaktivni spojevi (npr. faktori rasta, nukleinske kiseline i ligandi koji se vežu na integrine) se mogu uklopiti u strukture od nanovlakana.[1]

3.7. Metode i rezultati

3.7.1. Sprječavanje neuroinflamacije

Ovaj dio je posvećen znanstvenim radovima koji prikazuju prodor ENPs na području neuroinflamacije te spominje nedavne primjere funkcionalizacije koja omogućuje ENPs prolaz preko BBB i pristup moždanom parenhimu. Spomenute studije su sve provedene *in vivo*. [3]

Hu et al. su demonstrirali da polietilen glikol-polilaktid-poliglikolid (eng. Polyethylene glycol-poly lactide-polyglycolide – PEG-PLGA) ENPs konjugirani s laktoferinom (eng. lactoferrin – Lf) imaju značajno veću mogućnost dosega cerebralnog parenhima od nekonjugiranih ENPs. [25] Doista, PEG je poznat po tome što poboljšava vrijeme cirkulacije u krvi, a Lf je ciljani ligand koji promovira RMT preko receptora za transferin. Nakon intravenozne injekcije, Lf-PEG-PLGA ENPs su locirane u striatumu i substanciji nigri, dva zahvaćena područja u Parkinsonovoj bolesti. Ovaj sustav dostave u mozak je korišten kao nosač za urokortin (peptid dug 40 aminokiselina povezan s faktorom otpuštanja kortikotropina) koji se pokazao neuroprotektivnim te ublažava simptome u štakorskim modelima Parkinsonove bolesti. [26]

Tiwari et al. su ustvrdili da je kurkumin (eng. Curcumin – Cur) uklopljen u biorazgradivi PLGA (Cur-PLGA) ENPs obećavajući terapijski pristup kod Alzheimerove bolesti. Kurkumin, glavni pigment kurkume (*Curcuma longa*), ima zanimljiva protuupalna i antioksidativna svojstva za tretman upalnih bolesti CNS-a. No, njegova uporaba u terapiji je ograničena zbog njegove slabe dostupnosti mozgu, dijelom zbog niske BBB prolaznosti. Stoga, autori su odabrali uklopiti kurkumin u visoko lipofilni PLGA ENP za prevladavanje tog nedostatka. Nakon intraperitonealne injekcije Cur-PLGA ENPs, razine kurkumina u mozgu su bile više nego kod administracije kurkumina neuklopljenog u ENPs. Najznačajnije jest to da su u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti, Cur-PLGA ENPs stimulirale neurogenezu odraslog hipokampusa te su spasile životinju od kognitivnog propadanja. [27]

Piperin (PIP), glavni aktivni sastojak u papru, se upotrebljava u medicini zbog svojih protuupalnih i antimikrobnih svojstava. Autori su upotrijebili tripolifosfatni unakrsno spojeni chitosan (CS) ENPs kao nosač intranazalnom dostavom piperina. CS je pozitivno nabijen što omogućava bolju interakciju s biološkim membranama i mukoadhezivna svojstva. Efikasnost PIP-CS ENPs je procijenjena *in vivo* u štakorskom modelu sporadične demencije Alzheimerovog tipa inducirane centralnom injekcijom kolhicina. Studija je demonstrirala da je PIP-CS nanoformulacija protuupalna (pad produkcije $TNF\alpha$), antiapoptotička (smanjena aktivnost kaspaze-3) i antioksidativna (povećana aktivnost superoksidativne dismutaze). Nadalje, dok je piperin sam po sebi iritantan za nazalnu mukozu, PIP-CS ENPs nisu muko-iritantne. PIP-CS ENPs su dovele do povećanja kognitivnih funkcija u životinja.[28]

Hernando et al. su pokazali da glijalni neurotrofni faktor (eng. Glial cell-Derived Neurotrophic Factor – GDNF), koji promovira preživljavanje među ostalima i dopaminergičnih neurona (tj. stanica koje umiru u pacijentima oboljelih od Parkinsonove bolesti), može biti dostavljen u mozak nakon intranazalne administracije kada je uklopljen u nanoformulaciju sastavljenu od nanostrukturiranog lipidnog nosača (eng. nanostructured lipid carrier – NLC) premazanog s CS te površinskog peptida TAT koji penetrira u stanicu. CS i TAT su odabrani za uvećanje vremena prebivanja lijeka u nosnoj šupljini, za zaštitu lijeka od degradacije te za poboljšanje dostave u mozak. Samo je kompletna formulacija (CS-NLC-TAT-GDNF ENPs) pokazala terapijsku efikasnost u 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirin (eng. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine - MPTP) mišjem modelu Parkinsonove bolesti, tj. smanjen gubitak dopaminergičnih neurona u striatumu i substantii nigri, smanjen broj reaktivne mikroglije i napredak u motoričkim funkcijama.[29]

Iako nazalna ruta omogućava zaobilazak BBB i direktan pristup mozgu, na transport nos-mozak može utjecati urođeni obrambeni mehanizam dišnih puteva, mukocilijarno čišćenje. Kako bi popravili vrijeme prebivanja ENPs u nosnoj šupljini, Wen et al. su prilagodili PEG-PLGA ENPs s odoranalektinom (eng. odoranalectin – OL) koji se veže za L-fukozu izloženu na olfaktornom epitelu. Koristeći se *in vivo* slikanjem, demonstrirali su da su ENPs s OL imale veću sposobnost lokalizacije u mozgu nakon intranazalne administracije. Koristili su te ENPs za uklopiti neuropeptid urokortin.[30]

Tablica 1: Kompilacija rezultata odabranih za ovaj pregled

Tip ENPs	Prilagodbe (Ciljni ligandi)	Aktivna tvar	Način administracije i životinjski model
Polietilen glikol-polilaktid-poliglikolid (PEG-PLGA)	Laktoferin (Lf) cilja receptor transferina na endotelnim stanicama	Urokortin (URO)	Intravenozno (IV) Štakorski model Parkinsonove bolesti (PD)
PLGA	Nisu primijenjene	Kurkumin (Cur)	Intraperitonealno (IP) Štakorski model Alzheimerove bolesti (AD)
Kationski chitosan (CS) s unakrsno spojenim tripolifosfatom	Nisu primijenjene	Piperin (PIP)	Intranazalno (IN) Štakorski model sporadične demencije AD tipa
Nanostrukturirani lipidni nosač (NLC) premazan s kationskim CS	TransAktivator Transkripcije (TAT)	Glijalni neurotrofni faktor (GDNF)	IN Mišji model PD
PEG-PLGA	Odoranalektin (OL), cilja na L-fukozu izraženu na olfaktornom epitelu	URO	IN Štakorski model PD

3.7.2. Usmjeravanje diferencijacije matičnih stanica

Kolzova i kolege su upotrijebili anorganske nanočestice, točnije nanoporozne silica čestice za dostavu egzogenih trofičkih mimetika Cintrofina i Gliafina, peptidnih mimetika za neurotrofne faktore dobivene iz cilijarnih i glija staničnih linija, do embrionalnih matičnih stanica. Embrionalne matične stanice su ciljano diferencirane u motoričke neurone dostavom dva peptidna mimetika. Rezultati su potvrđeni imunobojanjem. Funkcija diferenciranih motoričkih neurona je karakterizirana kroz elektrofiziologiju i bojanjem fluorescentnim proteinom osjetljivim na voltažu. Nadalje, diferencirani motorički neuroni su transplantirani u miševе, pokazujući dugotrajno preživljavanje te time demonstrirajući potencijalnu primjenu ESC diferencijacije za terapiju matičnim stanicama.[31]

Inkorporirajući male molekule u polielektrolitne nanočestice—sastoje se od polietilenimina (eng. polyethyleneimine – PEI) i dekstran sulfata (eng. dextran sulfate – DS)—Santos et al. su dostavili retinoičnu kiselinu u subventrikularnu zonu kako bi inducirali diferencijaciju neuralnih matičnih stanica. Funkcija diferenciranih neurona je procijenjena kroz unutarstanične varijacije kalcija pri KCl depolarizaciji i histaminskoj stimulaciji. Dodatno, genska manipulacija putem nanočestica se pokazala alternativnom strategijom za usmjeravanje diferencijacije matičnih stanica.[32]

Raznolikost nanočestica omogućava ciljnu dostavu genskih molekula u stanice. Lee i kolege su prvo dokazali da uporaba nanočestica s magnetskom jezgrom za dostavu genskih materijala siRNA ili plazmidne DNA za usmjeravanje diferencijacije neuralnih matičnih stanica rezultira diferencijacijom u neurone i oligodendrocite. Kontrolirana diferencijacija neuralnih matičnih stanica je uspjela pristupom koji se bazira na RNA ometanju utišavajući dva ključna gena CAVEOLIN-1 i Sox9 za diferencijaciju oligodendrocita i neurona.[33]

Kao što je pokazano, doziranje malih molekula i genska manipulacija su jednako važni za usmjeravanje diferencijacije matičnih stanica u inženjeringu tkiva i regenerativnoj medicini. Lee et al. su dokazali zajedničku dostavu malih molekula i agenata koji ometaju RNA za diferencijaciju neuralnih matičnih stanica u neurone koristeći jedan sustav dostave baziran na dendritičkom poliaminu od modificiranog ciklodekstrina. Kroz vezanje malih molekula retinoične kiseline na β -ciklodekstrin i elektrostatske interakcije između siRNA i dendritičkog poliamina, kombinacija malih molekula i RNA ometanja je sinergično utjecala na mnogo staničnih puteva za induciranje diferencijacije matičnih stanica. Kontrolirana i pouzdana neuronalna diferencijacija je potvrđena imunobojanjem GFAP i TuJ1 markera.[34]

Lee je razvio NanoScript, sintetičku transkripciju baziranu na nanočesticama. NanoScript se sastoji od (I) NP jezgre, najčešće zlatne nanočestice zbog njegove biokompatibilnosti i jednostavnosti funkcionalizacije; (II) funkcionalnih peptida za lokalizaciju jezgre; (III) imitatora aktivacijske domene; (IV) poliamidne Py-Im ukosnice kao sintetičke vezne domene za DNA.[35] NanoScript može biti fleksibilno funkcionaliziran s izmjenjivim komponentama kako bi imitirao različite transkripcijske faktore. Jednom kada se prirodni transkripcijski faktori vežu za svoje ciljane gene, oni tada mogu aktivirati ili utišati transkripciju gena. Kao kontrast aktivaciji gena rabeći NanoScript platformu, NanoScript koji utišava gene je izražen da bi imitirao sposobnost represije prirodnog transkripcijskog faktora za downregulaciju ekspresije gena na razini transkripcije. Dizajniranjem represijskog NanoScript za downregulaciju Sox9 ekspresije, neuralne matične stanice su uspješno diferencirane u neurone. Promatrana je funkcija fluksa kalcijevih iona što je funkcija zrelih neurona.[36]

Grafen se pokazao kao biokompatibilan i obećavajući supstrat za uređaje s električnim i optičkim sučeljem zbog njegove visoke mehaničke fleksibilnosti, transparentnosti i provodljivosti. Hong et al. su izvjestili da je

supstrat od grafena stvoren taloženjem kemijskih para (eng. Chemical Vapor Deposition – CVD) efikasno uvećao diferencijaciju humanih neuralnih matičnih stanica u neurone.[37] Mehanizam je još uvijek nejasan, ali stanični putevi povezani s lamininom su se pokazali značajno povećanima, a grafenske supstrate su promatrali kako se ponašaju kao odličan sloj za adheziju stanica, pogotovo za dugotrajne procese diferencijacije.

Kasnije, isto se služeći CVD metodom, Cheng et al. su otkrili da mišji hipokampalni neuroni kultivirani na grafenu pokazuju povećano nicanje i rast neurona, što bi se moglo događati preko puteva povezanih s proteinom povezanim s rastom 43 (eng. Growth Associated protein 43 – GAP43).[38]

Kako su adhezija stanica i faktori rasta visoko povezani s površinskim funkcionalnim grupama grafena, razvijene su fluorinirane grafenske ploče kao strukture za usmjeravanje rasta i diferencijacije neuralnih matičnih stanica. Loh et al. su promatrali daljnje poboljšanje neuronalne diferencijacije iz mezenhimalnih matičnih stanica nakon što su uveli agent za indukciju neurona, retinoičnu kiselinu. Poboljšanje diferencijacije bi se moglo pripisati povećanoj apsorpciji i vezanju retinoične kiseline za fluorinirani supstrat.[39]

Obećavajući rezultati *in vitro* su nedavno dobiveni od Defterali et al. Termalno reducirani grafenski supstrati bez premaza (eng. thermally reduced graphene – TRG) su se koristili za rast i diferencijaciju neuralnih matičnih stanica, koje su rasle direktno na grafenskom materijalu bez nekog prijašnjeg biomolekulskog premaza. Kulture koje su rasle na TRG supstratima su karakterizirane višim brojem stanica i s više sinaptičkih izbočina, kao i s efikasnom diferencijacijom u više loza.[40]

Tablica 2: Kompilacija rezultata odabranih za ovaj pregled

Tip nanočestice	Prilagodba (ciljni ligandi)	Supstanca	Rezultati potvrđeni:
Nanoporozne silica čestice	-	Cintrofin i Gliafin	Imunobojanje, elektrofiziologija i slikanje fluorescentnim proteinom osjetljivim na voltažu
Polietilenimin i dekstran sulfat NPs	-	Retinoična kiselina	Histaminska stimulacija, varijacije kalcija pri KCl depolarizaciji
Magnetske nanočestice (MNPs)	-	siRNA ili plazmidna DNA	Imunobojanje
Dendritički poliamin od modificiranog ciklodekstrina	-	Retinoična kiselina i siRNA	Imunobojanje GFAP i Tuj1 markera
NanoScript	-	Transkripcijski faktori	Flux kalcijevih iona
Grafen	Taloženje kemijskih para (CVD)	-	Povećani putevi povezani s lamininom
Grafen	CVD	-	Povećani putevi povezani s GAP43
Fluorinirana grafenska struktura	-	Retinoična kiselina	Povećana diferencijacija
Grafen	Termalno reduciran	-	Povećani rast i diferencijacija neuralnih matičnih stanica

3.8. Nedostatci primjene nanočestica

Nanomaterijali pružaju ogroman potencijal za terapiju i dijagnostiku, ali ujedno otvaraju mogućnost nekontroliranog pristupa mozgu. *In vivo* studije su pokazale da se NPs mogu naći u CNS-u nakon raznih načina administracije. Brojni nano-sustavi dostave su se predlagali i testirali u terapijske svrhe, i *in vitro* i *in vivo*. Među najmodernijim sustavima, polimerne NPs su obećavajuće zbog njihovog velikog kapaciteta enkapsuliranja lijeka te tako štite i transportiraju hidrofobne lijekove bez oštećenja strukture BBB. Općenito, iskorištavanje RMT povezujući specifične peptide na površinu NPs je jedan od najispitivanijih sustava u području prelaska BBB. Razne molekule, poput transferina, inzulina, lektina i lipoproteina, fiziološki koriste ovu rutu kako bi prošle iz krvotoka u mozak, stoga bi ovi ligandi mogli uvećati omjer prelazaka NPs u kombinaciji s lijekom kroz BBB u terapijske svrhe.

Prekrivanje NPs surfaktantima potiče prolazno remećenje uskih spajanja u BBB, što dovodi do veće permeabilnosti endotela te potom i lakši prolaz velikih molekula i nanoprijenosnika kako bi došli u mozak. Unatoč obećavajućim rezultatima, tehnike koje mijenjaju permeabilnost BBB, pa makar prolazno i lokalno, nose sa sobom veliki problem, tj. gubitak kontrole nad prolazom neželjenih molekula i/ili mikroorganizama koji nastanjuju krvotok. Ako je točno da se količina lijeka koja dolazi do mozga povećava pri otvaranju uskih spajanja, također je točno da toksični spojevi koji su inače ograničeni na krvne žile netaknutim BBB-om, mogu proći u isto vrijeme kad i lijek, što predstavlja visok rizik za pacijenta.[8]

Potencijalna toksičnost nanomaterijala baziranih na ugljiku je bila zabrinjavajuća tema posljednjih godina. CNTs se sastoje od vlaknastih materijala za koje se smatra da su bioprezistentni te, stoga, posjeduju patogenost nalik azbestu.[17]

Izlaganje živih organizama nanočesticama je oduvijek postojalo budući da neke NPs imaju prirodna podrijetla. Danas, ENPs se također slučajno otpuštaju tijekom industrijskih i manufakturnih procesa. Stoga, razina različitih tipova ENPs u našem okolišu se povećava, a s time i u našem tijelu, s dugoročnim potencijalno štetnim učincima koji su još uvijek nepoznati. Na primjer, pokazano je da u štakorima ENPs mogu proći placentu kada su administrirani u trudnih štakorica. Dakle, izlaganje majke može imati efekte na embrij te na potomke. Istraživanja na različitim životinjskim modelima su pokazala da ENPs mogu imati negativne efekte na muške spolne stanice te na ženski reproduktivni sustav, oštećujući tako reprodukciju i normalni razvoj embrija i fetusa.[41],[42]

U posljednjim godinama se NPs upotrebljavaju u proizvodima za osobnu higijenu poput kozmetike, sredstava za sunčanje, sapuna i šampona. Upravo zato postoji potreba za razumijevanjem eventualne toksičnosti NPs koje mogu vrlo lako ući u stanice i inducirati oksidativni stres. No, ono što je važno shvatiti jest da se iste regulacije ne odnose na NPs za kliničke svrhe i NPs za proizvode masovnog tržišta (npr. kozmetika, tekstili). NPs korišteni u istraživačke svrhe uvijek prolaze studiju toksičnosti u kojoj je utvrđeno jesu li ili nisu prikladne za uporabu u medicinske svrhe.

4. ZAKLJUČAK

Nanotehnologija izaziva podijeljena mišljenja javnosti. S jedne strane se nalaze njezini široki tehnološki i ekonomski potencijali, no s druge strane sve je veća prisutnost njenih proizvoda u okolišu i zdravlju, a za čiju potencijalnu toksičnost još nema dovoljno podataka. Tijekom godina su regulatorne agencije u cijelom svijetu odobrile brojne ENP sustave, i za terapije i za dijagnostiku.[3] Jedinstvena svojstva MNPs ih čine idealnim za fizičko ciljanje CNS-a kako bi se optimizirala dostava lijeka.[2] Tretman neuroloških poremećaja kroz neinvazivne farmakološke primjene je još uvijek velika prepreka. Za znanstvenike je ključno razviti strategije za efikasnu dostavu tereta lijeka, biomolekula ili čak gena u mozak, mimoći BBB i pritom sačuvati njezinu strukturu i funkcije bitne za život.

Povezujući grafen s neuralnim stanicama se pokazalo izuzetno povoljnim za istraživanje električnog ponašanja neurona, ili za poboljšanje regeneracije kontroliranim poticanjem rasta neuronskih vlakana. Ove primjene otvaraju nova područja istraživanja, uključujući neuroonkologiju, neurooslikavanje, neuroregeneraciju, funkcionalne neurooperacije CNS-a i operacije perifernih živaca.

Osim izazova vezanih uz prijelaz lijekova kroz BBB, istraživanja na grafenima se razvijaju i na drugim aspektima neuroznanosti. Neuroonkologija bi mogla profitirati od razvoja grafenskih nanoploča i grafenskih NPs za ciljano oslikavanje tumora, fototermalnu terapiju, gensku terapiju i antitumorsku dostavu lijekova. Novi električni, kemijski i optički senzori mogu imati velik utjecaj na praćenje neuralne aktivnosti. Štoviše, kombinacija različitih oblika i kemijskih stanja grafena, raznolike kemijske funkcionalizacije i moguće asocijacije s drugim biomaterijalima za stvaranje grafenskih mješavina, bi mogla utjecati na stvaranje kompletnih alata kako za dijagnostiku, tako i za terapiju te time učinkovito stvarajući snažan teranostički uređaj.[8]

Općenito, samo NPs malih veličina karakterizirane strogim površinskim svojstvima mogu proći BBB. Međutim, vrlo mali broj dosad proizvedenih NPs je uspio doći do mozga kroz krvotok. Stoga, unatoč činjenici da je istraživanje BBB područje koje se intenzivno proučava već godinama, još smo daleko od jednostavnog i sigurnog kontroliranja njezine permeabilnosti.[2] Kao zaključak želim istaknuti da bi se, bazirano na pregledanoj literaturi i na rezultatima predkliničkih studija, naglasak trebao staviti na validaciju mogućnosti ENPs da prođu BBB u zdravim („wild type“) životinjama koje imaju netaknutu barijeru, na odabir životinjskog modela najbližeg ljudskoj patologiji te na evaluaciju potencijalne neurotoksičnosti ENPs. Slično tome, ključno je procijeniti da li ENPs mogu inducirati upalni odgovor same po sebi, bez obzira na terapijsku molekulu koju prenose.[3]

5. LITERATURA

- [1] S.-T. D. Chueng, L. Yang, Y. Zhang, and K.-B. Lee, "Multidimensional nanomaterials for the control of stem cell fate," *Nano Converg.*, vol. 3, no. 1, p. 23, 2016.
- [2] F. D'Agata *et al.*, "Magnetic nanoparticles in the central nervous system: Targeting principles, applications and safety issues," *Molecules*, vol. 23, no. 1, pp. 1–25, 2018.
- [3] R. Poupot, D. Bergozza, and S. Fruchon, "Nanoparticle-based strategies to treat neuro-inflammation," *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 2, 2018.
- [4] A. Sanabria-Castro, I. Alvarado-Echeverría, and C. Monge-Bonilla, "Molecular pathogenesis of alzheimer's disease: An update," *Ann. Neurosci.*, vol. 24, no. 1, pp. 46–54, 2017.
- [5] A. T. Rao, A. J. Degnan, and L. M. Levy, "Genetics of Alzheimer disease," *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 35, no. 3, pp. 457–458, 2014.
- [6] M. Rodriguez, C. Rodriguez-Sabate, I. Morales, A. Sanchez, and M. Sabate, "Parkinson's disease as a result of aging," *Aging Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 293–308, 2015.
- [7] A. Domínguez, B. Suárez-Merino, and F. Goñi-de-Cerio, "Nanoparticles and Blood-Brain Barrier: The Key to Central Nervous System Diseases," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 766–779, 2014.
- [8] M. Bramini *et al.*, "Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells," *Front. Syst. Neurosci.*, vol. 12, no. April, pp. 1–22, 2018.
- [9] M. A. Busquets, A. Espargaró, R. Sabaté, and J. Estelrich, "Magnetic Nanoparticles Cross the Blood-Brain Barrier: When Physics Rises to a Challenge," *Nanomaterials*, vol. 5, no. 4, pp. 2231–2248, Dec. 2015.
- [10] M. W. Salter and S. Beggs, "Sublime microglia: Expanding roles for the

- guardians of the CNS," *Cell*, vol. 158, no. 1, pp. 15–24, 2014.
- [11] J. Middeldorp and E. M. Hol, "GFAP in health and disease," *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, no. 3, pp. 421–443, 2011.
- [12] D. Melton, W. Is, and A. S. Cell, "' Stemness ': Definitions , Criteria , and Standards," pp. 7–17, 2014.
- [13] A. A. Dayem *et al.*, "The potential of nanoparticles in stem cell differentiation and further therapeutic applications," *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 12, pp. 1550–1560, 2016.
- [14] I. Faravelli *et al.*, "Motor neuron derivation from human embryonic and induced pluripotent stem cells: experimental approaches and clinical perspectives," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 5, no. 4, p. 87, 2014.
- [15] D. Payen *et al.*, "Review Article," vol. 45, no. 3, pp. 282–291, 2016.
- [16] S. F. Jang *et al.*, "Nanomedicine-based neuroprotective strategies in patient specific-iPSC and personalized medicine," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 3904–3925, 2014.
- [17] K. Bhattacharya *et al.*, "Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 333–351, 2016.
- [18] G. AK, "Graphene: status and prospects," *Science (80-.)*, vol. 324, no. 5934, pp. 1530–1534, 2009.
- [19] Y. Chen, A. Star, and S. Vidal, "Sweet carbon nanostructures: Carbohydrate conjugates with carbon nanotubes and graphene and their applications," *Chemical Society Reviews*. 2013.
- [20] A. A. John, A. P. Subramanian, M. V. Vellayappan, A. Balaji, H. Mohandas, and S. K. Jaganathan, "Carbon nanotubes and graphene as emerging candidates in neuroregeneration and neurodrug delivery,"

International Journal of Nanomedicine. 2015.

- [21] G. P. Kotchey, Y. Zhao, V. E. Kagan, and A. Star, "Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013.
- [22] M. Srikanth and J. A. Kessler, "Nanotechnology—novel therapeutics for CNS disorders," *Nat. Rev. Neurol.*, 2012.
- [23] R. G. Schwerdt, J.I.; Goya, G.F.; Calatayud, M.P.; Hereñú, C.B.; Reggiani, P.C.; Goya, "Magnetic field-assisted gene delivery: Achievements and therapeutic potential," *Curr. Gene Ther.*, vol. 12, no. 2, pp. 116–126, 2012.
- [24] L. J. Santos, R. L. Reis, and M. E. Gomes, "Harnessing magnetic-mechano actuation in regenerative medicine and tissue engineering," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 8, pp. 471–479, Aug. 2015.
- [25] K. Hu, Y. Shi, W. Jiang, J. Han, S. Huang, and X. Jiang, "Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: Preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease," *Int. J. Pharm.*, vol. 415, no. 1, pp. 273–283, 2011.
- [26] H. Li *et al.*, "Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018.
- [27] S. K. Tiwari *et al.*, "Curcumin-Loaded Nanoparticles Potently Induce Adult Neurogenesis and Reverse Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Model via Canonical Wnt/ β -Catenin Pathway," *ACS Nano*, vol. 8, no. 1, pp. 76–103, Jan. 2014.
- [28] Y. S. R. Elnaggar, S. M. Etman, D. A. Abdelmonsif, and O. Y. Abdallah, "Intranasal Piperine-Loaded Chitosan Nanoparticles as Brain-Targeted Therapy in Alzheimer's Disease: Optimization, Biological Efficacy, and

- Potential Toxicity," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 10, pp. 3544–3556, Oct. 2015.
- [29] R. M. Hernando, S.; Herran, E.; Figueiro-Silva, J.; Pedraz, J.L.; Igartua, M.; Carro, E.; Hernandez, "Intranasal administration of TAT-conjugated lipid nanocarriers loading GDNF for Parkinson's disease," *Mol. Neurobiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 145–155, 2018.
- [30] Z. Wen *et al.*, "Odorranalectin-conjugated nanoparticles: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on Parkinson's disease following intranasal administration," *J. Control. Release*, vol. 151, no. 2, pp. 131–138, 2011.
- [31] A. E. Garcia-Bennett *et al.*, "Delivery of Differentiation Factors by Mesoporous Silica Particles Assists Advanced Differentiation of Transplanted Murine Embryonic Stem Cells," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 2, no. 11, pp. 906–915, Nov. 2013.
- [32] J. Maia *et al.*, "Controlling the Neuronal Differentiation of Stem Cells by the Intracellular Delivery of Retinoic Acid-Loaded Nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 5, no. 1, pp. 97–106, Jan. 2011.
- [33] B. Shah, P. T. Yin, and K.-B. Lee, "Multimodal magnetic core-shell nanoparticles for effective stem cell differentiation and imaging," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 52, no. 24, pp. 6190–6195, Jun. 2013.
- [34] S. Shah, A. Solanki, P. K. Sasmal, and K.-B. Lee, "Single Vehicular Delivery of siRNA and Small Molecules to Control Stem Cell Differentiation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 42, pp. 15682–15685, Oct. 2013.
- [35] S. Patel, D. Jung, P. T. Yin, P. Carlton, M. Yamamoto, and T. Bando, "NanoScript : A Nanoparticle-Based Artificial Transcription Factor for,"

ACS Nano, vol. 8, no. 9, pp. 8959–8967, 2014.

- [36] S. Patel *et al.*, "Induction of Stem Cell-derived Functional Neurons via NanoScript-based Gene Repression," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 54, no. 41, pp. 11983–11988, Oct. 2015.
- [37] S. Y. Park *et al.*, "Enhanced Differentiation of Human Neural Stem Cells into Neurons on Graphene," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 36, pp. H263–H267, Aug. 2011.
- [38] N. Li *et al.*, "The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates," *Biomaterials*, vol. 32, no. 35, pp. 9374–9382, 2011.
- [39] W. C. Lee *et al.*, "Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide," *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 7334–7341, Sep. 2011.
- [40] İ. Defterali *et al.*, "In vitro evaluation of biocompatibility of uncoated thermally reduced graphene and carbon nanotube-loaded PVDF membranes with adult neural stem cell-derived neurons and glia," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2016.
- [41] M. Fatemi, J. Moshtaghian, K. Ghaedi, N. Jafari dinani, and G. Naderi, "Effects of Silver Nanoparticle on the Developing Liver of Rat Pups after Maternal Exposure," *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 16, no. 2, pp. 685–693, Dec. 2017.
- [42] R. D. Brohi *et al.*, "Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, p. 606, Sep. 2017.

ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Diana Dragičević



✉ diana.dragicevic0710@gmail.com

Spol Ž | Datum rođenja 07/10/1996 | Državljanstvo Hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

2015. – 2019. **Preddiplomski studij odjela za biotehnologiju**
Sveučilišni odjeli Sveučilišta u Rijeci, Radmile Matejčić 2, Rijeka, 51 000, Republika Hrvatska
- Smjer – Biotehnologija i istraživanje lijekova
2011. – 2015. **Prva riječka hrvatska gimnazija**
Frana Kurelca 1, Rijeka, 51 000, Republika Hrvatska
- Opći smjer

OSOBNJE VJEŠTINE

MATERINSKI JEZIK Hrvatski

OSTALI JEZICI

	RAZUMJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	SLUŠANJE	ČITANJE	GOVORNA INTERAKCIJA	GOVORNA PRODUKCIJA	
Engleski	C2	C2	C1	C1	C2
Njemački	A1	A1	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1/2: Temeljni korisnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2 Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

DIGITALNA KOMPETENCIJA

- Korištenje MS Office programa (Excel, PowerPoint, Word)

VOZAČKA DOZVOLA B