

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava a studium fyzikálních a biologických vlastností liposomů s protinádorově účinným trojjaderným komplexem platiny



Vypracovala: Bc. Barbora Kočnarová

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Vojtěch Novohradský, Ph.D.

Olomouc 2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Barbora Kočnarová

Název práce: Příprava a studium fyzikálních a biologických vlastností liposomů s protinádorově účinným trojjaderným komplexem platiny

Typ práce: experimentální

Pracoviště: Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Odd. Molekulární biofyziky a farmakologie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt: Zájmem této diplomové práce je vytvoření 100 nm liposomů uzavírajících platinový komplex BBR3464 a studium jejich fyzikálních a biologických vlastností. V rešeršní části je pojata problematika platinových cytostatických léčiv, výhody cíleného přenosu léčiv a shrnuty dosavadní znalosti o jejich osudu v biologickém systému. Je provedena základní charakterizace připravených nanočástic z hlediska velikosti, stability a morfologie. Další experimenty jsou zaměřeny zejména na srovnávání vlastností volného a enkapsulovaného komplexu BBR3464. Získaná data naznačují, že enkapsulace BBR3464 vylepšuje některé biologické vlastnosti, především v otázce zabránění interakcí s molekulami obsahující S-donorové skupiny, které jsou zodpovědné za vysokou obecnou toxicitu tohoto léčiva. Enkapsulace komplexu by tedy dle předložených *in vitro* dat mohla vést ke zlepšení terapeutického potenciálu BBR3464.

Klíčová slova: BBR3464, cílení léčiv, nanočásticové přenašeče, liposomy

Počet stran: 50

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Barbora Kočnarová

Title of thesis: Preparation and evaluation of physical and biological properties of liposomes loaded with antitumor trinuclear platinum complex

Type of thesis: Experimental

Department: Institute of Biophysics AS CR, v.v.i., Dep. of Molecular Biophysics and Pharmacology

Supervisor: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Year of defense: 2021

Abstract: The main objective of this thesis was to create a 100 nm liposomal formulation of the trinuclear platinum complex BBR3464 and determine whether this encapsulation improves its biological properties and protects the integrity of the studied complex from reaction with serum components. We overview the development of platinum cytostatic agents, their encapsulation in liposomes and basic concepts of targeted delivery. After preparing 100 nm liposomes loaded with BBR3464, their size distribution, zeta potential and morphology was determined. The main focus of selected experiments was to compare properties of the free and encapsulated form of BBR3464. Obtained data suggests encapsulation of BBR3464 improves some of the studied biological properties. It was also confirmed that liposomal nanocapsules could prevent the reaction with S-donor containing molecules that are present in human serum and cause serious side effects in patients treated with BBR3464.

Keywords: BBR3464, targeted delivery, nanocarriers, liposomes

Number of pages: 50

Number of attachments: 0

Language: Czech

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za odborné vedení práce, za cenné rady při jejím sepisování, a také za podporu a motivaci ke studiu. Velké díky patří také Mgr. Vojtěchu Novohradskému, Ph.D. za čas a mimořádnou trpělivost, kterou mi věnoval v laboratoři při realizaci experimentů. Rovněž děkuji pracovníkům firmy TESCAN, kteří nám pro účel diplomové práce poskytli snímky z elektronového mikroskopu. Tato práce byla financována z projektu IGA_PrF_2021_017.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Jany Kašpárkové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v seznamu literatury. V práci byly použity výsledky z kryogenního elektronového mikroskopu vzniklé ve firmě TESCAN v Brně.

V Olomouci dne:

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	PŘEHLED PROBLEMATIKY	2
2.1	Cytostatika na bázi platiny	2
2.1.1	Cisplatina	2
2.1.2	BBR3464.....	6
2.2	Cílený přenos léčiv.....	9
2.2.1	Liposomy	9
2.2.2	Příprava a stabilita.....	11
2.2.3	Principy zvýšené selektivity akumulace liposomálních léčiv v nádorové tkáni .	16
2.2.4	Interakce liposomů s buněčnou membránou.....	17
3	CÍLE PRÁCE.....	20
4	MATERIÁLY A METODY	21
4.1	Materiály	21
4.1.1	Použité chemikálie	21
4.1.2	Použité přístroje	22
4.2	Metody	22
4.2.1	Příprava liposomálních částic.....	22
4.2.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	24
4.2.3	Extruze připravených částic	24
4.2.4	Charakterizace částic.....	25
4.2.5	Antiproliferativní aktivita na buněčné kultuře A2780	25
4.2.6	Kinetika uvolňování komplexu BBR3464 z liposomů.....	26
4.2.7	Buněčná akumulace (uptake)	26
4.2.8	Lokalizace liposomů v buňce pomocí konfokálního mikroskopu.....	27
4.2.9	Určení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie	27
4.2.10	Reakce se síru obsahujícími látkami	28
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1	Enkapsulační účinnost.....	30
5.2	Charakterizace částic.....	31
5.3	Antiproliferativní aktivita na buněčné kultuře A2870	34
5.4	Buněčná smrt – průtoková cytometrie	37
5.5	Buněčná akumulace	39
5.6	Kinetika uvolňování	42
5.7	Reakce se síru obsahujícími látkami	43
6	ZÁVĚR	45
7	SEZNAM LITERATURY	47

SEZNAM ZKRATEK

5-CF	5-karboxyfluorescein
AAS	atomová absorpční spektroskopie
DSL	dynamický rozptyl světla
DMSO	dimethyl sulfoxid
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (lecitin)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence
FBS	fetální hovězí sérum
FDA	Food and Drug Administration
HMG	high mobility group
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl) methakrylamid
HR-TEM	transmisní elektronová mikroskopie vysokého rozlišení
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
MLV	multilamelární vezikuly
MPS	mononukleární fagocytární systém
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
LUV	velké unilamelární vezikuly
OD	optická dráha
PEG	polyethylenglykol
RES	retikuloendotelový systém
SUV	malé unilamelární vezikuly

1 Úvod

Rakovina je rozšířeným onemocněním, které se celosvětově vyskytuje ve vysokých příčkách statistik nejčastějších příčin úmrtí. Doposud na toto onemocnění nebyla vyvinuta dostatečně účinná a bezpečná léčba. Stále totiž dochází k objasňování funkčních mechanismů rakovinných buněk a odhalování nových potenciálních cílů v jejich léčbě. Narůstající finanční náročnost může být další překážkou při zavádění nových látek do klinické praxe. Pro překonání těchto problémů je možné využít několika přístupů – jedním z nich je hledat nové možnosti použití již schválených léčiv nebo selektivně vylepšovat farmakologické vlastnosti látek, které z nějakého důvodu neprošly klinickými testy. Proto se v této práci zabýváme komplexem BBR3464, který vykazuje protinádorovou aktivitu na širokém spektru buněčných linií. Klinické testování této nadějně látky však bylo pozastaveno z důvodu vysoké obecné toxicity. Bylo zjištěno, že při interakci se složkami krevního séra dochází k jeho rozpadu na toxické produkty a jejich interakci se sérovými proteiny. V této práci jsou tedy prozkoumány možnosti cíleného přenosu BBR3464 prostřednictvím liposomů, které by této interakci mohly zabránit.

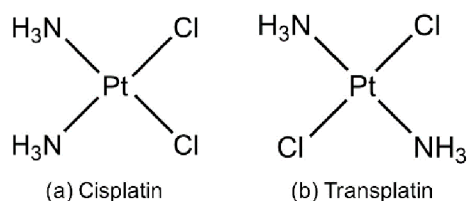
2 Přehled problematiky

2.1 Cytostatika na bázi platiny

Rakovinná buňka vzniká procesem kancerogeneze somatické buňky v důsledku akumulace mutací genetické informace za současné blokace apoptózy. (Anttila a kol. 2019) Mutace mohou vznikat na základě vnitřních předpokladů nebo vnějším působení chemických či fyzikálních faktorů (mutagenů) a následným selháním opravného mechanismu DNA. Zásadní odlišností transformované buňky od zdravé je rapidní až nekontrolovatelná proliferace a vznik nádorů, které mohou tvořit metastáze a usazovat se v různých částech těla. (Fouad a Aanei 2017) Léčba tohoto onemocnění může být složitá. V současné době se v terapii rakovinných onemocnění využívá chirurgických zákroků, radioterapie a chemoterapie nebo jejich kombinace. (Recht a kol. 1996) Zprvu byly aplikována léčiva s cytotoxickým účinkem nejvíce zasahující rychle se dělící buňky. (Serkova a Eckhardt 2016) To mělo za následek řadu nežádoucích vedlejších účinků, které vedou ke snížení kvality života pacientů. V posledních dekádách však byly objasněny různé mechanismy kancerogeneze a s nimi byla vyvinuta řada chemoterapeutik s rozsáhlým spektrem mechanismu působení. Tyto sloučeniny, nazývány cytostatika, využívají molekulárních a morfologických rozdílů mezi nerakovinnými a rakovinnými buňkami. Molekulární cíle zahrnují proliferální signální dráhy a působí na inhibici buněčného cyklu, zejména pak ve fázi replikace nebo transkripce. Prvním cytostatikem na bázi platiny schváleným americkou agenturou FDA k použití v boji proti rakovině varlat a vaječníků byla v roce 1978 cisplatina. (Wiltshaw 1979) Platinová cytostatika zaujímají do dnešního dne centrální postavení v chemoterapii.

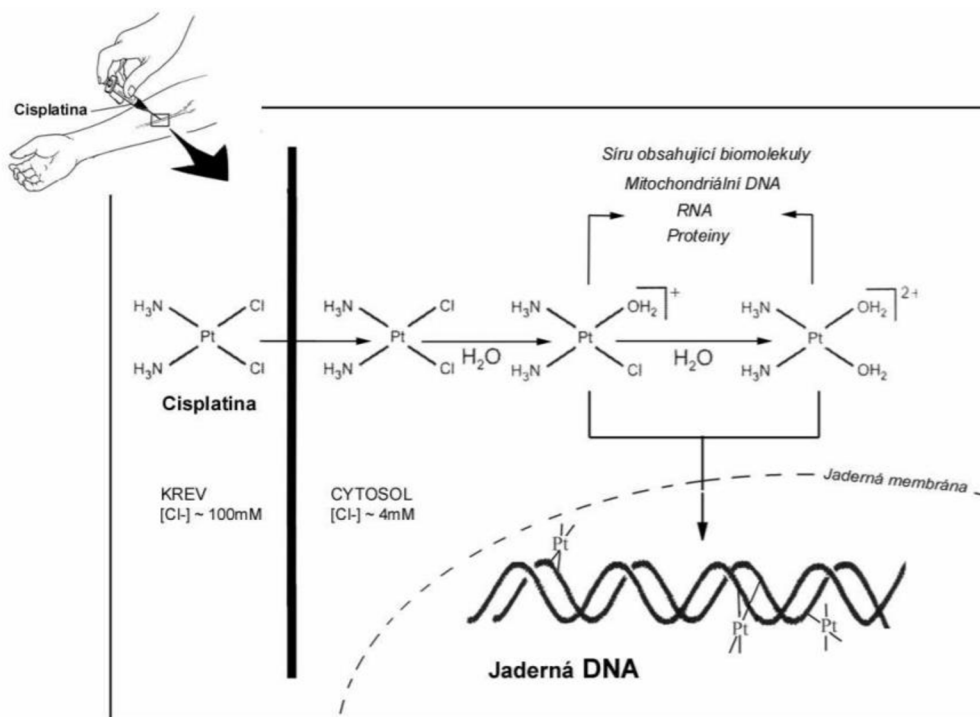
2.1.1 Cisplatina

Cis-diammindichloroplatnatý komplex, známý zkráceně jako cisplatina, je komplex obsahující platínu v oxidačním stavu II, na níž se v *cis* konformaci váží dva chloridové ionty a dvě amminové skupiny. Za objev ve spojitosti cisplatiny s cytostatickým účinkem vděčíme profesoru Rosenbergovy a jeho týmu, který studoval účinky elektrického pole na dělící se kolonii bakterií *Escherichia Coli* (Rosenberg a kol. 1965). Reakcí platinových elektrod a chloridu amonného, jež byl součástí výživného média bakterií, vznikly mimo jiné i sloučeniny uvedené na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Strukturní vzorec (a) cisplatinu; (b) transplatinu.¹

Tento objev byl později aplikován na rakovinné buňky, u nichž cisplatin rovněž zastavuje dělení. (Rosenberg a kol. 1969) Již v roce 1974 z klinických testů vyplývalo, že je cisplatin účinná i vůči nádorům, které na doposud dostupnou léčbu nereagovaly. Přesný mechanismus působení byl a v dnešní době stále je předmětem výzkumu. Dle Oberoi a kol. (2013) lze tento mechanismus vystihnout ve třech krocích – prvním je buněčná akumulace cisplatinu, druhým její hydrolyza a navázání na molekulární cíl a tím posledním je signalizace poškození skrze opravný mechanismus a spuštění signální kaskády vedoucí k buněčné smrti. Ukazuje se, že nejdůležitějším molekulárním cílem cisplatinu je molekula DNA. Souhrnný mechanismus působení je schematicky uveden na obrázku č. 2.



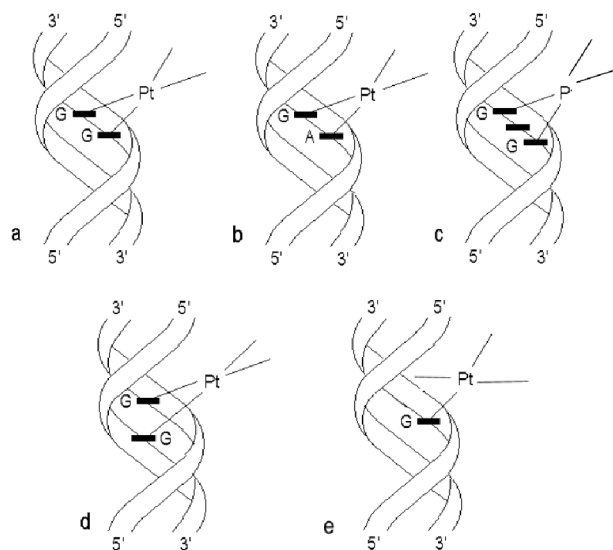
Obrázek 2: Schéma mechanismu působení cisplatinu.²

¹ Převzato z Kishimoto a kol. (2020).

² Převzato z Zerzánková (2011).

Cisplatina do buňky proniká pasivní difuzí nebo za pomoci přenašečů, z nichž známé jsou například přenašeče měďnatých iontů hCT1. (Oberoi a kol. 2013) V cytoplazmě, kde je přibližně 100x nižší koncentrace chloridových iontů než v krevní plazmě, dochází k odstoupení chloridových iontů z cisplatiny a ty jsou nahrazeny ionty hydroxylovými, přičemž komplex získá náboj 2+. Vzniklé diaqua komplexy elektrofilně napadají nukleofilní centra DNA, kterými disponují purinové báze (především guanin) v podobě dusíku N7. (Wang a Lippard 2005)

V molekule DNA vlivem těchto komplexů dochází k celé řadě modifikací, přičemž některé z nich jsou schematicky uvedeny na obrázku č. 3. Jedná se o monofunkční adukty, meziřetězcové můstky, můstky mezi DNA a proteiny, avšak z 60 – 65 % jsou zde zastoupeny 1,2-vnitřetězcové a z 20 - 25 % 1,3-vnitřetězcové můstky mezi dvěma guaniny nebo guaninem a adeninem, které způsobují změnu geometrie DNA. (Fuertes a kol. 2003)



Obrázek 3: Schematické znázornění aduktů vznikajících při vazbě cisplatiny na DNA.

- a) 1,2-vnitřetězcový můstek mezi dvěma guaniny, b) 1,2-vnitřetězcový můstek mezi guaninem a adeninem, c) 1,3-vnitřetězcový můstek mezi dvěma guaniny; d) meziřetězcový můstek; e) monofunkční adukt.³

Je možné, avšak doposud jednoznačně neprokázané, že právě 1,2-vnitřetězcové můstky jsou zodpovědné za cytostatické vlastnosti cisplatiny. (Fuertes a kol. 2003) Ukazuje se, že vzniklou geometrickou distorzi dvoušroubovice dochází ke zvýšení afinity high mobility group (HMG) proteinů a jejich nasedání na adukty cisplatina-DNA. Existuje několik hypotéz, proč tyto děje vedou k zastavení dělení buňky. Vlivem vazby

³ Převzato a upraveno z Polanský P. (2011).

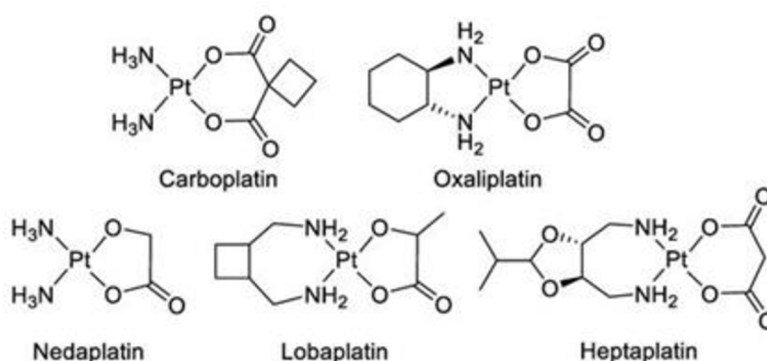
HMG proteinů na adukty cisplatina-DNA může docházet ke stínění tohoto poškození před proteiny zajišťující opravy DNA a buňka prostřednictvím signálních kaskád v kontrolní fázi buněčného cyklu není schopna pokračovat v dalším dělení. (Huang a kol. 1994) Druhou z těchto hypotéz je například interakce zúčastněných HMG proteinů s dalšími proteiny, které skrze různé signální dráhy indukují buněčnou smrt. (Fuentes a kol. 2003) Bylo ukázáno, že adukty cisplatina-DNA rovněž zabraňují nasedání TATA boxu a příslušných transkripčních faktorů, které zajišťují rozpoznání místa začátku transkripce, což je další z možných mechanismů působení cisplatiny, kdy je buňce znemožněna syntéza důležitých proteinů.

Cisplatina je velmi reaktivní sloučenina, a přestože cílovou molekulou je DNA, dochází k vazbě i na jiné biomakromolekuly včetně RNA a proteinů (v oblasti DNA například histonů nebo topoizomerázy II). Tyto vazby pak mohou přispívat k toxickým účinkům cisplatiny. (Fuerstes a kol. 2003) Bylo odhadnuto, že až 99 % aplikované cisplatiny je inaktivováno vazbou na jiné molekuly. Jedná se zejména o tripeptid glutathion, který je v cytoplasmě zastoupen ve vysoké koncentraci a zastává zde antioxidační funkci. Inaktivaci v mnohem větší míře podléhá také stereoizomer cisplatiny, a sice transplatina, jejíž strukturní vzorec je uveden na obrázku č. 1 (b). Na rozdíl od cisplatiny je však tato sloučenina klinicky neúčinná. Hlavní odlišností je, že ze sterických důvodů netvoří 1,2-vnitrořetězcové můstky a ve větší míře naopak dochází k formaci monofunkčních adduktů a 1,3-vnitrořetězcových můstků, které jsou účinněji odstraňovány opravnými mechanismy a u nichž se neuplatňuje vazba proteinů HMG. (Fuentes a kol. 2003) Dalším rozdílem je několikanásobně rychlejší inaktivace transplatiny glutathionem a dalšími metalothioneny. Transplatina tedy zřejmě způsobuje jiné poškození DNA a dalších molekul, což má za následek souhrnný cytotoxický účinek.

Kromě průlomových pozitivních ohlasů v klinické praxi se však brzy ukázalo, že má cisplatina i mnoho nepříznivých dopadů na lidský organismus. Mezi nežádoucí účinky se řadí nevolnost, únava, nechutenství, akutní poškození ledvin, poruchy sluchu, krvetvorby a další potíže zasahující rychle se dělící buňky. (Prestayko a kol. 1979) Mimo jiné může prostřednictvím vnitřních funkčních a molekulárních změn při opakovaném podávání dojít k vybudování rezistence nádorových buněk k cisplatině. (Siddik 2003) Jednou z možností obrany buňky je zcela zabránit vazbě cisplatiny na DNA, a to snížením importu cisplatiny do intracelulárního prostoru (tedy regulací exprese příslušných přenašečů), zvýšením produkce efluxních transportérů a přenos cisplatiny z buňky do

mezibuněčného prostoru nebo zvýšením produkce detoxifikačních proteinů (např. glutathionu). (Chen a Chang 2019) Po navázání na detoxifikační proteiny nemůže cisplatina dále působit na DNA. Vzniklé sloučeniny jsou pak účinně exportovány ATP-dependentními pumpami ven z buňky ve formě glutathion S-konjugátu. (Fuertes a kol. 2003) Mezi další možnosti se řadí zvýšení účinnosti oprav DNA nebo inhibice signálních drah pro indukci buněčné smrti. Platinová cytostatika odvozená od cisplatiny mají mnohdy podobný mechanismus působení, a proto se rezistence buněk vztahuje i na ně. Tyto překážky vedou k potřebě vyvíjení nových léčiv s cílem snížení toxicity a rezistence za současného zvýšení terapeutického účinku.

Po cisplatině následoval vývoj cytostatik druhé a třetí generace, multifunkčních platinových a multiplatinových komplexů. Podrobný přehled tohoto vývoje je možné najít například v publikaci Dilruba a Kalayda (2016). Nejznámější a klinicky schválená cytostatika druhé generace, tedy karboplatinu, oxaliplatinu, nedaplatinu, lobaplatinu a heptaplatinu, je možno vidět na obrázku č. 4. Zatímco karboplatin a oxaliplatin jsou schváleny a užívány celosvětově, nedaplatin se do klinické praxe dostala pouze v Japonsku, lobaplatin v Číně a heptaplatin v Jižní Koreji.

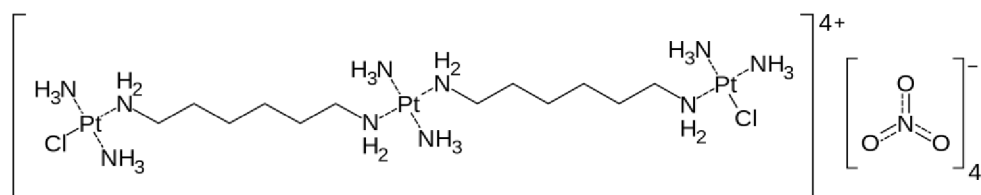


Obrázek 4: Strukturální vzorce komplexů odvozených od cisplatiny, schválených do klinického užívání.⁴

2.1.2 BBR3464

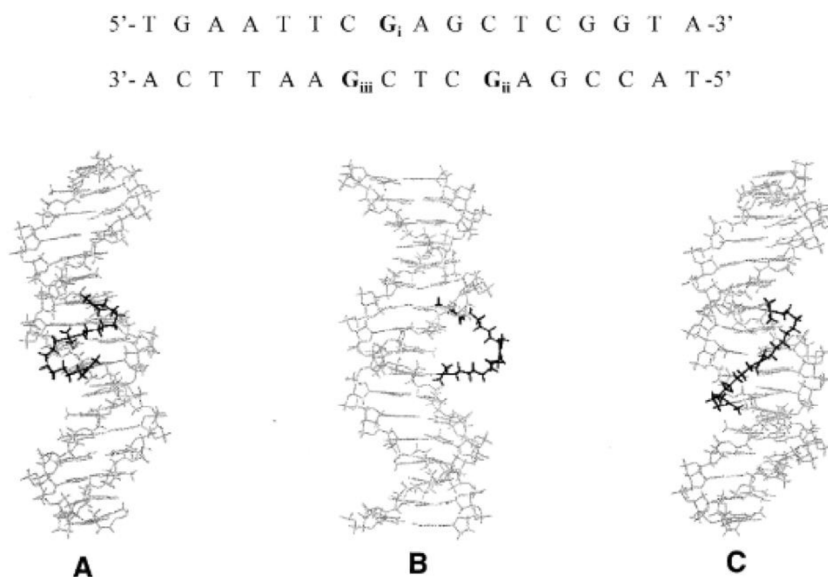
BBR3464 je název komplexu $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\mu\text{-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]^{4+}$, jehož struktura je uvedena na obrázku č. 5. Jedná se o trinukleární platinový komplex, který se skládá ze dvou transplatinových jednotek spojených flexibilním tetra-aminovým ligandem $trans\text{-[Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]$. (Farrell N. 2000)

⁴ Převzato a upraveno z Molinaro a kol. (2020).



Obrázek 5: Strukturní vzorec triplatinového komplexu BBR3464.⁵

Vývoj platinových cytostatik druhé a třetí generace byl soustředěn na syntézu nábojově neutrálních sloučenin. Navzdory tomuto přesvědčení však práce Harrise a kol. (2005) prokázala, že i nabité komplexy mohou být pojmány buňkou, a dokonce s větší efektivitou než původní neutrální sloučeniny. To může být i tím, že se při přenosu BBR3464 do buňky uplatňuje přenašeč měďnatých iontů hCTR1 (Kabolizadeh a kol. 2007). Mechanismus účinku vazby BBR3464 na DNA se od cisplatiny liší. Například kinetika vazby BBR3464 je až 6x rychlejší s poločasem 60 minut. (Brabec a kol. 1999) To může být způsobeno vysokou afinitou vysoce kladně nabitého komplexu a záporně nabitě fosfátové kostry dvoušroubovice DNA. Dochází k tvorbě tzv. můstků dlouhého dosahu, tedy 1,4- a 1,5- vnitřetězcových a meziřetězcových můstků. V publikaci Brabec a kol. (1999) bylo provedeno molekulární modelování těchto vazeb na úseku DNA a jejich výsledky je možno pozorovat na obrázku č. 6.



Obrázek 6: Simulace vazby komplexu BBR3464 na sekvenci DNA znázorněnou v horní části obrázku. A, B) Možné konformace 1,4-meziřetězcových můstků mezi G_i a G_{ii}; C) Konformace 1,5-vnitřetězcového můstku mezi G_{ii} a G_{iii}.⁶

⁵ Převzato z https://en.wikipedia.org/wiki/Triplatin_tetranitrate.

⁶ Převzato z Farrell (2000).

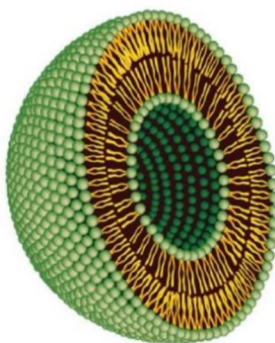
Kvantitativní hodnocení ukázalo, že meziřetězcové můstky byly po 48hodinové inkubaci v komplexu BBR3464 zastoupeny více (20 %) než v případě cisplatin (6 %). (Brabec a kol 1999) Tyto můstky mají kovalentní charakter a jejich vazba na DNA je nevratná, proto způsobují zcela jiné a hůře opravitelné poškození DNA než můstky vnitřetězcové. V protinádorové léčbě byly látky způsobující tento druh poškození využívány už od roku 1946. (Deans a West 2011) Při důležitých biologických procesech jako jsou replikace nebo transkripce, je totiž nutné od sebe oba řetězce DNA oddělit, aby došlo k nasednutí příslušného enzymového aparátu. V přítomnosti meziřetězcových můstků, které kovalentně spojují oba řetězce, to však není možné. Takovéto poškození je také složitější opravit. (Zehnulova a kol. 2001) Velkou skupinu opravných mechanismů DNA tvoří excisní opravy, mezi něž se řadí oprava chybného párování bází, bázová a nukleotidová excisní oprava. Tyto postupy využívají komplementárního charakteru dvoušroubovice, kdy je pro opravu poškozeného řetězce využito nepoškozeného řetězce, který slouží jako předloha pro opravnou DNA-polymerázu. Tento mechanismus může být uplatněn při opravě vnitřetězcových můstků, avšak v případě meziřetězcových můstků, kdy jsou poškozením zasaženy oba řetězce, již nejsou excisní mechanismy dosti užitečné a oprava musí být provedena jinými, pro buňku mnohdy rizikovějšími metodami. V některých případech ve snaze o vlastní záchranu může dojít k úplnému odstranění částí obou řetězců a tvorbě dvouřetězcových zlomů, které DNA-polymeráza při replikaci není schopna překlenout. Mezi opravy dvouřetězcových zlomů patří například homologní rekombinace nebo nehomologní spojování konců, což je nespecifické a v extrémních případech může vést k buněčné smrti. V důsledku to znamená, že zvýšenou tvorbou meziřetězcových můstků při podání BBR3464 je možné obejít rezistenci nádorových buněk vůči cisplatině, neboť dochází ke zcela jinému mechanismu působení. (Perego a kol. 1999) Komplex BBR3464 byl prvním polynukleárním platinovým cytostatikem v klinickém výzkumu, a to od června 1998. Ačkoli výsledky naznačovaly vysokou účinnost napříč různými nádorovými liniemi (Farrell N. 2000), musely být tyto testy pozastaveny kvůli vysoké obecné toxicitě. Ukázalo se, že BBR3464 podléhá degradaci skrze *trans*-efekt, kdy dochází k rozpadu molekuly za vzniku produktů podobných transplatině, které jsou stejně jako transplatin protinádorově neúčinné a toxické. To má za následek nenaplněný terapeutický potenciál a jednou z možností, jak omezit nebo zcela zabránit reakcím s látkami obsahujícími S-donorový atom (jako jsou například methionin a glutation), je hledat jiné formy přenosu.

2.2 Cílený přenos léčiv

Cílený přenos léčiv představuje nadějnou strategii pro zvýšení selektivity a efektivity při biodistribuci léčiv v organismu. Některé mechanismy přenosu navíc umožňují ochranu enkapsulovaných látek před nežádoucím působením vnějších vlivů, například enzymů nebo již zmíněnými reakcemi s látkami obsahujícími S-donorový atom. Mezi přenašeče vhodné pro pasivní transport se řadí například albumin, uhlíkové nanotrubičky, HEMA kopolymery nebo liposomy. Liposomy byly syntetizovány z vysušeného lipidového filmu již v roce 1961 a z uvedených látek jsou nejdéle a nejintenzivněji prozkoumanou skupinou těchto přenašečů. (Bangham 1964) Jejich využití v onkologické léčbě je výhodné zejména z hlediska biokompatibility, biodegradability, nízké toxicity a v neposlední řadě také kvůli možnosti enkapsulace látek s různorodými vlastnostmi. (Akbarzadeh a kol. 2013) Kromě toho je jejich použití vhodné také při diagnostice, genové a imunogenní terapii.

2.2.1 Liposomy

Liposomy jsou vezikulární útvary, jejichž vodný objem je zcela ohraničen membránou tvořenou lipidovými molekulami, nejčastěji fosfolipidy. (New R.R.C. 1990) Amfifilní charakter fosfolipidů umožňuje přenos látek různých fyzikálně-chemických vlastností. Enkapsulované hydrofilní látky jsou rozpuštěny ve vodném objemu uvnitř liposomu a jsou obklopeny hydrofilními fosfátovými hlavičkami (v obrázku č. 7 zeleně). Hydrofóbní látky jsou při přenosu zasazeny do nepolárního prostředí mezi lipidovými ocásky (v obrázku č. 7 žlutě). (Liu a kol. 2013)

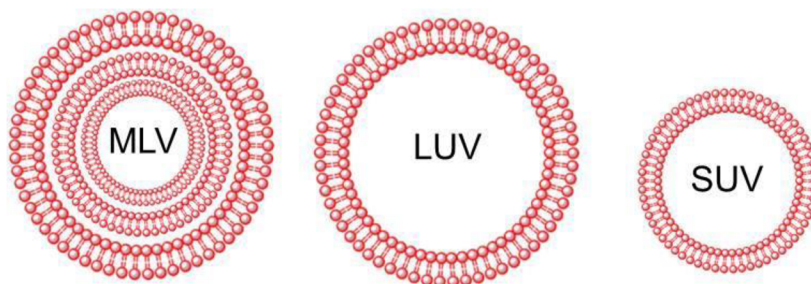


Obrázek 7: Repräsentace liposomu.⁷

⁷ převzato a upraveno z Vahabi a Eatemadi (2017).

Využívány jsou zejména liposomy přírodního charakteru, které napodobují složení biologických membrán. V tomto případě jsou jejich složky degradovány stejně jako ty přirozeně se vyskytující, což je principem biodegradability. (New R.R.C. 1990) V biologických membránách jsou zastoupeny sfingolipidy a fosfoglyceroly, mezi něž se řadí například fosfatidylcholin (lecitin), fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol. Dále se zde mohou vyskytovat strukturální lipidy steroly. V případě živočišných buněk je důležitým zástupcem sterolů cholesterol, který se vmezeřuje mezi acylové konce mastných kyselin a tím upravuje důležité vlastnosti membrán, zejména její tekutost. (Demel a Kruffy 1976)

Liposomy mohou mít různou lamelarnitu, tedy různý počet koncentrických dvojvrstev uspořádaných okolo vodního objemu. Z morfologického hlediska jsou podle počtu lamel a velikosti rozlišovány (Sharma a Sharma 1995):



Obrázek 8: Schématické znázornění morfologie liposomů.⁸

MLV (multilamelární vezikuly) tvořené populací částic o velikosti větší než 1000 nm s několika lamelami (5 i více).

LUV (velké unilamelární vezikuly) s velikostí v rozmezí 100 – 1000 nm s jednou lipidovou dvouvrvstvou. Oproti jiným částicím se vyznačují vysokým poměrem voda:lipidy, tudíž může být enkapsulováno velké množství vodního obsahu za současného ekonomického užití fosfolipidů. (New R.C.C.D. 1990)

SUV (malé unilamelární vezikuly) jsou nejmenšími liposomy s velikostí do 100 nm a jednou dvouvrvstvou. Jejich povrch je vzhledem k velikosti velmi zakřivený, což může při vyšších teplotách mít za následek nestabilitu vezikul.

⁸ Převzato a upraveno z https://www.researchgate.net/figure/Classification-of-liposomes-based-on-the-lamellarity-A-Multilamellar-Vesicles-MLV_fig1_297623957.

Parametry nanočásticových přenašečů jako je velikost, náboj, lamelarita a další povrchové vlastnosti stanovují farmakokinetický profil zapouzdřeného léčiva, zejména poločas cirkulace v krvi nebo biodistribuci. (Liu D. a kol. 2013) Vybrané parametry lze ovlivnit samotným složením liposomů nebo úpravou postupu při jejich přípravě. Takto lze vytvořit a přizpůsobit liposom přímo na míru pro danou aplikaci. (New R.R.C. 1990)

2.2.2 Příprava a stabilita

Velkou překážkou v začátcích výzkumu liposomů byly nejednotné postupy přípravy, které generovaly nereprodukovatelné částice z hlediska stability, velikosti i lamelarity. (Lasic D.D.1988) V současné laboratorní praxi je nejčastější metodou pro přípravu liposomů hydratace lipidového filmu (Bulbake a kol. 2017), kterou lze dle Vocetkové a kol. (2014) shrnout do tří kroků:

i. Příprava lipidového filmu

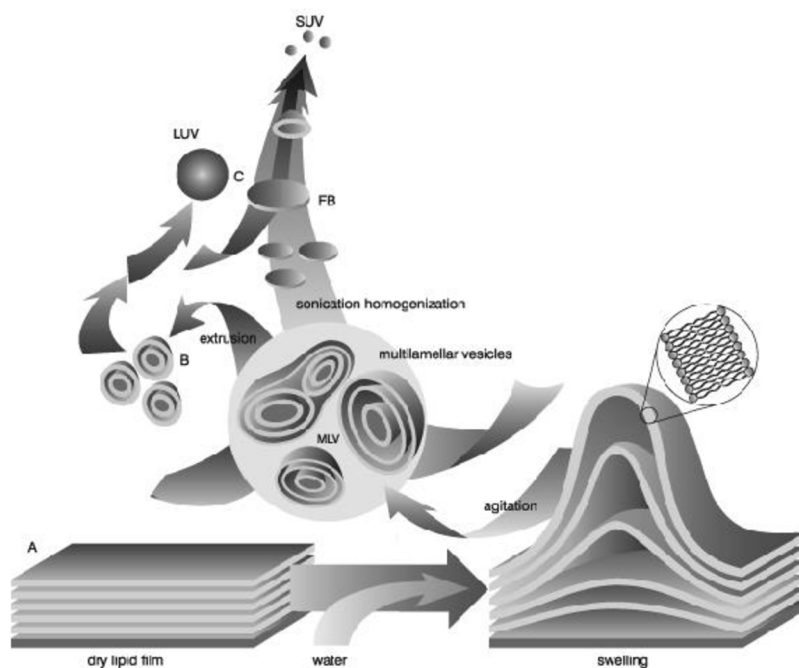
Nejprve je připraven lipidový film například postupem vakuového odpařování. Fosfolipidy smíchané ve vybraném poměru jsou umístěny do vakuové odparky a při odpařování rozpouštědla dojde ke vzniku lipidového filmu na dně a stěnách baňky. V tomto a následujícím kroku se povětšinou pracuje ve vodní lázni o teplotě, která přesahuje fázovou teplotu přechodu lipidů. Jedná se o bod, kdy dochází k přechodu lipidů z gelové fáze do tekuté fáze, tedy k dosažení volného pohybu uhlíkových řetězců fosfolipidů. (New R.R.C. 1990) V tomto stavu jsou všechny vybrané složky homogenně distribuovány a zlepšuje se výsledná kvalita fosfolipidového obalu.

ii. Hydratace fosfolipidového filmu

Připravený film je následně hydratován příslušným organickým rozpouštědlem (nejčastěji chloroformem), přičemž nejprve dochází k agitaci fosfolipidů, nabobtnání membrány a následné formaci váčků, jak lze pozorovat na schématu v obrázku č. 9.

iii. Konečné úpravy

Následují úpravy suspenze lipidů jako je přečištění, homogenizace nebo úprava výsledné velikosti. Další analýza zahrnuje stanovení distribuce velikosti nebo účinnosti zapouzdření požadovaného léčiva, která se dá zpětně optimalizovat zvoleným postupem přípravy.



Obrázek 9: Schéma hydratace lipidového filmu.⁹

Lamelaritu, jak naznačuje uvedený obrázek, je možné ovlivnit množstvím energie vložené do systému při přípravě vezikul. (Lasic D.D. 1988) Hydratací filmu spontánně vznikají částice MLV s různou distribucí velikosti, přičemž hnací silou této agregace jsou hydrofobní interakce. Volná energie unilamelárních částic je vyšší než v případě MLV, a proto musí pro jejich vznik být dodána další energie, která může být spojena s různými pasivními metodami enkapsulace léčiv. Mezi nejvýznamnější způsoby pasivního zapouzdření patří metody mechanické disperze, a to zejména mechanické třepání, sonikace, French press, extruze nebo zmrazovací cykly. (Akbarzadeh a kol. 2013)

Jedním z nejdůležitějších sledovaných parametrů v aplikaci nanočásticových přenašečů je stabilita, a to chemická, fyzikální i biologická. Každá z těchto komponent bude následně diskutována v samostatných podkapitolách, neboť s sebou nese důležité implikace pro použití liposomů v klinické praxi.

2.2.2.1 Chemická stabilita

Přenašeč by měl splňovat požadavky na stabilitu, aby nedošlo k jeho předčasnému rozpadu a vylití obsahu před dosažením cílového místa. Problém však mohou představovat i liposomy, které jsou stabilní až příliš a k uvolnění enkapsulovaného léčiva

⁹ Převzato z <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/liposome-preparation.html>.

tak nedojde téměř vůbec. Tento fakt lze ovlivnit zejména lipidovým složením. Příkladem může být fosfatidylcholin (DSPC), který je jedním z nejužívanějších fosfolipidů ve farmakologii. (Grit a Crommelin, 1993) Anderson a Omri (2002) ukázali, že z liposomů tvořenými čistým DSPC se po 48 hodinách inkubace v PBS při 37 °C uvolnilo pouze 14,2 % obsaženého léčiva. Proto byly pro farmakologické účely vyvinuty vhodnější formulace obsahující DSPC společně s dalšími složkami, zejména strukturním lipidem cholesterolem. (New R.R.C. 1990) Pro přehled těchto formulací současně využívaných v klinické praxi je možné odkázat na literaturu Bulbake a kol. (2017).

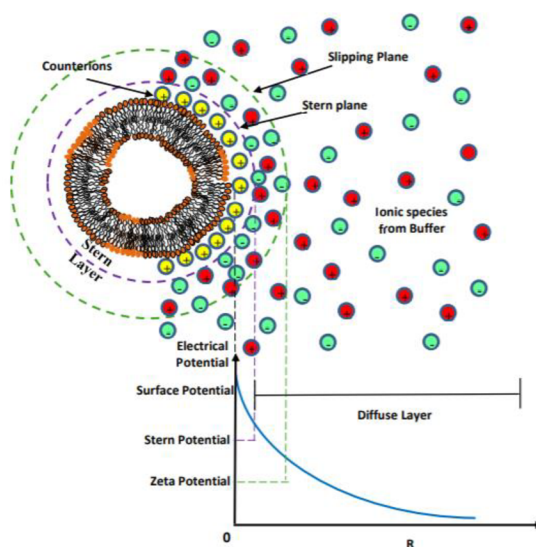
Všechny biomakromolekuly za určitých podmínek podléhají chemické degradaci a není tomu jinak ani v případě fosfolipidů. Hydrofobní řetězce nenasycených mastných kyselin jsou náchylné k oxidaci acylových zbytků. (Grit a Crommelin 1993) Může docházet také k hydrolyze esterových vazeb spojující mastné kyseliny a glycerolovou kostru. Vzniklé modifikace mohou vést k agregaci a fúzi částic, v extrémním případě také ke ztrátě chemické integrity. Chemickou degradaci lze částečně omezit dodržováním vhodných podmínek (pH a teploty) při přípravě a skladování liposomů. Oxidaci pak lze předejít přidáním antioxidantů do rozpouštědla, prací v dusíkové atmosféře nebo při užití nenasycených fosfolipidů oproti nenasyceným, jelikož oxidace nenasycených mastných kyselin probíhá až při vyšších teplotách.

2.2.2.2 Koloidní stabilita

Hlavním cílem výzkumu liposomálních formulací léčiv je vytvoření vhodného nanočástiového přenašeče, který vylepšuje vlastnosti zúčastněného léčiva oproti jeho volné formě. (Lombardo a kol. 2019) Avšak při pohybu v nanočásticovém (též koloidním) světě nutně narážíme na problematiku stability koloidních soustav. Pojem koloidní stability prozatím nebyl jednoznačně zaveden. Obecně jím lze rozumět množství povrchové energie jednotlivých molekul disperzní fáze (tj. jednotlivých vezikul) a interakce mezi nimi. (Kvítek a Panáček 2007) Těmito interakcemi jsou zpravidla myšleny slabé nekovalentní interakce, kterými mohou být například vodíkové vazby a také hydrofobní, Van der Waalsovy nebo elektrostatické interakce. (Lombardo a kol. 2019) V literatuře je při řešení tohoto problému odkazováno na teorii DLVO, jejíž znění přesahuje rozsah této diplomové práce. (Napper D.H. 1970)

Uvážíme-li jednoduchou situaci, kdy je liposom tvořen převážně složkami se záporným jednotkovým nábojem při fyziologickém pH, lze jej aproximovat nabitou částicí, jak je

uvedena na obrázku č. 10. Každá nabitá částice je v roztoku obalena dvěma pomyslnými vrstvami, tzv. elektrickou dvojvrstvou. (Kvítek a Panáček 2007) Vnitřní vrstva, nazývaná Sternova, obsahuje vrstvu stabilizujících proti-iontů, které jsou zde silně vázány vlivem přitažlivé elektrostatické interakce a částečně tak stíní náboj liposomu. Ve vnější vrstvě, zvané difúzní, jsou ionty vázány o něco slaběji. Při pohybu uvažovaného systému v prostoru se ionty ve Sternově i difúzní vrstvě pohybují spolu s nabitou částicí. Hranici mezi ionty pohybujícími se vázaně a volně v disperzním prostředí pak označujeme jako rovinu skluzu. V této úrovni existuje tzv. zeta potenciál.



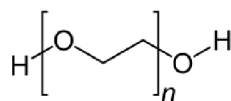
Obrázek 10: Reprezentace elektrické dvojvrstvy okolo fosfolipidové membrány.¹⁰

Nedostatečná koloidní stabilita vezikul způsobena poklesem povrchové energie může vést k nežádanému shlukování a změně velikosti částic. (Kvítek a Panáček 2007) Tomu se dá zabránit například elektrostatickou stabilizací, kdy je zvýšena hustota povrchového náboje, aby docházelo k vzájemnému odpuzování částic. Soustavy, které jsou považovány za stabilní mají hodnotu zeta potenciálu vně intervalu $< -30, 30 >$ mV. (Honary a Zahir 2013)

Liposomy je možné stabilizovat také stericky, kdy jsou na povrch přenašeče adsorbovány větší molekuly, především polymery nebo surfaktanty. (Selvamani 2007) Nejčastěji se pro tyto účely využívá polyethylenglykol (PEG). PEG je lineární nebo větvený polymer ethylenoxidu. Je netoxický, biokompatibilní, rozpustný ve vodě i organických

¹⁰ Převzato z Lombardo a kol. (2019).

rozpouštědlech a schválený pro vnitřní užití agenturou FDA. (Milla a kol. 2012) Jeho strukturní vzorec je uveden na obrázku č. 11, kde n reprezentuje počet jednotek.



Obrázek 11: Strukturní vzorec polyethylenglykolu.¹¹

Liposomy modifikované PEG vykazují vyšší stabilitu než konvenční liposomy, neboť mezi řetězci PEG jednotlivých vezikul v určité vzdálenosti působí odpuzivé síly, které zabraňují jejich dalšímu přiblížení. (Bergstrand N. 2003) PEG však hraje důležitou úlohu i v biologické stabilitě liposomů, o níž bude pojednáno v následující kapitole.

2.2.2.3 Biologická stabilita

Liposomy musí při aplikaci v biologickém systému překonat hlavně biologické nástrahy, které pro ně představuje mononukleární fagocytární systém (MPS; v literatuře někdy označován jako RES – retikuloendoteliální systém). Jedná se o soubor makrofagocytujících buněk, které se podílí na odstraňování cizorodých látek z krevního řečiště a jejich odbourávání v detoxifikačních systémech, převážně v játrech a slezině. Rozpoznání cizorodých částic fagocyty je ve velké míře zprostředkováno značkami, tzv. opsoniny, navázanými na povrchu částic určených k degradaci. (Bryers a Woodrow 2017) Opsoniny se na částice váží v krevním řečišti v procesu zvaném opsonizace. Pro intravenózně aplikovaná léčiva to má za následek snížení poločasu cirkulace v krvi, kdy většina podaných liposomů může být systémem vycytána v řádech již několika minut a přenášené léčivo se v požadované dávce nedostává k cílovému místu působení, a tudíž je neúčinné. (Semple a kol. 1998)

Historicky prvním řešením tohoto problému bylo snížení fluidity membrány liposomů zvýšením koncentrace cholesterolu. (Moghimi a Patel 1988) Ukázalo se totiž, že makrofágy specializované pro jaterní buňky mají menší afinitu k liposomům bohatým na cholesterol v porovnání s liposomy neobsahující cholesterol. Snížení fluidity zvyšuje stabilitu liposomů v krevním řečišti a ty jsou pak odolnější vůči působícím faktorům. Tato odolnost však nemusí být dostatečná pro interakci s opsoniny, proto byl adaptován princip

¹¹ Převzato z https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol.

modifikace povrchu liposomů polyethylenglykolem, který zneprístupňuje a maskuje povrch vezikul před jejich působením. (Klibanov a kol. 1990)

PEGylace je tedy s výhodou používána nejen v otázce sterické stabilizace, ale také právě kvůli prodloužení doby cirkulace liposomů v organismu, díky čemuž si vysloužily přívlastek dlouho-cirkulující a zcela tak překonaly problémy konvenčních liposomů. (Klibanov a kol. 1990) Zvýšení doby cirkulace totiž umožňuje efektivnější akumulaci účinných látek v pevných nádorech.

Stabilita však není jediným požadavkem na úspěšný transport protinádorově zaměřených léčiv. V dalším textu proto bude diskutován princip pasivního a aktivního přenosu léčiv a parametry, které liposomy musí splnit, aby pro tento transport byly vhodné.

2.2.3 Principy zvýšené selektivity akumulace liposomálních léčiv v nádorové tkáni

Hlavní nevýhodou použití cytostatik při rakovinné terapii jsou závažné vedlejší účinky. Ty jsou způsobeny zejména neselektivním hromaděním chemoterapeutik a jejich působení na zdravé buňky v organismu. (Angelis 2008) Existují však nepatrné metabolické, morfologické i funkční rozdíly mezi nerakovinnou a rakovinnou tkání, které mohou být využity při jejich cílení. (Kutova a kol. 2019)

Ve výzkumu cíleného přenosu farmak lze rozlišit dva hlavní přístupy – pasivní a aktivní transport. Zatímco aktivní transport je založený na specifické interakci molekuly na povrchu přenašeče s receptorem nebo molekulou na membráně cílené buňky (např. protilátky nebo sacharidu), u pasivního přenosu se uplatňuje tzv. efekt zvýšené propustnosti a retence (EPR). Zvýšené akumulace léčiva v pevném nádoru za využití makromolekulárního nosiče si všimli Matsumura a Maeda (1986) při studiu protinádorově působícího proteinu neocarzinostatinu. EPR souvisí s rapidním dělením rakovinných buněk, k nimž jsou přiváděny živiny prostřednictvím stejně rychle rostoucího cévního systému. Touto zrychlenou výstavbou krevního řečiště vzniká nedokonalý cévní endotel s dírami. (Dvorak a kol. 1988) Zatímco ve zdravé tkáni tyto póry dosahují velikostí 5 nm a jsou propustné především pro vodu a ionty, u pevných nádorů mohou fenestrace endotelu dosahovat 200 nm až 2 μm . (Kutova a kol. 2019) Dalším jevem přispívajícím k zadržování léčiv v pevných nádorech je nedostatečně

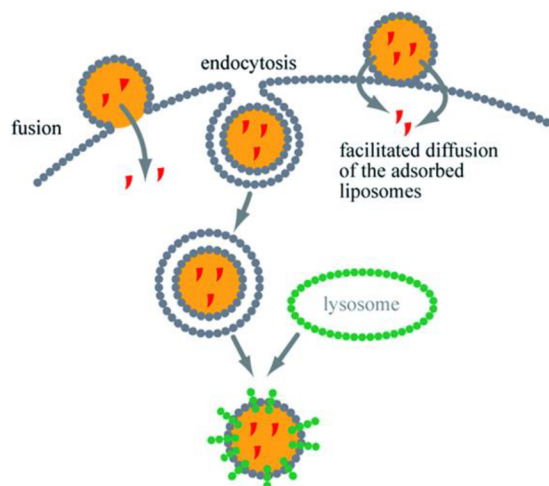
vyvinutá lymfatická drenáž. Nedochozí k efektivnímu odčerpávání extravaskulární tekutiny, což napomáhá kontinuálnímu zadržování látek a jejich působení v buňkách.

Optimální velikost liposomů pro přenos nádorově zaměřených léčiv se pohybuje mezi 50 – 150 nm, ale závisí na konkrétní aplikaci. (Hoshyar a kol. 2016) Velké množství liposomálních léčiv v preklinických nebo klinických studiích má velikost okolo 100 – 110 nm. (Liu a kol. 2013) V této optimální velikosti jsou zohledněny různé *in vivo* farmakokinetické vlastnosti jednotlivých velikostí – od poločasu cirkulace, přes biodistribuci až po účinné pronikání do buněk. (Hoshyar a kol. 2016) Selektivita může být dále umocněna použitím tzv. termosenzitivních a pH-senzitivních liposomů, jejichž obsah je uvolněn až při dosažení specifické teploty nebo pH. Tyto liposomy tak rozšiřují možnosti cíleného transportu léčiv. (Aghdam a kol. 2019)

Při aktivním přenosu protinádorově zaměřených léčiv je využito interakcí mezi specifickým receptorem na buňce a značkou (v podobě ligandu, peptidu, sacharidu...) zabudovanou ve fosfolipidovém konstruktu. (Kutova a kol. 2019) Příkladem může být folátový receptor, který je nadexprimovaný v několika typech nádorů. Jejich přehled je uveden například v publikaci Parker a kol. (2005). Folát pak může být zabudovaný do liposomu a po navázání na příslušný receptor na buněčné membráně nádorové buňky dojde k jeho internalizaci endocytózou. Kromě endocytózy však existují i jiné mechanismy průniku liposomů a jejich obsahu do buňky.

2.2.4 Interakce liposomů s buněčnou membránou

Terapeutický potenciál liposomálně formulovaných léčiv je naplněn ve chvíli, kdy po odolání biologickým nástrahám a pasivní nebo aktivní akumulaci v nádorové tkáni, pronikají obsažená léčiva do buněk, kde působí na své molekulární cíle. K tomu může docházet několika způsoby. (New a kol. 1990) Na obrázku č. 12 jsou schématicky uvedeny některé z nich – fúze, endocytóza a zprostředkovaná difuze adsorbovaného liposomu.



Obrázek 12: Schéma interakce liposomu s buňkou.¹²

První z těchto interakcí je již zmíněná endocytóza, kdy jsou váčky obklopeny buněčnou membránou, pohlceny do intracelulárního prostoru a stávají se součástí vezikulárního transportu buňky. Z takto přijatých liposomů se stávají endozomy, které jsou následně sloučeny s lysozomy. V lysozomech probíhají procesy buněčného trávení a fosfolipidy jsou recyklovány pro další využití buňkou, zatímco vodný obsah liposomu je v lysozomu uchován. pH-senzitivní liposomy mají ovšem tendenci uvolňovat svůj obsah do cytoplazmy ještě před jejich recyklací. (Aghdam a kol. 2019) V případě endocytózy zprostředkované receptorem může dojít i k cílení jiných buněčných kompartmentů. (New a kol. 1990)

Druhou možností průniku látek obsažených v liposomech do buňky je fúze liposomu s buněčnou membránou a uvolnění obsaženého léčiva do cytoplazmy. Fosfolipidy obsažené v liposomu se pak stávají součástí buněčné membrány. To platí především pro liposomy, které obsahují tzv. fúzogení lipidy, jako je například 1,2-dipalmitoyl-phosphatidylglycerol (DPPG) (Stathopoulos a Boulikas 2011).

Alternativně může dojít k uvolnění při kontaktu. Jedná se o unikátní a málo prozkoumaný mechanismus, kdy se z liposomu při kontaktu s buněčnou membránou uvolní obsah v blízkosti buňky. Uvolněné látky pak do buňky vnikají specializovanými přenašeči bez nutnosti pohlcení nebo dalšího zpracování fosfolipidů. (New a kol. 1990)

Uvnitř buňky pak léčivo účinkuje vlastním mechanismem. Protinádorová léčiva na bázi platiny působí cytostaticky, kdy je hlavním cílem inhibice dalšího dělení rakovinných

¹² Převzato z Hwang a kol. (2016).

buněk. Využití nabočástečových systému pro jejich přenos, jak bylo ukázáno v této teoretické části, může zlepšit terapeutický potenciál přenášených látek. Výzkum je zaměřený zejména na zlepšení akumulčních vlastností a selektivitě přenosu za účelem snížení obecné toxicity a zlepšení prognózy i kvality života pacientů s nádorovými onemocněními.

3 Cíle práce

Cíle této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Vypracovat přehled problematiky na téma cytostatických léčiv na bázi platiny se zvláštním zaměřením na trinukleární komplex BBR3464, enkapsulaci protinádorově zaměřených léčiv do nanočástic, především liposomů a obecných vlastností těchto částic.
- 2) Připravit liposomy s enkapsulovaným komplexem BBR3464 a charakterizovat je z hlediska fyzikálních vlastností a stability. Provést základní testy zaměřené na účinky těchto částic na nádorové buňky.
- 3) Diskutovat naměřené výsledky a zhodnotit potenciální klinické využití těchto částic, zvláště s ohledem na dosavadní výsledky klinických testů samotného komplexu BBR3464.

4 Materiály a metody

4.1 Materiály

4.1.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité při měření dosahovaly p. a. čistoty.

BBR3463	(prof. Farrell, USA)
Cholesterol	(Avanti Polar Lipids, Inc., USA)
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)	(Avanti Polar Lipids, Inc., USA)
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG(2000) Folate)	(Avanti Polar Lipids, Inc., USA)
1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[folate(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG(2000) Amine)	(Avanti Polar Lipids, Inc., USA)
L- α -Fosfatidylcholin	(Sigma-Aldrich, Německo)
N,N-dimethylformamid	(Sigma-Aldrich, Německo)
5-karboxyfluorescein	(Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina chlorovodíková	(Penta, Česká republika)
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	(Penta, Česká republika)
Fyziologický roztok pufovaný fosfáty (PBS)	(vyrobeno na pracovišti)
DBPS	(Corning, USA)
Médium RPMI 1640 obohacené FBS a ATP	(Biosera, Francie)
Cellstriper	(Corning, USA)
Annexin-V	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Propidium jodid	(Sigma-Aldrich, Německo)
Fetální hovězí sérum (FBS)	(Biosera, Francie)
Hovězí sérový albumin (2 mg/ml)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Triton X-100	(Sigma, USA)
Činidlo Bradfordové	(Biorad, Francie)

4.1.2 Použité přístroje

Rotační vakuová odparka RV004	(INGOS, Česká republika)
Třepačka thermomixer comfort	(Eppendorf, Německo)
Atomový absorpční spektrometr AA240Z	(VARIAN, USA)
Multifunkční modulární reader SPARK	(Schoeller, Česká republika)
Centrifuga 4-16 KS	(Sartorius, Německo)
Mini-extrudér 610023	(Avanti Polar Lipids, Inc., USA)
Inkubátor Sanyo MCO-20AIC CO ₂	(Schoeller, Česká republika)
pH metr CyberScan 510	(Eutech Instruments, Nizozemsko)
CARY Eclipse Fluorescence Spectrophotometer	(VARIAN, USA)
Konfokální mikroskop Leica TSC SP-5X	(Leica Microsystems, Německo)
Zetasizer NanoZS	(Malvern, Velká Británie)
FacsVerse průtokový cytometr	(BD Biosciences, USA)
Počítačka buněk TC10	(Biorad, USA)
Mikroskop CKX41	(Olympus, Česká republika)
ICP-MS	(Agilent Technologies, USA)

4.2 Metody

4.2.1 Příprava liposomálních částic

V této diplomové práci byla pro přípravu částic zvolena metoda vakuového odpařování s následnou hydratací lipidového filmu. Složení bylo vybráno podle již klinicky schváleného léčiva Lipoplatin, které obsahuje enkapsulovanou cisplatinu (Bulbake a kol. 2017) a dále bylo složení upraveno dle Zhao a kol. (2015). Výběr fosfolipidových komponent vycházel z předchozích publikací, kde byl studován vliv jednotlivých složek na výslednou stabilitu připravených nanočástic a jejich následné parametry při použití *in vivo*. Klíčové parametry získané z *in vivo* farmakokinetických experimentů pro optimalizaci složení konstruktů byly: poločas cirkulace nanočástic v krvi, biodostupnost a eliminace. Na základě těchto poznatků byl k tvorbě fosfolipidového filmu zvolena formulace sestávající se z 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholinu (18:0 DSPC), cholesterolu (Chol), L- α -fosfatidylcholinu (PC), polyethylen glycolu (DSPC-PEG) a folátu (DSPC-PEG-Fol). Vybrané složky byly smíchány v poměru DSPC:Chol:PC: DSPC-PEG: DSPC-PEG-Fol (55:25:15:4,5:0,5), kdy celková hmotnost lipidů byla 7,88 mg v objemu 407,5 μ l. Ten byl doplněn na 1 ml chloroformem. Tato

suspenze byla ponechána k inkubaci na třepačce při 65 °C, 1200 rpm na 10 minut a následně přenesena do nahřáté skleněné baňky. Baňka pak byla vložena do rotačního vakuového odpařovačku do vodní lázni při 65 °C a ponechána, dokud se nevytvořil tenký film na dně a stěnách baňky. Do baňky byla přiváděna dusíková atmosféra kvůli zabránění oxidace lipidů. Teplota 65 °C byla zvolena proto, že hlavní složka suspenze 18:0 DSPC má výrobcem uváděnou teplotu fázového přechodu 55 °C.



Obrázek 13: Rotační vakuová odparka RV004.¹³

Hydrataci takto připraveného filmu jsme provedli několika různými způsoby.

Způsob 1: Nerozpuštěná navážka komplexu BBR3464 byla přidána do skleněné baňky k filmu a následně hydratována 1 ml PBS v 65 °C lázni.

Způsob 2: Navážka BBR3464 byla rozpuštěna v 1 ml pufru PBS a poté se přidala k lipidovému filmu, který byl hydratován v 65 °C lázni.

Způsob 3: Dále byla adaptovaná modifikace, kdy byl roztok liposomů, připravený dle postupu v bodě 2 podroben pěti cyklům zmrazování a rozmrazování, což bylo realizováno kombinovanou inkubací v lázni suchého ledu s etanolem (-80 °C) a následným přenesením do termoregulované třepačky (65 °C).

¹³ Převzato z <https://bioconsult.cz/cs/rotacni-vakuove-odparky/7379-rotacni-vakuova-odparka-rvo-400.html>.

4.2.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Z důvodu optimalizace postupu přípravy nanočástic bylo nutné stanovit enkapsulační účinnost, tedy kolik léčiva z celkově přidaného bylo zapouzdřeno do připravených liposomů. Jelikož jsme jako separační techniku pro rozdělení liposomů a volného komplexu využili centrifugaci, byl výpočet enkapsulační účinnosti následovný

$$EE[\%] = \frac{c_{Pt}(tot) - c_{Pt}(sup)}{c_{Pt}(tot)} \cdot 100, \quad (1)$$

kde $c_{Pt}(tot)$ je celková (výchozí) koncentrace platiny a $c_{Pt}(sup)$ je koncentrace volné platiny v supernatantu. Po centrifugaci, která probíhala na přístroji SIGMA 4-16 KS při 4 °C, RCF 16363g po dobu 20 minut, byl supernatant odebrán do čisté mikrozkušavky. Ke zbylému sedimentu byl následně přidán stejný objem PBS, který odpovídal objemu odebraného supernatantu a sediment byl v PBS důkladně rozsuspendován.

Koncentrace platiny pak byla stanovena pomocí atomového absorpčního spektrometru Varian AA240Z. Vzorky byly naředěny tak, aby se teoretická koncentrace platiny blížila středu rozsahu kalibrační křivky. Ta se pohybovala v rozmezí 0 – 1 μM . Vzorky byly ředěny v pomocném roztoku DNA (10^{-5} M), 0,2 % HCl a 0,1 % TRITON X-100 pro zabránění adsorpce volného kladně nabitého trojjaderného komplexu na stěny mikrozkušavky. Přístroj pomocí automatického dávkovacího raménka proměřil 5 bodů kalibrace: 0 μM (blank), 0,25 μM , 0,5 μM , 0,75 μM a 1 μM . Výchozí analytický kalibrační roztok (Sigma Aldrich) byl připraven v 0,2 % HCl. Měřené body byly proloženy kalibrační křivkou, na základě níž byla z naměřené absorbance vzorků vypočítána koncentrace platiny v jednotlivých vzorcích.

4.2.3 Extruze připravených částic

Extruze je klíčovou technikou v přípravě biologicky aktivních částic. Při tlakové extruzi dochází k prohnání lipidové suspenze polykarbonátovými membránami o definované velikosti pórů a tím dochází k selekci jejich velikosti. Do nahřátého mini-extrudéru 610023, který lze vidět na obrázku č. 14, jsme vložili membránu o zvolené velikosti pórů, kterou jsme předem hydratovali pomocí PBS. Připravená suspenze pak byla 10x protlačena membránou o velikosti pórů 50 nm a 100 nm. Rovněž byly připraveny i prázdné částice bez léčiva o totožné velikosti.



Obrázek 14: Mini-extrudér 610023.¹⁴

4.2.4 Charakterizace částic

4.2.4.1 Stanovení velikosti pomocí dynamického rozptylu světla

Experiment probíhal na přístroji ZetaSizer vybavený He-Ne laserem (633 nm) na katedře biofyziky v Olomouci. 1 ml 100x ředěného vzorku byl napipetován do jednorázové kyvety (OD = 1 cm) a následně bylo provedeno 7 měření o 15 skenech při teplotě 25 °C. Vzorkem zde bylo samotné rozpouštědlo PBS, dále 50 a 100 nm částice a také částice bez extruze.

4.2.4.2 Určení stability měřením zeta potenciálu

Zeta potenciál byl obdobně jako předchozí experiment měřen na přístroji ZetaSizer. Do kyvety s integrovanými elektrodami bylo napipetováno 750 μ l 10x zředěného vzorku v pufru PBS (pH 7,4). Měření probíhalo při 25 °C. Kvůli problémům se vzorky jsme byli nuceni snížit počet měření ze 3 na 2 měření s 50 skeny.

4.2.5 Antiproliferativní aktivita na buněčné kultuře A2780

Ke stanovení antiproliferativní aktivity částic byl zvolen test MTT. Buňky linie A2780 byly pasážovány 2x týdně. Při jednom z těchto pasážování byly na mikrojamkovou destičku nasazeny buňky v množství 8000 buněk na jamku a po 24hodinové inkubaci v RPMI-1640 médiu (při 37 °C a 5% CO₂ atmosféře ve sterilních podmínkách) k nim byla v kvadruplikátu přidána koncentrační řada liposomálních částic o velikosti 100 nm (Lipo 100 nm) s koncentrací enkapsulovaného komplexu odpovídající 0,1; 0,5; 1; 2; 4 a 10 μ M a také řada 0,5; 1; 2; 4; 10 a 25 μ M komplexu BBR3464. Do kontrolních vzorků byly přidány prázdné nanočástice, aby bylo možné stanovit případnou toxicitu nosiče.

¹⁴ Převzato z <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/luvet>.

Po 72 hodinách inkubace bylo přidáno 20 μ l činidla MTT (1,25 mg/ml) a po dalších 3 hodinách inkubace s tímto činidlem bylo odsáto médium a přidáno 100 μ l DMSO. Destičky byly na 15 minut uloženy na třepačku při 450 rpm a následně bylo na mikrodestičkovém readeru SPARK změřena absorbance při 570 nm (referenční vlnová délka 620 nm).

4.2.6 Kinetika uvolňování komplexu BBR3464 z liposomů

Roztok média RPMI-1640 byl upraven na tři různé hodnoty pH pomocí kyseliny chlorovodíkové. Původní hodnota pH média byla 8,2. Následně byla část upravena na pH 6,5 pro simulaci kyseléjšího prostředí nádorových buněk (Shirmanova a kol. 2015) a další na pH 5 pro simulaci prostředí lysozomů (DiCiccio a Steinberg 2011). Do mikrozkušavek bylo napipetováno 490 μ l média o různém pH a 10 μ l Lipo 100 nm k odebrání po 1, 2, 3, 4, 5, 18, 24, 72 hodinách pro každou variantu pH. Vzorky byly po definovaný čas inkubovány při 37 °C. Mikrozkušavka pro daný časový úsek byla zcentrifugovaná při 4 °C a 16363g po dobu 20 minut. Následně bylo odebráno 200 μ l supernatantu do čisté mikrozkušavky a postup opakován pro všechny vzorky. Po uplynulých 72 hodinách jsme změřili koncentraci volné platiny na atomovém absorpčním spektrofotometru ve všech vzorcích stejně jako je uvedeno v předchozích kapitolách.

4.2.7 Buněčná akumulace (uptake)

Do Petriho misek o průměru 100 mm byly nasazeny buňky A2780 v množství $2 \cdot 10^6$ buněk na jamku a inkubovány po dobu 48 hodin. Poté byly v duplikátu vytvořeny sady vzorků s volným nebo s enkapsulovaným BBR3464. K buňkám bylo přidáno 6,21 μ l BBR3464 a 21,9 μ l 100 nm liposomů, aby finální koncentrace BBR3464 v obou vzorcích odpovídala 1 μ M. Buňky jsme po 24hodinové inkubaci s komplexem a nanočásticemi propláchli v PBS, ztrypsovali a přenesli do 10 ml falkonek. Po smíchání 10 μ l vzorku s 10 μ l trypanovou modří bylo pomocí stolní počítačky 3x spočítáno množství buněk a zvláště zaznamenány celkové objemy vzorků, aby bylo se dalo množství platiny zpětně vztáhnout na počet buněk.

Vzorky jsme zcentrifugovali při teplotě 4 °C, RCF 300g po dobu 3 minut. Po slítí supernatantu jsme buňky propláchli v PBS a znovu stočili na centrifuze při stejných podmínkách. Tento postup byl opakován ještě 2x. K získanému peletu buněk bylo přidáno 200 μ l 35% HCl a následně byly vzorky inkubovány po dobu 72 hodin při

pokojevých teplotě, aby došlo k úplné digesti vzorku k účelům následné analýzy na ICP-MS.

4.2.8 Lokalizace liposomů v buňce pomocí konfokálního mikroskopu

Pro účel lokalizace liposomů na konfokálním mikroskopu jsme připravili částice (dle postupu 3 popsaného v kapitole 4.2.1) s komplexem BBR3464 značené 5-karboxyfluoresceinem. Částice byly připraveny na definovanou velikost 100 nm. U těchto liposomů bylo nutné provést postupnou extruzi, tedy 10 cyklů přes 200 nm membránu a poté 10 cyklů přes 100 nm membránu. Fluorescenční spektrum částic značených 5-karboxyfluoresceinem bylo změřeno na fluorescenčním spektrometru CARY Eclipse pro excitační vlnovou délku 493 nm a dalšími parametry, které jsou uvedené v tabulce č. 1. Uvedená excitační vlnová délka byla následně použita i při samotném snímání na konfokálním mikroskopu.

Tabulka 1: Parametry měření fluorescenčního spektra liposomů značených 5-karboxyfluoresceinem

λ_{ex}	493 nm
λ_{em}	500 – 700 nm
Spektrální šířka štěrbin	5 nm
Optická dráha	0,5 cm
Koncentrace vzorku	0,33 μ M

Buňky A2780 byly v duplikátu nasazeny v počtu $1,5 \cdot 10^5$ buněk na konfokální misku o průměru 35 mm v médiu RPMI-1640 a k nim byly přidány značené 100 nm liposomy, přičemž koncentrace enkapsulovaného komplexu BBR3464 odpovídala 0,5 μ M. Byly připraveny též kontrolní vzorky bez fluorochromového značení, pro potřeby kontroly případné vlastní fluorescence buněk. Buňky byly se vzorky inkubovány po dobu 3 a 24 hodin včetně připravených kontrol. Vizualizace částic probíhala na konfokálním mikroskopu Leica SP8 SMD, kde byl k excitaci fluorescenční značky použit Supercontinuum white-light laser s vybranou emisní čarou 493 nm a imersní objektiv se zvětšením 63x.

4.2.9 Určení typu buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie

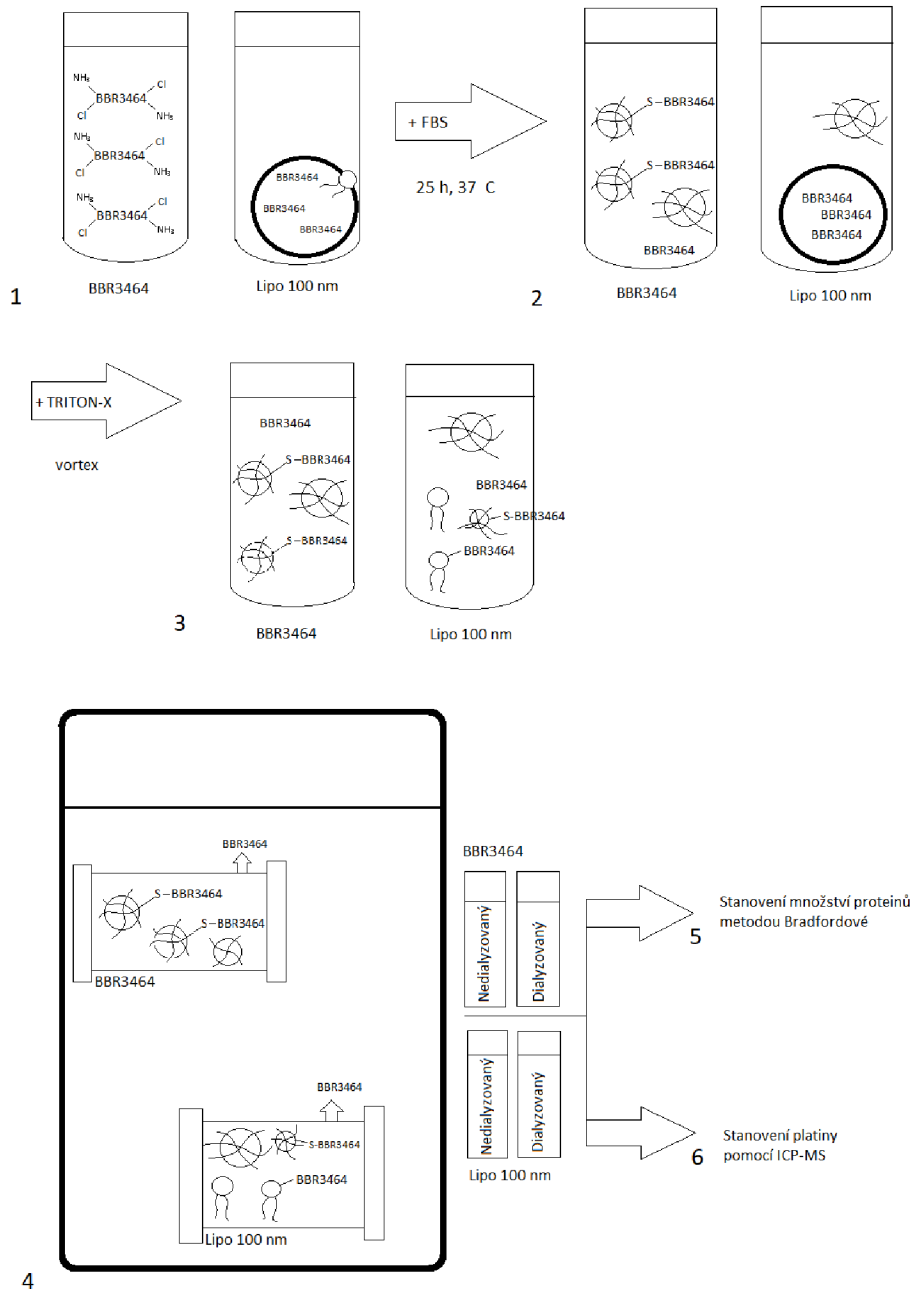
Na každou jamku 6 jamkové destičky bylo nasazeno $1,5 \cdot 10^5$ buněk A2780. Po 24hodinové inkubaci byly k buňkám přidány 100 nm liposomy, přičemž koncentrace enkapsulovaného komplexu BBR3464 odpovídala 0,5 a 1 μ M. Kontrolní vzorky obsahovaly samotné kultivační medium. Buňky byly inkubovány se studovanými

nanočásticemi a volným komplexem (0,5 μM , 1 μM , 10 μM) po dobu 24 hodin. Po ukončení inkubace bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty DPBS (bez Ca a Mg) a přidán 1 ml disociačního roztoku CellStriper[®]. Po 3 minutách působení CellStriperu byly buňky rozsuspendovány a dále peletovány centrifugací, která probíhala 2 minuty při 15 °C a RCF 200g. Následně jsme odsáli supernatant a k sedimentovaným buňkám přidali 110 μl značícího roztoku. Tento roztok obsahoval propidium iodid (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 20x ředěný annexin-V-Pacific Blue. Po 15minutové inkubaci při pokojové teplotě byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru BD FACSVerse a data analyzována s pomocí FCS Express softwaru.

4.2.10 Reakce se síru obsahujícími látkami

Reakce byla realizována smícháním enkapsulovaného a volného BBR3464 s fetálním hovězím sérem zředěným v PBS tak, aby výsledná koncentrace platiny byla 5 μM . Schematicky je tento experiment uveden na obrázku č. 15. Kontrolní vzorky byly připraveny obdobným způsobem. Lipo 100 nm a BBR3464 byly rozsuspendovány/rozpuštěny v čistém PBS. Vzorky byly vyhotoveny v duplikátu a následně probíhala 25hodinová inkubace při teplotě 37 °C. Po této uplynulé době bylo ke všem vzorkům přidáno 2% (v/v) Triton-X a vzorky byly důkladně rozmíchány na vortexu, čímž bylo dosaženo rozbití liposomů a uvolnění BBR3464 před dialýzou. Z celkového objemu 500 μl bylo odebráno dostatečné množství vzorku (tj. 150 μl), aby je bylo možné dále analyzovat pomocí metody Bradfordové a stanovit množství platiny na ICP-MS. Zbytku vzorku byla pro odstranění nenavázaného komplexu provedena dialýza oproti deionizované vodě (MWCO 3500), a to při 4 °C na magnetické míchačce ve třech cyklech – voda byla vyměněná po jedné a dvou hodinách a následně probíhala přes noc při stejných podmínkách. V tomto kroku tak došlo k odstranění komplexu BBR3464, který se nenavázal na sérové proteiny nebo jiné složky séra. Kvůli možnému naředění vzorků pak bylo nutné zjistit koncentraci proteinu, k čemuž byla využita metoda Bradfordové. V duplikátu byla vytvořena koncentrační řada standardu hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentracích 0,005 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,03 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,07 mg/ml a 0,1 mg/ml. Vzorky (dialyzované i nedialyzované) byly na mikrojamkovou destičku nanášeny v triplicátu. Do všech jamek pak bylo přidáno 200 μl 5x ředěného činidla Bradfordové a ihned analyzováno na mikrodestičkovém spektrofotometru Schoeller SPARK reader při vlnové délce 595 nm. Kalibrační křivka $y = 26,96x + 0,3051$ ($R^2 = 0,9946$) byla využita pro výpočet koncentrace proteinu ve

vzorcích ze změřené absorbance. Následně bylo u všech vzorků stanoveno množství platiny pomocí ICP-MS.



Obrázek 15: Schématické znázornění průběhu reakce BBR3464 a Lipo 100 nm s hovězím sérem:
1) komplex a liposomy v mikrokumavkách; 2) po smíchání s FBS a inkubaci došlo k navázání volného BBR3464 na sérové proteiny skrze S-donorové atomy, v Lipo 100 nm je BBR3464 chráněno liposomy;
3) přidáním detergentu a vigorózním vortexováním došlo k rozbití liposomů a vylití jejich obsahu do roztoku; 4) vzorky byly neprodleně dialyzovány v membránách s MWCO 3500 – nenavázaný komplex BBR3464 přešel do roztoku s deionizovanou vodou, ve vzorku Lipo 100 nm zůstaly v membránách kromě proteinů také fosfolipidy a části dezintegrované membrány; 5) + 6) následují další analýzy s dialyzovanými i nedialyzovanými vzorky. Totožný postup byl proveden i pro blanky, ke kterým bylo v kroku 1) místo FBS přidáno pouze PBS.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Enkapsulační účinnost

Po přípravě liposomálních částic s trojjaderným platinovým komplexem byla stanovena enkapsulační účinnost jednotlivých metod. V prvním případě byla přidána nerozpuštěná navážka BBR3464 k dehydratovanému lipidovému filmu a hydratována společně pomocí PBS (postup 1). V druhém případě jsme lipidový film hydratovali s předem rozpuštěným BBR3464 (postup 2) a v poslední řadě jsme takto připravené částice podrobili pěti cyklům zmrazování a rozmrazování (postup 3). Centrifugací roztoku jsme rozdělili komplex zapouzdřený a volný. Poté jsme v každém vzorku změřili koncentraci platiny na atomovém absorpčním spektrofotometru, kdy se výpočtem z kalibrační křivky a absorbance vzorků určila výsledná koncentrace v jednotlivých frakcích. Výsledky stanovení enkapsulační účinnosti pro jednotlivé metody přípravy jsou uvedeny v tabulce č. 2, jejich výpočet je proveden dle rovnice č. (1).

Tabulka 2: Výpočet enkapsulační účinnosti různých postupů přípravy

Typ přípravy	Enkapsulační účinnost
Postup 1	5,8 %
Postup 2	11,2 %
Postup 3	27,2 %
Postup 3 + 5-CF	69,3 %

Tyto data jednoznačně ukazují, že největší účinnost zapouzdření komplexu BBR3464 do lipidových váček byla při postupu se zmrazovacími cykly, a to 27,2 %, v porovnání s 11,2 % u postupu 2 a 5,8 % u postupu 1. Z tohoto důvodu byla metoda 3 zvolena pro další přípravu částic. Jedná se o způsob přípravy, který je v literatuře běžně doporučován pro maximalizaci enkapsulační účinnosti ve vodě rozpustných látek. (Velinova a kol. 2014)

Z dané tabulky lze také pozorovat, že fluorescenčně značené částice vykazovaly až 2,5x vyšší účinnost enkapsulace, než tomu bylo u neznačených částic, které byly připraveny obdobným způsobem. Jedná se zřejmě o projev vlivu chemické struktury přidaného fluoroforu na zapouzdřování komplexu.

5.2 Charakterizace částic

1. Stanovení velikosti liposomů metodou DSL

Prvním krokem v charakterizaci připravených částic bylo ověření jejich velikosti po extruzi. Velikost byla stanovena měřením dynamického rozptylu suspenze prázdných 100 nm částic (kontrola), 50 nm (Lipo 50 nm), 100 nm (Lipo 100 nm) liposomů a také liposomů bez extruze (Lipo). Jedná se o spektrofotometrickou metodu, kdy je měřena fluktuační intenzity interferujícího záření, které je rozptýleno na pohybujících se částicích ve vzorku vlivem Brownova pohybu. (Ševčíková a kol. 2014) Velikost částic zjištěná touto metodou odráží hydrodynamický poloměr – tedy velikost částic s elektrickou dvovrstvou. Při měření byla sledovaná zejména distribuce dle počtu a polydisperzita. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3 včetně směrodatné odchylky ze 7 měření o 15 skenech.

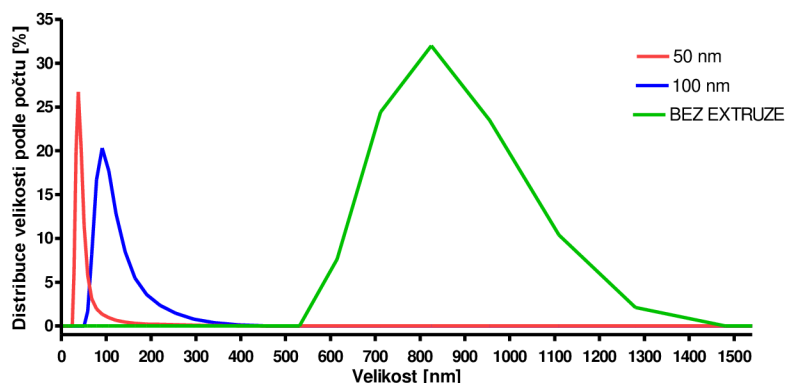
Tabulka 3: Stanovení distribuce velikosti připravených liposomů dle počtu metodou DLS se směrodatnou odchylkou ze sedmi měření

Vzorek	Polydisperzita (max. 1)	Maximální hodnota \pm SD
Kontrola	0,14 \pm 0,02	105 \pm 6
Lipo 50 nm	0,23 \pm 0,01	104 \pm 7 46 \pm 17
Lipo 100 nm	0,15 \pm 0,01	113 \pm 5
Lipo (bez extruze)	0,67 \pm 0,12	885 \pm 233

První zajímavostí je, že se u 50 nm vzorku s platinovým komplexem projevují frakce o velikosti 104 nm. U tohoto vzorku bylo pro vysokou polydisperzitu nutné měření opakovat s počtem 17 skenů. V průběhu jednotlivých měření byly pozorovány dva střídající se jevy – zatímco při jednom měření data korespondovala s grafem na obrázku č. 16, kdy se maximum vyskytovalo v okolí 50 nm, při dalším měření se kromě tohoto vyskytoval i další pík v oblasti 5000 nm, který zřejmě neměl nic společného se vzorkem a byl pouze projevem fitu daných dat. Tímto pak došlo ke vzniku frakce (104 \pm 53) nm velkých částic a relevantní je pro tento vzorek tedy výsledek (46 \pm 17) nm. Dle očekávání pak měly prázdné liposomy a liposomy s BBR3464 podobnou velikost (105 \pm 6) nm a (113 \pm 5) nm. Kvalita měření byla příslušným softwarem stanovena jako dobrá téměř u všech vzorků. Vyjímkou byly neextrudované částice, u kterých se projevila přirozeně vysoká polydisperzita (0,67 \pm 0,12). Došlo také k pokusu o měření samotného rozpouštědla PBS. Software měření po dvou skenech ukončil a vyhodnotil, že se v

rozpouštědly nevyskytovaly žádné částice, které by mohly být měřeny, čímž lze vyloučit přítomnost prachu a jiných nečistot.

V obrázku č. 16 uvádíme příklady distribučních křivek ze série měření, které jsou součástí dat v tabulce č. 3.



Obrázek 16: Ukázka grafu distribuce velikosti připravených částic podle počtu.

Dle literatury se optimum velikosti nanočástic pro medicínské využití pohybuje okolo 100 nm, a proto byly pro další experimenty využity liposomy o této velikosti. (Hoshyar a kol. 2016)

2. Určení hodnoty zeta potenciálu připravených suspenzí

Dalším krokem v charakterizaci připravených liposomů bylo měření zeta potenciálu. Ten je důležitým fyzikálně-chemickým ukazatelem stability koloidních soustav. Potenciál byl změřen pro vzorek Lipo 100 nm a také pro samotné částice bez BBR3464 o velikosti 100 nm, aby bylo možné zvážit stabilitu samotného konstruktu i případný vliv přidání BBR3464. V tabulce č. 4 jsou uvedeny průměrné hodnoty zeta potenciálu a směrodatná odchylka ze 2 měření o 50 skenech.

Tabulka 4: Zeta potenciál připravených liposomů

Vzorek	Zeta potenciál ± SD [mV] (pH 7,4)
Kontrola (100 nm)	3,90 ± 0,06
Lipo 100 nm	2,90 ± 0,75

Jak lze pozorovat v uvedené tabulce, zeta potenciál kontrolních částic bez BBR3464 byl (3,90 ± 0,06) mV a liposomů s BBR3464 (2,90 ± 0,75) mV. Přístroj měří s přesností jednotek mV, avšak směrodatné odchylky zde byly řádově menší. Nelze je tedy pokládat za relevantní zřejmě z důvodu nízkého statistického souboru. Počet měření musel být

v průběhu snížen kvůli znehodnocení vzorku, kdy se na dně kyvety vytvořil fialový agregát. Příklad této degradace je uveden na obrázku č. 17. Dle Honary a Zahir (2013) jsou vzorky s absolutní hodnotou zeta potenciálu vyšší než 30 mV stabilní, 20 mV dočasně stabilní a menší než 5 mV náchylné k agregaci. Hodnota potenciálu u obou vzorků byla nízká a kladná. Jak se ale později ukázalo, byly tyto nízké hodnoty způsobeny nikoli nestabilitou připravených nanočástic, ale vysokým počtem opakování při měření (jedno měření představovalo 50 skenů). Vzorky byly na pracovišti později přeměřeny znovu s programem pro liposomy, který byl na přístroji přednastaven výrobcem. Změřený zeta potenciál Lipo 100 nm pak byl (35 ± 2) mV. Zároveň byla po každém měření sledována distribuce velikosti částic, aby se ověřilo, zda částice nedegradují. Ukázalo se, že tato distribuce byla velmi stabilní a reprodukovatelná. Z toho plyne, že také liposomy obsahující BBR3464 byly velmi stabilní.

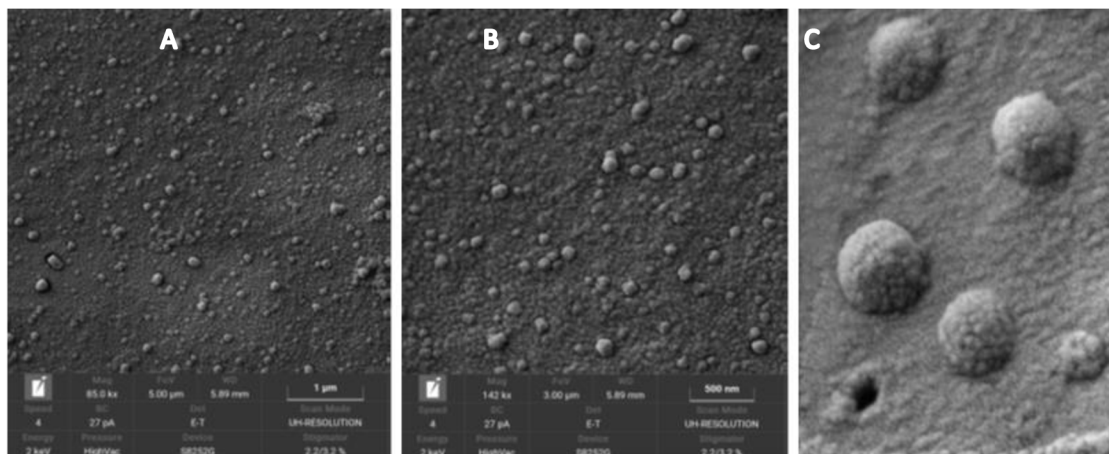


Obrázek 17: Ukázka degradace vzorku liposomů při měření zeta potenciálu.

3. Vizualizace morfologie liposomů pomocí elektronové mikroskopie

Nedílnou součástí charakterizace připravených liposomů byla jejich vizualizace na elektronovém mikroskopu. Tato měření byla provedena rukama proškolených odborníků v Brněnské firmě TESCAN, jimž byly dodány námi připravené vzorky. Měření jsme se nemohli osobně zúčastnit z důvodu protiepidemických opatření spojených s onemocněním Covid-19. Analýza byla provedena v různých podmínkách a ukázalo se, že pro vizualizaci liposomů je nejvhodnější měření při kryogenních podmínkách. To je ve shodě s řadou údajů v literatuře, která uvádí, že pro mikroskopické studium liposomů je kryo-TEM nejvhodnější metodou. (Burrows a Penn, 2013) V tomto experimentu byla

sledována zejména morfologie a velikost liposomů ve vzorku Lipo 100 nm. Reprezentativní fotografie jsou uvedeny na obrázku č. 18.



Obrázek 18: A, B) snímky suspenze liposomů Lipo 100 nm s enkapsulovaným BBR3464. C) Detail liposomů, výřez z panelu B.

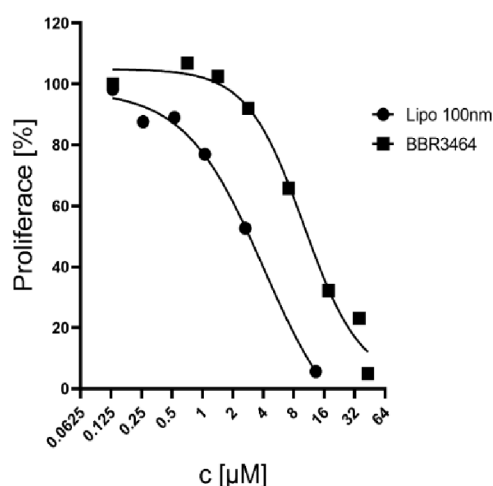
Ze snímků je patrné, že připravené částice mají kulovitý tvar a většina má srovnatelnou velikost.

V rámci měření došlo k pokusům o vizualizaci vzorku Lipo 100 nm pomocí HR-TEM na pracovišti RCPTM, a to zejména za účelem vytvoření prvkové mapy a analýzy rozložení prvků C, P, Pt. Takovéto měření by mohlo poskytnout informace o uspořádání platinového komplexu BBR3464 ve vztahu k molekulám fosfolipidů a tím zpřesnit představy o mechanismu přenosu a dalších vlastnostech připravených liposomů. Příprava vzorku pro tuto analýzu však zahrnuje fixaci na mřížku, barvení a následné sušení, což jak se ukázalo, nebyl postup slučitelný s chemickou integritou liposomů. K další optimalizaci přípravy bohužel v rámci diplomové práce nebyl prostor, proto v této části uvádíme pouze výsledky získané z kryogenního elektronového mikroskopu.

5.3 Antiproliferativní aktivita na buněčné kultuře A2870

Trojjaderný platinový komplex BBR3464 byl speciálně navržen a testován pro potenciální využití jako protinádorové léčivo. Hlavním cílem této práce je zjistit, zda enkapsulací dojde k vylepšení jeho vlastností, proto je v rámci experimentů zahrnuto hodnocení antiproliferativní aktivity připravených liposomů v porovnání s volným BBR3464 na linii buněk lidského ovariálního karcinomu A2870. V tomto experimentu byl využit test MTT, jak je popsáno v kapitole 4.2.5. Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi BBR3463 nebo 100 nm liposomů po dobu 72 hodin, poté bylo na 3 hodiny přidáno činidlo MTT, výsledný formazanový produkt byl rozpuštěn v DMSO a změřena

absorbance při 570 nm. Tento kolorimetrický test poskytuje informaci o mitochondriální enzymatické aktivitě, která je přímo úměrná počtu buněk ve vzorku. Výsledné hodnoty absorbance byly vztaženy ke kontrole a vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci studované látky. Následně byly tyto experimentální body proloženy rovnicí růstové křivky ([Inhibitor] vs. response), kde koncentrace inhibitoru odpovídá biologické odezvě. Reprezentativní křivky pro studované látky jsou uvedeny v obrázku č. 19.



Obrázek 19: Vybrané přežívací křivky po 72hodinové inkubaci s BBR3464 nebo Lipo 100 nm.

Byly provedeny tři nezávislé experimenty, přičemž v každém experimentu byla každá z koncentrací nanesena v kvadruplikátu. Výsledné hodnoty IC50 odečtené z příslušných křivek jsou v tabulce č. 5. Jedná se o hodnotu stanovující koncentraci látky, která je potřebná pro inhibici dělení 50 % buněk.

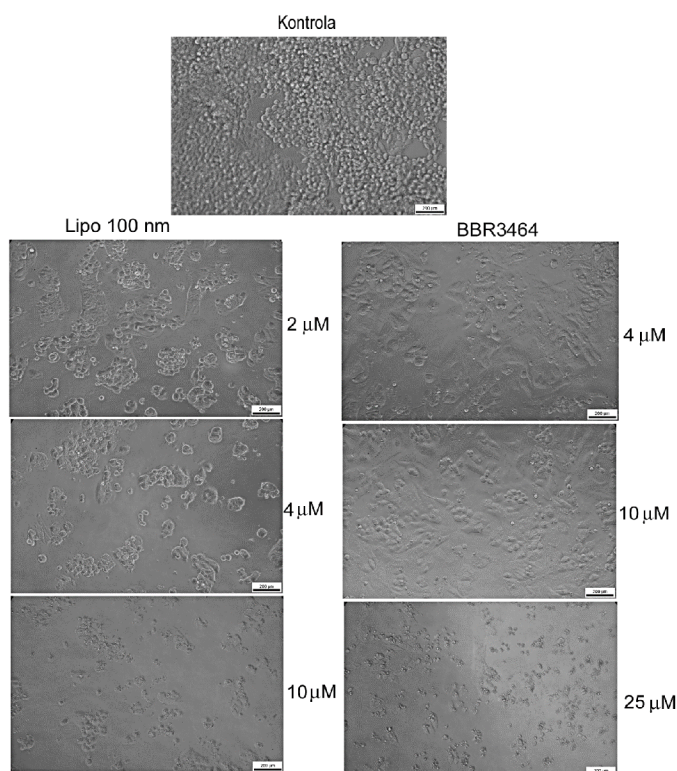
Tabulka 5: Tabulka hodnot IC50 včetně směrodatné odchylky stanovených pro volný komplex BBR3464 a liposomy obsahující BBR3464 (Lipo 100 nm) v buňkách A2780 po 72 h inkubace

	BBR3464	Lipo 100 nm
Měření	IC50 _i [µmol/l]	IC50 _i [µmol/l]
1	12,8	3,6
2	9,0	2,3
3	10,9	2,9
$\overline{\text{IC50}} \pm \text{SD}$ [µmol/l]	10,9 ± 1,6	2,9 ± 0,5

Z uvedených dat lze usoudit, že připravené liposomy mají lepší antiproliferativní aktivitu, kdy hodnota IC50 byla stanovena na (2,9 ± 0,5) µmol/l oproti samotnému komplexu BBR3464 (10,9 ± 1,6) µmol/l. Testován byl také vliv prázdných liposomů na dělení buněk, přičemž koncentrace fosfolipidů ve vzorku odpovídala stejnému množství fosfolipidů, které byly přidány s nejvyšší koncentrací BBR3464. Výsledky ukázaly, že

samotné liposomy nijak neovlivňují proliferaci a životnost buněk. To je ve shodě se známými daty i vzhledem k tomu, že liposomy podobného složení již byly schváleny pro použití v klinické praxi. (Liu a kol. 2013)

V rámci tohoto experimentu byla také věnována pozornost vlivu studovaných látek na morfologii buněk. Z fotografií v obrázku č. 20 je patrné, že kontrolní buňky vykazují kulatý tvar typický pro zvolenou buněčnou linii A2780 a rostou v těsném seskupení s významnou mezibuněčnou kohezí. Oproti tomu, buňky inkubované s BBR3464 (4 a 10 μM) nebo Lipo 100 nm (2 a 4 μM) mají více fibroblastický tvar a vykazují omezené mezibuněčné kontakty. Je zřejmé, že zatímco kontrolní buňky se množily velmi rychle a za dobu inkubace (72 h) dosáhly téměř úplného pokrytí dna jamky, dělení buněk v přítomnosti BBR3464 bylo inhibováno. V těchto vzorcích bylo po uplynulé době inkubace mnohem méně buněk než v kontrole, i přestože byl na začátku experimentu do každé jamky nasazen stejný počet buněk. Mrtvé a degradované buňky byly patrné až při nejvyšších použitých koncentracích (10 μM pro Lipo 100 nm a 25 μM pro volné BBR3464). Z tohoto plyne, že volné i enkapsulované BBR3464 primárně zastavuje buněčné dělení, a je tedy cytostatické. Cytotoxický efekt se projevuje až při vysokých koncentracích.



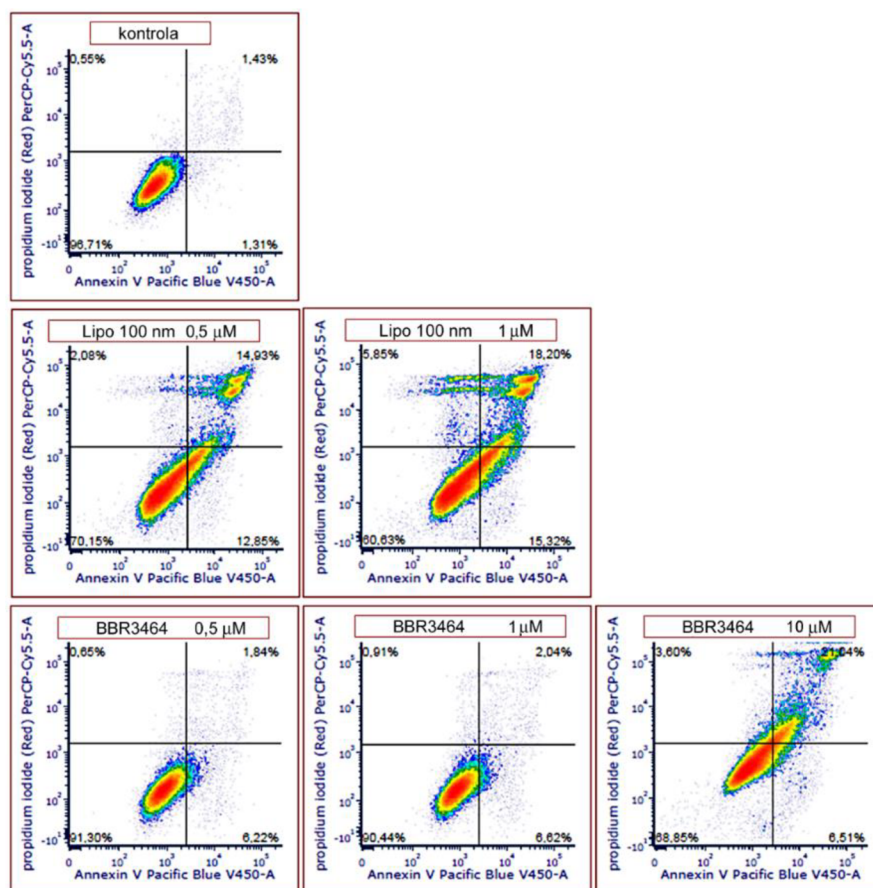
Obrázek 20: Buňky A2780 po 72h inkubaci s enkapsulovaným a volným BBR3464 v příslušných koncentracích v porovnání s kontrolními buňkami, které byly inkubovány v kulturačním médiu.

Z výsledků vyplývá, že při enkapsulaci do liposomů došlo ke zvýšení antiproliferativní aktivity BRR3464, přičemž bylo prokázáno, že tento nárůst není způsoben příspěvkem aktivity samotných fosfolipidových částic. Enkapsulace zřejmě ovlivňuje některé biologické aspekty studovaného komplexu jako je průnik přes membránu nebo akumulace v buňkách, čemuž budou věnovány další kapitoly.

5.4 Buněčná smrt – průtoková cytometrie

Pokud dojde k zastavení buněčného cyklu vlivem poškození DNA (jako v případě studovaného komplexu) a buňka není schopna toto poškození opravit, pak se zpravidla spouští mechanismy programované buněčné smrti. (Surova a Zhivotovsky 2012) Výsledky předchozího experimentu naznačují, že připravené částice mají cytostatický účinek, a proto jsme zde chtěli ověřit, zda v důsledku jejich působení buňky podléhají tomuto typu odpovědi a případně také stanovit druh indukované buněčné smrti. Ačkoli existuje velké množství typů buněčné smrti, v nezákladnějším rozdělení lze hovořit o apoptóze a nekróze. Zatímco apoptóza je energeticky náročný a vysoce regulovaný proces, při nekróze dochází mimo jiné k desintegraci membrány a vylití obsahu buňky do okolí, přičemž se může projevit zánětlivá reakce. To je obecně považováno za nežádoucí jev.

Buňky A2780 byly inkubovány s různými koncentracemi volného či enkapsulovaného BBR3464 a kontrola se samotným kultivačním médiem po dobu 24 hodin. Následně byly vzorky značeny roztokem obsahující propidium iodid a annexin-V Pacific Blue. Annexin-V se váže na fosfatidylserin – jedná se o fosfolipid, který je asymetricky distribuován na cytosolové straně membrány a na vnější stranu je přesouván v počáteční fázi apoptózy. Propidium iodid oproti tomu vniká do buňky skrze poškozenou membránu nekrotické buňky a váže se na DNA, přičemž u vitálních buněk dochází k aktivnímu vylučování tohoto barviva do extracelulárního prostoru. Po značení následovala analýza na průtokovém cytometru. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v obrázku č. 21.



Obrázek 21: Porovnání typu buněčné smrti na průtokovém cytometru v případě volného (0,5; 1; 10 μM) a enkapsulovaného (0,5; 1 μM) komplexu BBR3464 po 24 hodinách inkubace s buněčnou linií A2780. Kontrola byla inkubovaná se samotným kultivačním médiem.

Dvojité barvení propidium iodidem a annexinem-V umožňuje fluorescenční rozlišení buněk živých (levý spodní kvadrant), v brzké apoptické fázi (pravý spodní kvadrant), nekrotických (levý horní kvadrant) a buňky v pozdní apoptické fázi a sekundární nekróze (pravý horní kvadrant). Z výsledků je patrné, že enkapsulovaný komplex má tendenci indukovat apoptickou buněčnou smrt podobně jako volné BBR3464, a to i při 10x nižší koncentraci. Apoptická cesta v zastoupení převažuje u všech vzorků, avšak vzhledem ke tvaru distribuce a sílící populaci patrné především v levém horním kvadrantu u 1 μM Lipo 100 nm se dá předpokládat, že v případě použitých liposomů bude současně docházet i k jiným formám buněčné smrti.

Uvedená data jsou však v souladu s předchozím zjištěním, že 100 nm liposomy mají lepší antiproliferativní aktivitu než samotné BBR3464. Enkapsulace, jak už bylo uvedeno v předchozích kapitolách, může zlepšovat některé biologické parametry studované látky, proto je další kapitola věnovaná porovnávání průniku do buněk u volného a zapouzdřeného komplexu.

5.5 Buněčná akumulace

Cílovým místem působení mnohých cytostatických (zejména platinových) léčiv je molekula DNA. Interakce léčiva s touto molekulou a znemožnění dalšího dělení nezvratně vede k indukci buněčné smrti, jak bylo ukázáno v předchozí kapitole. To je i případ studovaného komplexu BBR3464, jehož princip působení spočívá v tvorbě dlouhodobých meziřetězcových můstků na DNA. (Brabec a kol. 1999) Vzhledem k tomu, že je cílové místo lokalizované uvnitř buňky, musí být tato léčiva schopna procházet cytoplazmatickou membránou a zároveň čelit neustálému vylučování z buňky efluxními přenašeči. Zabývali jsme se proto měřením koncentrace platiny v buňkách při inkubaci s BBR3464 a Lipo 100 nm, aby bylo možné porovnat, zda má enkapsulace vliv na průchod membránou a akumulaci v buňkách. Koncentrace platiny byla stanovena pomocí ICP-MS, jak je popsáno v kapitole materiály a metody, po 24 hodinách inkubace, kdy lze předpokládat ustálený stav mezi transportem do buněk a ven z buněk. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v tabulce č. 6, kde je výsledné množství platiny přepočítáno na 10^6 buněk.

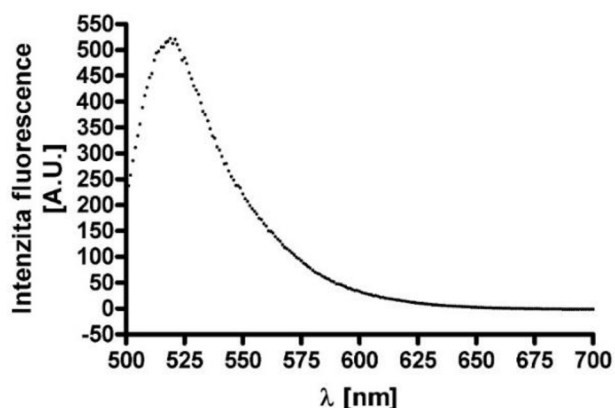
Tabulka 6: Srovnání akumulace Pt v buňkách A2780 pro volný a enkapsulovaný (Lipo 100 nm) komplex BBR3464 po 24 hodinách inkubace

BBR3464		Lipo 100 nm	
Měření	ng Pt/106 buněk	Měření	ng Pt/106 buněk
1	13,8	1	23,4
2	21,1	2	25,8
Průměr ± průměrná odchylka	17,5 ± 3,7	Průměr ± průměrná odchylka	24,6 ± 1,2

Akumulace platiny v buňkách inkubovaných s volným BBR3464 byla ($17,5 \pm 3,7$) ng platiny na 10^6 buněk a u Lipo 100 nm ($24,6 \pm 1,2$) ng platiny na 10^6 buněk. Ač u Lipo 100 nm pozorujeme mírný nárůst koncentrace platiny, je tento rozdíl vzhledem k chybě měření nepatrný. Dané zjištění se liší od obecně udávané informace, že enkapsulace látek do liposomů výrazně zlepšuje jejich akumulační vlastnosti (Montané a kol. 2020) a je také v rozporu se zjištěnými daty z experimentů s jinými léčivy. (Vrána a kol. 2016) I přes svůj vysoký kladný náboj (4+) totiž studovaný komplex proniká přes fosfolipidovou membránu velmi efektivně. Detailní aspekty přenosu BBR3464 do buněk nejsou zcela známy. Bylo však zjištěno, že tomuto transportu napomáhají přenašeče pro měď hCTR1. (Kabolizadeh a kol. 2007) Liposomy na rozdíl od volného komplexu nejčastěji pronikají do buněk endocytózou, jejich internalizace je tedy podněcována odlišnými mechanismy. Po uvolnění z liposomů dochází k vylučování BBR3464

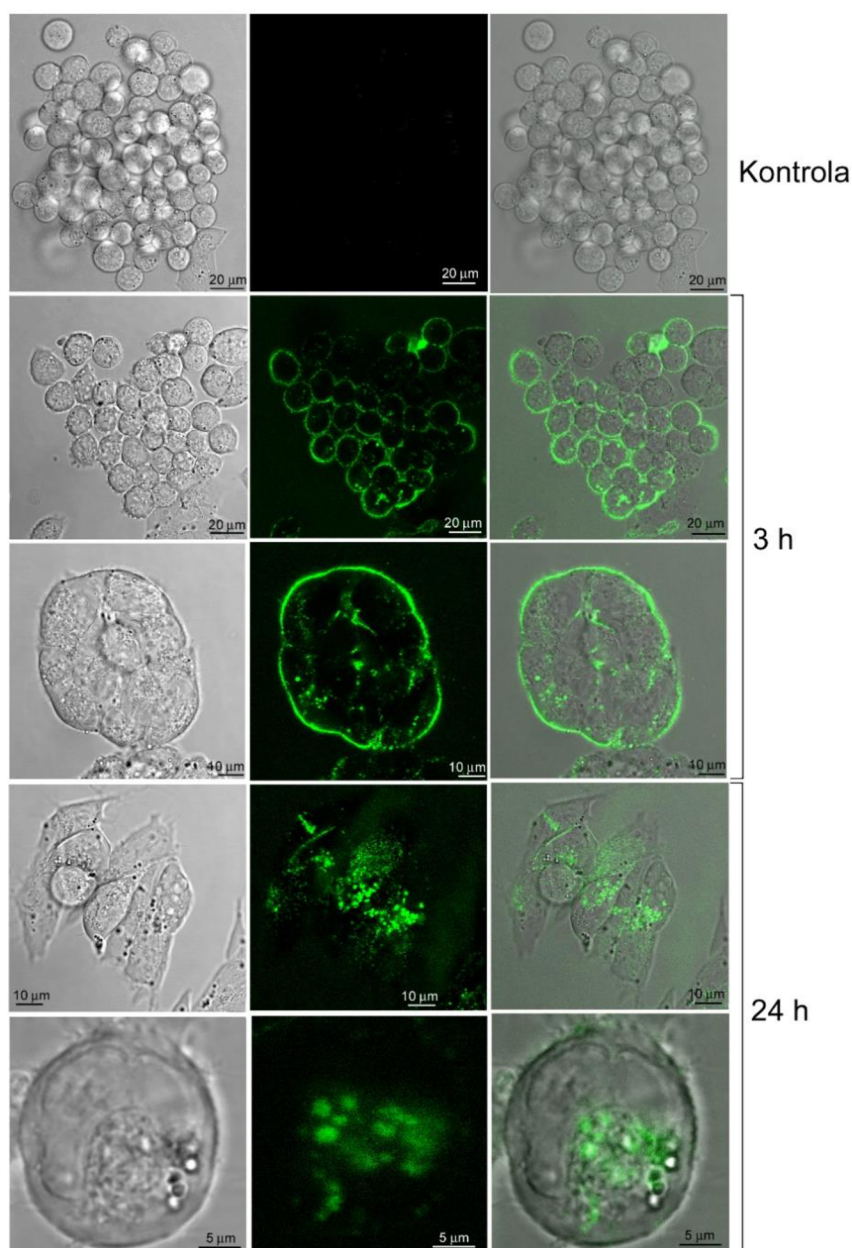
transportérem ATP7B (Kabolizadeh a kol. 2007) stejně jako k tomu dochází u vzorku s volným BBR3464. Zřejmě i z tohoto důvodu je u obou studovaných vzorků při dané inkubaci pozorovaná podobná výsledná koncentrace platiny. Z těchto výsledků plyne, že zlepšení antiproliferativní aktivity Lipo 100 nm není způsobeno vyšší akumulací aktivního léčiva v buňkách a zřejmě zde bude docházet i k jiným jevům jako je například ochrana komplexu před působením složek média nebo detoxifikačních proteinů v cytoplazmě.

Součástí experimentu bylo také kvalitativní hodnocení buněčné akumulace, a to přípravou liposomů značených 5-karboxyfluoresceinem (5-CF Lipo 100 nm) a jejich vizualizací na fluorescenčním konfokálním mikroskopu. Cílem tohoto experimentu bylo porovnání lokalizace částic v buňce po 3 a 24 hodinách inkubace buněk A2780 s 5-CF Lipo 100 nm. Fluorescenční spektrum 5-CF Lipo 100 nm při excitační vlnové délce 493 nm je uvedeno v obrázku č. 22.



Obrázek 22: Fluorescenční spektrum 100 nm liposomů značených 5-karboxyfluoresceinem, $\lambda_{\text{ex}} = 493$ nm.

Na obrázku č. 23 jsou uvedeny reprezentativní fotografie z vizualizace na konfokálním mikroskopu Leica TSC SP-5X. Je zřejmé, že po 3 hodinách inkubace buněk s Lipo 100 nm byla většina fluorescence kolokalizována s buněčnou membránou a zároveň byla určitá část fluorescenčního signálu detekovatelná i v cytoplazmě buněk. Po 24 hodinách inkubace již většina fluorescenčně značených částic pronikla do buněk. Jejich signál je pozorován ve formě ohraničených oblastí, které se nachází mimo jádro. Mohlo by se jednat o struktury odpovídající endosomům nebo lysosomům. Barvením lysosomů specifickou značkou by se dala určit přesná míra kolokalizace a potvrzení výskytu liposomů. Tento experiment je však nad rámec diplomové práce.

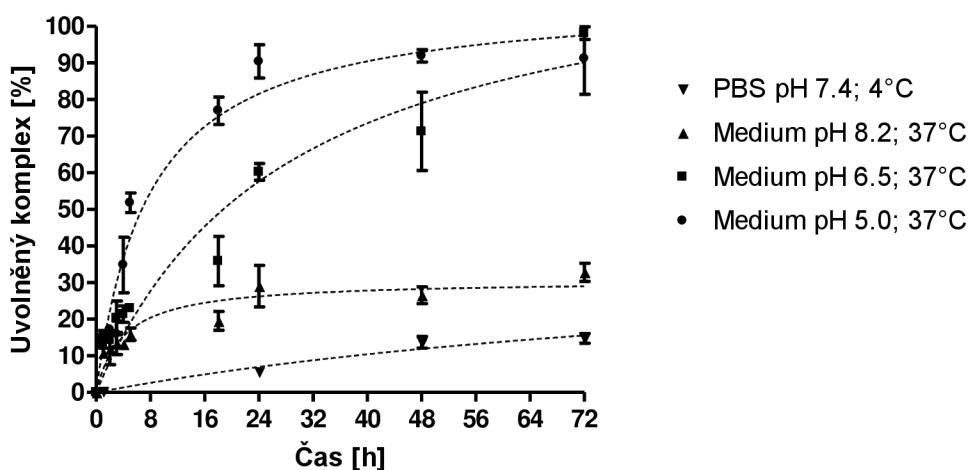


Obrázek 23: Reprezentativní fotografie z konfokálního mikroskopu zobrazující lokalizaci částic 5-CF Lipo 100 nm (obsahující BBR3464) v buňkách po 3 nebo 24 hodinách inkubace. Kontrola představuje buňky inkubované v čistém mediu. Levé panely: zobrazení v bílém světle; prostřední panely: zelený fluorescenční kanál (493 nm), pravé panely: sloučené obrázky z bílého světla a fluorescence.

Aby došlo k požadovanému cytostatickému účinku studované látky, je nutné, aby po vstupu do buňky mohla působit na cílovou molekulu. Musí tedy dojít k uvolňování BBR3464 z liposomů. Z tohoto důvodu jsou v další kapitole prozkoumány podmínky uvolňování tohoto léčiva.

5.6 Kinetika uvolňování

Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, k požadovanému cytostatickému působení komplexu BBR3464 dochází až po navázání na DNA. Proto bylo do série experimentů v této práci zahrnuto i studium kinetiky uvolňování BBR3464 z Lipo 100 nm, a to v průběhu 72 hodin při inkubaci v médiu RPMI-1640 při 37 °C při třech různých hodnotách pH média – pH 5; 6,5 a 8,2. Zároveň byla sledována i stabilita liposomů při podmínkách skladování, a to v PBS při 4 °C. Po uplynutí daného časového úseku byla stanovena koncentrace platiny ve vzorcích pomocí AAS, jak je uvedeno v kapitole materiály a metody. Tyto hodnoty pak byly vztaženy na celkovou koncentraci platiny ve vzorku a v grafu v obrázku č. 24 uvedeny jako procenta uvolněné platiny v čase. Body jsou naměřeny pro 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 a 72 hodin pro uvolňování v médiu při 37 °C a 24, 48 a 72 hodin pro uvolňování v PBS při 4 °C. Tyto body jsou proloženy hyperbolou.



Obrázek 24: Graf kinetiky uvolňování BBR3464 z liposomů po dobu 72 hodin. Svislé úsečky představují průměrnou odchylku ze dvou nezávislých experimentů.

Nejméně uvolněné platiny (do 15 % za 72 hodin) bylo detekováno v PBS při 4 °C. S přihlédnutím k výsledkům získaných pro uvolňování BBR3464 v médiu by se dalo očekávat, že zvýšení teploty povede k vyšší míře uvolnění léčiva z liposomů. Již v předchozích studiích bylo zjištěno, že zvýšení teploty při skladování vede k destabilizaci systému obsahující liposomy. (Plessis a kol. 1996)

Z uvedeného grafu je patrné, že kinetika uvolňování BBR3464 z liposomů závisí na pH, což je ve shodě s literaturou. Závislost je nepřímo úměrná, tedy že s klesající hodnotou pH dochází k větší míře uvolňování. Tyto výsledky naznačují možné zvýšení citlivosti připravených částic k nádorové tkáni, která se oproti séru (pH 7,4) vyznačuje kyselějším

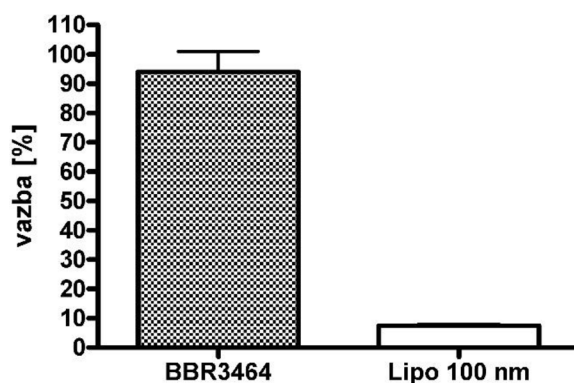
prostředím s pH v rozmezí 6,5-6,8. (Alasvand a kol. 2017) Spolu s EPR efektem by tento poznatek mohl vést k prohloubení preferenční akumulace enkapsulovaného léčiva v pevných nádorech za současného snížení dávky působící na zdravé buňky. To by potenciálně mohlo vést ke zmírnění vedlejších účinků. Poznatků vycházejících z obrázku č. 24 je využíváno také při konstrukci termosenzitivních a pH-senzitivních liposomů. (Aghdam a kol. 2019)

V této části práce byla uvedena celá řada výsledků z různých experimentů, které prokázaly zlepšení některých biologických vlastností (antiproliferativní aktivita, pH selektivita) ve prospěch enkapsulované formy komplexu BBR3464. Také bylo zjištěno, že za daným zlepšením zřejmě nestojí vyšší akumulace v buňkách, a proto nás v následujícím a zároveň posledním experimentu zajímalo, zda může enkapsulace zabránit interakcím komplexu se složkami séra.

5.7 Reakce se séru obsahujícími látkami

Hlavní motivací této diplomové práce bylo zjištění, že obecná toxicita platinového komplexu BBR3464 je způsobena interakcí se složkami séra, kdy skrze *trans*-efekt dochází k jeho rozpadu na sloučeniny podobné transplatině, které jsou samy o sobě vysoce toxické. Enkapsulací BBR3464 do fosfolipidového obalu by mělo být těmito interakcím zabráněno, což by v důsledku mělo snížit obecnou toxicitu této látky.

Experiment byl realizován reakcí BBR3464 nebo Lipo 100 nm s hovějším sérem a jejich inkubací. Následně byly pro odstranění nenavázané platiny všechny vzorky dialyzovány a kvůli možné změně koncentrace při dialýze bylo stanoveno množství proteinu metodou Bradfordové, jak je popsáno v kapitole materiály a metody. Množství platiny (tedy komplexu navázaného na složkách séra) bylo stanoveno pomocí ICP-MS. Při vyhodnocování bylo u všech vzorků vztaženo množství platiny k zjištěnému množství proteinu jednoduchým podělením. U nedialyzovaných vzorků byl poměr Pt/protein definován jako 100% a k němu byly vztahovány hodnoty získané pro dialyzované vzorky. Ze získaných hodnot byl vytvořen poměr vzorku po dialýze ku vzorku před dialýzou a vynásobeno 100, čímž jsme zjistili množství platiny v %, které se navázalo na sérové proteiny. Pro vzorky Lipo 100 nm i BBR3464 byl připraven i vzorek blank, se kterým byla provedena stejná analýza a tyto blanky byly odečteny od výsledných poměrů vzorků Lipo 100 nm a BBR3464. Výsledek tohoto experimentu v % vazby uvádíme v grafu na obrázku č. 25.



Obrázek 25: Porovnání vazby volného a enkapsulovaného BBR3464 na sérové proteiny. Sloupce představují průměr a svislé úsečky průměrnou odchylku ze dvou nezávislých experimentů.

Z uvedeného grafu je patrné, že v případě enkapsulovaného komplexu došlo k účinnému zabránění vazby BBR3464 na sérové proteiny. V případě BBR3464 to bylo $(94 \pm 7) \%$. Vzorek blank bylo nutné stanovit a odečíst od Lipo 100 nm z toho důvodu, že se BBR3464 kromě proteinů účinně váže i na fosfátové skupiny fosfolipidů, které zůstaly v dialyzační membráně. (Brabec a kol. 2017) Ukázalo se, že tento efekt není zanedbatelný a tvoří 30 % celkové vazby. Po odečtení tvořila vazba BBR3464 na sérové proteiny u tohoto vzorku pouze $(7,5 \pm 0,5) \%$. Získané výsledky naznačují, že enkapsulací komplexu do liposomů byla zásadně omezena interakce mezi BBR3464 a sérovými proteiny.

6 Závěr

V této diplomové práci jsme se zabývali enkapsulací platinového komplexu BBR3464 do 100 nm liposomů, jejich charakterizací a studiem biologické aktivity. Měřením dynamického rozptylu připravených nanočástic bylo zjištěno, že distribuce velikosti dle počtu odpovídá připravené velikosti 100 nm. Liposomy měly kulovitý tvar a vykazovaly dobrou stabilitu. Z důvodu chemicky náročného postupu přípravy vzorku se nepodařilo částice charakterizovat na HR-TEM, kde hlavním cílem byla vizualizace morfologie liposomů a získání prvkové mapy. Tato analýza byla nahrazena právě kryogenní elektronovou mikroskopií ve firmě TESCAN, kde jsme se spokojili s jejich vizualizací.

Kromě charakterizace nanočástic byly provedeny také základní biologické testy na buněčné kultuře A2780. Konkrétně bylo zjištěno, že antiproliferativní aktivita enkapsulovaného komplexu je lepší než u volného BBR3464, přičemž samotné liposomální částice nemají na životnost buněk žádný vliv. Analýza na průtokovém cytometru ukázala, že v otázkách indukce buněčné smrti mají volný i enkapsulovaný komplex podobný profil, který se navíc u Lipo 100 nm projevuje už při 10x nižší koncentraci aplikovaného léčiva. Apoptotická cesta převažovala u většiny vzorků, avšak je možné, že dochází i k dalším typům buněčné smrti. Rovněž bylo zjištěno, že vylepšené antiproliferativní schopnosti BBR3464 nejsou způsobeny zlepšeným hromaděním liposomů v buňkách, jak je často uváděno v literatuře pro jiné sloučeniny platiny. Buněčná akumulace BBR3464 a Lipo 100 nm byla srovnatelná. Z kvalitativního hodnocení akumulace na fluorescenčním konfokálním mikroskopu bylo možné stanovit, že po 3 hodinách inkubace dochází k asociaci značených nanočástic s buněčnou membránou a po 24 hodinách inkubace byly v buňkách pozorovány ohraničené struktury připomínající endozomy. Uvolňování léčiva z liposomů, jak naznačuje experiment studující kinetiku uvolňování, je závislé na pH. Tímto principem může být dosažena vyšší selektivita pro nádorovou tkáň, která se vyznačuje nižší hodnotou pH oproti tkáni nenádorové. Posledním experimentem bylo ukázáno, že obalení BBR3464 fosfolipidovou obálkou zabraňuje interakci se složkami séra, zejména s látkami obsahující S-donorový atom (peptidy, proteiny apod.). Hlavní cíl předložené práce, tedy připravit formu BBR3464, která by byla stabilnější v krevním řečišti a nepodléhala interakcím se složkami séra, se tedy podařilo splnit.

Samotné BBR3464 je velmi nadějným protirakovinným terapeutikem, neboť cytostaticky účinkuje na široké spektrum buněčných linií. Navíc svým mechanismem působení

úspěšně obchází nedostatky jiných platinových léčiv jako je například rezistence buněk vůči cisplatině a cisplatině podobným sloučeninám. Souhrnná data naznačují vylepšení terapeutických vlastností komplexu BBR3464 v jeho liposomální formulaci. Je však nutno provést další testy, které by toto zjištění potvrdily a dále rozvinuly jeho potenciální využití v klinické praxi.

7 Seznam literatury

- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Haniferpour Y., Samiei M., Kouhi M., Nejati-Koshki K. (2013) Liposomes: Classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters* **8**: 102.
- Alasvand N., Urbanska A.M., Rahmati M., Saeidifar M., Gungor-Ozkerim P.S., Sefat F., Rajadas J., Mozafari M. (2017) Therapeutic nanoparticles for targeted delivery of anticancer drugs. In: *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. (Grumezescu A. M.), Elsevier, Amsterdam, Holandsko, 245-259.
- Anttila J.V., Shubin M., Cairns J., Borse F., Guo Q., Mononen T., Vázquez-García I., Pulkkinen O., Mustonen V. (2019) Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLOS Computational Biology* **15**: 1007493.
- Anderson M., Omri A. (2002) The effect of different lipid components on the *in vitro* stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Delivery* **11**, 33-39.
- Aghdam M.A., Bagheri R., Mosafer J., Baradaran B., Hashemzaei M., Baghbanzadeh A., de la Guardia M., Mokhtarzadeh A. (2019) Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. *Journal of Controlled Release* **315**, 1-22.
- Bangham A.D., Horne R.W. (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology* **8**, 660-668.
- Bergstrand N. (2003) *Liposomes for drug delivery*. Dissertation thesis, Uppsala University, Uppsala, Švédsko.
- Brabec V., Hrabina O., Kašpárková J. (2017) Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews* **351**, 2-31.
- Brabec V., Kašpárková J., Vrána O., Nováková O., Cox J.W., Qu Y., Farrell N. (1999) DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent. *Biochemistry* **38**, 6781-6790.
- Bryers J.D., Woodrow K.A. (2007) Engineering interfaces for infection immunity. In: *Comprehensive Biomaterials II*. Vol. 4. (Paul Ducheyne), Elsevier, Amsterdam, Holandsko, 381-403.
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N. Khan, W. (2017) Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics* **9**, 1–33.
- Burrows N.D., Penn R.L. (2013) Cryogenic transmission electron microscopy: Aqueous suspensions of nanoscale objects. *Microscopy and Microanalysis* **19**, 1542-1553.
- Chen S.-H., Cheng J.-Y. (2019) New insights into mechanisms of cisplatin resistance: From tumor to cell microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 4136.
- De Angelis C. (2008) Side effects related to systemic cancer treatment: Are we changing the Promethean experience with molecularly targeted therapies? *Current Oncology* **15**, 198-199.
- Deans A.J., West S.C. (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer* **11**, 467-480.
- Demel R.A., De Kruffyff B. (1976) The function of sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **2**, 109-132.
- DiCiccio J. E., Steinberg B. E. (2011) Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *Journal of General Physiology* **137**, 385-390.
- Dilruba S., Kalayda G.V. (2016) Platinum-based drugs: Past, present and future. *Cancer Therapy and Pharmacology* **77**, 1103-1124.
- Du Plessis J., Ramachandran C., Weiner N., Muller D.G. (1996) The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. *International Journal of Pharmaceutics* **127**, 273-278.
- Dvorak H.F., Nagy J.A., Dvorak J.T., Dvorak A.M. (1988) Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *American Journal of Pathology* **133**, 95-109.

- Farrell N. (2000) Polynuclear charged platinum compounds as a new class of anticancer agents. In: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*. (Kelland, L. R., Farrell, N. P.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 321-338.
- Fouad Y.A., Aanei C. (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research* **7**, 1016-1036.
- Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Pérez J.M. (2003) Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Current Medical Chemistry* **10**, 257-266.
- Grit M., Crommelin D.J.A. (1993) Chemical stability of liposomes: Implication for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids* **64**, 3-18.
- Harris A.L., Yang X., Hegmans A., Povirk L., Ryan L.J., Kelland R., Farrell N. (2005) Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a novel highly charged trinuclear platinum compound. enhancement of cellular uptake with charge. *Inorganic Chemistry* **44**, 9598–9600.
- Honary S., Zahir V. (2013) Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – a review. *Tropical Journal of Pharmaceutic Research* **12**, 265-273.
- Hoshyar N., Grey S., Han H., Bao G. (2016) The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine* **11**, 673-692.
- Hwang J.Y., Li Z., Loh X. J. (2016) Small molecule therapeutic-loaded liposomes as therapeutic carriers: From development to clinical applications. *RSC Advances* **6**, 70592-70615.
- Kabolizadeh P., Ryan J., Farrell N. (2007) Differences in the cellular response and signaling pathways of cisplatin and BBR3464 ($[[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)(2)]_2\mu\text{-(trans-Pt}(\text{NH}_3)(2)(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)(6)\text{-NH}_2)_2)]_4+$) influenced by copper homeostasis. *Biochemical Pharmacology* **73**, 1270-1279.
- Kishimoto T., Yoshikawa Y., Yoshikawa K., Komeda S. (2020) Different effects of cisplatin and transplatin on the higher-order structure of DNA and gene expression. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 34.
- Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. (1990) Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *Federatin of European Biochemical Societies* **268**, 235-237.
- Kvítek L. Panáček A. (2007) *Základy koloidní chemie*. Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kutova O.M., Guryev E.L., Sokolova E.A., Alzeibak R., Balalaeva I.V. (2019) Targeted delivery to tumors: Multidirectional strategies to improve treatment efficiency. *Cancers* **11**: 68.
- Lasic D.D. (1988) The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal* **256**, 1-11.
- Liu D., He C., Wang A.Z., Lin W. (2013) Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. *International Journal of Nanomedicine* **8**, 3309-3319.
- Lombardo D., Calandra P., Caccamo M.T., Magazú S., Kiselev M.A. (2019) Colloidal stability of liposomes. *Material Science* **6**, 200-213.
- Matsumura Y., Maeda H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research* **46**, 6387-6392.
- Milla P., Dosio F., Cattel L. (2012) PEGylation of proteins and liposomes: A powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current Drug Metabolism* **13**, 105-119.
- Moghimi S.M., Patel H.M. (1988) Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes. *FEBS LETTERS* **223**, 143-147.
- Molinaro C., Martoriati A., Pelinski L., Cailliau K. (2020) Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. *Cancers* **12**: 2863.
- Montané X., Bajek A., Roszkowski K., Montornés J.M., Giamberini M., Roszkowski S., Kowalczyk O., Garcia-Valls R., Tylkowski B. (2020) Encapsulation for cancer therapy. *Molecules* **25**: 1605.

- Napper D.H. (1970) Colloid Stability. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **9**, 467-477.
- New R.R.C. (1990) Preparation of liposomes. In: *Liposomes: A practical approach*. (New R.R.C.) Oxford University Press, New York, U.S.A., 33-103.
- New R.R.C., Black C.D. V., Parker R. J., Puri A., Scherphof G.L. (1990) Liposomes in biological systems. In: *Liposomes: A practical approach*. (New R.R.C.) Oxford University Press, New York, U.S.A., 33-103.
- Oberoi H.S., Nukolova N.V., Kabanov A.V., Bronich T. K. (2013) Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Systems Reviews* **65**, 1667-1685.
- Parker N., Turk M.J., Westrick E., Lewis J.D., Low P.S., Leamon C.P. (2005) Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry* **338**, 284-293.
- Perego P., Caserini C., Gatti L., Carenini N., Romanelli S., Supino R., Colangelo D., Viano I., Leone R., Spinelli S., Pezzoni G., Manzotti C., Farrel N, Zunino F. (1999) A novel trinuclear platinum complex overcomes cisplatin resistance in an osteosarcoma cell system. *Molecular Pharmacology* **55**, 528-534.
- Polanský Petr. (2011) *Studium molekulárního mechanismu protinádorové aktivity dinukleárních komplexů platiny*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Prestayko A.W., D'Aoust J.G., Issell B.F., Crooke S.T. (1979) Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treatment Reviews* **6**, 17-39.
- Recht A., Come S.E., Henderson I.C., Gelman R. S., Silver B., Hayes, D.F., Shulman L.N., Harris J.L. (1996) The sequencing of chemotherapy and radiation therapy after conservative surgery for early-stage breast cancer. *The New England Journal of Medicine* **334**, 1356-1361.
- Rosenberg B., VanCamp L., Krigas T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699.
- Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E., Mansour V.H. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**, 385-386.
- Selvamani V. (2018) Stability studies on nanomaterials used in drugs. In: *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. (Ranjan S., Mohapatra S., Kumar R., Thomas S., Dasgupta N.), Elsevier, Amsterdam, Holandsko, 425-437.
- Semple S.C., Chonn A., Cullis P.R. (1998) Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour *in vivo*. *Advanced Drug Delivery Reviews* **32**, 3-17.
- Serkova N.J., Eckhardt S.G. (2016) Metabolic imaging to assess treatment response to cytotoxic and cytostatic agents. *Frontiers in Oncology* **6**: 152.
- Sharma A., Sharma U.S. (1997) Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* **154**, 123-140.
- Shirmanova M. V., Druzhkova I. N., Lukina M. M., Matlashov M. E., Belousov V. V., Snopova L. B., Prodanetz N. N., Dudenkova V. V., Lukyanov S. A., Zagaynova E. V. (2015) Intracellular pH imaging in cancer cells *in vitro* and tumors *in vivo* using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochimica et Biophysica Acta* **1850**, 1905-1911.
- Siddik Z.H. (2003) Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279.
- Stathopoulos G.P., Boulikas T. (2011) Lipoplatin formulation review article. *Journal of Drug Delivery* **2012**, 1-15.
- Surova O., Zhivotovsky B. (2012) Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* **32**, 3789-3797.
- Vahabi S., Eatemadi A. (2017) Nanoliposome encapsulated anesthetics for local anesthesia application. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **86**, 1-7.
- Velinova, M. J. et al. (2004) Preparation and stability of lipid-coated nanocapsules of cisplatin: Anionic phospholipid specificity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1663**, 135-142.

- Vocetková K., Míčková A., Jarošíková T., Rosina J., Handl M., Amler E. (2014) Liposomy, jejich charakterizace, příprava a inkorporace do nanovláknenných nosičů. *Lékař a technika* **44**, 11-17.
- Vrana O., Novohradský V., Medriková Z., Burdíkova J., Stuchlíková O., Kasparková J., Brabec V. (2016) Internalization of ineffective platinum complex in nanocapsules renders it cytotoxic. *Chemistry – A European Journal* **22**, 2728-2735.
- Wang D., Lippard S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery* **4**, 307-320.
- Wiltshaw E. (1979) Cisplatin in the Treatment of Cancer. *Platinum Metals Review* **23**, 90-98.
- Zhao, Y., May, J. P., Chen, I. W., Undzys, E. & Li, S. D. (2015) A study of liposomal formulations to improve the delivery of aquated cisplatin to a multidrug resistant tumor. *Pharmaceutical Research* **32**, 3261–3268.
- Zehnulova J., Kasparkova J., Farrell N., Brabec V. (2001) Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair of DNA intrastrand crosslinks of novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 22191-22199.
- Zerzánková L. (2011) *Studium interakcí protinádorově účinných komplexů těžkých kovů s biomakromolekulami*. Disertační práce, Masarykova Univerzita, Brno.

Internetové zdroje:

Wikipedia triplatin tetranitrate page: https://en.wikipedia.org/wiki/Triplatin_tetranitrate (staženo 4.1.2020).

Research gate: https://www.researchgate.net/figure/Classification-of-liposomes-based-on-the-lamellarity-A-Multilamellar-Vesicles-MLV_fig1_297623957 (staženo 23.3.2021).

Merck Liposome preparation page: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/liposome-preparation.html> (staženo 23.9.2020).

Wikipedia polyethylene glycol page: https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol (staženo 12.3.2021).

Bio Consult page: <https://bioconsult.cz/cs/rotacni-vakuove-odparky/7379-rotacni-vakuova-odparka-rvo-400.html> (staženo 23.9.2020).

Liposome preparation site for Avanti® Polar Lipids: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/luvet> (staženo 23.9.2020).

Tech Support site for Avanti® Polar Lipids: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps> (23.9.2020).