

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

Cílené podávání léků: potenciální aplikace s resveratrole

Targeted drug delivery system: potential application to resveratrol

Hassan Farghali • Ludmila Kameníková

Došlo: 14. dubna 2017 / Přijato: 11. května 2017

Souhrn

Od systému cíleného podávání léků (DDS – drug delivery system) se očekává pro terapii zvýšená účinnost léčiv, cílená distribuce a snížení nežádoucích efektů. V přehledném článku jsou stručně popsány základní principy nanotechnologie vyvinuté pro DDS, jednotlivé úseky současného výzkumu a klíčové oblasti nutné pro budoucí zkoumání. Pozornost je věnována resveratrolu jako modelové látce se zajímavými farmakologickými vlastnostmi, které byly potvrzeny v řadě studií, a také pro jeho široké užívání ve formě doplňkové terapie. Vzhledem k nepříznivým farmakokinetickým parametrům resveratrolu, charakterizovaných velmi nízkou biodostupností přes dostatečně vysokou orální absorpci, se účinnost resveratrolu začala studovat v nových nanotechnologiích připravených lékových formách. V přehledu jsou uvedeny výsledky dosavadních *in vitro* a *in vivo* studií s resveratrole v novém typu lékových forem s využitím různorodých nanočástic jako jsou liposomy, pevné lipidní částice, cyklodextriny a micely.

Klíčová slova: cílené podávání léků • nanotechnologie • resveratrol

Summary

Drug delivery system (DDS) is intended to increasing effectiveness of drugs through targeted distribution and to reducing of unwanted effects. In this mini-review, the basic principles of nanotechnology that were developed for DDS were reported including sections on the present research in key areas that are important for future investigations. Attention is paid on resveratrol as a model phytochemical with interesting pharmacologic profile which was demonstrated in great numbers of studies and for its wide use as supplemental therapy. Due to complicated pharmacokinetic profile of resveratrol that is characterized by very low bioavailability in spite of high oral absorption, the effects of resveratrol is being studied in new nanotechnology preparations of pharmaceutical formulation.

Herein we report on results of present *in vitro* and *in vivo* investigations with resveratrol in new types of drug formulations using different nanoparticles as liposomes, solid lipid particles, cyclodextrins and micelles.

Key words: targeted drug delivery • nanotechnology • resveratrol

Úvod

Úspěšnost farmakoterapie je závislá na mnoha faktorech. Jedním z velmi důležitých faktorů je uvolňování účinné látky z lékové formy. V současné farmakoterapeutické praxi se užívají všechny tři druhy lékových forem: formy s neřízeným účinkem, tzv. formy konvenční, dále s řízeným účinkem a vyvíjejí se lékové formy s cílenou distribucí. Systém cíleného podávání léků (tzv. drug delivery system – DDS) byl vytvořen inženýrskou technologií pro cílené podávání a/nebo kontrolované uvolnění terapeutické účinné látky. Je možné kontrolovat rychlost, při které se léčivo uvolňuje, a místo, kde se v těle léčivo kumuluje. Cílem tohoto výzkumu s jakoukoliv jednotlivou účinnou látkou je přispět k zajištění lepší účinnosti léčby ve srovnání s konvenční aplikací léků.

Tento pokrokový systém není možné vždy akceptovat pro některá onemocnění, i když byl vyvinut na základě pokrokových strategií molekulární biologie, a to v důsledku vzniklých nežádoucích efektů, jež pak limitují snahu k navržení optimální léčby např. pro nádorová, neurodegenerativní a infekční onemocnění.

Pro budoucí terapeutické využití třetí generace lékových forem jsou důležité principy nanotechnologického výzkumu. Od tohoto systému se očekává zvýšená účinnost léčiv a úbytek nežádoucích efektů léčby. Za účelem optimalizovat tento systém byli začleněni do výzkumných týmů pracovníci rozličných specializovaných oborů, tj. chemici, biologové, farmaceutičtí technologové.

Základní principy nanotechnologie vyvinuté pro DDS

Základním principem nanotechnologie je snaha vytvořit nový transportní systém s léčivem, ve kterém je léčivo během prostupu tkáněmi chráněno, a dopravit ho až do cílené tkáně, kde se teprve léčivá látka uvolní.

V tkáni, která je patologicky postižená, by pak uvolněné léčivo mělo zlikvidovat škodlivé buňky a zároveň

H. Farghali • prof. RNDr. Ludmila Kameníková, DrSc. (✉)
Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN
Albertov 4, 128 00 Praha 2
e-mail: ludmila.kamenikova@lf1.cuni.cz

nezasáhnout zdravou tkáň. To je velký úkol pro moderní biomedicínu¹⁾.

Jednotlivé úseky současného výzkumu pro DDS

Prvním úsekem současného výzkumu pro DDS je cesta podání (delivery), neboť je mnoho rozmanitých způsobů aplikace, z nichž každá má pro konkrétní léčbu své výhody i nevýhody. Příkladem může být např. mikrovláknová náplast pro aplikaci vakcíny²⁾. Tato nová léková forma je snadno použitelná, bez speciálních příkazů, takže může být používána samotnými pacienty i v domácí péči.

Druhý úsek výzkumu pro DDS se zabývá výběrem a testováním správného nosiče (cargo) pro léčivo. Tento úsek je pro cílený DDS nejdůležitější a také nejobtížnější. Prozkoumává se použití genů, proteinů i kmenových buněk jako nosičů. Takovým příkladem je projekt proteinové léčby autoimunitních onemocnění. Byly vyvinuty mikroskopické, biodegradovatelné částice, schopné selektivně napadnout imunitní buňky spojené s autoimunitním narušitelem pro vznik roztroušené sklerózy. Proteinové mikročástice bude možné využít v léčbě jiných na imunitě závislých nemocí, včetně alergií nebo při útlumu orgánové rejekce transplantovaných pacientů.

Třetím úsekem výzkumu je cílená strategie, tj. určení onoho terče neboli cíle, kam má být léčivo dopraveno a kde má efektivně působit. Tímto cílem mohou být celé orgány (srdce, plíce, mozek), typy tkání (svaly, nervy), struktury specifické nemoci (nádorové buňky) nebo vnitřní struktury v buňce. Tak byly např. vyvinuty nanočástice rostlinného viru schopné zacílit a atakovat nádorové prostatické buňky³⁾. Existuje mnoho dalších výzkumných projektů pro vývoj virových nanočástic k dopravě chemoterapeutických léčiv přímo do nádorů. Výhodou dané strategie bývá snížení vedlejších efektů, které téměř vždy doprovázejí terapii nádorového onemocnění.

Klíčové oblasti nutné pro budoucí zkoumání

Pro budoucí výzkum v DDS systému bude nutné hlouběji zkoumat průnik léčiv krevně-mozkovou bariérou u nemocí mozku, shromažďovat znalosti o průniku léčiv škodlivých mozku. Systém DDS je speciálně důležitý pro léčbu např. mozkových nádorů, Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci.

Druhou budoucí klíčovou oblastí je navýšení poznatků o cíleném intracelulárním podávání léčiv. Jako je tělo chráněno imunitním systémem před nemocemi, tak každá z našich buněk disponuje vlastními interními procesy k rozpoznání a zbavení se potenciálně škodlivých látek, tedy látek tělu cizích. Pomocí nových inženýrských technologií v rámci DDS zajistit průnik léčiva do cíleného intracelulárního místa a jeho uvolnění v závislosti na specifických molekulárních signálech a na základě správně vybraných intracelulárních buněčných strukturách.

Třetí oblast výzkumu se týká teranostiky⁴⁾ – nové strategie kombinace diagnózy a léčby. Se zobrazovací

technologii a současným cíleným dodáním léčiv budou lékaři schopni diagnostikovat a léčit nemoci současně, tzv. jedním krokem⁴⁾.

Resveratrol – účinná látka, potravní doplněk

Zájem o substituční dodání resveratrolu do lidského těla souvisí s tzv. „francouzským paradoxem“ z poloviny osmdesátých let 20. století. Epidemiologické pozorování totiž odhalilo, že Francouzi i přes relativně bohatou stravu na tuky vykazují nízkou incidenci kardiovaskulárních onemocnění. Dává se to do souvislosti s velkou potřebou ovoce a vína, jejichž významnou složkou je resveratrol. Resveratrol svými příznivými farmakologickými vlastnostmi^{5, 6)} se začal jevit jako potenciální léčivá látka k léčbě rozličných potíží. Vykazuje antioxidační, kardioprotektivní, protizánětlivý, protirakovinný potenciál a popisuje se také jeho anti-aging efekt^{7–9)}. Je konzumenty užíván kromě konzumace ovoce a pití vín také jako potravní doplněk, a to dosud v klasických perorálních lékových formách.

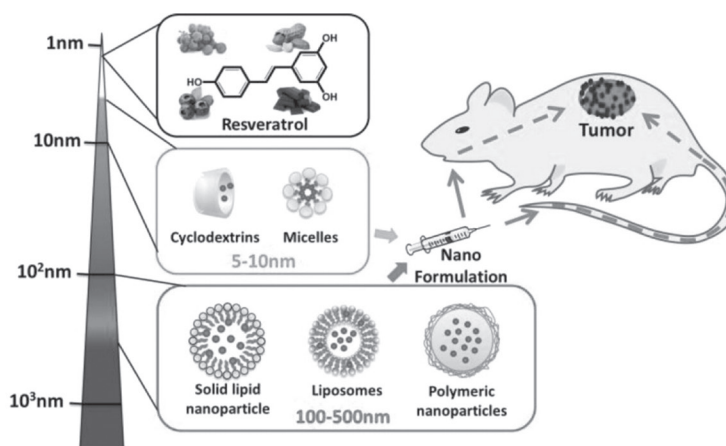
Problematika substitučního podávání resveratrolu do organismu není zdaleka tak jednoduchá, jak by se zdálo. Většina základní vědecké literatury obsahuje enormní počty substrátů, které slibují zlepšit či dokonce anulovat symptomy nemocí v rozsahu mezi léčbou rakoviny až ke zpomalení samotných procesů stárnutí. Na druhé straně však tyto látky nebyly dostatečně zkoumány u lidí. Je nutné mít na mysli vždy důležitost extrapolace výsledků získaných ze základního výzkumu ke klinickému použití¹⁰⁾.

Konference uspořádaná v Dánsku v roce 2011 upozornila na tu skutečnost, že publikované výsledky nejsou vždy jednoznačnými důkazy pro to, aby byl resveratrol podáván lidem v dávkách větších než v té dávce, která odpovídá denní spotřebě potravin¹¹⁾. Přesto se resveratrol svými farmakologickými vlastnostmi zdá být potenciální léčivou látkou k léčbě rozličných potíží v důsledku svých silných antioxidačních vlastností. Aby se však stal potenciálním kandidátem zařazeným do první linie léčby nemocí, vede ještě dlouhá cesta.

Podívejme se a zamysleme se nad jeho složitou farmakokinetikou.

Farmakokinetické vlastnosti resveratrolu

Jsou charakterizovány velmi nízkou biodostupností, slabou rozpustností ve vodě v důsledku své lipofility. Zajímavé je porovnání jeho účinnosti s biologickou dostupností. Tato látka je absorbována v těle ze 75 %, ale její biologická dostupnost je pouze 1%⁶⁾. Je absorbována ze zažívacího traktu do jater, kde dochází k biotransformaci, k first-pass-efektu s tvorbou řady metabolitů a také ze střevního traktu. Dá se tedy říci, že farmakokinetické vlastnosti nejsou u resveratrolu ve srovnání s jinými účinnými látkami příznivé, a to nejen pro jeho nepatrnou – velice nízkou biodostupnost a nízkou rozpustnost ve vodě, ale také pro chemickou nestabilitu.



Obr. 1. Možnosti nanoformulací s resveratrolem dle⁶⁾

Samotný resveratrol existuje ve dvou geometrických isomerech jako cis- a trans-isomer. Trans-isomer se vyskytuje častěji a je biologicky aktivnější než cis-isomer¹²⁾. Přesto je orální absorpce resveratrolu u lidí vysoká (asi 75%) a uskutečňuje se převážně transepiteliální difuzí¹³⁾. Značně nízká biologická dostupnost resveratrolu (< 1 %) vyplývá v důsledku extensivního metabolismu ve střevě a játrech. Při biotransformaci dochází ke glukuronové a sulfátové konjugaci s tvorbou klíčových metabolitů a to trans-resveratrol-3-O-glukuronid a trans-resveratrol-3-sulfát¹⁴⁾. Zda tyto metabolity vykazují také farmakologickou účinnost přes původně zjištěnou nepatrnou biologickou dostupnost, není dosud potvrzeno. Zda se jedná o nelineární farmakokinetiku není v publikacích uváděno.

Základní farmakokinetické parametry byly získány na dobrovolnících po aplikaci konvenčních lékových forem. V jedné farmakokinetické studii¹⁵⁾ byl podáván resveratrol po dobu 29 dní v dávkách 0,5–5 g/den. Vyšší dávky od 2,5 g/den vyvolaly však řadu nepříjemných gastrointestinálních potíží. V dalších studiích^{16, 17)} byly farmakokinetické parametry získávány včetně stanovení metabolitů u různého počtu dobrovolníků (soubor až 40). Hlavní pík plazmatické koncentrace látky byl nalezen v rozmezí 0,8–1,5 h, plocha pod plazmatickou křivkou byla závislá na dávce. Exkrece resveratrolu i jeho metabolitů do moči byla rychlá, okolo 4 h při nejnižší podané dávce. Po perorálně aplikovaném resveratrolem byla u lidí zjištěna jen nízká koncentrace volné látky¹³⁾ v systémové cirkulaci a byla potvrzena hepato-enterická recirkulace¹⁸⁾ s výsledným biologickým poločasem 9,2 h.

Farmakologické vlastnosti resveratrolu

Hlavní farmakologické efekty po podání resveratrolu byly zjištěny převážně v *in vitro* studiích. Byla to aktivita protinádorová, antioxidační, kardioprotektivní a apoptotická.

Protirakovinná aktivita resveratrolu byla testována u rozličných nádorových buněčných linií. Přesné farmakologické poznatky nejsou však dosud zcela známé. Pochopení vlastního mechanismu účinku

resveratrolu je založeno na schopnosti této látky indukovat apoptózu a zabrzdit buněčný cyklus^{19–21)}. Vysvětlit mechanismus účinku této aktivity resveratrolu je možné na základě regulace reaktivních druhů kyslíku (ROS), snížení signalizace této patologické cesty. Je nutné si také uvědomit, že v některých studiích vyšel nejen antioxidační, ale i prooxidační potenciál. Který z těchto dvou mechanismů je více dominantní a na čem to závisí, nelze dosud rozhodnout a nelze uvažovat jen o velikosti dávky.

Při zkoumání vlivu resveratrolu na parametry oxidativního stresu a na hladinu ROS včetně antioxidační aktivity se ukázalo, že dlouhotrvající substituce resveratrolu signifikantně snížila poškození DNA způsobené podáním některých toxických látek²²⁾, došlo ke zhášení lipidních aniontových radikálů hydroperoxyly, hydroxyly a superoxydu²³⁾ a ke zvýšení antioxidační aktivity v buňkách, a to u superoxiddismutázy (SOD) a katalázy; rovněž byla zvýšena hladina různých kofaktorů nutných pro antioxidační efekt jako glutathionu, vitaminu C, vitaminu E a betakarotenu²²⁾. Z výsledků převážně *in vitro* studií vyplynulo, že resveratrol by mohl mít důležitou roli v prevenci iniciace karcinogeneze. Ovšem tato tvrzení bude nutno podložit klinickými studiemi, které dosud se samotným resveratrolem k dispozici nejsou.

Hlavním farmakologickým účinkem resveratrolu je jeho antioxidační aktivita, jak bylo uvedeno výše, která se může projevit také v účinku kardioprotektivním. Tento vliv byl prokázán v srdeční tkáni úbytkem iontových radikálů patřících do skupiny ROS. Resveratrol zvyšuje aktivitu endoteliální nitric oxid syntasy a inhibuje LDL oxidaci. Vykazuje také protektivní účinky vůči neurodegenerativnímu poškození. Je schopen inhibovat tvorbu a agregaci β -amyloidního peptidu²⁴⁾ zodpovědného za neuronální dysfunkce a úmrtí spojená s Alzheimerovou nemocí v důsledku působení ROS.

Pro spuštění apoptózy lidských buněk akutní myeloidní leukemie byl Yaseenem et al.²⁵⁾ prokázán synergický účinek resveratrolu s inhibitory histon deacetylasy. Došlo ke zvýšené tvorbě ROS doprovázené zvýšeným

poškozením DNA a buněčnou apoptózou a následně aktivaci receptorů, jež dále aktivovaly enzymy proapoptotické kaskády. Podobné výsledky byly získány na nádorových buňkách lidského střeva, HT-29 a COLO 201, v nichž resveratrol indukoval celulární apoptosu.

K dalším vlastnostem resveratrolu přispěla v tomto roce publikovaná studie²⁶⁾ o možnosti biodostupnosti této – ve vodě slabě rozpustné látky – do kůže. S použitím modelu prasečí ušní kůže se zjistilo, že po aplikaci lékové nanosuspensní formy resveratrolu došlo k jeho větší penetraci do hlubších úrovní kůže než ve srovnání s hrubou suspensní látkou. Tento poznatek by mohl být v budoucnu využit za účelem léčby kožních nemocí.

Přesto, že výsledky prováděné s resveratrolem v *in vitro* studiích se zdály být slibné, byly v mnohém limitovány. Pro *in vivo* studie byl limitujícím faktorem výběr vhodného nosiče léčiva, se kterým by bylo možné látku cíleně zacílit např. do nádorových buněk v těle.

Pro jeho výrazné farmakologické a terapeutické účinky zjištěné a potvrzené převážně v *in vitro* studiích a vzhledem k jeho malé biologické dostupnosti se začalo uvažovat o novém typu lékových forem pro resveratrol s využitím tzv. „nanodelivery“ systémů.

Jaké jsou výsledky studií s resveratrolem v nanoformách?

Zkoumání účinnosti resveratrolu v novém typu lékových forem bylo provedeno za *in vitro* i *in vivo* podmínek⁵⁾. Cílem těchto studií bylo zvýšit orální dostupnost resveratrolu pro další užití v medicíně jako doplňku stravy. K vytvoření nových lékových forem s resveratrolem bylo využito různorodých nanočástic: liposomy, pevné lipidní nanočástice, cykloextriny a micely. Proti tradičním lékovým formám se očekávala řada předností. A to zvýšení rozpustnosti resveratrolu ve vodě, zlepšení biodostupnosti, zvýšení fyzikálně-chemické stability látky. Především však schopnost zacílit léčivo přímo do místa účinku včetně možnosti kontrolovat postupné uvolňování léčiva^{27, 28)}.

Zjistilo se, že lékové formy s nanovelikostí mají své přednosti zejména v terapii nádorů v důsledku zvýšeného permeačního a retenčního efektu (EPR), kterým se tyto molekuly přednostně hromadí v nádorových tkáních. EPR efekt byl navržen k vysvětlení selektivního hromadění nanonosičů u solidních tumorů a použit k vysvětlení strategie celého „delivery“ systému²⁹⁾. Nanočástice mohou snadno difúzně proniknout do cévního systému a nahromadit se v intersticiální tekutině, např. v lymfatickém systému karcinogenní tkáně, a tak ji poškodit.

Podívejme se na výsledky náročných studií provedených v posledních letech s různorodými nanoformami s resveratrolem.

Liposomy

První sledovanou nano-lékovou formou s resveratrolem byly liposomy. Vesikuly liposomů obsahují vodní jádro obklopené fosfolipidní dvouvrstvou se silnou podobností

se savčí plazmatickou membránou³⁰⁾, která je důležitá pro stabilitu vehikul. Výhodou liposomů je skutečnost, že zabráňují fotochemickou degradaci velkého počtu léčiv a biomolekul. Chemická stabilita trans-resveratrolu v liposomech byla zachována při jejich uskladnění v nepřítomnosti světla, ale jen při nízkých teplotách nad nulou³¹⁾. Samotná fotoisomerizace resveratrolu má za následek narušení integrity liposomální dvojvrstvy a zapuštění látky do lipidního kompartmentu. Liposomální stabilita závisí na povrchu zeta (ζ)-potenciálu, což je parametr, podle kterého se určuje predikce elektrostatické stabilizace v koloidním systému. Vysoký ζ -potenciál je příznakem dobré disperzní stability.

V *in vitro* studiích byla zkoumána účinnost liposomů naplněných resveratrolem s cíleným zaměřením (targeting) do rakovinných buněk. Velikost liposomů použitá ve studiích se pohybovala v rozmezí 70–200 nm. Výsledkem byl pasivní transport většiny nanočástic do nádoru s využitím patofyziologických abnormalit cévní sítě nádoru. Na základě tohoto výsledku byly prováděny také povrchové modifikace za účelem zvýšení celulární přínavosti liposomů a ochrany vesikulů před metabolickou eliminací za podmínek *in vivo*³²⁾.

Úspěšně byly testovány imunoliposomy nejen s resveratrolem, ale i s obsahem dalších polyfenolů, např. s kurkuminem³³⁾. Ukázalo se, že imunoliposomy ve srovnání s konvenčními liposomy vykazují větší kumulaci v buňkách s HER2 receptory (receptor lidského epidermálního růstového faktoru), což vedlo ke zlepšení selektivity a antiproliferačních účinků resveratrolu v těchto buňkách. Síla účinnosti imunoliposomů je závislá na úrovni exprese tohoto receptoru v buňkách³⁴⁾. Inovativním zlomem ve vývoji nanočástic resveratrolu bylo objevení mitochondrial-targeting liposomů. Wang et al.³⁵⁾ vyzkoušel použít tyto modifikované nanočástice za účelem selektivního zvýšení liposomů s resveratrolem při léčbě rezistentních plicních nádorových buněk. Výsledkem byla zvýšená apoptóza v nádorových buňkách vyvolaná zvýšeným celulárním příjmem a akumulací léčiva v mitochondriích. Jejím důsledkem došlo ke snížení mitochondriální depolarizaci.

Za účelem zvýšení cytotoxické účinnosti resveratrolu vůči rakovinným buňkám byly provedeny studie s kombinovanou enkapsulací resveratrolu s jinými cytotoxickými látkami, např. s 5-fluorouracilem³⁶⁾. Společná enkapsulace neprokázala násobně zvýšenou cytotoxickou aktivitu, ale značně se snížilo množství resveratrolu požadovaného pro 50% úmrtí buněk. Vysoké koncentrace resveratrolu měly synergické účinky s 5-fluorouracilem, zatímco nízké koncentrace antagonizovaly chemoterapeutické účinky léčby. Zdá se, že tato zjištění jsou důležitá pro budoucí výzkumy s ohlednutím k účinnosti resveratrolu, uvažuje-li se o společné enkapsulaci s jinými chemoterapeutickými činidly. Významnou brzdou ve výzkumu resveratrolem naplněných liposomů zůstává jejich nízká „loading“ kapacita, tj. limitující prostor ve fosfolipidní dvojvrstvě pro obsazení lipofilního léčiva, aby nedošlo ke ztrátě jeho strukturální integrity.

Chceme-li závěrem hodnotit tuto lékovou nanoformu – liposomy, lze říci, že životní prostor liposomální lékové formy bývá časově omezen a je nezbytné vždy vyžadovat skladování této lékové formy v chladu.

Polymerní nanočástice

K úspěšné přípravě těchto lékových forem bylo nutné vyřešit kompatibilitu těchto nanočástic s léčivou látkou. Proto bylo použito mnoho rozdílných polymerů obsahující poly(laktid-co-glykolidy) (PLGA), polyethylenglykol (PEG), polykaprolakton (PCL) a polyaktid (PLA)³⁷.

Za podmínek *in vitro* studií byla prokázána vysoká účinnost enkapsulace resveratrolu do PCL nanočástic v rozmezí 73–98 % k porovnání jejich cytotoxicity vůči volnému resveratrolu, a to v buněčných liniích DU-145 a LNCaP³⁸.

Enkapsulace resveratrolu do PLGA nanočástic byla studována nejen za podmínek *in vitro*, ale také za podmínek *in vivo*³⁷. Její účinnost se pohybovala mezi 42 % a 72 %, resveratrol byl uvolňován po dobu 12 dnů a nanočástice zůstaly stabilní po dobu nejméně 6 měsíců. Hodnotili jsme absorpční rychlost resveratrolu, tak ve srovnání s čistým léčivem byla sedminásobná a AUC (plocha pod plazmatickou křivkou) desetinásobná. Bylo prokázáno také signifikantní zvýšení biodostupnosti resveratrolu.

Enkapsulace resveratrolu byla hodnocena i do další formy polymerních nanočástic, a to PEG-PLA³⁹, jak za podmínek *in vitro*, tak *in vivo*. Výsledkem bylo nahromadění nanočástic do mozкового nádoru, signifikantně snížený objem nádoru, což vedlo k prodloužení přežívání potkanů s C6 gliomy. Použilo-li se methoxy-PEG-PCL nanočástic napuštěných resveratrolem, potvrdila se zvýšená antioxidační aktivita resveratrolu, vyšší radikálové zhášení a snížená lipoperoxidace ve srovnání s volným resveratrolem ve vodném roztoku⁴⁰.

Hodnotíme-li dosavadní výzkumy s polymery PLGA, PEG, PCL a PLA, můžeme říci, že jsou biokompatibilní, biodegradovatelné a netoxické. Podle směrnic FDA mohou být použity, ovšem jejich zpracování do nanočástic je dosud velice drahé a inkorporace resveratrolu do polymerních nanočástic je poměrně nízká.

Ve výzkumu na úseku polymerních nanočástic se v tomto desetiletí přešlo na hodnocení polymerních micel, které jsou syntetizované z kopolymerů s hydrofilní a hydrofobní monomerní jednotkou⁴¹. I když se dosáhlo poměrně vysoké enkapsulace resveratrolu (89%) a získaly se dobré výsledky v *in vitro* studiích, hlavním limitujícím faktorem pro využití polymerních micel byly obtížnosti vyplývající z jejich náročné syntézy a nemožnosti rozsáhlejšího užití polymerních micel v důsledku jejich limitované stability v krvi⁴².

Pevné lipidní nanočástice (solid lipid nanoparticles – SLN)

Další studovanou lékovou formou s resveratrolem jsou pevné lipidní nanočástice kombinované s lipidní emulzí.

Lipidní jádro, obklopené surfaktantem, umožňuje snadné vkládání resveratrolu jako hydrofobního léčiva do jádra s hydrofobním povrchem. Resveratrol je tak chráněn před hydrolytickým štěpením, před oxidací a fotodegradací, čímž se také zvyšuje jeho biodostupnost⁴³.

Příjem SLN lékových forem do buněk je možné měnit na základě rozdílnosti jejich povrchových vlastností, dovolující zacílení buňky (targeting). Příjem a transport resveratrolu do keratinocytů za podmínek *in vitro* prokázal větší cytostatické efekty enkapsulovaného léčiva⁴⁴ i pozitivní lipoperoxidační aktivitu v porovnání s resveratrolem v roztoku. Cytotoxický efekt resveratrolu v částicích SLN s glycerolem byl prokázán také v mozkové tkáni na potkaních ve studii *in vivo*, kdy se hodnotila jeho biodistribuce. Částice SLN signifikantně navyšovaly koncentraci resveratrolu do mozkové tkáně v porovnání s volným resveratrolem v roztoku⁴⁵.

Ukazuje se, že pevné lipidní nanočástice by mohly být vhodnou lékovou formou pro orální aplikaci v důsledku jejich schopnosti chránit resveratrol a řídit jeho uvolňování. Mohly by tedy být slibným léčivo-dodávajícím systémem. Bude však nutné vyhodnotit další série studií s resveratrolem nejen za podmínek *in vitro*, ale především *in vivo*.

Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD), cyklické oligosacharidy o průměru 1 a 2 nm, mají hydrofilní povrch a hydrofobní vnitřní dutinu, která umožňuje přijmout molekuly xenobiotik⁴⁶. CD mohou být za účelem zvýšení svých vlastností snadno modifikovány. Jak bylo prokázáno⁴⁷, mají pro farmaceutický delivery systém hlavní význam cukry. V důsledku jejich schopnosti vytvářet s léčivy komplexy, vykazují následující přednosti: zvyšují rozpustnost léčiv ve vodě, zvyšují disoluční rychlost a biodostupnost, ochraňují léčiva před krystalizací a zlepšují jejich stabilitu. Tato léková forma je vhodná pro terapeutické použití, jenže jejich výroba je limitována vysokou cenou.

Ke zkoumání protirakovinné účinnosti resveratrolu vůči MCF-7 buňkám bylo v *in vitro* studiích²⁸ použito resveratrol-sulfobutylether- β -CD komplexu v poměru 1 : 1. Potvrdilo se, že tvorba tohoto komplexu, tedy komplekce všech složek, značně zvýšila rozpustnost ve vodě a pozitivně ovlivnila cytotoxickou aktivitu léčiva a že CD molekula bez resveratrolu neměla žádný vliv na buněčnou viabilitu. V další *in vitro* studii⁴⁶ byly vytvořeny resveratrolové komplexy jak s β -CD, tak s 2-hydropropyl- β -CD za účelem vyhodnocení jeho dopadu na cytotoxicitu léčiva u dvou buněčných populací (HeLa a Hep3B) v porovnání se zdravou buněčnou populací. Bylo zjištěno, že v kancerogenních buňkách došlo ke zvýšení jejich cytotoxicity, aniž by byly pozorovány nějaké změny u zdravých buněk.

Lze říci, že CD komplexy značně zvyšují rozpustnost resveratrolu ve vodě, avšak jejich použití v nádorové terapii je limitováno v důsledku jejich nedostatečné zacílené distribuce (targeting) a v důsledku vysokých výrobních nákladů.

Závěr

Snahou výzkumných projektů v systému cíleného podávání léků je zvýšit jejich bezpečnost a minimalizovat výskyt rizikových nežádoucích efektů. Není snadné vždy dosáhnout tohoto cíle ve všech parametrech. Jako příklad uvádíme výsledky dosavadního výzkumu s resveratrolem, který patří mezi látky se zajímavou farmakologickou aktivitou a je vyhledáván pro doplňkovou terapii.

Pro jeho nepříznivé farmakokinetické parametry (velmi nízká biodostupnost přes dostatečně vysokou orální absorpci) se výzkumní pracovníci zaměřili na možnost cíleně distribuovat tuto látku na místo účinku v nových lékových formách. Slibnou oblastí se jeví různé formy „delivery“ systému, v nichž je důležitá nanoenkapsulace resveratrolu. Takové nanoformulace jsou schopny zacílit léčivo ke specifickým buňkám, snížit jeho požadovanou dávku a následně tak i toxicitu léčiva.

Mohlo by se zdát, že při inkorporaci resveratrolu do nanoformulací byly úspěšně překonány některé bariéry vzhledem k jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem, přesto se enkapsulace resveratrolu dosud nachází v plenkách. Z toho důvodu zůstává mnoho otázek, jež bude nutné v dalších studiích experimentálně objasnit a zhodnotit, jako je např. dlouhodobá bezpečnost nanočástic, jejich interakce s biologickými systémy, tvorba reprodukovatelných a koloidně stabilních nanoformulací, ověření parametrů vedoucích ke zlepšení „loading“ kapacity resveratrolu s cílem získat co největší terapeutický efekt látky. Zajímavými by mohla být i zjištění synergického vlivu resveratrolu s dalšími látkami, jako je kurkumin a 5-fluorouracil.

Slibné protirakovinné a protizánětlivé vlastnosti resveratrolu byly v nanočásticích prokázány již *in vitro* modelech a ve studiích s buněčnými liniemi. Ovšem k využití terapeutické účinnosti resveratrolu k léčbě např. nádorového onemocnění bude nutné po zvážení všech preklinických hodnot přejít z *in vitro* a *in vivo* studií ke klinickému testování látky v nových lékových formách. A tak se vyskytují také úvahy, jak dalece je nezbytné pokračovat dále v těchto zajímavých, ale nesmírně drahých výzkumných projektech.

Střet zájmů: žádný.

Literatura

- Král V. Život je geniální projekt. Za obzorem Vyd. Advent Orion s.r.o., 2013; 1, 1–4.
- Pamornpathomkul B., Wongkajorsilp A., Laiwattanapaisai W., Rojanarata T., Opanasopit P., Ngawhirunpat T. A combined approach of hollow microneedles and nanocarriers for skin immunization with plasmid DNA encoding ovalbumin. *Int. J. Nanomedicine* 2017; 12, 885–898.
- Gusta S., Wilder H., Rao A. L. N., Vyllev V. I., Anvari B. Plant virus-resembling optical nano-materials conjugated with Anti-EGFR for targeted cancer imaging. Reporters, dyes, nanoparticles, and molecular probes for biomedical applications IV. 2012; Proceedings of SPIE vol. 8233, No. 82330S.
- Hwang S. R., Ku S. H., Joo M. K., Kim S. H., Kwon I. C. Theranostic nanomaterials for image-guided gene therapy. *MRS Bulletin* 2014; 39, 44–50.
- Neves A. R., Lúcio M., Martins S., Lima J. L., Reis S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int. J. Nanomedicine* 2013; 8, 177–187.
- Summerlin N., Soo E., Thakur S., Qu Zhi. Resveratrol nanoformulations: Challenges and opportunities. *Inter. J. Pharmac.* 2015; 479, 282–290.
- Aluyen J. K., Ton Q. N., Tran T., Yang A. E., Gottlieb H. B., Belanger R. A. Resveratrol potential as anticancer agents. *J. Diet Suppl.* 2012; 9, 45–56.
- Kraft T. E., Parisotto D., Schempp C., Efferth T. Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009; 49, 782–799.
- Yang X., Li X., Ren J. From french paradox to cancer treatment: anti-cancer activities and mechanisms of resveratrol. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2014; 14, 806–825.
- Farghali H., Kutinová Canová N., Lekic N. Resveratrol and related compounds as antioxidants with an allosteric mechanism of action in epigenetic drug targets. *Physiol. Res.* 2013; 2, 1–13.
- Vang O., Ahmad N., Baile C. A., Baur J. A., Brown K., Csizsar A., Das D. K., Delmas D., Gottfried C., Lin H. Y. What is new for an old molecule? Systematic Review and Recommendations on the use of resveratrol. *Plos One* 2011; 6, No. E9881, doi:10.1371.
- Augustin M. A., Sanguansri L., Lokett T. Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2013; 1290, 107–112.
- Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011; 1215, 9–15.
- Rotches-Ribalta M., Andres-Lacueva C., Estruch R., Escibano E., Urpi-Sarda M. Pharmacokinetic of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 2012; 66, 375–382.
- Brown V. A., Patel K. R., Viskaduraki M., Crowell J. A., Perloff M., Booth T. D., Vasilinin G., Sen A., Schinas A., Piccirilli G., Brown K., Steward W. P., Gescher A. J., Brenner D. E. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Research* 2010; 70, 9003–9011.
- Almeida L., Vaz-da-Silva M., Falcao A., Soares E., Costa R., Loureiro A. J., Fernandes-Lopes C., Rocha J. P., Nunes T., Wright L., Soares-da-Silva P. Pharmacokinetic and safety profile of *trans*-resveratrol in a Rosiny multiply-dose study in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53, S7–15.
- Boocock D. J., Faust G. E. S., Patel K. R., Schinas A. M., Brown V. A., Ducharme M. P., Booth T. D., Crowell J. A., Perloff M., Gescher A. J., Steward W. P., Brenner D. E. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteer of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol. Biomarkers and Prevention* 2007; 16, 1246–1252.
- Rotches-Ribalta M., Andres-Lacueva C., Estruch R., Escibano E., Urpi-Sarda M. Pharmacokinetic of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 2012; 66, 375–382.
- Karthikeyan S., Rajendra Prasat N., Ganamani A., Balamurugan E. Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. *Biomed. Prev. Nutr.* 2013; 3, 64–73.
- Miki H., Uehara N., Kimura A., Sasaki T., Yuri T., Yoshizawa K., Tsubura A. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2012; 40, 1020–1028.
- Sun W., Wang W., Kim J., Keng P., Yang S., Zhang H., Liu C., Okunieff P., Zhang L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; 614, 179–186.
- Sengottuvelan M., Deeptha K., Nalini N. Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact.* 2009; 181, 193–201.

23. Murias M., Jager W., Handler N., Erker T., Horvath Z., Szekeres T., Nohl H., Gille L. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* 2005; 69, 903–912.
24. Richard T., Pawlus A. D., Iglesias M. I., Pedrot E., Waffo-Teguo P., Merillon J. M., Monti J. P. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011; 1215, 103–108.
25. Yaseen A., Chen S., Hock S., Rosato R., Dent P., Dai Y., Grant S. Resveratrol sensitizes acute myelogenous leukemia cells to histone deacetylase inhibitors through reactive oxygen species-mediated activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol. Pharmacol.* 2012; 82, 1030–1041.
26. Sinico C., Pirredu R., Pini E., Valenti D., Caddeo C., Fadda A. M., Lai F. Enhancing topical delivery of resveratrol through nanosizing approach. *Planta Medica* 2017; 83, 476–481.
27. da Rocha Lindner G., Khalil N. M., Mainardes R. M. Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles: validation of an HPLC-PDA method to determine the drug entrapment and evaluation of its antioxidant activity. *Sci. World J.* 2013; 2013, S06083.
28. Venuti V., Cannava C., Cristiano M. C., Fresta M., Majolino D., Paolino D., Stancanelli R., Tommasini S., Ventura C. A. A characterization study of resveratrol/sulfobutyl ether-beta-cyclodextrin inclusion complex and *in vitro* anticancer activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2014; 115, 22–28.
29. Maeda H., Bharate G. Y., Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 71, 409–419.
30. Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65, 36–48.
31. Coimbra M., Isacchi B., van Bloois L., Torano J. S., Ket A., Wu X., Broere F., Metselaar J. M., Rijcken C. J., Storm G., Bilia R., Schiffelers R. M. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int. J. Pharm.* 2011; 416, 433–442.
32. Csiszar A., Csiszar A., Pinto J. T., Gautam T., Kleusch C., Hoffmann B., Tucsek Z., Toth P., Sonntag W. E., Ungvari Z. Resveratrol encapsulated in novel fusogenic liposomes activates Nrf2 and attenuates oxidative stress in cerebrovascular endothelial cells from aged rats. *J. Gerontol. Series A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2014; 70, 303–313.
33. Catania A., Barrajon-Catalan E., Nicolosi S., Cicirata F., Micol V. Immunoliposome encapsulation increases cytotoxic activity and selectivity of curcumin and resveratrol against HER2 overexpressing human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 141, 55–65.
34. Barrajon-Catalan E., Menendez-Gutierrez M. P., Falco A., Carrato A., Saceda M., Micol V. Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: correlation with their HER2 expression level. *Cancer Lett.* 2010; 290, 192–203.
35. Wang X. X., Li Y. B., Yao H. J., Ju R. J., Zhang Y., Li R. J., Yu Y., Zhang L., Lu W. I. The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells. *Biomaterials* 2011; 32, 5673–5687.
36. Mohan A., Narayanan S., Sethuraman S., Krishnan U. M. Novel resveratrol and 5-fluorouracil coencapsulated in PEGylated nanoliposomes improve chemotherapeutic efficacy of combination against head and neck squamous cell carcinoma. *BioMed. Res. Int.* 2014; Artical Numer 424239.
37. Singh G., Pai R. S. Optimized PLGA nanoparticle platform for orally dosed *trans*-resveratrol with enhanced bioavailability potential. *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2014; 11, 647–659.
38. Sanna V., Siddiqui I. A., Sechi M., Mukhtar H. Resveratrol-loaded nanoparticles based on poly(epsilon-caprolactone) blend for prostate cancer treatment. *Mol. Pharm.* 2013; 10, 3871–3881.
39. Guo W., Li A., Jia Z., Juan Y., Dai H., Li H. Transferrin modified PEG-PLA-resveratrol conjugates: *in vitro* and *in vivo* studies for glioma. *Eur. J. Pharmacol.* 2013; 718, 41–47.
40. Yin H., Si J., Xu H., Dong J., Zheng D., Lu X., Li X. Resveratrol-loaded nanoparticles reduce oxidative stress induced by radiation or anuloid-beta in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014; 10, 1536–1544.
41. Xu W., Ling P., Zhang T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J. Drug Deliv.* 2013; 20, 340315.
42. Kim S., Shi Y., Kim J. Y., Park K., Cheng J. X. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, *in vivo* stability, and micelle cell interaction. *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2010; 7, 49–62.
43. Ekambaram P., Sathali A., Priyanka K. Solid lipid nanoparticles: a review. *Sci. Rev. Chem. Commun.* 2012; 2, 80–102.
44. Teskac K., Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int. J. Pharm.* 2010; 390, 61–69.
45. Jose S., Anju S. S., Cinu T. A., Aleykutty N. A., Thomas S., Souto E. B. *In vivo* pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *Int. J. Pharm.* 2014; 474, 6–13.
46. Lu Z., Chen R., Fu R., Xiong J., Hu Y. Cytotoxicity and inhibition of lipid peroxidation activity of resveratrol/cyclodextrin inclusion complexes. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2012; 73, 313–320.
47. Tiwari G., Tiwari R., Rai A. Cyclodextrins in delivery systems: applications. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2010; 2, 72–79.