

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra anorganické chemie



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Příprava a studium vlastností liposomů  
s vybranými platnatými komplexy**

Autor: David Smola

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Management v chemii

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 12. 5. 2014

Já, David Smola, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Pavla Štarhy, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry anorganické chemie a Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 12. 5. 2014

.....

Chtěl bych zde upřímně poděkovat Mgr. Pavlu Štarhovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při vypracovávání této bakalářské práce, za provedení experimentů atomové absorpční spektroskopie a pomoc s interpretací výsledků provedených technik. Dále děkuji RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za pomoc při měření a interpretaci DLS experimentů.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: David Smola

Název práce: Příprava a studium vlastností liposomů s vybranými platnatými komplexy

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt: Různými variantami metody hydratace lipidového filmu byly připraveny lecitinové liposomy obsahující protinádorově aktivní komplexy platiny s různými deriváty 7-azaindolu. U připravených systémů byly vhodnými technikami (např. Dynamický rozptyl světla (DLS) nebo Atomová absorpční spektroskopie (AAS)) zkoumány jejich vlastnosti (velikost, zeta potenciál, obsah Pt(II) komplexu) a jejich stabilita za různých vnějších podmínek (pH, teplota, čas). Metoda přípravy užívající ultrazvukový homogenizátor byla optimalizována a reprodukovatelně poskytuje liposomy obsahující platnatý komplex o velikosti okolo 100 nm, jež jsou vhodné pro následné studium protinádorové aktivity takových systémů.

Klíčová slova: Cílený transport léčiv; Protinádorová aktivita; Pt(II) komplexy; Liposomy; Lecitin.

Počet stran: 42

Jazyk: Čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: David Smola

Title: Preparation and studies of properties of liposomes with selected platinum(II) complexes

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Czech Republic

Supervisor: Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.

The year of presentation: 2014

**Abstract:** The lecithin liposomes containing antitumor active platinum(II) complexes with various derivatives of 7-azaindole were prepared by different variations of the method of lipid film hydration. The systems were studied by suitable techniques (such as Dynamic Light Scattering or Atomic Absorption Spectroscopy) for their properties (size, zeta potential, content of Pt(II) complex) and their stability under different conditions (pH, temperature, time). A preparation method using an ultrasonic homogenizer was optimized and reproducibly provides liposomes containing platinum complex of the size of 100 nm, which can be considered as suitable for the antitumor activity study of such systems.

Keywords: Targeted drug delivery; Antitumor activity; Pt(II) complexes; Liposomes; Lecithin.

Number of pages: 42

Language: Czech

## OBSAH

1. Úvod a cíl bakalářské práce .....	7
2. Teoretická část .....	8
2.1. Protinádorová léčiva na bázi platiny .....	8
2.1.1. Mechanismus účinku .....	10
2.2. Cílený transport léčiv .....	11
2.2.1. Nanočástice .....	12
2.3. Liposomy - nosiče léčiva .....	15
2.3.1. Rozdělení liposomů podle složení .....	16
2.3.2. Rozdělení liposomů podle velikosti .....	16
2.3.3. Rozdělení liposomů podle náboje .....	17
2.3.4. Cílení liposomů .....	17
3. Experimentální část .....	21
3.1. Chemikálie .....	21
3.2. Přístroje .....	21
3.3. Příprava liposomů .....	22
3.3.1. Hydratace fosfolipidového filmu .....	22
3.3.2. Extruze a homogennizace .....	23
3.3.3. Stanovení efektivního zapouzdření .....	23
3.3.4. Studium vlastností liposomů .....	24
3.3.4.1. Velikost váčků + zeta potenciál .....	24
3.3.4.2. Stabilita liposomů .....	25
4. Výsledky .....	26
4.1. Výsledky měření velikostní distribuce .....	26
4.2. Výsledky měření zeta potenciálu .....	33
4.3. Studium zapouzdření komplexů do liposomových nosičů .....	34
4.4. Studium stability při různé teplotě .....	35
4.5. Studium stability při různém pH .....	36
5. Diskuze .....	37
6. Závěr .....	39
6. Použitá literatura .....	40

## 1. ÚVOD A CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

*Cisplatina*, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], je chemoterapeutikum na bázi platiny užívané od roku 1978 celosvětově v protinádorové terapii k léčbě různých typů nádorů, jehož aplikace má ovšem řadu negativních vedlejších účinků, jako je přílišná toxicita pro zdravou tkáň a orgány [1]. Dalším vážným problémem je rezistence některých typů nádorů proti jejímu účinku. Z těchto důvodů stále probíhá studium nových komplexů platiny, které by při vyšším biologickém účinku vykazovaly nižší toxicitu a vůči jejichž účinku nebudou nádorové buňky rezistentní. Další možností pro zvýšení biologického efektu resp. potlačení vedlejších účinků komplexů platiny, kterou se zabývá i tato bakalářská práce, je cílený transport léčiva do nádorových tkání za použití různých nosičů (např. liposomy, nanočástice oxidů železa nebo zlata). Tyto nosiče mají zabezpečit co největší hromadění komplexů platiny nebo jiných biologicky účinných látek v tumoru, případně zamezit deaktivaci aktivní látky ve fyziologických podmínkách [2].

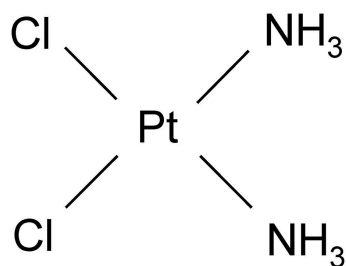
Hlavními cíli předložené bakalářské práce byla příprava a studium vlastností série lecitinových liposomů s vybranými protinádorově aktivními platnatými komplexy, kterými byly deriváty klinicky užívaných léčiv na bázi platiny (*cisplatina*, *oxaliplatina*) s různými N-donorovými ligandy (deriváty *N*6-benzyladeninu nebo 7-azaindolu). Liposomové systémy byly připravovány různými modifikacemi metody hydratace lipidového filmu a studovány vhodnými analytickými metodami (např. Dynamický rozptyl světla (DLS) nebo Atomová absorpční spektroskopie (AAS)). Podařilo se nám optimalizovat metodu přípravy, pro dosažení požadované velikosti liposomů (*ca* 100 nm) se zapouzdřenými biologicky aktivními komplexy platiny.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Protinádorová léčiva na bázi platiny

Výzkum protinádorových léčiv na bázi platiny započal Barnett Rosenberg, který původně zkoumal vliv elektrického proudu na dělení bakteriálních a savčích buněk. Z důvodu malé chemické reaktivity při svém bádání použil sadu platinových elektrod, na kterých ovšem při zavedení elektrického proudu a následné elektrolýze vznikaly sloučeniny platiny, které potlačovaly buněčné dělení studovaných *E. coli*. Těmito látkami byly *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (*cis*-diammin-dichloroplatnatý komplex, *cisplatin*) a *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>] (*cis*-diammin-tetrachloroplatičitý komplex). Nejintenzivněji byl studován *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] komplex, který při pokusech vykazoval nejvýraznější biologické (protinádorové) účinky, které byly publikovány poprvé v roce 1965. V roce v 1971 vstoupila *cisplatin* do klinických testů a konečně v roce 1978 byla schválena jako chemoterapeutikum používané při léčbě rakoviny varlat a vaječníků [1,2].

Molekula *cisplatin* (Obrázek 1) se skládá z centrálního Pt(II) iontu, dvou molekul NH<sub>3</sub> (tzv. *carrier ligands*) a dvou chloridových iontů, které mohou být případně nahrazeny jinými ligandy (tzv. *leaving groups*) [3]. I kvůli její jednoduchosti je jedním z nejdostupnějších léčiv užívaných při léčbě rakoviny. *Cisplatin* jako chemoterapeutikum má prokázanou aktivitu při léčbě rakoviny vaječníků, varlat, plic, močového měchýře a dalších typů. Kromě pozitivních účinků vykazuje ovšem *cisplatin* i negativní vedlejší účinky [2], které jsou dány necíleným transportem a biologickým účinkem tohoto léčiva v organismu. Léčivo nenapadá pouze rakovinné buňky, ale i zdravou tkáň a způsobuje nevolnost, zvracení, nefrotoxicitu, hepatotoxicitu, srdeční komplikace, poškození močového měchýře příp. poškození zrakového nervu i Cortiho orgánu. Tyto vedlejší účinky se musí kontrolovat omezenými dávkami léčiva za den, a to 100 mg/den. Použití *cisplatin* je dále omezeno vrozenou rezistencí některých nádorových typů nebo získanou rezistencí, kterou si nádorové buňky vytvořily opakovanou aplikací *cisplatin* do organismu. Proto bylo a i v současnosti je soustavnou a neutuchající



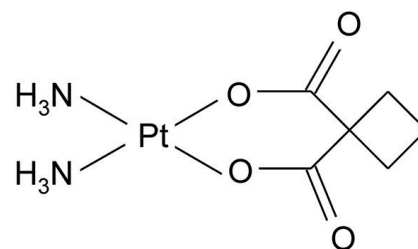
Obrázek 1: *cisplatin*

snahou vědců zvýšit účinnost chemoterapeutik na bázi platiny, omezit toxicitu a překonávat rezistenci. Z mnoha tisíc studovaných derivátů *cisplatin* jen několik desítek látek dosáhlo fáze klinických testů a méně než deset jich je v používáno v onkologické praxi, např. *karboplatina* (léčivo druhé generace, diammin-(1,1'-



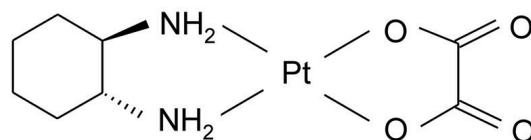
cyklobutandikarboxylato)platnatý komplex), *oxaliplatina* (léčivo třetí generace, *1R,2R*-diaminocyklohexan-oxalatoplatnatý komplex), nebo *nedaplatina* (*cis*-diammin-glykolatoplatnatý komplex).

*Karboplatina* (obrázek 2) má na rozdíl od *cisplatin*y bidentátní organickou odstupující skupinu (tj. 1,1'-cyklobutandikarboxylatový dianion), který vykazuje pomalejší hydrolytickou substituci za aqua ligandy než chloridové ionty u *cisplatin*y. N-donorové ligandy ( $\text{NH}_3$ ) má *karboplatina* stejné jako *cisplatin*a. U *karboplatiny* byla zjištěna nižší toxicita proti některým tkáním a orgánům (dochází k menšímu poškození nervů, ledvin a sluchového orgánu) a lepší distribuce v těle organismu ve srovnání s *cisplatinou*. Ovšem na druhé straně je aktivní vůči stejným nádorům jako *cisplatin*a a navíc i nádorové buňky rezistentní vůči účinkům *cisplatin*y nejsou proti *karboplatině* nijak citlivější (tzv. křížová rezistence) [4,5]. Mechanismus účinku *karboplatiny* má ještě další zásadní odlišnosti, a to je reaktivita s DNA a také rychlost jejího následného vyloučení z buňky, která je u *karboplatiny* 10x delší než u *cisplatin*y, takže v nádoru setrvává větší koncentrace účinné látky [6].



Obrázek 2: Karboplatina

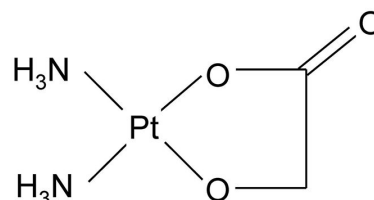
*Oxaliplatina* (obrázek 3) je dalším léčivem na bázi platiny k léčbě rakoviny. Je nyní používána v Americe, Evropě a Asii [5,7]. U tohoto léčiva je velmi důležité, že konečně nevykazuje účinnost proti stejným nádorovým



Obrázek 3: Oxaliplatina

buňkám, ale na rozdíl od *cisplatin*y a *karboplatiny* se může použít k léčbě nádorových tkání, které byly doposud vůči léčbě rezistentní [6]. Dále byla zjištěna její mnohem lepší reaktivita, pokud je podávána společně s 5-fluorouracilem a leucovorinem. *Oxaliplatina* také na rozdíl od předchozích sloučenin neničí ledviny a sluchový orgán, ale její dávku nám limituje neurotoxicita [8].

*Nedaplatina* (obrázek 4) je jedním z mála léčiv, které taky úspěšně prošlo klinickým testováním. Bohužel rezistence proti jejímu účinku je obdobná jako u *cisplatin*y. Její užití má výhodu v tom, že vykazuje nižší chorobné snížení počtu bílých krvinek v krvi



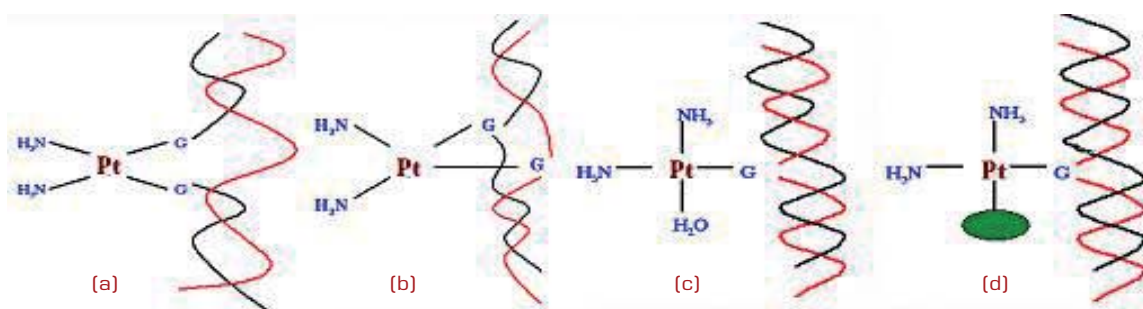
Obrázek 4: Nedaplatina

(leukopenie), dále má nižší toxicitu na celý zažívací trakt a ledviny. Na druhé straně vykazuje daleko vyšší snížení počtu krevních destiček (trombocytopenii) [9]. Našla si ovšem užití v léčbě širokého spektra nádorů od hlavy krku, přes plicí, jícnu až po vaječníky a varlata.

### 2.1.1. Mechanismus účinku

Molekula *cisplatin*y, složená ze dvou ligandů  $\text{NH}_3$  a dvou chloridových iontů, které jsou labilními skupinami a chovají se jako nukleofily snadno podléhající hydrolyze, je navenek poměrně inertní sloučenina. Zdaleka nereaguje se všemi molekulami v těle, ale pouze s těmi, které jí mohou nabídnout atom síry, kyslíku, ale i dusíku. Takže se *cisplatin*a chová jako akceptor těchto skupin a molekuly v těle jako donory [10-12].

Doposud nám není zcela znám celý mechanismus účinku *cisplatin*y vzhledem k velmi složitým procesům, které v těle organismů probíhají. Co se už ovšem podařilo zjistit při jejím zkoumání, je nahrazování chloridových iontů procesem hydrolyzy. Je to způsobeno nízkou koncentrací chloru v intracelulární tekutině, kde dochází k jejich nahrazení jednou nebo dvěma molekulami vody nebo zápornými hydroxidovými ionty. Pouze takto přeměněné molekuly *cisplatin*y mohou reagovat s DNA, převážně s purinovými bázemi a z nich hlavně s guaninem. *Cisplatin*a má dvě možnosti navázání se na DNA a to jako vnitrořetězcová (intrastrand cross-links) forma nebo meziřetězcová (interstrand cross-links) forma [13]. Z těchto dvou možností je daleko častější i nad rámec pravděpodobnosti možnost vnitrořetězcové forma a je předpokládáno, že tato forma hraje důležitou roli při ničení nádorových tkání a léčbě rakoviny. U vnitrořetězcové formy se váže *cisplatin*a na guanin na jednom vlákne DNA a na tom stejném vlákne DNA ještě vytvoří druhou vazbu a to opět na guanin nebo adenin (1,2-GG nebo 1,2-AG). V druhém případě (interstrand cross-links) dochází k navázání ne na stejné vlákno DNA, ale na protilehlé vlákno, a to na N7 atomy guaninu obou vláken. Jsou také známy adukty sahající přes jednu nukleobázi, již může být kterákoli ze zbývajících, tedy thymin, adenin nebo cytosin. (1,3-GXG) [14-16]. Po takto



Obrázek 5: Možnosti vazby *cisplatin*y na molekulu DNA, převzato z literatury [13]

závažných zásazích do sekundární struktury DNA dochází k jejímu nevratnému poškození. Takže DNA nemůže být správně replikována a po rozpoznání této situace vnitrobuněčnými pochody je vyvolána apoptóza, tedy smrt buňky [6].

Dalšími možnými reakcemi *cisplatin*y v buňce, které vede k potlačení požadovaného účinku, je navázání aktivovaného aqua komplexu na sloučeniny obsahující síru (např. aminokyseliny methionin nebo cysteinem) [5]. Takto vytvořené sloučeniny pak opouští pomocí GS-X pumpy nádorovou buňku. Dalším způsobem potlačení účinku *cisplatin*y je transport jejích aktivovaných aqua komplexů pryč z buňky za pomoci výstupních proteinů ATP7A a ATP7B. Výše popsané reakce tedy vedou k rezistenci nádorových buněk vůči léčbě *cisplatinou* [7]. A to nejsou ještě zdaleka jediné situace, ke kterým může v lidských buňkách docházet, například může nastat případ, při kterém dochází k přesycení metalothioneinu nebo glutathionu v buňce, což má za následek nenavázání aqua komplexů na strukturu DNA ani jedním z obou možných případů, ale jejich vychytání a reakci se zmíněnými sloučeninami, takže nedochází k požadované apoptóze buňky vlivem změněné sekundární struktury DNA. Částečně se může zvýšit odolnost nádorových buněk ovlivněním činnosti měďných přenašečů (CTR1), kterými se léčiva na bázi platiny transportovány do nádorových buněk. Jejich blokací se změní příjem různých látek, tedy i platnatých léčiv, čímž dochází ke zvýšení tolerance dávek [5]. Další příčinou zvýšení rezistence mohou být samotné opravné mechanismy lidské buňky, které fungují na principu nahrazování poškozených částí DNA (včetně navázaného aqua komplexu), kdy právě v tomto místě poškozený úsek vystříhnu a nahradí správnou odpovídající nukleotidovou bází. V neposlední řadě může docházet k nárůstu tolerance navázaného platnatého komplexu, čímž dochází k potlačení mechanismu opravy poškozené DNA, tudíž potlačení buněčné smrti. Tímto potlačením dochází k buněčnému dělení buňky i s poškozenou DNA a následnému obnovení růstu nádoru s tolerancí vůči léčivu [8].

## 2.2. Cílený transport léčiv

Užívání *cisplatin*y a obecně i dalších protinádorových chemoterapeutik je limitováno jejich vedlejšími negativními účinky, dále problémy s rozpustností, distribucí po organismu, či schopností přecházet přes buněčné membrány. Platnaté komplexy tedy napadají i zdravou tkáň, což vede ke zničení jater, ledvin a dalších životně důležitých orgánů. Z toho důvodu stále probíhá výzkum zabývající se možnostmi snížení negativních vedlejších účinků léčiv na bázi platiny. Jednou z perspektiv je tzv. cílený transport léčiv směřující ke zvýšení účinnosti za současného snížení vedlejších negativních účinků. Cílený transport léčiv se dělí na dvě zkoumané oblasti, jsou to pasivní transport léčiv a aktivní transport léčiv [17]. Abychom

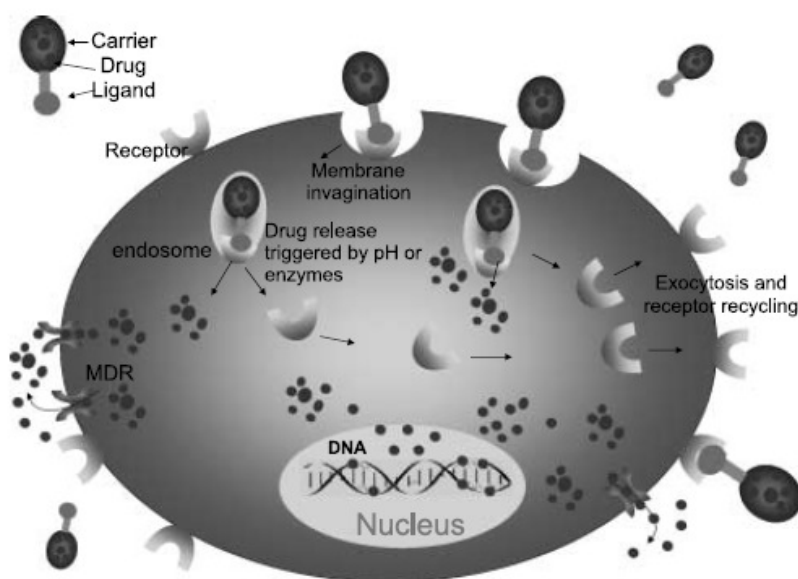
vůbec mohli zkoumat pasivní nebo aktivní cílený transport, musí nosiče léčiva (např. liposomy nebo nanočástice) splňovat určité podmínky na velikostní distribuci a povrch, aby nosiče dostatečně dlouho cirkulovaly v krevním řečišti, nebyly eliminovány retikuloendotelovým systémem (játra, slezina) a měly tedy možnost postupně dosáhnout nádorové tkáně [17].

### 2.2.1. Nanočástice

Aby byla protinádorová léčiva co nejučinnější musí splňovat jejich nosiče dvě nejdůležitější vlastnosti. Po podání dosáhnout co nejdříve nádorové tkáně s co nejmenší ztrátou objemu nebo účinnosti v krevním řečišti. Zadruhé by měli být schopny po dosažení nádorové tkáně schopny uvolňování v aktivní formě a selektivně zabíjet nádorové buňky bez působení na zdravé tkáně. Stále více se zdá, že by nanočástice mohli splňovat obě tyto podmínky, které jsou důležité pro zlepšení života pacientů a hlavně pro jejich přežití [18].

Velikostní distribuce a povrch nanočástic:

Velikost – jednou z výhod nanočástic je jejich volitelná velikost, která závisí pouze na zvolené metodě jejich přípravy. Výsledná velikost nesmí být příliš malá (<10 nm), aby nedocházelo k procházení všemi nebo většinou krevních vlásečnic, a zároveň příliš velká, aby nedocházelo k vychytávání nanočástic makrofágy nebo jejich zachycování v játrech a slezině, jejichž póry mají velikost od 150–200 nm [19]. Velikost pórů v rakovinné tkáni je variabilní a pohybuje se mezi 100–600 nm [20]. Z toho důvodu je požadovaná velikost nanočástic v rozmezí 10–100 nm.



Obrázek 6: Průnik nanočástic do buňky, převzato z [18]

Povrch nanočástic – Povrch nanočástic je další faktor, který velmi ovlivňuje setrvávání nanočástic v krevním řečišti [21]. Povrch nanočástic by měl mít hydrofilní vlastnosti. Toho lze dosáhnout například pokrytím nanočástice hydrofilním polymerem PEG (činí nanočástice obtížně rozpoznatelné pro makrofágy resp. imunitní systém) nebo z kopolymeru, který se skládá z vnitřní hydrofobní a vnější hydrofilní vrstvy [22,23].

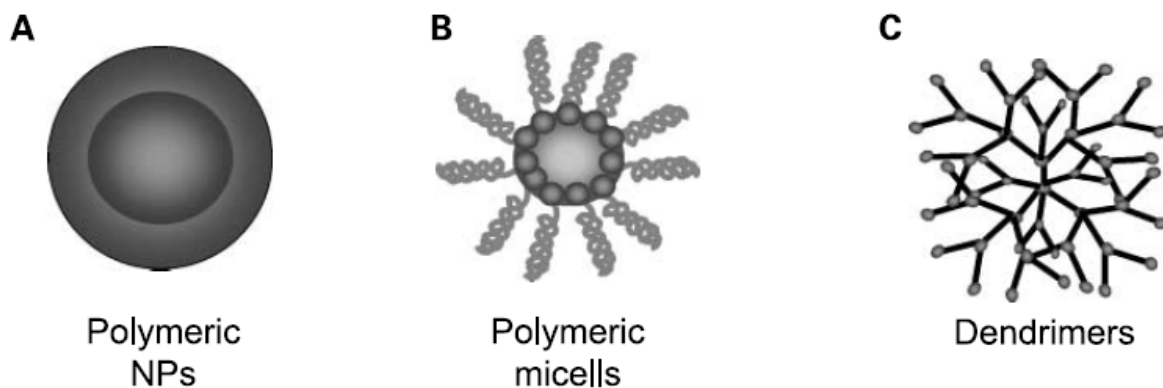
Pasivní cílený transport léčiv:

Pro pasivní transport je důležité, aby nanočástice splňovaly všechny výše zmíněné podmínky, což díky větším pórům nádorové tkáně, do nichž přechází nanočástice s léčivem, umožňuje jejich hromadění v nádorové tkáni. K uvolňování léčiva z nanonosičů pak dochází přímo v nádorové tkáni.

Aktivní cílený transport léčiv:

U aktivního transportu léčiv je požadované přesné cílení léčiva na nosičích do rakovinné tkáně. Používají se přenašeče, které rozpoznávají určité receptory přítomné pouze v rakovinné tkáni. Další možností je použití superparamagnetických nanočástic oxidů železa, které jsou k místu nádoru přitahovány silným externím magnetem. A samozřejmě je opět splnění všech výše probíraných vlastností.

První možností cíleného transportu léčiv jsou nanočástice na bázi polymeru. Polymerní částice se dělí podle použitého materiálu na přírodní nebo syntetické polymery. Dále podle způsobu přípravy polymeru s léčivem mohou být vytvořeny kapsle (A), ve kterých je léčivo



Obrázek 7: Zleva: Polymerní nanočástice, Polymerní micely, Dendrimery, převzato z [18]

přímo uzavřeno, polymerní micely (B), které jsou tvořeny jádrem nanočástice na které je léčivo navázáno, nebo dendrimery (C), což jsou vysoce rozvětvené makromolekuly [24].

Polymerní nanočástice (Obr. 7, A):

Mezi přirozeně se vyskytující polymery patří albumin (byl popsán jako nosič při léčbě rakoviny prsu [25]), heparin nebo chitosan. Opačnou skupinou jsou syntetické polymery, mezi které patří např. *N*-(2-hydroxypropyl)-methakrylamid kopolymer (HPMA), polystyren-anhydrid kyseliny maleinové kopolymer, polyethylenglykol (PEG) a poly-L-glutamová kyselina (PGA). PGA je první biologicky odbouratelný polymer, který se v praxi osvědčil, protože nevykazoval nedostatky volných forem léčiv. Mezi nimi, Xyotax (PGA-paclitaxel a CT-2106 (PGA-camptothecin) jsou nyní v klinických studiích. PEG a HPMA jsou na druhé straně biologicky neodbouratelné polymery [26] a jsou nasazovány pacientům, u kterých selhala předchozí léčba (ozařování, chemoterapie) a jsou nadále zkoumány [27].

Polymerní micely (Obr. 7, B):

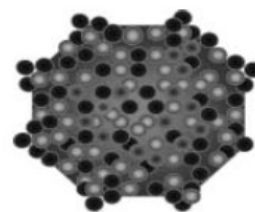
Vlastnosti polymerních micel vychází z jejich struktury. Skládají se z hydrofobního jádra, které slouží jako rezervoár pro hydrofobní léčivo. Tuto nanočástici stabilizuje ve vodném prostředí a poskytuje jí tím i rozpustnost hydrofilní vnější kůra. Léčivo může být do nanočástice, buď mechanicky zapouzdřeno, nebo vázáno chemickou vazbou [22,28]. Tento typ nanočástic je intenzivně studován pro svůj vysoký biomedicíální potenciál [29].

Dendrimery (Obr. 7, C):

Dendrimery jsou syntetické polymery, které jsou složeny z monomerů navázaných na centrální jádro. Mají možnost modifikovatelného povrchu, mnoho míst pro navázání léčiva, rozpustnost a vnitřní dutinu pro pohlcení léčiva [30]. Nejčastěji se používají ve spojení s *cisplatinou* [31]. Mnoho míst pro navázání umožňuje navázání i např. kontrastní látky pro diagnostické účely - dendrimery mohou sloužit jako multifunkční lék [30].

Virové nanočástice (Obr. 8):

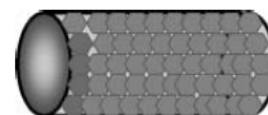
Virové nanočástice (např. psí parvovirus, bakteriofágy) byly vyvinuty jako alternativa cíleného transportu léčiv do požadované tkáně. Tyto viry jsou vyvinuty, aby se přichytávali



Viral-based  
NPs

Obrázek 8: Virová  
nanočástice, převzato z [18]

pouze k určitým tkáním, byly cíleny na určité receptory nebo tepelně cílené proteiny [32,33] a na kapslích těchto virů jsou přichyceny léky, které mají být dopravovány do nádorové tkáně [34].



Carbon  
nanotubes

Uhlíkové nanotrubičky (obr. 9):

Uhlíkové nanotrubičky jsou válce složené z šestičetných kruhů uhlíkových atomů. Nanotrubičky se pokrývají lineárním nebo rozvětveným polyethylenglykolem. V případě lineárního pokrytí jsou pozorovány větší hydrofilní vlastnosti a jsou vhodnější pro užití v medicíně [35]. V případě rozvětveného PEG pozorujeme výbornou biokompabilitu, zároveň jsou snadno transportovány do buněčné cytoplazmy, takže jsou dobře hromaděny v tkáních [36]. Dalším typem uhlíkových nanotrubiček jsou jedностěnné a víceštěnné trubičky, v případě víceštěnných je prováděna kombinace trubiček ještě se zlatem. Tyto typy vykazovaly různou toxicitu pro různé typy rakovin [37,38]. Hlavní výhodou uhlíkových nanotrubiček je možnost navázání většího množství molekul léčiva najednou na stěny trubiček, což je výhodné při potenciální léčbě rakoviny.

Obrázek 9: Uhlíková nanotrubička, převzato z [18]

### 2.3. Liposomy - nosiče léčiva

Liposomy, které slouží například jako nosiče léčiva, jsou malé sférické molekuly, které jsou rozptýleny v rozpouštědle (např. ve vodě). Liposomy se skládají z lipidových dvojvrstev (jedné, ale i více). Tyto dvojvrstvy jsou v naprosté většině případů složeny z fosfolipidů, mastných kyselin a/nebo fosfatidylcholinu a ve středu liposomů se vyskytuje uzavřená vodná fáze. Využíváme tedy fyzikálních a chemických vlastností liposomů pro připojení různých forem léčiva. Hydrofóbní léčivo bývá zapouzdřeno v lipidové dvojvrstvě, naopak hydrofilní se vyskytuje v uzavřené vodné fázi uvnitř liposomů [39].

V roce 1960 byly objeveny A. Banghamem a díky dalšímu rozvoji a zkoumání pro jejich komerční využití se dosáhlo mnoha způsobů využití v léčbě. Proto v dnešní době jsou liposomy záležitostí mnoha oborů od biologie, biochemie, chemie a farmaceutického průmyslu. Díky intenzivnímu studiu různých metod jejich přípravy, jejich chování a vlastností dnes můžeme připravit liposomové vesicle požadované velikosti a tvaru, pro nejlepší efektivnost využití v léčbě [40].

### 2.3.1. Rozdělení liposomů podle složení

#### 1. Glycerolové deriváty

- 1.1 glycerolfosfolipidy
- fosfatidylethanolamin
  - fosfatidylinositol
  - kardiolipin
  - fosfatidylserin
  - fosfatidylcholin

1.2 glycerolglykolipidy

#### 2. Sfingosinové deriváty

- 2.1 glykosfingolipidy
- sulfatidy
  - gangliosidy
  - cerebrosidy

2.2 sfingomyeliny

#### 3. Steroly

- cholesterol
- stigmasterol
- sitosterol
- ergosterol

#### 4. Složky v menšině

- karotenoidy
- polyprenoly
- polyprenylchinony

### 2.3.2. Rozdělení liposomů podle velikosti

- SUV (small unilamellar vesicles) – 15-50 nm. Čistý lecitin z vajíček může být použit pro přípravu SUV o velikosti 15 nm.
- LUV (large unilamellar vesicles) – 100-200 nm. Nejběžnější a nejvhodnější velikost liposomů pro nejdelší cirkulaci v těle a pro hromadění v nádorové tkáni.
- MLV (multilamellar vesicles) – 100-1000 nm. Běžně mají větší počet lamel (5 a více). Tyto multilamelární vesikuly se dále dělí na oligolamelární (v řádech jednotek) a polylamelární (v řádech desítek).

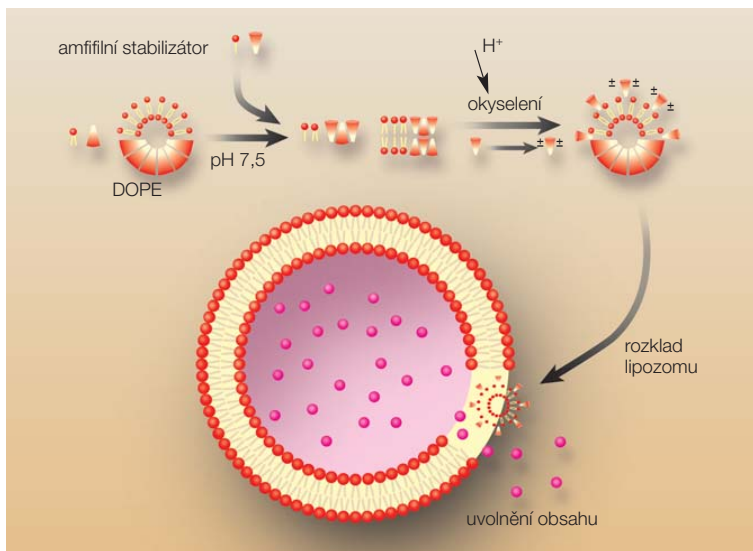


### 2.3.3. Rozdělení liposomů podle náboje

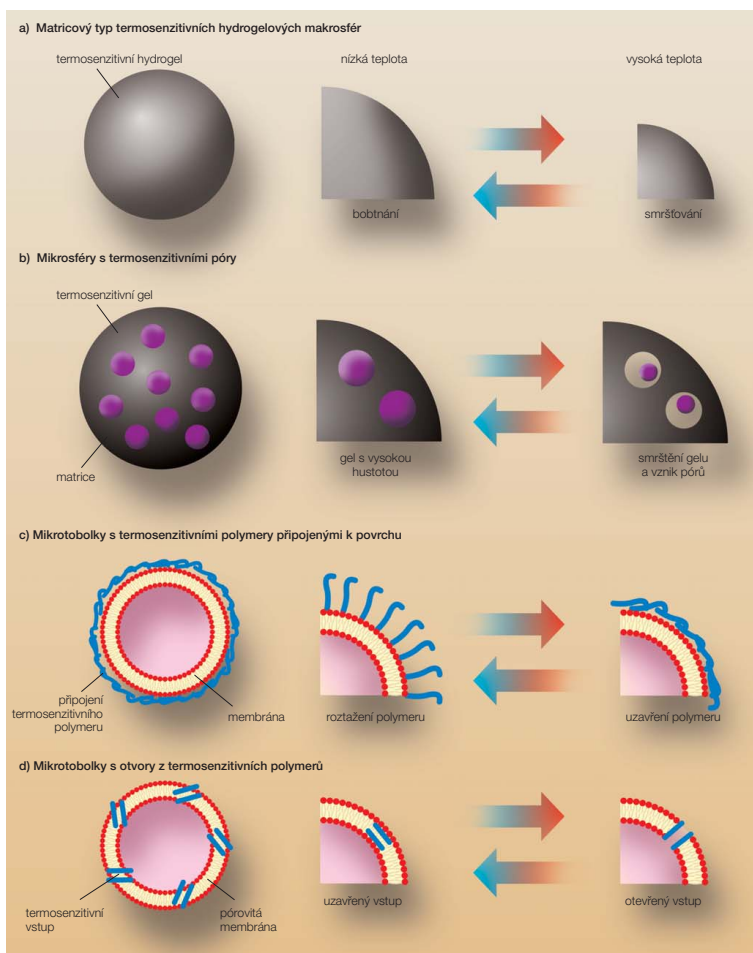
Náboj je důležitá vlastnost liposomů, protože díky němu nedochází ke koagulaci liposomů do velkých hrud a systém se chová jako stabilní. Důležitá metoda, která slouží k měření povrchového náboje je měření zeta potenciálu. Hranice, která byla stanovena jako určující, že daný systém je ještě stabilní je 30 mV nebo -30 mV, pokud jsou naměřené hodnoty nižší, než udané hodnoty považujeme systém za méně stabilní, z důvodu nedostačující odpuzující repulze mezi částicemi, což vede k jejich koagulaci a také vykazují zvýšenou sedimentaci (neutrální náboj na liposomech). Liposomy lze připravit s kladným nábojem (**CDAN** N<sup>1</sup>-cholesteryloxykarbonyl-3,7-diazanonan-1,9-diamin, **CTAP** N<sup>15</sup>-cholesteryloxykarbonyl-3,7,12-triazapentadekan-1,15-diamin), tyto liposomy snadno zreagují se sérovými proteiny a mohou být využity v genové terapii, protože mohou přenášet intracelulárně DNA. Záporným nábojem (**PG** Glycerol, **PS** Serin) tyto liposomy vypouští navázané látky už během cirkulace, ale na druhé straně jsou velmi rychle zachycovány v cílových buňkách. Musí se optimalizovat v případě použití pro léčbu nádorů. Jsou známy také neutrální liposomy, které jsou bez náboje (**PC** Cholin, **PE** Ethanolamin) [41].

### 2.3.4. Cílení liposomů

Liposomy, pokud splní výše popsané podmínky, jsou převážně pasivně shromažďovány v nádorové tkáni [42,43]. Uvolňování léčiva může být ovšem urychleno a tím i přesněji zacíleno, za použití určitých technik nebo úprav. Prvním příkladem může být použití liposomů, které jsou citlivé na působení ultrazvuku. Používání ultrazvuku má řady výhod. Hlavní výhodou je jeho neinvazivní charakter, pronikání měkkými tkáněmi a to i do hlubších vrstev. Jeho účinek se projevuje pouze v místě, kde vyžadujeme jeho působení [44]. Jako další mechanismus, který může sloužit jako spouštěcí mechanismus je citlivost na teplotu (Obrázek 11). Teplota také napomáhá kumulaci v nádoru, při mírném zahřátí této tkáně. Opět splňuje lokální působení, při použití termolabilních liposomů, je to neinvazivní metoda [45,46]. Další možností pro zlepšení cíleného působení liposomů a jejich zvýšení účinnosti bylo vyvinutí pH senzitivních liposomů (Obrázek 10). Tyto liposomy jsou během cirkulace, při normálním pH, stabilní a nerozpadají se. Změna situace nastává, při dosažení liposomy nádorové tkáně. Protože je všeobecně známo, že nádorová tkáň má přibližně o čtyři desetiny nižší pH než zdravá tkáň, tedy dosahuje kyselějšího pH. Proto pH senzitivní liposomy se v této tkáni rozpadají za současného uvolnění léčiva [47].



Obrázek 10 Příprava liposomu citlivého na pH a jeho rozpad v kyselějším pH. Spojením kyseliny olejové, která v tomto případě slouží jako amfifilní stabilizátor a Dioleoylfosfatidylethanolaminu vzniknou při za pH 7 liposomy, které zachovávají dvojvrstvu, která je pro liposomy typická vytvořením iontových párů a za pomoci kónických molekul, které si vzájemně doplní. V kyselém pH zaniká iontový pár, odchází záporný náboj u stabilizátoru, vytváří se póry a uvolňuje enapsulovaná látka. Převzato a upraveno z [48,49]



Obrázek 11 Morfologie různých typů termosenzitivních nanostrukturovaných mikročastic. Polymery, které jsou termosenzitivní vykazují kladné, či záporné reakce na zvýšení teploty. a) Matricový typ termosenzitivních hydrogelových makrosfér, vykazují změnu při různé teplotě. Za nižších teplot se nafukují a uvolňují léčivo, naopak při vyšších teplotách se zmenšují a nedochází k úniku léčiva. b) Mikrosféry s termosenzitivními póry, mají opačné chování. Používá se zde gel, který má vysokou hustotu. Za nízkých teplot, kdy částice zvětšují svůj objem jsou póry vyplněny tímto gelem a naopak za vyšších teplot gel zmenšuje svůj objem a vzniklými mezery dochází k úniku léčivé látky. c) Mikrotobolky s termosenzitivními polymery připojenými k povrchu, které opět se roztahují nebo smršťují v závislosti na měnící se teplotě. Otevření – únik x uzavření – zamezení úniku. d) Mikrotobolky s otvory s termosenzitivních polymer, které opět reagují na změnu teploty prostředí a dochází k otevírání a uzavírání, tedy k vypouštění léčiva nebo ne. Převzato a upraveno z [49,50].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Chemikálie

Fosfolipidy:

- Lecithin obyčejný, Silvita (dostupný v lékárně)
- Lecithin, extra pure, SLR, egg about 90%. 25 a, Fisher Scientific

Látky enkapsulované do liposomů:

- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>1</sub> = 3-chlor-7-azaindol)
- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>2</sub> = 4-brom-7-azaindol)
- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>3</sub> = 3-iod-5-brom-7-azaindol)
- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>4</sub> = 4-chlor-7-azaindol)
- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>5</sub> = 3-iod-7-azaindol)
- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>6</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>6</sub> = 3-brom-7-azaindol)
- *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>7</sub> = 5-brom-7-azaindol)
- *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>8</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>8</sub> = 7-azaindol)
- *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>]
- [Pt(ox)(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>]
- [Pt(ox)(L<sub>9</sub>)<sub>2</sub>] (L<sub>9</sub> = 2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-N6-(3-methoxybenzyl)-9-isopropyladenin)

Pufry:

- TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>

Ostatní chemikálie: chloroform, HCl, HNO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, NaCl, K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, Acros Organics a Fisher Scientific)

#### 3.2. Přístroje

Rotační vakuová odparka (Laborota 4000 efficient, Heidolph)

Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) – Přístroj umí měřit velikostní distribuci nanočástic, plus je používám pro měření zeta potenciálu na základě dynamického rozptylu světla (DLS, Dynamic Light Scattering).

Plamenový atomový absorpční spektrometr iCE 3300 (Thermo Scientific) tento přístroj se používá pro stanovení (Ru, Fe, Pt, Au, Cu, Zn) za použití plamene skládajícího se podle potřeby z  $N_2O/vzduch/ C_2H_2$ .

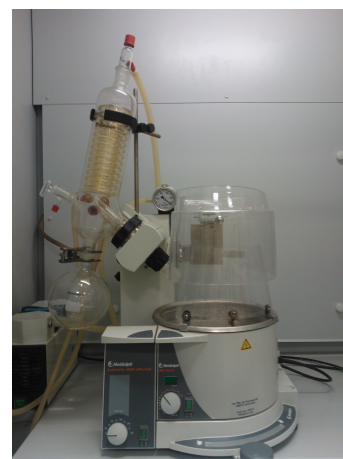
Termický inkubátor (Termo lázeň Fnoice, Bibby Scientific, UK) – lázeň, která používá k udržování teploty suché chladicí médium (keramické kuličky 1,5-2 mm, které dokonale vedou teplo). Teploty pro uchování se pohybují v rozmezí 0-40 °C.

### 3.3. Příprava liposomů

Liposomy byly připravovány metodou hydratace fosfolipidového filmu s následnou extruzí přes mikrofiltry [52].

#### 3.3.1. Hydratace fosfolipidového filmu

Příprava fosfolipidového filmu byla provedena v kádince rozpuštěním daného množství lipidů (obvykle 100 mg) v chloroformu (na uvedených 100 mg lecitinu náleželo 5 ml). Po úplném rozpuštění byl roztok přelit do baňky s kulatým dnem. Na rotační vakuové odparce (obrázek 12) bylo puštěno chladicí médium (voda), byl nastaven podtlak v rozmezí 190–200 mBar a při teplotě lázně 40 °C začalo ze systému odcházet rozpouštědlo (chloroform), po jehož úplném odpaření byl povrch baňky pokryt tenkou vrstvou lipidového filmu. Do baňky se přidalo přiměřené množství vody (30 ml) a následně byl lipidový film různými způsoby (viz dále) hydratován až se vytvořily lipidové váčky.



Obrázek 12 Rotační vakuová odparka

Obdobně byly připraveny liposomy s enkapsulovanými komplexy platiny. Opět se rozpustilo obvyklé množství lecitinu (100 mg) v kádince v 5 ml chloroformu, tentokrát byl navíc ve druhé kádince dokonale rozpouštěn daný komplex platiny (obvykle 15 mg) v 15 ml chloroformu. Po úplném rozpuštění byly oba roztoky přelity do baňky s kulatým dnem a promíchány. Byl proveden proces pro vytvoření lipidového filmu a jeho následná hydratace ve vodě pro vytvoření lipidových váčků s enkapsulovaným komplexem platiny.

### 3.3.2. Extruze a homogenizace

Takto připravené váčky mají velké rozdíly ve velikosti a morfologii. Proto je nutná jejich další úprava pro velikostní sjednocení a dosažení požadované velikosti, k čemuž bylo použito několik způsobů.

- 1) Aby se dosáhlo ideální velikosti liposomových váček (přibližně mezi 100–200 nm), bylo provedeno několikanásobné protlačení (extruze) přes filtry s velikostí pórů 450 nm (protlačeno 10x), 200 nm (protlačeno 20x) příp. 100 nm (protlačeno 10x).
- 2) Další postup používal přefiltrování lipidové suspenze obdobným způsobem, ale následně se přefiltrovaná suspenze vložila do homogenizátoru (Obrázek 13) (nastavení amplitudy bylo 50% při 20 s intervalech, bylo provedeno 5 cyklů).
- 3) Třetí metodou bylo vystavení suspenze působení homogenizátoru (nastavení amplitudy bylo 50% při 20 s intervalech, bylo provedeno 5 cyklů) a následná filtrace přes polykarbonátové filtry s velikostí pórů 450 nm (protlačeno 10x), 200 nm (protlačeno 20x) příp. 100 nm (protlačeno 10x).
- 4) Poslední metodou bylo použití homogenizátoru (nastavení amplitudy bylo 50% při 20 s intervalech, bylo provedeno 5 cyklů), bez jakéhokoli předešlého nebo následného filtrace.



Obrázek 13 Homogenizátor s regulační skříní

### 3.3.3. Stanovení efektivního zapouzdření

Metodou hydratace fosfolipidového filmu a jejich následným rozsuspendováním byly připraveny liposomové váčky obsahující komplexy platiny.

Pro studium efektivního zapouzdření bylo provedeno napipetování liposomové suspenze do ultrafiltračních mikrozkmavek používaných pro vysokoúčinnou centrifugaci. Centrifugace probíhala při 16 000 otáčkách za minutu a došlo k oddělení supernatantu od liposomových váček. Supernatanty byly následně odpipetovány do eppendorfek a studovány

metodou AAS (obrázek 14). Příprava kalibračních roztoků pro AAS vycházela z  $K_2PtCl_4$  (zásobní roztok obsahoval 160 mg/100 ml vody) a 5%  $HNO_3$ . Kalibrační sady se skládala ze sedmi roztoků o koncentracích 15 mg/l, 30 mg/l, 75 mg/l, 150 mg/l, 300 mg/l, 750 mg/l a 1500 mg/l (vztaženo na mg platiny).



Obrázek 14 AAS, převzato z [53]

### 3.3.4. Studium vlastností liposomů

#### 3.3.4.1. Velikost váčků + zeta potenciál

Pro stanovení velikosti lipidových váčků byla použita metoda DLS (Dynamic Light Scattering neboli Dynamický rozptyl světla). Je to fyzikální metoda, kterou používáme ke stanovení velikostní distribuce pro suspenze nebo roztoku polymeru, ve kterých chceme měřit malé částice. Na stejném přístroji byl měřen i zeta potenciál, který nám přibližuje potencionální stabilitu koloidního roztoku. Měření bylo provedeno napipetováním liposomové suspenze do kyvet o různých koncentracích. Pro měření zeta potenciálu byly použity speciální odporové kyvety.

#### 3.3.4.2. Stabilita liposomů

##### a) časový rámec skladování liposomů:

Lipidy byly uskladněny v lednici při 5 °C. V různých časových intervalech byla měřena jejich velikostní distribuce pomocí přístroje DLS.

##### b) stabilita při různé teplotě:

Lipidy byly uskladněny v termickém inkubátoru (obrázek 15) při teplotě 30 a 40 °C. Po 1 a 24 hod bylo pomocí AAS měřeno množství uvolněné platiny z liposomů do supernatantu experiment, byl prováděn napipetováním liposomové suspenze do ultrafiltračních mikrozkuvek používaných pro vysokoúčinnostní centrifugaci (obrázek 11). Centrifugace probíhala při 16 000 otáčkách za minutu a došlo k oddělení supernatantu od liposomových váčků. Supernatanty byly následně studovány metodou AAS obrázek 12.



Obrázek 15 Termická lázeň

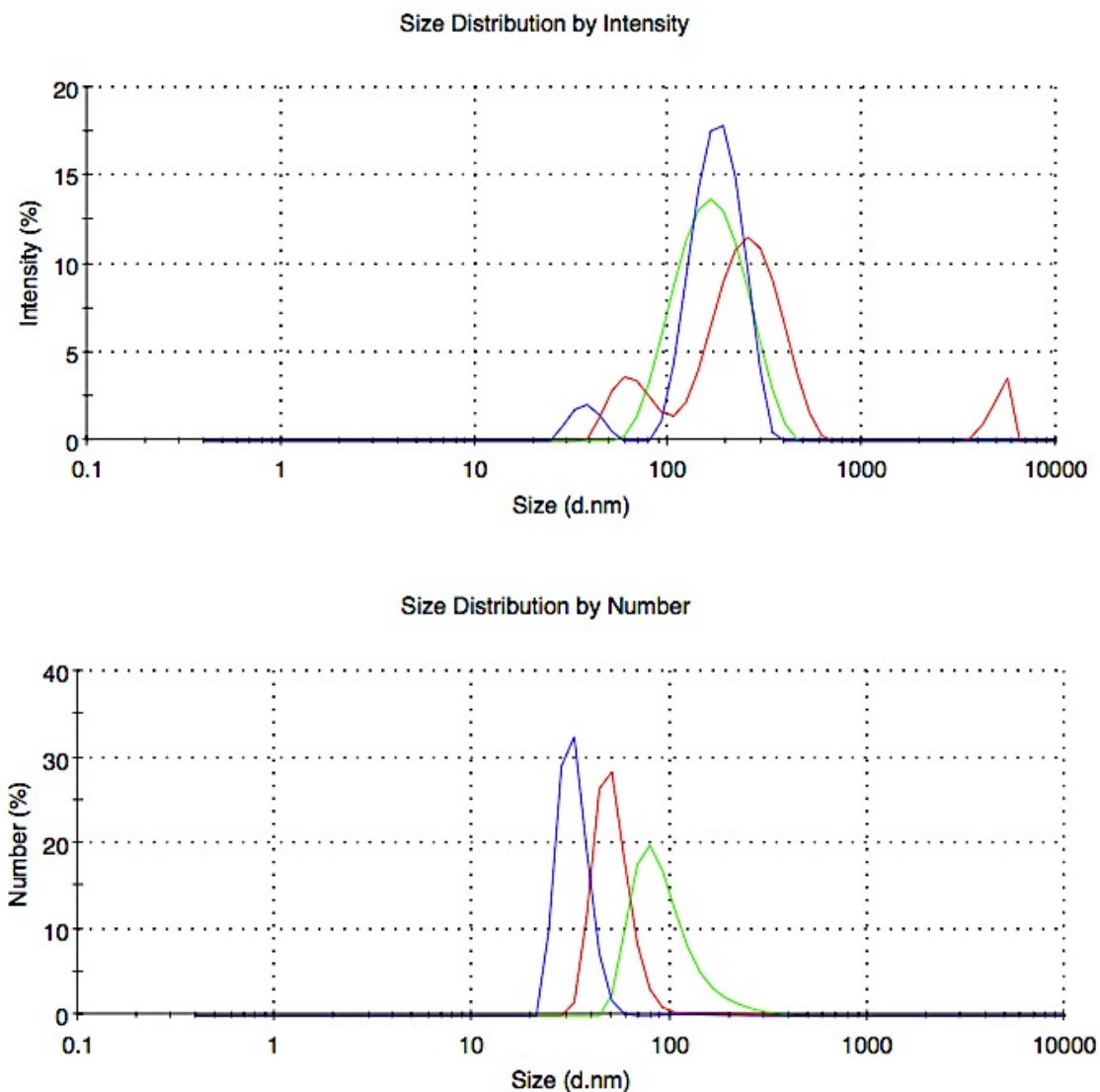
### **c) stabilita při různém pH**

Lipidy byly inkubovány při různém pH (2,4 a 6) 24 hodin a opět u nich bylo provedeno měření uvolněné platiny do supernatantu po centrifugaci pomocí přístroje AAS.

## 4. VÝSLEDKY

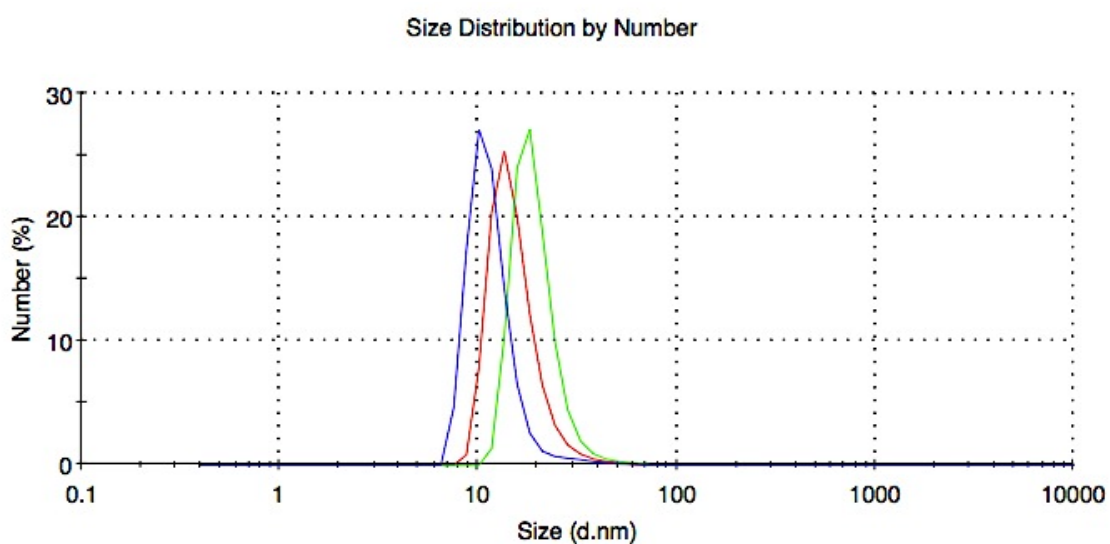
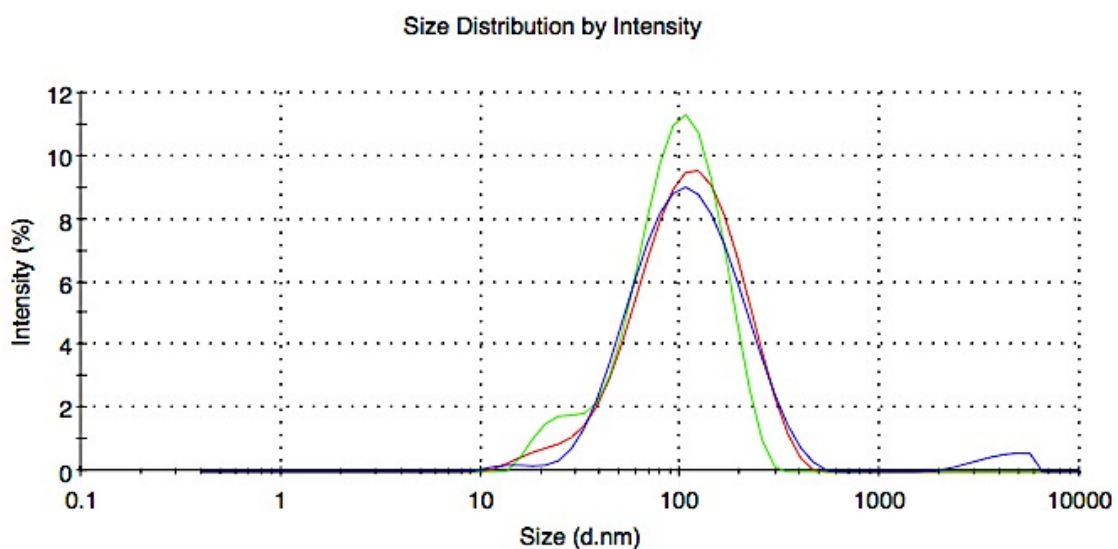
### 4.1. Výsledky měření velikostní distribuce

V následující kapitole budou prezentovány vybrané výsledky měření velikosti připravených liposomálních systémů.

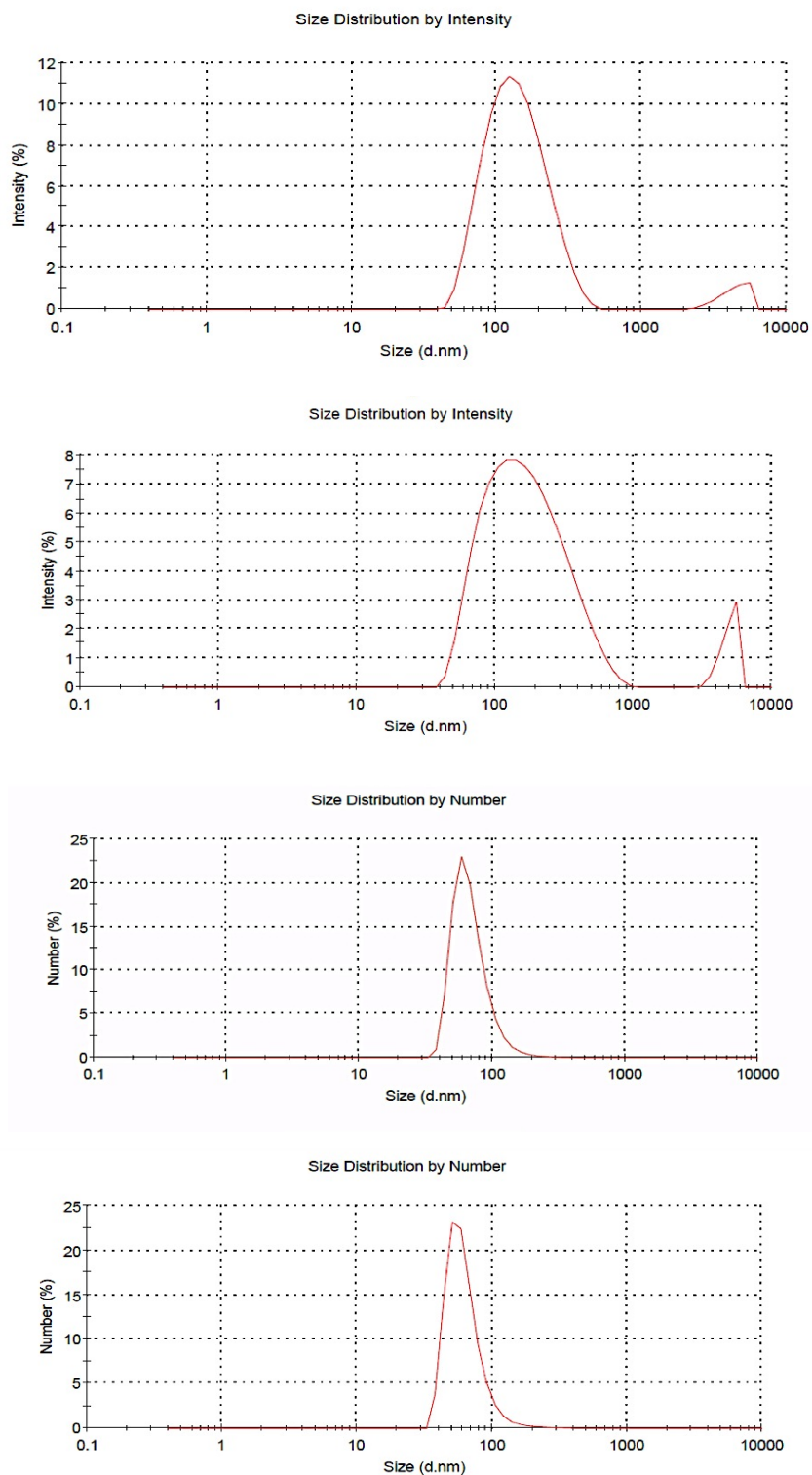


Obr. 16: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů bez Pt(II) komplexu podle intensity (nahore) a počtu (dole). Jsou srovnávány tři vzorky, které se liší posledním krokem úpravy. Jeden vzorek byl filtrován 20x přes filtr s velikostí 450 nm (červeně), druhý vzorek byl filtrován 20x filtrem o velikosti 450 nm a 20x přes 200 nm filtr (zeleně), třetí vzorek byl pouze homogenizován v homogenizátoru bez následné filtrace (modře).

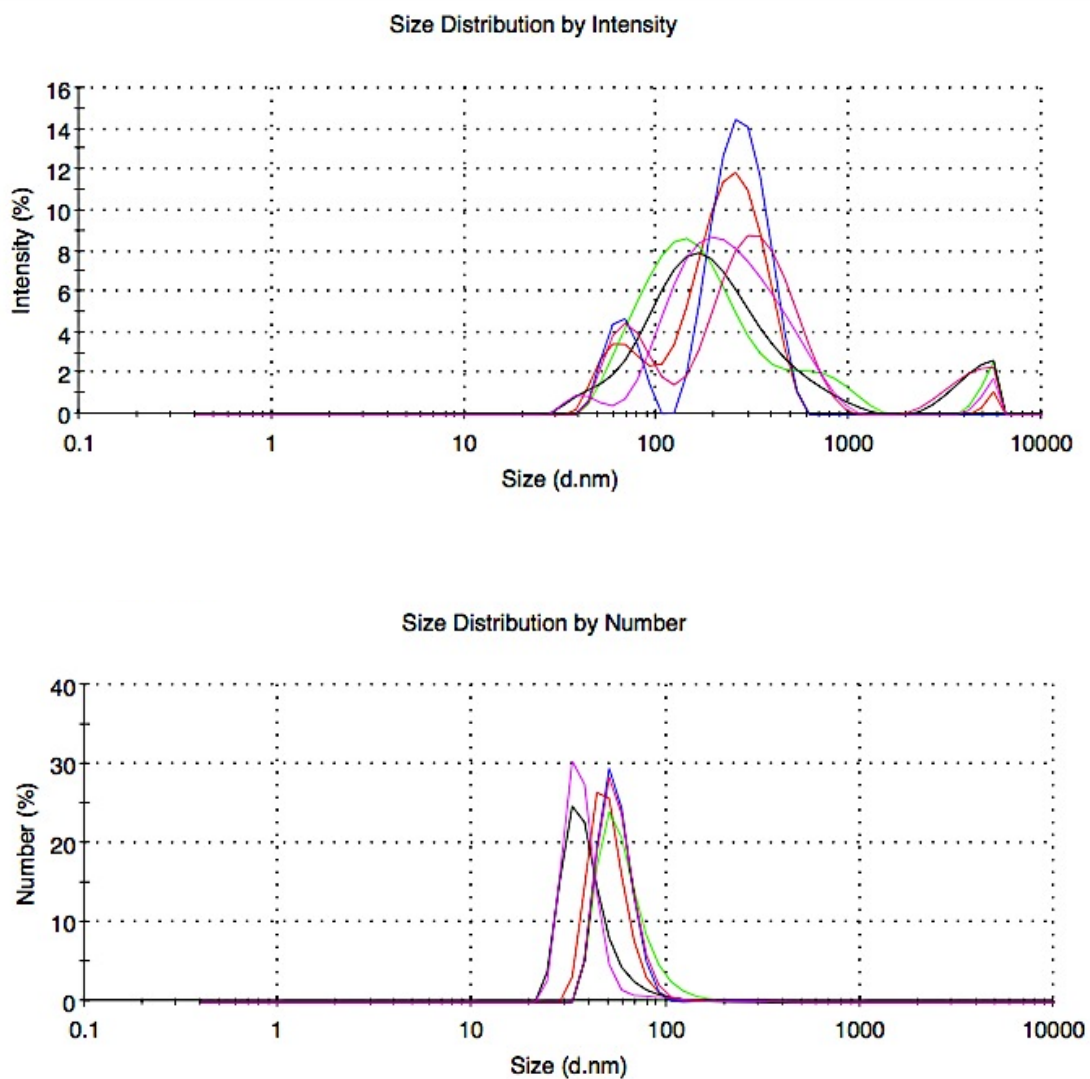




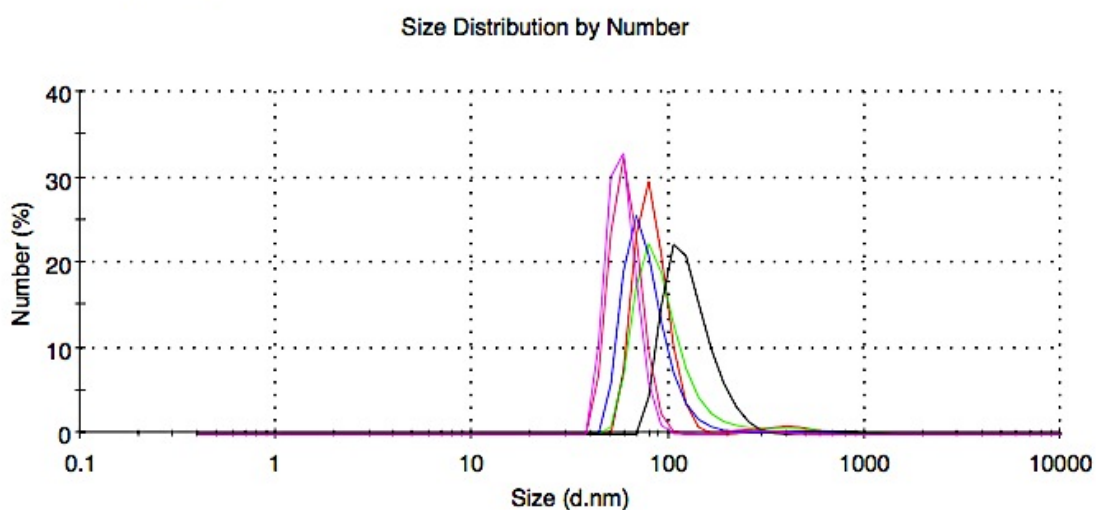
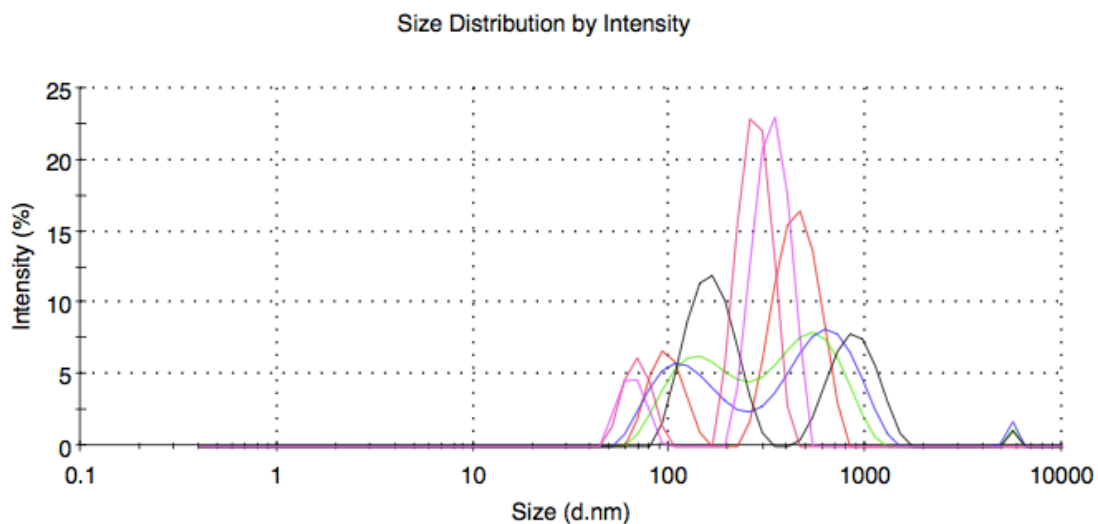
Obr. 17: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů bez Pt(II) komplexu podle intensity (nahore) a počtu (dole). Jsou srovnávány tři vzorky, které se liší posledním krokem úpravy. Jeden vzorek byl filtrován 20x přes filtr s velikostí 450 nm (červeně), druhý vzorek byl filtrován 20x filtrem o velikosti 450 nm a 20x přes 200 nm filtr (modře), třetí vzorek byl filtrován 20x filtrem o velikosti 450 nm, 20x přes 200 nm filtr a 10x přes 100 nm filtr (zeleně).



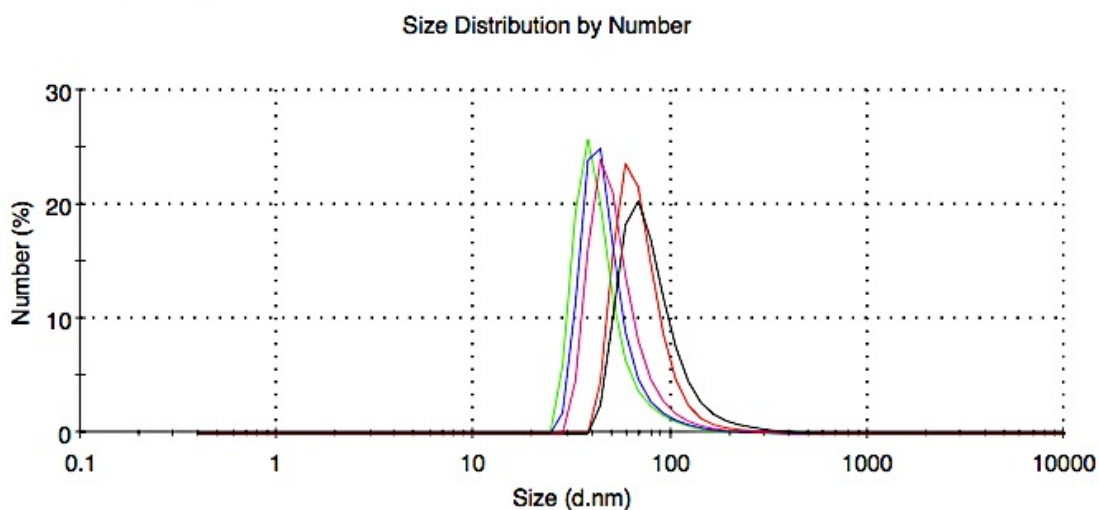
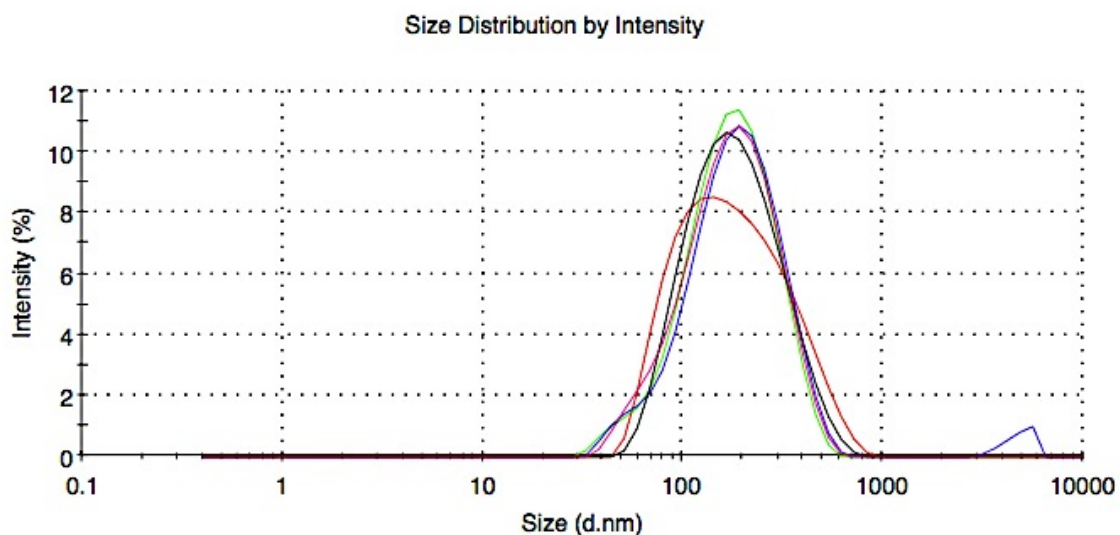
Obr. 18: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů bez Pt(II) komplexu podle intenzity (nahore) a počtu (dole). Jsou srovnávány vzorky, které byly připraveny stejným způsobem a liší se dobou uskladnění. Vzorky jsou srovnávány po týdenním uskladnění.



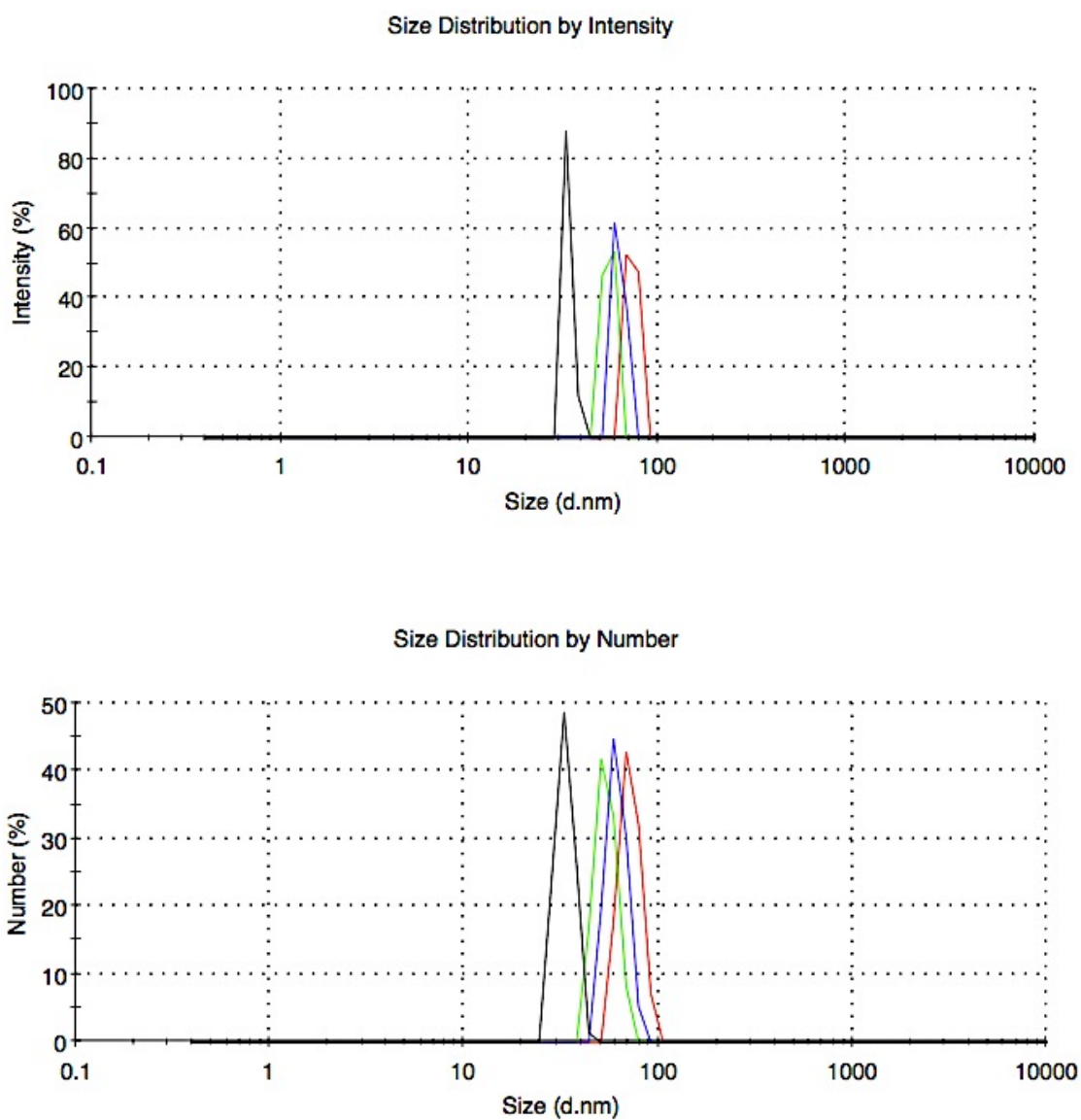
Obr. 19: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů se čtyřmi různými Pt(II) komplexy podle intensity (nahore) a počtu (dole). Byly použity komplexy *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; zeleně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; černě), *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; červeně), *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; modře), (L<sub>9</sub> = 2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-N6-(3-methoxybenzyl)-9-isopropyladenine) (fialově) a *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] (růžově)



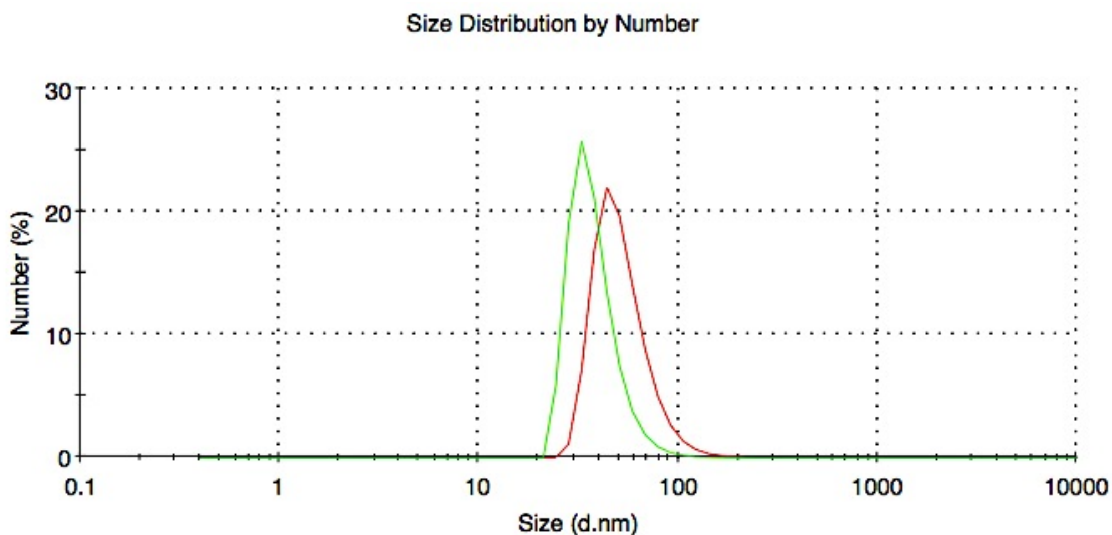
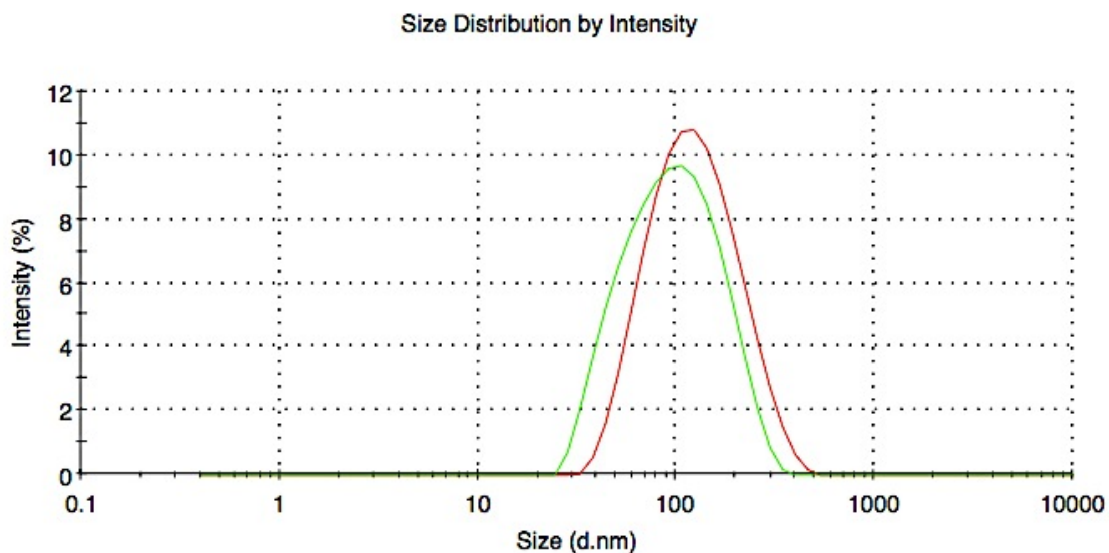
Obr. 20: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů s různými Pt(II) komplexy pro různé ředění (10x nebo 20x) podle intensity (nahore) a počtu (dole). Byly použity komplexy *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>6</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; zeleně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>6</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; černě), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; červeně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; modře), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; růžově) a *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; fialově)



Obr. 21: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce pěti různých liposomů s různými Pt(II) komplexy pro různé ředění (5x, 10x nebo 15x) podle intensity (nahore) a počtu (dole). Byly použity komplexy *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>6</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; zeleně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 15x; černě), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>6</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 5x; červeně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 15x; modře), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; fialově)



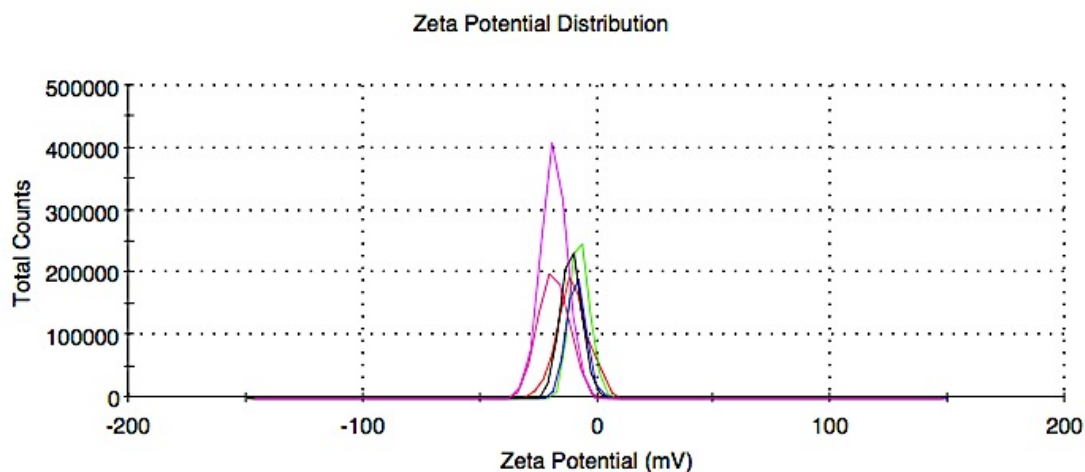
Obr. 22: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů s *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] komplexem pro různý počet homogenizačních cyklů (1x - červeně, 5x - zeleně, 10x - modře nebo 13x - černě) podle intensity (nahore) a počtu (dole).



Obr. 23: Výsledné grafy pro srovnání velikostní distribuce liposomů s *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zeleně) a *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (červeně) komplexy pro způsob přípravy zahrnující homogenizaci a filtraci přes 400 nm (20x), 200 nm (20x) a 100 nm (10x) filtry

#### 4.2. Výsledky měření zeta potenciál

U vybraných liposomálních systémů byl měřen také zeta potenciál připravených liposomálních systémů.



Obr. 24: Velikost zeta potenciálu liposomů, po zapouzdření různých komplexů a pro různé zředění. Byly použity komplexy *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; zeleně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; černě), *cis*-[PtI<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 10x; červeně), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; modře), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 20x; fialově), *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěno 30x; růžově)

Tabulka 1: Přehled zeta-potenciálů

Pt(II) komplex	Zředěno	Zeta potenciál
<i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> ]	10x	-16,9 mV
<i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> ]	20x	-18,6 mV
<i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> ]	30x	-21,3 mV
<i>cis</i> -[PtI <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> ]	10x	-17,0 mV
<i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> ]	10x	-17,1 mV
<i>cis</i> -[PtCl <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> ) <sub>2</sub> ]	20x	-19,3 mV

### 4.3. Studium zapouzdření komplexů do lipidových nosičů

Studium zapouzdření komplexů do lipidových nosičů bylo provedeno pro 2 vybrané liposomální systémy obsahující komplexy [Pt(ox)(L<sub>9</sub>)<sub>2</sub>] a *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]. Tyto liposomové systémy byly dány přímo na měření obsahu platiny na AAS.



Tabulka 2: Výsledky AAS pro přímo měřené liposomové systémy s komplexy  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$  a  $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{L}_4)_2]$

Vzorek	Signál	Koncentrace	Upravená koncentrace
	Abs	mg/L	mg/L
Blank	-0,00	0	
Standard 1	0,01	15,00	
Standard 2	0,02	30,00	
Standard 3	0,05	75,00	
Standard 4	0,10	150,00	
Standard 5	0,16	300,01	
Standard 6	0,33	750,03	
Standard 7	0,57	1500,05	
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	0,18	326,11	326,11
$\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{L}_4)_2]$	0,15	235,48	235,48

Studium zapouzdření komplexů do lipidových nosičů bylo provedeno pro tři vybrané liposomální systémy obsahující komplexy  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$  a  $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$ . Tyto liposomy se vložily do centrifugy a po jejich zcentrifugování byla měřena koncentrace platiny v supernatantu metodou AAS.

Tabulka 3: Přehled signálů AAS pro měřené supernatanty s komplexy  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$  a  $\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$ .

Vzorek	Signál	Koncentrace	Upravená koncentrace
	Abs	mg/L	mg/L
Blank	0,00	0	
Standard 1	0,07	75,00	
Standard 2	0,11	150,01	
Standard 3	0,19	300,01	
Standard 4	0,41	750,03	
$\text{cis}-[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$	0,01	12,60	12,60
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	0,01	7,19	7,19
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	0,02	19,66	19,66

#### 4.4. Studium stability při různé teplotě

Studium stability zapouzdření komplexů do liposomů při různé teplotě. Bylo provedeno pro tři vybrané liposomální systémy s komplexy ( $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$ , *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$ ). Tyto liposomální systémy byly umístěny na různě dlouhou dobu (1 h, 24 h) do termostatu, při dvou různých teplotách 30 °C a 40 °C, po centrifugování byla měřena koncentrace platiny v supernatantu na AAS.

Tabulka 4: Přehled signálů AAS pro měřené supernatanty liposomálních systémů, po vystavení dvou různých teplotách 30 °C a 40 °C, po různě dlouhou dobu (1 h, 24 h).

Vzorek	Čas	Teplota	Signál	Koncentrace	Upravená koncentrace
	h	°C	Abs	mg/L	mg/L
Blank			0,00	0	
Standard 1			0,05	75,00	
Standard 2			0,10	150,01	
Standard 3			0,18	300,01	
Standard 4			0,40	750,03	
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	1	30	0,01	18,79	18,79
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	1	30	0,00	5,76	5,76
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$	1	30	0,00	10,03	10,03
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	24	30	0,00	11,12	11,12
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	24	30	0,00	5,26	5,26
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$	24	30	0,01	8,70	8,70
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	1	40	0,01	12,41	12,41
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	1	40	0,00	5,32	5,32
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$	1	40	0,00	9,29	9,230
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	24	40	0,01	14,24	14,24
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	24	40	0,00	6,19	6,19
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$	24	40	0,01	10,76	10,76

#### 4.5. Studium stability při různém pH

Studium stability zapouzdření komplexů do liposomů při různém pH. Bylo provedeno pro tři vybrané liposomální systémy s komplexy ( $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$ ,  $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$ , *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$ ), Tyto liposomální systémy byly dány do pufrů o různém pH a po určitém čase byla provedena centrifugací a změřil množství platiny v supernatantu na AAS.

Tabulka 5: Přehled signálů AAS

Vzorek	pH	Signál	Koncentrace	Upravená koncentrace
		Abs	mg/L	mg/L
Blank		0,00	0	
Standard 1		0,07	75,00	
Standard 2		0,14	150,01	
Standard 3		0,27	300,01	
Standard 4		0,54	750,03	
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	6	0,02	17,27	17,27
<i>cis</i> - $[\text{PtCl}_2(\text{L}_2)_2]$	6	0,02	15,54	15,54
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	4	0,02	19,69	19,69
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	4	0,01	14,71	14,71
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_9)_2]$	2	0,03	27,07	27,07
$[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L}_1)_2]$	2	0,02	17,18	17,18

## 5. DISKUZE

Liposomové systémy, k jejichž přípravě jsou používány různé metody [52,55], jsou intenzivně studovány, a to i v souvislosti s různými druhy protinádorově aktivních komplexů platiny, především *cisplatin*y [54]. Vzhledem k tomu, na Katedře anorganické chemie, PřF, UP v Olomouci byly v nedávné době připraveny vysoce protinádorově aktivní komplexy platiny (dichloro komplexy nebo oxalato komplexy s různými N-donorovými ligandy), nabízely se tyto látky pro studium pokročilejších systémů zasahujících do oblasti cíleného transportu léčiv. Pro přípravu byla zvolena metoda hydratovaného fosfolipidového filmu poskytující pole literatury liposomy požadované velikostní distribuce. Nejprve byla provedena příprava samotných liposomů bez komplexů platiny. Na nich jsme zkoušeli různé způsoby přípravy. První pokusy byly prováděny s Lecitinem dostupným v lékárně - Silvita (dostupný v lékárně), metodou hydratace fosfolipidového filmu, s následnou extruzí přes polykarbonátové filtry s různě velkými póry. Hned od prvních pokusů se ukázalo, že tento lecitin je pro takové pokusy nevhodný. Tvořil hned po hydrataci velké koaguláty a filtrace nebo jiná úprava byla téměř nemožná. K dalším pokusům jsme již použili komerčně dostupný Lecithin (Fisher Scientific), ze kterého jsme připravovali liposomy opět metodou hydratace fosfolipidového filmu [52,55], přičemž z tohoto lecitinu byly připraveny liposomy požadovaných vlastností a bez koagulátů. Kromě zmíněné extruze přes polykarbonátové filtry byly použity i jiné způsoby úpravy výchozí suspenze liposomů (homogenizace ultrazvukovým homogenizátorem s následnou extruzí přes filtry nebo samotná homogenizace). Pak jsme měřili velikosti vytvořených liposomů na přístroji DLS, abychom určili, který způsob metody poskytuje nejlepší výsledky, která metoda je tedy nejoptimálnější. V případě extruze přes polykarbonátové filtry se projevila velikostní závislost na druhu použitého filtru (velikost) a počtu extruzí přes jednotlivé filtry (obrázek 17), kdy nejlepší velikostní distribuce (výsledky DLS podle intenzity) dosáhl systém, k jehož úpravě byly použity i 100 nm filtry. Použití ultrazvukového homogenizátoru po extruzi vedlo k vylepšení velikostního profilu připravených liposomů (Obrázek 16), překvapivě však bylo zjištěno, že nejlepší velikostní distribuce dosáhl systém vystavený účinkům homogenizátoru bez předešlé nebo následné filtrace. Další studie připravených liposomů se zabývaly jejich stabilitou v průběhu času. Provedli jsme měření na přístroji DLS pro určení velikostní distribuce okamžitě po přípravě liposomů a po týdnu stání v lednici (5 °C). Pozorovali jsme téměř nezatelný rozdíl mezi původními a uskladněnými vzorky, a to jak pohledem DLS (Obrázek 18), tak také makroskopicky. Dále jsme na přístroji DLS měřili velikost zeta potenciálu, pro

stanovení chování systému (Obrázek 24). Liposomy vykazovaly podobný zeta potenciál s nepatrnou závislostí na zředění. Čím větší bylo zředění, tím byla hodnota zeta potenciálu vyšší. Naměřené hodnoty u komplexů se pohybovaly v rozmezí od -16,9 mV u komplexu *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěn 10x) po -21,3 mV u stejného komplexu *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(L<sub>1</sub>)<sub>2</sub>] (zředěn 30x). Zbytek hodnot se pohybuje v tomto rozmezí v závislosti na zředění. Hodnota zeta potenciálu, od které se systémy považují za stabilní a je mezi nimi dostatečná repulze k zabránění v koagualci je považována nad 30 mV a nebo pod -30 mV [56]. Námi naměřené hodnoty (Tabulka 1) se tomuto číslu blížily a přestože jsme požadovaných hodnot nedosáhli, tak jsme nepozorovali nějaké nežádoucí chování systému. Analogická studia jsme provedli i s liposomy, které byly připraveny opět metodou hydratace fosfolipidového filmu, v tomto případě společně i se zapouzdřenými komplexy platiny. Problémem bylo, že metody přípravy optimalizované pro samotné liposomy poskytovaly jiné výsledky pro systémy s Pt(II) komplexy. Proto bylo nutné hledat i pro tyto systémy hledat a optimalizovat nejvhodnější způsob přípravy pro získání požadovaných vlastností výsledných liposomů. Nicméně i zde lze konstatovat, že liposomy s Pt(II) komplexy vystavené pouze homogenizaci poskytly nejlepší velikostní distribuci (Obrázky 23 a 24). Vytvořené liposomy se zapouzdřeným komplexem jsme studovali na DLS (Obrázek 19 a 20) a zjistili jsme, že vykazují odlišnou velikostní distribuci a že zapouzdřený komplex vedl ke zvětšení velikosti liposomů (ve srovnání s liposomy bez komplexu), i tak se ale velikost vzorků pohybovala okolo 100 nm. Dále jsme u těchto systémů zkoumali účinnost zapouzdření Pt(II) komplexů. Nejprve jsme zkoumali přítomnost Pt(II) komplexů (resp. koncentraci platiny) v suspenzi liposomů na AAS, a to na liposomové suspenzi bez jakékoli předešlé úpravy (Tabulka 2). Následně jsme stanovili účinnost zapouzdření Pt(II) komplexů do liposomů. To jsme prováděli za pomoci ultracentrifugace, kdy vzniklé supernatanty byly měřeny metodou AAS (Tabulka 3). Porovnáním výsledků jsme prokázali, že Pt(II) komplexy jsou zapouzdřeny do liposomů, protože v supernatantu jsme naměřili jen stopové množství platiny. Studium stability liposomů při různé teplotě po různou dobu (Tabulka 4) prokázalo závislost nestability liposomů na zvyšující se teplotě a čase. Vyšší teplotu a delší čas vedly k vyšším koncentracím platiny (stanoveno AAS) v supernatantu po ultracentrifugaci. Podobným pokusem jsme zkoumali stabilitu liposomů v různě kyselém prostředí (pH 2, 4, 6) (Tabulka 5). Bylo zjištěno, že čím nižší byla hodnota pH, tím více byly liposomy narušovány a uvolnilo se více Pt(II) komplexů do supernatantu.

## 5. Závěr

V bakalářské práci je popsána příprava a studium vlastností série lecitinových liposomů s vybranými protinádorově aktivními platnatými komplexy, kterými byly deriváty klinicky užívaných léčiv na bázi platiny (*cisplatina*, *oxaliplatina*) s různými N-donorovými ligandy (deriváty N6-benzyladeninu nebo 7-azaindolu). Byla optimalizována příprava lipidových nanočástic, jak samotných, tak s komplexy platiny. Byly provedeny různé kombinace příprav s polykarbonátovými filtry, kombinace filtrů a ultrazvukového homogenizátoru nebo pouze homogenizátoru bez předchozí filtrace. Vlastnosti těchto systémů (velikost, velikostní distribuce, obsah Pt(II) komplexů) byly studovány metodami DLS a AAS. U připravených liposomů s Pt(II) komplexy byla také studována jejich stabilita z hlediska vystavení účinkům vyšší teploty, času nebo pH.

## 5. Summary

This bachelor thesis describes preparation and study properties of series lecithin liposomes with selected anticancer active platinum complexes. These complexes were derivatives of clinically used drugs based on platinum (cisplatin, oxaliplatin) with different N-donor ligands (derivatives of N6-benzyladenin or 7-azaindole). The preparation of lipids nanoparticles was optimized with and also without platinum complexes. There were combined different methods of preparation like performed with polycarbonate filters, combination of filters and ultrasonic homogenizer or just homogenizer without prior filtration. The properties of these systems (size, size distribution, content of Pt (II) complexes) were analyzed by DLS and AAS. There was studied properties of liposomes with Pt (II) complexes like their stability in higher temperature, time and pH.

## 6. Použitá literatura

1. B. Rosenberg a kol. *Nature* 205, 698 (1965).
2. E. Wong a kol. *Chem. Rev.* 99, 2451–2466 (1999)
3. Y. P. Ho a kol. *Med. Res. Rev.* 23, 633-655 (2003)
4. M. S. Highley a kol. *Platinum – Based Drugs in Cancer Therapy*, L. R. Kelland a kol. Human Press Inc., Totowa/ NJ, PP. 171-194 (2000)
5. J. Lokich, *Cancer Invest.* 19. 756-760 (2001)
6. F. Levi a kol. *Clin. Pharmacokinetics* 38, 1-21 (2000)
7. L. R. Wiseman a kol. *Drugs Aging* 14, 459 – 475 (1999)
8. P. J. O’ Dwyer a kol. *Drugs* 59, 19-27 (2000)
9. B. Desoize a kol. *Grit. Rew. Oncol. Hematol.* 42, 317-325 (2002)
10. L.R.Kelland a kol. *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*. Humana Press, New Jersey. (2000)
11. M.J. Cleare a kol. *Bioinorg. Chem.* 2, 187 (1973).
12. Z. H. Siddik. *Oncogene* 22, 7265 (2003).
13. Robert Terkola MPPharm, Phd. *Liposomal cisplatin: Lipoplatin*. *European Journal of Oncology Pharmacy*, Volume 1, (2007)
14. M. Gielen a kol. *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic agents*, London, Willey, (2005)
15. P. M. Takahara a kol. *Nature* 377, 649 (1995).
16. H. Huang a kol. *Science* 270, 1842 (1995).
17. Jennifer S Butler a kol. *Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes*, *Current Opinion in Chemical Biology*, 175–188 (2013)
18. Kwangjae Cho a kol. *Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer*, *Clin Cancer Res*, 1310-1316. (2008)
19. Wisse E a kol. *Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver*. *Toxicol Pathol*, 11-100 (1996).
20. Yuan F a kol. *Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size*. *Cancer Res*, 6-3752 (1995).
21. Moghimi SM a kol. *Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties*. *Prog Lipid Res*, 78-463 (2003).

22. Adams ML a kol. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci*, 55 -1343 (2003).
23. Harris JM a kol. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 51-539 (2001).
24. Rawat M a kol. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biol Pharm Bull*, 8-1790 (2006).
25. Gradishar WJ a kol. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol*, 803-7794 (2005).
26. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 60-374 (2003).
27. Vasey PA a kol. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Clin Cancer Res*, 83-94 (1999).
28. Batrakova EV a kol. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *Br J Cancer*, 52-1545 (1996).
29. Nasongkla N a kol. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett*, 30-2427 (2006).
30. Malik N a kol. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs*, 76- 767 (1999).
31. Svenson S a kol. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev*, 29-2106 (2005).
32. Flenniken ML a kol. Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture. *Chem Biol*, 70-161 (2006).
33. Flenniken ML a kol. Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture. *Chem Commun (Camb)*, 9-447 (2005).
34. Manchester M a kol. Virus-based nanoparticles (Vnanoparticles): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 22-1505 (2006).
35. Bottini M a kol. PEG-modified carbon nanotubes in biomedicine: current status and challenges ahead. *Biomacromolecules*, 3381-3393 (2011).
36. Bianco A a kol. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chem Commun*, 10182-10188 (2011).
37. Tripisciano C a kol. Single-wall carbon nanotubes based anticancer drug delivery system. *Chem Phys Lett*, 200-205 (2009).



38. Li J a kol. Carbon nanotube bottles for incorporation, release and enhanced cytotoxic effect of cisplatin. *Carbon*, 1625-1634 (2012).
39. Bangham A.D. a kol. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 238-252 (1965).
40. Vodrážka Z., *Biochemie*, Akademia Praha, (2002).
41. Ostro M. J., *Scientific American* 256, 102-111 (1987).
42. Kono K a kol. *Smart nano- and microparticles*. London, Kentus Books (2006).
43. Kataoka K a kol. Doxorubicin – loaded poly(ethyleneglycol)-poly( $\beta$ -benzyl-L aspartate) copolymer micelles: Their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Rel*, 143–153 (2000).
44. Marin A a kol. Drug delivery in pluronic micelles: Effect of high frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J Control Rel*, 39–47 (2002).
45. Gaber MH a kol. Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int J Rad Oncol Biol Phys*, 1177–1187 (1996).
46. Needham D a kol. Development and testing of a new temperature – sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Del Res*, 285–305 (2001).
47. Lasic DD. Liposome biotechnology. *Trends Biotechnol*, 307–321 (1998).
48. Wang X a kol. Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chem Soc Rev*, 202-224 (2013). Comprehensive review focussing on targeted delivery of platinum anticancer complexes since 2006. Summarises both active and passive drug delivery with focus on platinum drug carriers.
49. Doc. PharmDr. Miloslava Rabišková, CSc., *Využití nanočásticových systémů v medicíně*, Remedia, (2008).
50. Sabbatini P a kol. Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *J Clin Oncol*, 31-4523 (2004).
51. Bhatt R a kol. Synthesis and in vivo antitumor activity of poly(L-glutamic acid) conjugates of 20S-camptothecin. *J Med Chem*, 3-190 (2003).
52. A. Schädlich a kol. *ACS Nano* 5, 8710-8720 (2011).
53. <http://agch.upol.cz/cs/katedra-pristroje>
54. Boulikas T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncol Rep.*, 3-12 (2004).
55. P. G. Tardi a kol. Drug ratio-dependent antitumor activity of irinotecan and cisplatin combinations in vitro and in vivo, *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, no. 8, 2266–2275, (2009).

56. User manual, zetasizer, Malvern instruments Ltd.2003