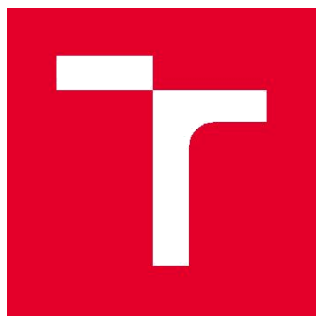




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM VLIVU LIPOSOMÁLNÍCH PLATINOVÝCH CYTOSTATIK NA NÁDOROVÉ BUŇKY POMOCÍ VOLTAMETRICKÝCH METOD

INFLUENCE OF LIPOSOMAL PLATINUM CYTOSTATICS ON CANCER CELLS – VOLTAMMETRIC
STUDY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Petra Laníková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D.

BRNO 2016



Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Petra Laníková

ID: 158186

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

1 NÁZEV TÉMATU:

Studium vlivu liposomálních platinových cytostatik na nádorové buňky pomocí voltametrických metod

2 POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte rešerši na téma elektrochemická detekce platiny. 2) Seznamte se se základy elektrochemické analýzy a principem uzavírání platinových cytostatik do liposomů. 3) Navrhněte a optimalizujte elektrochemickou metodu pro studium vlivu platinových cytostatik na nádorové buněčné linie. 4) Metodu aplikujte na reálné vzorky.

5) Zpracujte a vyhodnoťte výsledky a proveďte diskuzi.

Pro splnění semestrálního projektu je nutné vypracování alespoň bodů 1) až 3).

3 DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] LOCATELLI, C. Voltammetric analysis of trace levels of platinum group metals principles and applications. *Electroanalysis*, 2007, sv. 19, č. 21, s. 2167-2175. ISSN 1040-0397.

[2] DOSPIVOVA, D. et al. Catalytic Electrochemical Analysis of Platinum in Pt-DNA Adducts. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, sv. 7, č. 4, s. 3072- 3088. ISSN 1452-3981.

[3] PELEG-SHULMAN, T. et al. Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2001, sv. 1510, č. 1-2, s. 278-291. ISSN 0005-2736.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D.

Konzultant: MVDr. Ludmila Krejčová, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření semestrální práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Předmětem této práce je studium vlivu liposomálních platinových cytostatik na nádorové buňky pomocí voltametrických metod. V práci jsou sumarizovány dostupné informace o působení cisplatiny na nádorové buňky, její uzavření do liposomů a působení takto uzavřené cisplatiny na nádorové buněčné linie. Experimentální část práce se věnuje přípravě, testování a aplikaci různých druhů liposomální cisplatiny. Pro studium efektů takto připravených liposomálních cisplatin bylo použito následujících buněčných linií: MDA-MB-231 (prsni nádorová buněčná linie), A2780 (rakovinné buňky vaječníku) a UKF-NB-4 (nádorové buněčné linie neuroblastomu) a UKF-NB-4-CDDP (nádorové buněčné linie neuroblastomu rezistentní na cisplatinu).

Klíčová slova

Cisplatina, cytotoxicita, liposomy, elektrochemická detekce, voltametrie, diferenční pulsní voltametrie, rakovina, nádorové buněčné linie, MTT test, enkapsulace liposomů

Abstract

Aim of this thesis is a voltammetric study dealing with the influence of liposomal platinum cytostatics on cancer cells. One of the goals is summarisation of available informations about influence of cisplatin on cancer cells. One of the goals is summarisation of available informations about influence of cisplatin on cancer cells. The experimental part deals with the preparation, testing and application of various types of liposomal cisplatin. The following cell lines were used to study the effects of liposomal cisplatin: MDA-MB-231 (breast tumor cell line), A2780 (ovarian cancer cells) and UKF-NB-4 (neuroblastoma tumor cell line) CDDP (cisplatin-resistant neuroblastoma cell line).

Key words

Cisplatin, cytotoxicity, liposomes, electrochemical detection, voltammetry, differential pulse voltammetry, cancer, cancer cell lines, MTT test, encapsulation of liposomes

LANÍKOVÁ, P. *Studium vlivu liposomálních platinových cytostatik na nádorové buňky pomocí voltametrických metod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 83 s. Vedoucí diplomové práce Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Studium vlivu liposomálních platinových cytostatik na nádorové buňky pomocí voltametrických metod jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedeného diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

.....

Bc. Petra Laníková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Ing. et Ing. Davidu Hynkovi, PhD., za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci. Také chci poděkovat MVDr. Ludmile Krejčové, PhD., Ing. Zuzaně Koudelkové a RNDr. Lukášovi Richterovi, PhD., za konzultace a cenné rady k práci.

V Brně dne

.....

Bc. Petra Laníková

Obsah

Obsah	VIII
Seznam obrázků.....	X
Seznam tabulek.....	XII
Úvod	13
1 Uzavírání platinových cytostatik do liposomů	14
3.1 Platinová cytostatika	14
Cisplatina	14
Carboplatina	16
Oxaliplatina	16
3.2 Cílený transport léčiv	17
Aktivní transport.....	17
Pasivní transport	18
3.3 Liposomy	20
Druhy liposomů	20
3.4 Využití liposomů jako média pro přepravu léků.....	21
Metody testování fyzikální stability liposomů	21
Metody testování chemické stability	23
Metody testování mezipovrchové stability.....	23
3.5 Proces enkapsulace cisplatiny do liposomů.....	24
Možnosti uzavírání cisplatiny do liposomů.....	24
Struktura liposomů obsahujících platinové léčivo	25
3.6 Efekt liposomů s enkapsulovanou cisplatinou na nádorové buňky	26
Mechanismus účinku liposomálních léčiv s enkapsulovanou cisplatinou.....	26
Využití liposomů s uzavřenou cisplatinou v klinické praxi	28
4 Elektrochemická detekce platiny.....	30
4.1 Princip voltametrie.....	30
5 Experimentální plán.....	35
6 Materiály a metody	36
6.1 Chemikálie	36
6.2 Přístrojové vybavení	36
6.3 Příprava liposomů	36
6.4 Příprava roztoků.....	37
6.5 Uzavírání cisplatiny do liposomů	37
6.6 Charakterizace liposomů pomocí koloidního analyzátoru ZetaSizer Nano.....	38
6.7 Diferenční pulsní voltametrie	39
6.8 MTT test	40

7	Experimentální část	41
7.1	Elektrochemické stanovení cisplatiny a jeho optimalizace	41
7.2	Příprava liposomů a studium jejich stability.....	46
7.3	Uzavírání cisplatiny do liposomů	49
7.4	Studium stability liposomů s uzavřenou cisplatinou	50
7.5	Studium účinku připravených liposomálních cisplatin na živé buňky	61
8	Diskuse	66
9	Závěr.....	69
	Literatura	70
	Seznam zkratk.....	77
	Přílohy	78

Seznam obrázků

Obrázek 1. Cisplatina, cis-diammindichloroplatnatý komplex, $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, [5].	15
Obrázek 2. Mechanismus účinku cisplatiny, [5].	15
Obrázek 3. Karboplatina, cis-diamminkyklobutandikarboxyplatnatý komplex, [5].	16
Obrázek 4. Oxaliplatina, (1R,2R-diaminocyklohexan) oxalátplatnatý komplex, [3].	17
Obrázek 5. Druhy liposomů, [46].	20
Obrázek 6. Cisplatina uzavřená v liposomu (Lipoplatina), [19].	24
Obrázek 7. b) velikost liposomu bez enkapsulované cisplatiny, c) velikost liposomu s enkapsulovanou platinou, měřeno pomocí AFM, [20].	25
Obrázek 8. Navazování léků uvnitř liposomu.	26
Obrázek 9. Princip anti angiogeneze [27].	27
Obrázek 10. Působení liposomů s enkapsulovanou cisplatinou in vitro na nádorovou tkáň a) liposomy bez cisplatiny b) liposomy s cisplatinou [22].	28
Obrázek 11. Voltametrický aparát [41].	31
Obrázek 12. Tříelektrodové zapojení [40].	31
Obrázek 13. Časový průběh potenciálu a závislost proudu na potenciálu při elektrochemické rozpouštěcí voltametii [40].	32
Obrázek 14. Potenciál vkládaný na elektrodu [40].	33
Obrázek 15. Průběh potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu při diferenční pulsní polarografii [40].	34
Obrázek 16. Schéma uzavírání cisplatiny do liposomů.	37
Obrázek 17. Přístroj Zeta-sizer Nano	39
Obrázek 18. Přístroj pro měření pomocí diferenční pulsní adsorpční voltametrie.	39
Obrázek 19. MTT test - titrační destička.	40
Obrázek 20. Optimalizace depozičního potenciálu.	41
Obrázek 21. Optimalizace depozičního času.	42
Obrázek 22. Optimalizace času probublávání.	42
Obrázek 23. Optimalizace volby počátečního a koncového potenciálu.	43
Obrázek 24. Srovnání voltamogramů naměřených pro vzorky cisplatiny s liposomy a bez liposomů, červená barva-cisplatina s liposomy o koncentraci 300 $\mu g/l$, tmavě modrá-pouze cisplatina o stejné koncentraci (300 $\mu g/l$), zelená- cisplatina s liposomy o koncentraci 120 $\mu g/l$, tyrkysová- cisplatina o stejné koncentraci (120 $\mu g/l$), černá- cisplatina s liposomy o koncentraci 40 $\mu g/l$, fialová- cisplatina o koncentraci 40 $\mu g/l$.	44
Obrázek 25. Kalibrační křivky cisplatiny před mineralizací (červeně) a po mineralizaci (oranžově).	45
Obrázek 26. Kalibrační křivky mineralizované cisplatiny.	45
Obrázek 27. Změna velikosti prázdných 100 nm liposomů v čase.	47
Obrázek 28. Změna velikostí liposomů L8, L10 a L15 v časovém úseku jednoho měsíce - test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data.	48
Obrázek 29. Histogramy rozložení naměřených hodnot velikostí liposomů v jednotlivých prostředcích po dobu jednoho měsíce v rámci tří druhů liposomů L10, L8, L15.	51
Obrázek 30. Velikost liposomů L8, L10 a L15 s uzavřenou cisplatinou v časovém úseku jednoho měsíce ve vnitrobuněčném prostředí- test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data	54
Obrázek 31. Velikost liposomů L8, L10 a L15 s uzavřenou cisplatinou v časovém úseku jednoho měsíce ve fyziologickém roztoku- test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data	55

Obrázek 32. Velikost liposomů L8, L10 a L15 s uzavřenou cisplatinou v časovém úseku jednoho měsíce v Ringerově roztoku- test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data	56
Obrázek 33. Boxplot velikostí liposomů L8 v jednotlivých prostředcích.....	57
Obrázek 34. Boxplot velikostí liposomů L10 v jednotlivých prostředcích.....	57
Obrázek 35. Boxplot velikostí liposomů L15 v jednotlivých prostředcích.....	58
Obrázek 36. Změna velikosti liposomů s uzavřenou cisplatinou v průběhu času liposomy L8 (modrá-fyziologický roztok, zelená-vnitrobuněčné prostředí, žlutá-Ringerův roztok). 59	
Obrázek 37. Změna velikosti liposomů s uzavřenou cisplatinou v průběhu času liposomy L10 (modrá-fyziologický roztok, zelená-vnitrobuněčné prostředí, žlutá-Ringerův roztok).	59
Obrázek 38. Změna velikosti liposomů s uzavřenou cisplatinou v průběhu času liposomy L15 (modrá-fyziologický roztok, zelená-vnitrobuněčné prostředí, žlutá-Ringerův roztok).	60
Obrázek 39. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami NB4 (nádorové linie neuroblastomu).....	62
Obrázek 40. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami MDA-MB231 (nádorové buňky prsu).....	63
Obrázek 41. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami A2780 (nádorové buňky vaječníku)	64
Obrázek 42. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami NB4 rezistentními na cisplatinu (nádorové buněčné linie neuroblastomu).	65

Seznam tabulek

Tabulka 1. Vliv přítomnosti liposomů ve vzorku na výšku detekovaného signálu cisplatiny.....	44
Tabulka 2. P-hodnoty Shapiro-Wilkova testu pro testování normality dat z velikostí tří druhů liposomů měřených v průběhu jednoho měsíce.	46
Tabulka 3. P-hodnoty testu regrese vypočtené z hodnot velikostí liposomů v průběhu jednoho měsíce	47
Tabulka 4. Stanovení schopnosti liposomu L8 uzavírat cisplatinu o dané koncentraci	49
Tabulka 5. Množství uzavírané cisplatinu do tří druhů liposomů, supernatantu a výpočet ztráty množství cisplatinu v průběhu extruze	50
Tabulka 6. P-hodnota Shapiro-Wilkova testu pro testování normality naměřených dat pro liposomy L8.....	52
Tabulka 7. P-hodnota Shapiro-Wilkova testu pro testování normality naměřených dat pro liposomy L10.....	52
Tabulka 8. P-hodnota Shapiro-Wilkova testu pro testování normality naměřených dat pro liposomy L15.....	53
Tabulka 9. P-hodnota testu lineární regrese jednotlivých liposomů v rámci každého prostředí.....	53
Tabulka 10. P-hodnoty z Tuckeyho testu rozdílů mezi velikostmi liposomů v rámci rozdílných prostředí.....	58
Tabulka 11. Množství cisplatinu uzavřené v liposomech v průběhu 24 hodinového časového úseku ve třech různých prostředích	61
Tabulka 12. Koncentrace cisplatinu uzavřené v liposomech, které byly aplikovány na nádorové buňky.	62
Tabulka 13. Uzavírání cisplatinu o koncentraci 0,2 g/l v různém množství, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 5.	78
Tabulka 14. Uzavírání 75 ul cisplatinu o koncentraci 2,6 g/l do 4 druhů liposomů, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 6.	78
Tabulka 15. Měření supernatantu z uzavírání cisplatinu o koncentraci 2,6 g/l do liposomů měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 6.	79
Tabulka 16. Stabilita liposomů ve vnitrobuněčném prostředí, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 11.....	79
Tabulka 17. Stabilita liposomů ve fyziologickém roztoku, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 11.....	80
Tabulka 18. Stabilita liposomů v plazmě, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 11.....	80
Tabulka 19. Koncentrace cisplatinu uzavřená v liposomech pro reakci s nádorovými buňkami, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 12.....	81

Úvod

Tato práce se zabývá studiem vlivu liposomálních platinových cytostatik na nádorové buňky pomocí voltametrických metod. Léčba rakoviny je dnes jednou z nejzásadnějších otázek medicíny. Každý rok zemře na rakovinu miliony lidí. Rakovina patří k velmi častým nemocím postihujících značnou část populace. Dnešní rakovinná léčiva jsou bohužel doprovázena mnoha vedlejšími účinky, proto je ve výzkumu tendence nalézat formu léčiv, která by tyto vedlejší účinky snižovala.

Účinky cisplatiny na nádorové buňky jsou velmi významné, avšak vedlejší efekty cisplatiny jsou markantní. Je tedy snaha tyto vedlejší efekty minimalizovat.

Tato práce řeší problematiku uzavírání cisplatiny do liposomů, jakožto nosiče, který zmírňuje vedlejší účinky cisplatiny. Liposomy jsou považovány za vhodné přenašeče díky jejich biologické inertnosti, biodegradabilitě a hlavně díky snadné modifikaci povrchu lipidové dvojvrstvy, což umožňuje dopravit konkrétní látku na určité místo [1].

Zkoumá se interakce enkapsulované cisplatiny v liposomu a nádorových buněk. Tato interakce je zkoumaná pomocí voltametrických metod, které jsou známé svou velkou citlivostí. Tato interakce bude poté statisticky vyhodnocena a budou z ní vyvozeny závěry.

1 Uzavírání platinových cytostatik do liposomů

Cílem cytostatické léčby je zajištění optimálního farmakoterapeutického účinku za přijatelné toxicity vůči zdravé tkáni. Cytostatika obecně dělíme do šesti skupin. První skupinu tvoří alkylující látky, které alkylují DNA a mají za následek smrt buňky. Ke druhé skupině řadíme antimetabolity, většina z nich podléhá endogenní aktivaci, která má za následek inhibici syntézy nukleotidů DNA. Další skupinou jsou rostlinné alkaloidy, které se vážou na tubulin, způsobují jeho krystalizaci a tím pádem i rozpuštění vřeténka, což má za následek zástavu buněčného dělení. Do čtvrté skupiny řadíme antibiotika, která působí jako interkalační cytostatika. Pátou skupinou jsou steroidní hormony, které se vážou na receptorové proteiny v nádorových buňkách. Tuto skupinu někteří autoři řadí mezi hormonální léčbu. Poslední skupinu tvoří ostatní cytostatika, ke kterým řadíme platinová cytostatika, asparaginasu, irinotecan, topotecan, procarbazin a interferon alfa [2].

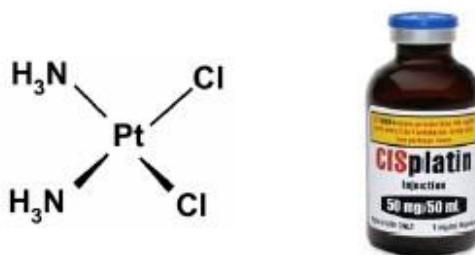
3.1 Platinová cytostatika

Protirakovinné činitele založené na platině jsou hlavní částí klinických léků pro léčbu různých nádorů. Hlavní antitumorovou drogou je cisplatina. V klinické praxi se využívají carboplatina, cisplatina a oxalplatina. Každá z těchto platin má nějaké kvality, kterými cisplatina nedisponuje [1, 2]. Platinatá cytostatika se řadí do skupiny synteticky připravovaných cytostatik. Jedná se o cytostatika, které nějakým způsobem poškozují nukleové kyseliny [3].

Cisplatina

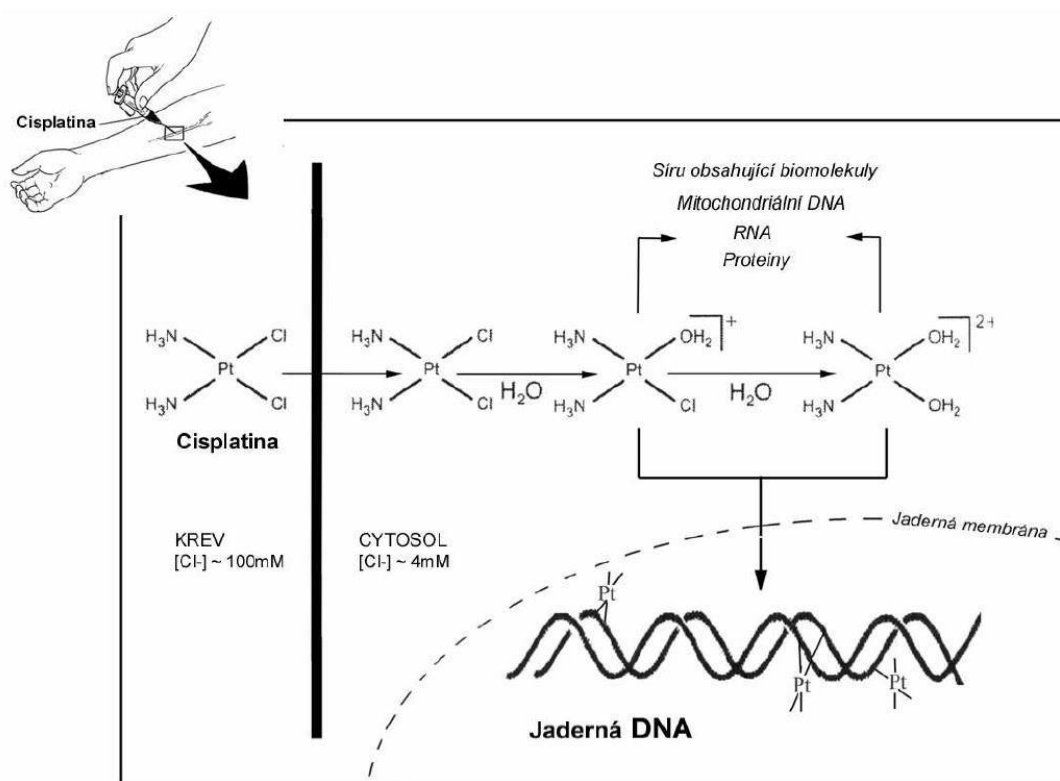
Cisplatina se řadí mezi nejsilnější emetogeny. U této látky se předpokládá, že působí stejným mechanismem jako alkylující látky. Alkylující látky poškozují DNA a dochází ke vzniku interkalačních vazeb mezi řetězci, což má za následek zamezení replikace nukleových kyselin. Cisplatina se stává aktivní až v intracelulárním prostředí a ničí buňky v každém stádiu buněčného cyklu. Antiproliferační aktivita cisplatiny je nejlépe pozorovatelná u nádorů urogenitálního systému [3].

V případě použití cisplatiny se vyskytují systémové toxikace jako je nefrotoxicita, která závisí na dávce, pak neurotoxicita, ototoxicita, nevolnost, zvracení, porucha homeostázy elektrolytů a další, které mají špatný vliv na organismus a omezují její účinnost [3, 4].



Obrázek 1. Cisplatina, cis-diammindichloroplatnatý komplex, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, [5].

Mechanismus účinku cisplatiny: Molekula cisplatiny se skládá ze dvou ligandů NH_3 a dvou chloridových iontů (relativně nereaktivní dichlorforma). V krevním řečišti je vysoká koncentrace chloridových iontů, takže cisplatina zůstává v dichlorové formě až do chvíle, než vstoupí do buňky. Lék vstupuje do buňky pasivní difúzí. V buněčné cytoplazmě je koncentrace chloridů výrazně nižší a zde dochází k nahrazení chloridových iontů hydroxylovými skupinami. Tím dochází ke vzniku mono nebo di-hydroxy formy cisplatiny, která interaguje s jednotlivými buněčnými komponenty obsahujícími nukleofilní skupiny (viz Obrázek 2) [5]. Hlavním farmakologickým místem působení cisplatiny je jádro buňky. Cisplatina se obvykle podává intravenózně [5].

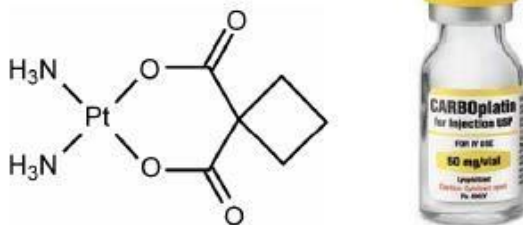


Obrázek 2. Mechanismus účinku cisplatiny, [5].

Cisplatina je jedna z nejúčinnějších protirakovinných činidel projevující se klinickou aktivitou proti velkému rozsahu tumorů. Její způsob cytotoxicity je zprostředkován její interakcí s DNA. Cisplatina vytváří DNA adukty, které aktivují několik signálních transdukčních drah, zahrnující ATR, p53, p73 a MAPK a kulminuje v aktivaci apoptózy. Poškození DNA pomocí apoptotických signálů však může být oslabeno a následná odolnost je hlavní limitací terapie založené na cisplatině [6].

Carboplatina

Carboplatina je dalším analogem platiny, která je využívána k léčbě nádorů. Mechanismus účinku je totožný s účinkem cisplatiny, dochází k poškození DNA. Vedlejšími účinky je myelosuprese, nauzea, alopecie a stejně jako u cisplatiny i neurotoxicita. Má menší nežádoucí účinky než cisplatina [2, 3].

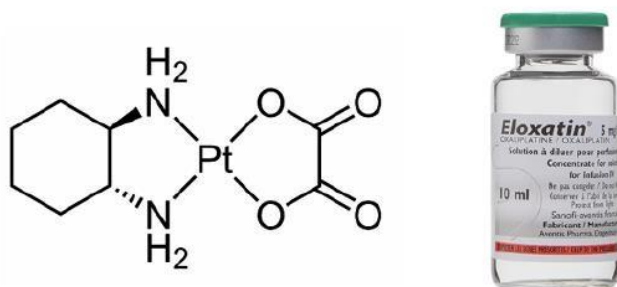


Obrázek 3. Karboplatina, cis-diammincyklobutandikarboxyplatnatý komplex, [5].

Carboplatina se odlišuje od cisplatiny tím, že skupina, která opouští molekulu místo chloridové skupiny je dikarboxylatocyklobutanová skupina, tvořená stabilními ligandy, které pomaleji podléhají hydrataci. Toto způsobuje, že je carboplatina chemicky stabilnější než cisplatina. To znamená, že v tělesných tekutinách zůstává déle intaktní [5]. Carboplatina disponuje delším poločasem života. Výzkumy potvrzují, že má carboplatina značně sníženou nefrotoxicitu ve srovnání s cisplatinou [7].

Oxaliplatina

Oxaliplatina je odvozena od cisplatiny nahrazením atomu chloru molekulou oxalátu. Oxaliplatina nevyvolává ani nefrotické ani emetogenní účinky a její myelosupresivní vlivy jsou mírné [2]. Může způsobovat periferní neuropatie, což závisí na podané dávce oxaliplatiny, k dalším nežádoucím účinkům se řadí nevolnost a zvracení [2, 3]. Tento analog cisplatiny se ukázal být účinným farmakem proti rakovině tlustého střeva [5].



Obrázek 4. Oxaliplatina, (1R,2R-diaminocyklohexan) oxalátplatnatý komplex, [3].

3.2 Cílený transport léčiv

Cílený transport léčiv reprezentuje vysoce aktivní oblast výzkumu pro léky, které jsou cíleny přímo na jejich biologické cíle. Ve srovnání s tradiční chemoterapií má cílená terapie pro léčbu rakoviny dvě hlavní výhody: při léčbě se vyhneme poškození zdravých tkání a omezíme rezistenci k léčivu. Cílený transport léčiv dělíme do dvou skupin, a to do skupin aktivního a pasivního transportu [4]. Transportéry léků jsou důležitými klíčovými faktory koncentrací léčiv v systémovém oběhu [8]. V této kapitole se zabýváme převážně nosiči léků založených na kovu, s důrazem na transport cisplatiny.

Aktivní transport

Aktivní transport je založen na specifických biomolekulárních interakcích mezi léčivem a buňkou, či tkáňovými elementy. Tento přístup může být aplikován na nádory obsahující biologické entity, jejichž množství nebo funkčnost je odlišná od normálních tkání [4].

Transport pomocí estrogenu

Estrogeny jsou schopny jednoduše projít buněčnou membránu pomocí pasivní difúze díky vysoké lipofilii, navázat se na estrogenový receptor v cytoplazmě a poté jsou přesunuty do jádra, odtud jsou atraktivními nosiči pro aktivní cílený transport léčiv. Tkáň a odpovídající buněčné linie, které podléhají efektu zvýšené propustnosti a retence (EPR), jsou nazývány jako estrogen reagující (ER) [4].

Transport pomocí karbohydrátů

Karbohydráty jako mono a polysacharidy jsou základními komponenty glykolipidů a glykoproteinů a základními stavebními jednotkami nukleotidů. Nádorové buňky se běžně projevují pozměněným sacharidovým metabolismem. Proto mohou být karbohydráty využity jako nosiče pro protirakovinné léky založené na platině [4].

Biofosfáty jako nosiče

Biofosfáty disponují vysokou afinitou ke kostem a dalším kalcifikovaným tkáním a mají široké využití jako terapeutické prostředky pro několik onemocnění týkajících se kostí. Schopnost chelace vápenných iontů je základní schopností biofosfátů určených k cílení kostí. Jelikož biofosfáty mohou být absorbovány do povrchu kostí a prokazují značnou inhibici osteoklastické resorpce a antitumorové efekty v preklinických modelech, mohou být považovány za potenciální na kosti se zaměřující nosiče platinových léčiv [4].

Kukurbit[n]urily jako nosiče

Kukurbit[n]urily ($n=6,7,8$) se staly v posledních letech nejvíce atraktivními makrocykly užívanými pro enkapsulaci cisplatiny. Tyto nosiče využívají při doručování léčiv částicový potenciál na svou ochranu. Kukurbit[n]urily obsahují dvě symetrické hydrofilní karbonylové ohraničené části, stabilizující centrální hydrofobní dutinu a poskytující tak makrocyclům amfifilní charakter. Vnitřní hydrofobní dutina poskytuje prostor pro úspěšné navázání nepolárních molekul, zatímco karbonylové jednotky makrocyclů slouží pro navázání hydrogenu a pro elektrostatické interakce s kationickými částmi molekuly. Tyto molekuly tvaru barelu mohou být použity jako molekulární hostitelé pro neutrální a nabitě mono či multijaderné platinové protirakovinné činidla [4].

Pasivní transport

Pasivní transport je dosažen pomocí zdokonaleného efektu zvýšené propustnosti a retence (EPR) v nádorových tkáních. Vaskularita endotelu v nádorech proliferuje rapidně a nesouvisle, což má za následek vyšší počet proděravění a otevřených spojení než normální cévy, pohybuje se mezi 0,2 μm až 1,2 μm . Následně mohou částice, které jsou dostatečně malé (typicky okolo několika stovek nm) pasivně překročit nádorovou endoteliální bariéru přes membránové póry. Navíc nedostatek funkční lymfatické sítě zajišťuje prevenci snahy o přesunutí přebytku tekutiny z pevné nádorové tkáně. Kombinace těchto dvou efektů způsobuje hyperpermeabilitu nádorových buněk pro cirkulující makromolekuly, které se rozlévají a akumulují v pevné nádorové hmotě díky neúčinnému odvodňování pomocí lymfatického systému a zůstávají zde značnou dobu [4].

Nanočástice

Využití polymerních nanočástic jako sekvenčních uvolňovacích vektorů pro protirakovinné léky je dobře zavedenou metodou [9]. Umožňuje ochranu naplněných sloučenin od okolního prostředí. Nanočástice ochraňují lék nejen proti tělním tekutinám, ale také izolují tělo od nechtěných chemických následků léků, což má za následek minimalizaci na dávce závislých vedlejších efektů [9]. Nanočástice mohou proniknout do určitého nádoru díky EPR efektu a tím změnit distribuci farmakokinetiky naplněných

léků v tkáni. V porovnání s ostatními doručovacími strategiemi mají nanočástice spousty výhod, jako je zdokonalená akumulace léku v nádorové tkáni, či redukce systémové toxicity. Uzavírání cisplatinu ovšem představuje výzvu díky svým chemicko-fyzikálním vlastnostem [4, 9].

Karbonové nanotrubic

Karbonové trubice jsou atraktivními nosiči cílených léčiv díky jejich unikátním fyzikálním, chemickým a fyziologickým vlastnostem [4]. Prokázaly schopnost transportu širokého rozmezí molekul přes membrány do žijících buněk [9]. Strukturální stabilita karbonových nanotubic může prodloužit cirkulační čas a biologickou dostupnost enkapsulovaných léků. Funkční rozpustné jednotenné karbonové nanotrubic a jednotenné karbonové nanorohy jsou nejužívanějšími nanotubicemi pro doručování léků založených na platině, jelikož disponují spoustou vnitřního prostoru, který poskytuje možnost inkorporace léku [4, 9].

Polymerní micely

Dalším přístupem je užívání polymerních molekul, které se kovalentně vážou na platinu. Toto je alternativní způsob, který chrání komplexy před degradací a stejně tak poskytuje možnost pro chemicky kontrolované uvolnění léčiva [9]. Tímto dochází ke zvyšování efektivity platinově založené chemoterapie. Od polymerních micel je očekáváno zlepšení akumulace platinového léčiva v nádorové tkáni pomocí EPR efektu. Typicky jsou platinové léky inkorporovány do vnitřního jádra polymerních micel chemickou konjugací nebo fyzickým zachycením s relativně vysokou stabilitou [4].

Liposomy

Uzavírání chemoterapeutik do liposomů redukuje distribuční objem a velmi zvyšuje akumulaci léčiva v nádorové tkáni. Tento přístup je atraktivní možností pro zlepšení účinnosti a redukci vedlejších efektů platinových cytostatik. V tomto případě dochází k uvolňování terapeutické skupiny léčiva v nádorovém cíli, zatímco liposom ochraňuje léky před deaktivací plazmatickými proteiny nebo makrofágy [4, 10].

Těmito nosiči se zabývá celá tato práce, proto budou znova podrobněji rozvedeny v následující části práce.

3.3 Liposomy

Liposomy jsou uzavřené sférické membránové váčky tvořeny dvěma částmi s různou rozpustností, cholesterolem a lipidy, nejčastěji lecitinem. Mohou obsahovat i jiné fosfolipidy jako je např. fosfatidylglycerol a fosfatidylethanolamin. Cholesterol slouží ke snížení fluidity a také permeability liposomálních membrán. Liposomy jsou mikročásticové nosiče s proměnnou velikostí, obvykle o velikostech mezi 0,05 až 5 μm , které spontánně vznikají, když dochází k hydrataci určitých lipidů ve vodním médiu. K vytváření liposomů z vodného fosfolipidového roztoku dochází až při dosažení kritické micelární koncentrace. Tvorba liposomálních struktur je podmíněna polaritou prostředí a amfifilním charakterem fosfolipidů. Hydrofilní skupiny nalezneme na povrchu liposomální dvojvrstvy, která je ve styku s vodnou fází, hydrofóbní skupiny směřují dovnitř dvojvrstvy. Liposomy jsou tvořeny relativně biokompatibilním a biologicky rozložitelným materiálem [1, 11].

Druhy liposomů

Liposomy dělíme nejčastěji z morfologického hlediska dle jejich velikosti a počtu membránových dvojvrstev. Velikost váčku je kritickým parametrem v určení cirkulačního poločasu života liposomů a velikost a počet dvojvrstev ovlivňují míru enkapsulace léku dovnitř liposomu [1, 11].



Obrázek 5. Druhy liposomů, [46].

Malé unilamelární liposomy (SUV) jsou tvořeny jednou fosfolipidovou dvojvrstvou s malým poměrem voda/lipid. Jejich velikost se pohybuje mezi 20-100 nm. Disponují vysokým zakřivením dvojvrstev, což způsobuje nerovnoměrné zastoupení fosfolipidů v jednotlivých monovrstvách membrány a nestabilitu liposomů. Malá velikost také omezuje množství léčiva, které může být uzavíráno dovnitř liposomu [5, 11].

Velké unilamelární vesikuly (LUV) jsou tvořeny jednou fosfolipidovou dvojvrstvou s vysokým poměrem voda/lipid. Jejich velikost se pohybuje mezi 100 až 1000 nm a více. Jsou využívány pro uzavírání hydrofilních léčiv a disponují vysokou schopností zachytávání makromolekul. Při použití vhodné technologie mohou být využívány jako modely přirozených biologických membrán [1, 11].

Multilamelární vesikuly (MLV). Disponují více než jednou fosfolipidovou dvojvrstvou. Jejich velikost je větší než 0,1 μm . Mají výbornou enkapsulační účinnost lipofilních léčiv. Jsou stabilní i při delším skladování, jednodušší na přípravu a jsou většinou připravovány metodou hydratace tenkého filmu či hydratací lipidů v přítomnosti organického roztoku [11].

3.4 Využití liposomů jako média pro přepravu léků

Používání liposomů jako transportních vektorů léků zahrnuje inkluzi léku dovnitř lipidové dvojvrstvy biologicky odbouratelné částice. Liposomy mají výhodu, že mohou být distribuovány a lokalizovány v místech tumoru EPR efektem. Modifikací cis platiny a užitím lipofilních derivátů cisplatiny pomáháme zvýšit množství komplexů uvnitř liposomu. Jiným přístupem je modifikace kompozice samotného liposomu, abychom obdrželi větší enkapsulační účinnost. Novou technikou uzavírání platinových cytostatik do liposomů je proces hydratace, kdy následuje roztavení-zmrznutí a poté centrifugace. Tímto procesem dochází k formulaci částic na tvar fazole s lipidovou dvojvrstvou. Tyto částice zvyšují poměr lék/lipid [9].

K přepravě léků je nutno užívat stabilních liposomů, jelikož existuje nebezpečí, že se obsah enkapsulované látky uvolní v nevhodnou dobu a způsobí poškození organismu. Liposomy jsou považovány za vhodné přenašeče díky jejich biologické inertnosti, biodegradabilitě a hlavně díky snadné modifikaci povrchu lipidové dvojvrstvy, což umožňuje dopravit konkrétní látku na určité místo [1].

Metody testování fyzikální stability liposomů

Vnější vzhled liposomu, průměrná velikost a rozdělení podle distribuce jsou důležitými parametry, které je potřeba ověřit. Tyto parametry jsou velmi významné pro liposomy, které jsou určeny k terapeutickým účelům [12]. Liposomové nosiče jsou obecně charakterizovány jednoduše kontrolovatelnými vlastnostmi jako je morfologie, náboj, složení lipidů a další, díky kterým jsme schopni řídit jejich koloidní stabilitu [13]. Zásadní jsou také vlastnosti fosfolipidové dvojvrstvy [1].

Cyklická voltametrie

Je používána jako metoda ke studiu modelů biomembrán. U těchto studií máme pracovní elektrodu pokrytou fosfolipidovou dvojvrstvou, což nám umožňuje studium fosfolipidové dvojvrstvy, permeability membrány pro různé ionty, kinetiky přenosu náboje apod. [1].

Transmisní elektronová mikroskopie

TEM umožňuje studium morfologie liposomů, jejich lamelaritu, zastoupení ve vzorku a uspořádání jejich fosfolipidových dvojvrstev. K vizualizaci liposomů užíváme metody negativního kontrastování pomocí uranylacetátu, kyseliny fosfowolframové nebo molybdenanu amonného. Dále lze použít mrazové techniky jako mrazové lámání nebo mrazové leptání. Tyto techniky umožňují zachování povrchových struktur liposomů a můžeme díky nim nahlédnout i do vnitřní struktury liposomů [1].

Turbidimetrie

Turbidita kvantifikuje stupeň, při kterém světlo prochází vzorkem a je rozptýleno suspendovanými nanočásticemi. Turbidita závisí podstatně na entitách koloidních velikostí v tekuté fázi, na rozdílu refrakčního indexu mezi částicemi a médiem a na velikosti distribuce částic. Lze jí měřit Nefelometrickými Turbiditními Jednotkami (NTU) [14]. Turbidimetrii užíváme k charakterizaci fosfolipidových vesikulů v závislosti na jejich poloměru. Turbidimetrie lze také využít k zjišťování mechanismů přechodu liposom-micela a micela-liposom nebo ke sledování agregačního procesu a fúze liposomů [1].

Rozlišovací skenovací kalorimetrie

Termická analýza nám poskytuje informaci o chování krystalizace, načasování polymorfních přechodů, teploty tání, entalpii a stupni disperze táním homogenizovaných glycerinových nanočástic disperze [14].

RTG

Krystaly způsobují difrakci RTG záření, stejně jako rozdělují viditelné světla do barevného spektra pomocí mřížky. Toto je možné díky faktu, že vlnové délky RTG záření jsou stejného rozsahu jako vzdálenosti mezi atomy molekul krystalu. RTG difrakční vzorec je fotografován na citlivou destičku, která je umístěna za krystalem a tím pádem je možné touto cestou zkoumat strukturu krystalu [14].

Změna zeta potenciálu

Skoro všechny částice v kontaktu s tekutinou získávají na povrchu náboj. Kolem každé částice existuje elektrická dvojvrstva. Její první částí je Sternova vrstva, kterou řadíme k vnitřní oblasti a kde jsou ionty silně navázány a druhou částí je difúzní oblast, kde už ionty nejsou tak pevně připojené k fázovému rozhraní. Uvnitř druhé části existuje

jakási teoretická hranice, uvnitř které utvářejí ionty a částice stabilní jednotku. Když je částice v pohybu, ionty uvnitř hranice se také pohybují, ale u iontů za hranicí k pohybu nedochází. Hranici nazýváme rovinou skluzu a potenciál, který se nalézá na této hranici je potenciál zeta [15]. Zeta-potenciál je užitečný identifikátor povrchového náboje, který je využíván k predikci a kontrole stability koloidních suspenzí a emulzí. Čím větší je zeta potenciál, tím více je pravděpodobné, že je suspenze stabilní, protože nabitě částice odpuzují jedna druhou a tak překonávají tendenci se shlukovat [14, 15].

Metody testování chemické stability

Hlavními součástmi liposomu jsou lipidy. Fosfolipidy obsahující nenasycené mastné kyseliny, jsou známy tím, že podléhají oxidačním reakcím [12].

Degradační chemické procesy ovlivňující fyzicko-chemickou stabilitu liposomů a mohou mít dvě formy. Nejčastěji se jedná o hydrolýzu esterových vazeb nebo dochází k oxidaci nenasycených uhlíkových řetězců [16].

Chromatografické metody

Chromatografie je metoda založená na separaci částí vzorku mezi pohyblivou fází, jejímž pohybem je vzorek unášen soustavou a nepohyblivou fází, která zadržuje složky vzorku v různých časových okamžicích, čímž je od sebe separuje [17].

Pro liposomy se využívá plynové chromatografie, která slouží k analýze zastoupení mastných kyselin v liposomech [1]. Koncentraci neporušených mastných kyselin lze měřit plynovo-kapalnou chromatografií [16]. Zastoupení mastných kyselin určuje fyzikálně-chemické vlastnosti liposomů. K charakterizaci mastných kyselin se využívá vysokoteplotní plynová chromatografie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie [1].

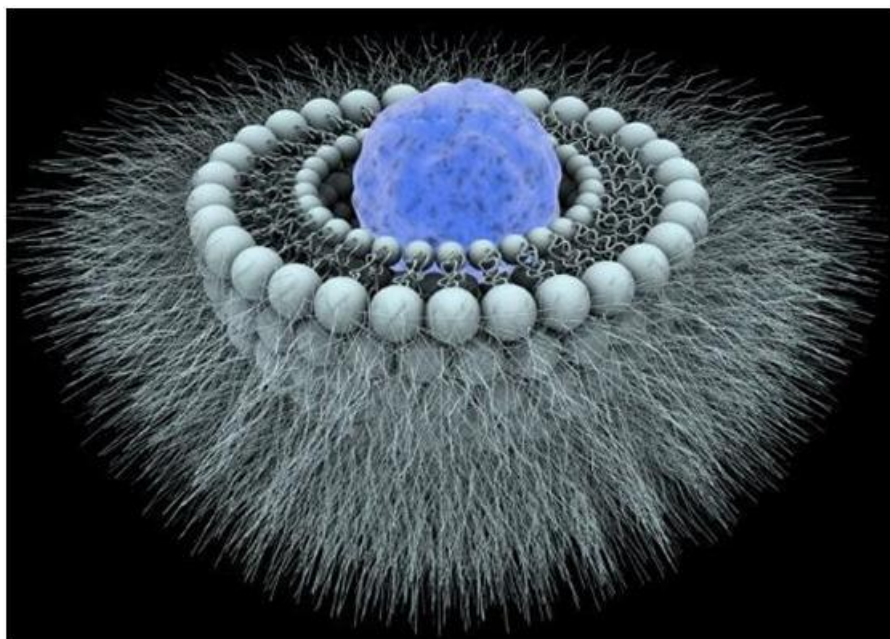
Metody testování mezipovrchové stability

Studium mezipovrchové stability je založeno zejména na dvou veličinách, povrchovém napětí a povrchovém potenciálu. Povrchové napětí lze určit Wilhelmovou destičkovou metodou. [14]

Koncentraci fosfolipidů v liposomových váčkách lze stanovit spektrofotometrickými metodami využívajícími kyselinu askorbovou, kde se určuje množství fosforečnanů [16].

3.5 Proces enkapsulace cisplatiny do liposomů

Efektivní velikost liposomu pro uzavírání cisplatiny je mezi 100 až 300 nm. V případě cisplatiny je očekáváno, že pouze rozpustná část léku uvnitř liposomu bude biologicky dostupná a bude interagovat s vnitrobuněčnou DNA. Každá cisplatinová sraženina je považována za neefektivní [18].



Obrázek 6. Cisplatina uzavřená v liposomu (Lipoplatina),[19].

Možnosti uzavírání cisplatiny do liposomů

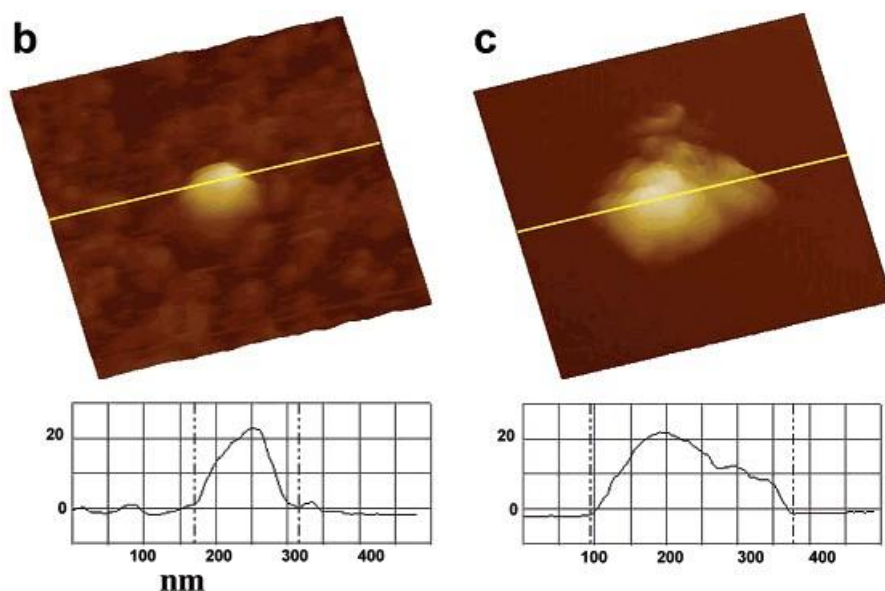
První způsob uzavírání: N-cisplatina je rozpuštěna v 0,9% NaCl za teploty 65 °C a ponechána při této teplotě po dobu jedné hodiny. Lipidy rozpustíme v etanolu. Lipidy jsou hydratovány přidáním tohoto etanolového roztoku do směsi léku. Konečná koncentrace lipidů je 150 mg/ml v 10% etanolu při teplotě 65 °C. Směs je míchána hodinu za teploty 65 °C, poté za stejné teploty protlačena jedenáctkrát přes polykarbonové póry o velikosti 200 nm. Liposomy o velikosti 100 nm se ochlazují při pokojové teplotě. V průběhu chlazení se formuje těžká žlutá sraženina. Kal je vysbírán a směs ponechána dále při pokojové teplotě. Poté se znovu objevuje další sraženina a ta je znovu vysbírána. Vzorek se poté dvojnásobně zředí a dialyzuje s 10% sacharózou obsahující 1mM NaCl za pokojové teploty. Měření probíhá 5 krát proti 100vols. 10% sacharóze obsahující 1mM NaCl stále za pokojové teploty. Za těchto podmínek by mělo nastat kompletní vyrovnání s 10% sacharózou obsahující 1mM NaCl. Nakonec je přidán histidinový pufr o pH 6.5. Konečná liposomová disperze je průsvitně bílá [20].

Další způsob přípravy liposomů s uzavřenou cisplatinou je následující: na začátku jsou lipidy rozpuštěny v chloroformu a přemístěny na kulaté dno baňky a ponechány

odpařování. Získaná lipidová vrstva je rozpuštěna v ethyletheru a poté je k ní přidáno 2 mg/ml cisplatinového roztoku připraveného v 0,9% NaCl. Poměr tekuté a etherové fáze je jedna ku třem. Výsledná směs je vortexem rozmíchána na vodovou/olejovou emulzi. Poté dochází k vypaření ethyl-etheru a ke vzniku výsledného tvaru liposomů. Tyto liposomy jsou poté filtrovány přes 0.4-0.2 μm polykarbonátové membrány a poté dochází k eliminaci neuzavřené platiny pomocí ultracentrifugace za teploty 10 stupňů v průběhu 60 min [21].

Struktura liposomů obsahujících platinové léčivo

Cisplatina se v roztoku formuje do částic, které jsou heterogenní ve velikosti a tvaru. Velikost částic může mít značný a přímý vliv na množství cisplatiny, která se uzavírá do liposomálních váčků. Liposomy bez cisplatiny jsou obvykle malé s objemem v rozmezí velikostí od stovek nm až k několika μm . Na druhé straně liposomy s uzavřenou cisplatinou jsou relativně větší a neuniformní [22].



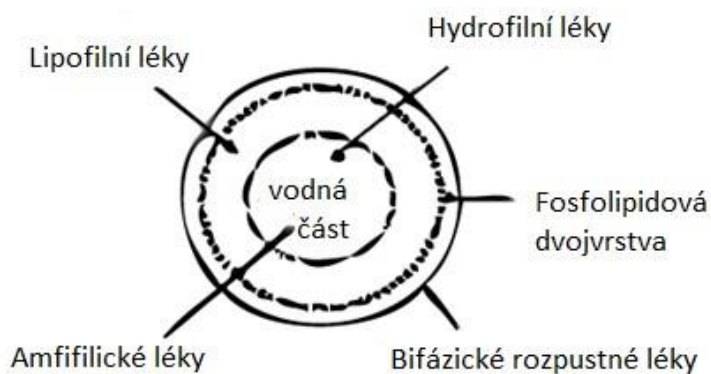
Obrázek 7. b) velikost liposomu bez enkapsulované cisplatiny, c) velikost liposomu s enkapsulovanou platinou, měřeno pomocí AFM, [20].

Jak lze také vidět na Obrázek 7 z mikroskopu atomárních sil, po uzavření platiny do liposomu dojde k částečnému zvětšení objemu liposomu.

3.6 Efekt liposomů s enkapsulovanou cisplatinou na nádorové buňky

Z důvodu snížení toxicity cisplatiny může být platnatý komplex uzavírán do specifických nosičů a cílen na nádorové buňky. V této práci se zabýváme liposomy jako nosiči cisplatiny. Liposomy se řadí k nejpokročilejší formě nosičů chemoterapeutik. Liposomální formulace je atraktivní možností pro vylepšení účinnosti a redukci vedlejších efektů u protinádorových léků založených na platině. Liposomální enkapsulace vede k výraznému snížení vedlejších účinků bez snížení protirakovinné aktivity [3, 4, 23].

Liposomové vesikuly jsou tukové dvojvrstvé sférické membrány s vnitřním vodním objemem. Vesikuly mohou být považovány jako univerzální systém nosičů pro hydrofilní, lipofilní a amfifilní léky. Na Obrázek 8. lze vidět, do jaké části liposomu se navazuje jaký typ léčiva [24].



Obrázek 8. Navazování léků uvnitř liposomu.

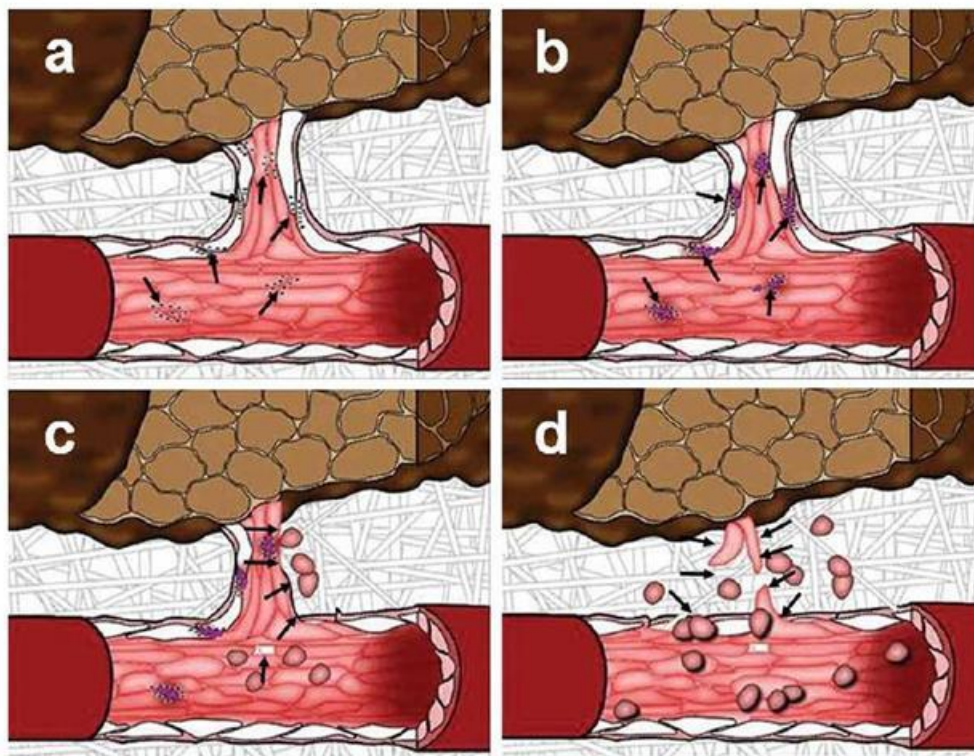
U léků založených na platině je navazování komplikovanější, jelikož platinové léky disponují oběma vlastnostmi, jak lipofilními tak hydrofilními, což vede k nízkému poměru lék/lipid a k nestabilitě liposomálního systému. Tento poměr lze zlepšit tím, že vezmeme za výhodu limitní rozpustnost platinových léků ve vodě. Suchá lipidová vrstva může být znovu rehydratována ve vodném srovnávacím roztoku o pH 7.4 s 5mM platinou následovanou deseti cykly zamrznutí-tání, které jsou následované odstraněním volné platiny centrifugací [24].

Pro usnadnění uzavírání platiny do liposomu mohou být také použity negativně nabitě fosfolipidy, které vytvářejí elektrostatické interakce s pozitivně nabitými akva druhy cisplatiny. Toto donutí lék formovat agregáty obklopené lipidovou dvojvrstvou. Takto uzavřené cytostatika mají třikrát větší účinnost než volná cytostatika [24, 25].

Mechanismus účinku liposomálních léčiv s enkapsulovanou cisplatinou

Všechna cisplatina přítomná v liposomech se chová jako ve vodě rozpustný lék a není tu žádná známka nerozpustného léku. Což znamená, že lék uvnitř liposomu nevytváří

sraženinu či nekrytalizuje. Také interakce léku s membránou jsou minimální. Lék uzavřený v liposomu by měl být velice stabilní, což znamená, že nesledujeme žádný odtok léku či přítok částic média [18].



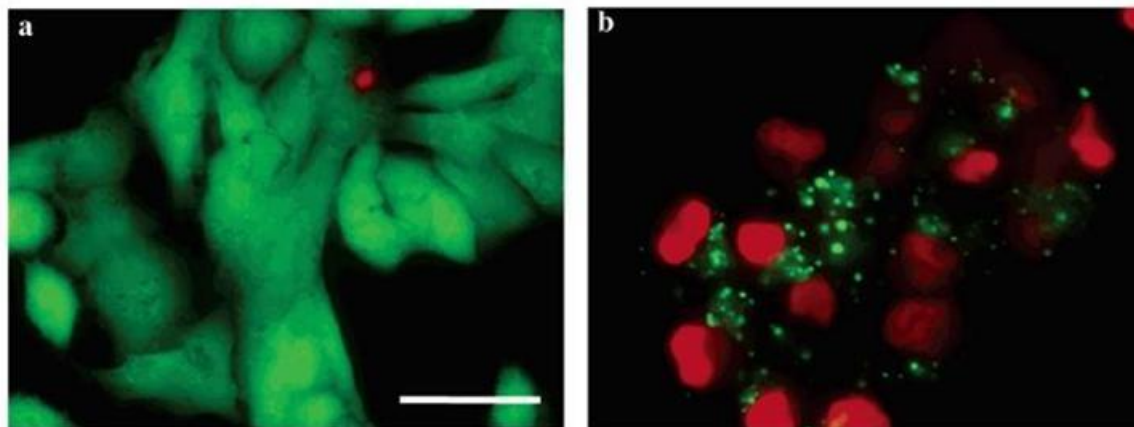
Obrázek 9. Princip anti angiogeneze [27].

Liposomy malé velikosti vstupují do buňky pasivní difúzí a působí na nádor pomocí EPR efektu, což je jev, který je založen na zvýšené schopnosti propouštění makromolekul či léčiv na bázi makromolekul pomocí zvýšené propustnosti krevních cév nádoru, díky tomu, že je zde absence lymfatické drenáže, která vrací přebytečné látky ven z nádoru, čímž si nádor kumuluje velké množství látek, které potřebuje ke svému růstu. U většiny polymerních látek je akumulace v nádorové tkáni 5-10x větší, než jejich koncentrace v krevní plazmě 24 hodin po intravenózním podání.[4,26] Liposomy obsahující cisplatinu působí také proti angiogenezi nádorové tkáně, jak lze vidět na Obrázek 9[27].

Liposomy malé velikosti (<100nm) bývají lokalizovány v blízkosti jádra a v cytoplasmě, což znamená, že menší liposomy jsou účinně přijaty buňkou pomocí endocytózy. Tyto liposomy, které jsou buňkou přijaty za vlastní, pak mohou uvolnit cisplatinu přímo do buňky a tak vykonat jejich cytotoxickou aktivitu s DNA a další biochemický mechanismus a způsobit u hostující buňky nevratný buněčný úhyn [4].

I přes všechny výhody mají liposomální formulace své limity. Limituje je krátký krevní cirkulační čas, nestabilita in vivo a nedostatek cílové selektivity. Ke zvýšení akumulace liposomových léčiv v cílových tkáních je používáno povrchově vázaných

ligandů, které jsou schopny rozpoznat specifickou buňku a navázat se na ni. I přes vylepšení cílení jsou však liposomy eliminovány ve velkém množství buňkami retikuloendoteliálního systému, primárně v játrech [27].



Obrázek 10. Působení liposomů s enkapsulovanou cisplatinou in vitro na nádorovou tkáň a) liposomy bez cisplatiny b) liposomy s cisplatinou [22].

Z Obrázek **10** lze vidět, že u buněk v reakci s liposomem bez enkapsulované platiny nedochází k buněčné smrti a naopak při reakci s liposomem obsahujícím platinu následuje masivní buněčný úhyn [22].

Využití liposomů s uzavřenou cisplatinou v klinické praxi

Volná cisplatina je užívána zejména k léčbě nádorů varlat, ovarií, močového měchýře a tumorů v oblasti ORL a solidních nádorů [2].

Komerční léková forma cisplatiny uzavřené v liposomech se nazývá Lipoplatina. Řadí se k prvním liposomálním formulacím obsahujícím cisplatinu. Tento liposom je tvořen dipalmitoylfosfatidylglycerolem (DPPG), sójovým fosfatidylcholinem a methoxypolyethylenglykoldistearoylfosfatidylethanolaminem (cisplatina 8,9 %, lipidy 91,1 %, w/w) o průměru 110nm [26].

Lipoplatina byla testována v kombinaci s gemcitabinem u pacientů s pokročilým IIIB/IV nemalobuněčné rakoviny plic v rámci klinické studie fáze II. Po zhodnocení výsledků bylo zjištěno snížení nežádoucí cytotoxicity (hlavně nefrotoxicity) a zvýšení účinnosti léčiva. V současné době tato léková forma prošla třetí fází klinického testování proti nemalobuněčné rakovině plic [28, 29].

Lipoplatina byla také testována na metastázujících nádorových buněčných liniích vaječníků. Ovlivňuje buněčnou proliferaci, vykazuje stejný cytotoxický efekt v nádorových buňkách vaječníků různého histologického původu, včetně na platinu rezistentních linií. V tomto případě také dochází ke značnému snížení nežádoucí cytotoxicity a přidává se zde výhoda snížení metastázového potenciálu. Nahrazením platiny lipoplatinou u cisplatinově rezistentních pacientů s nádorem vaječníku má

za výhodu sníženou toxicitu [30].

Lipoplatina je také používána v oblasti léčby karcinomu prsu. Výzkumy ukazují, že má liposomální cisplatina stejný mechanismus účinku jako volná cisplatina, avšak snižuje toxicitu a zlepšuje účinnost léku. Výsledky výzkumů poukazují na dosažení povzbudivých výsledků v oblasti celkového přežití, času progresu nemoci a střední hodnoty přežití [32].

Účinky lipoplatiny na nádorovou tkáň jsou také zkoumány v případě rakoviny štítné žlázy. Lipoplatina nejenom ničí nádorové buňky, ale také endoteliální buňky cévního systému nádoru, v čemž se skrývá značný potenciál tohoto léčiva, jelikož funguje jako chemoterapeutikum a zároveň působí proti angiogenezi nádorové tkáně. Klinické a experimentální výsledky poukazují na to, že v kombinaci s gemcitabinem se Lipoplatina jeví jako slibná strategie pro léčbu nádoru štítné žlázy [27].

Další oblastí testování působení liposomů s uzavřenou platinou je oblast léčby žaludečních nádorů. Transferin polyethylen-glykolové liposomy se ukázaly jako užitečné nosiče pro in vivo cytoplasmatické cílení cis platiny u myši s peritoneálním šířením žaludečních nádorových buněk [32].

4 Elektrochemická detekce platiny

V minulosti se pro měření platiny užívalo výhradně spektrometrie, ale v posledním desetiletí se stále atraktivnější metodou stává voltametrie [33]. Citlivé metody voltametrie byly adaptovány a aplikovány na detekci platiny v biotických a ekologických materiálech, v lidských tělesných tekutinách, ve vzduchu a v chromatografických odpadech [34].

První metodou je adsorpční rozpouštěcí voltametrie. Tato metoda zahrnuje formaci, adsorpční akumulaci a redukci povrchově aktivního komplexu kovu. Voltametrická odpověď takového komplexu je přímo spojována s jeho povrchovou koncentrací [34, 35].

Další metodou je cyklická voltametrie, při které musí být platina znovu v komplexu s jinou látkou, což nám umožní prozkoumat její povrch. Platina může být také navázána v uhlíkových nanočásticích [36, 37, 38].

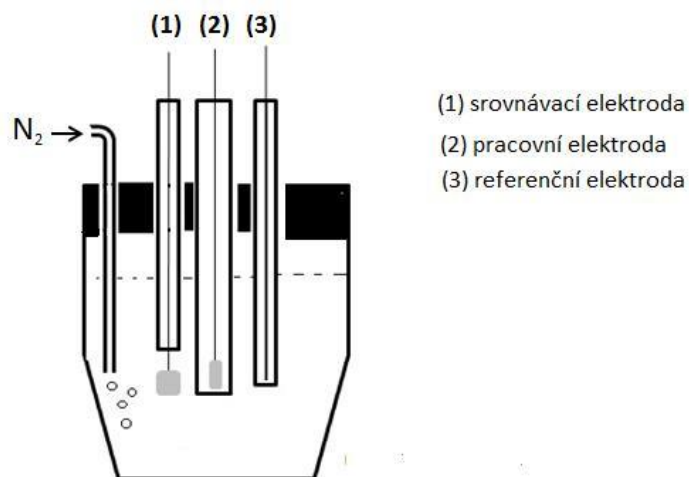
K měření platinových skupin se používá také další odvětví voltametrie s názvem diferenční pulsní voltametrie [33].

K měření platiny v krvi lze také využít polarografii. Tato metoda má samozřejmě limity díky extrémní citlivosti na stopy organické hmoty. Byla popsána Zhao a Freiserem s detekčním limitem 20 ng/L, tuto metodu poté vylepšili van den Berg a Jacinto na detekční limit 8 pg/L. Polarografické měření je tedy také jednou z metod, jak zjistit množství platiny [39].

4.1 Princip voltametrie

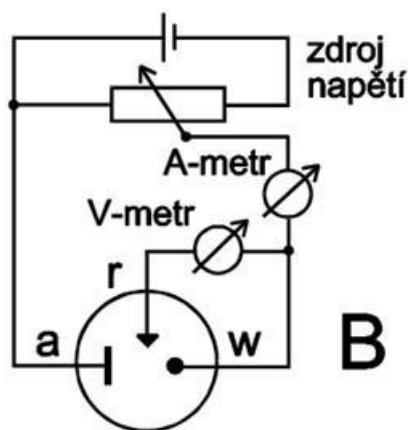
Voltametrie je metoda, při níž sledujeme závislost proudu procházející pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na potenciálu, jež je na tuto elektrodu vkládán z vnějšího zdroje [40]. Mezi dvě (nebo tři) elektrody ponořené v roztoku elektrolytu vkládáme měnící se napětí a pozorujeme změnu proudu. Jedna elektroda je pracovní a druhá je referenční. Pracovní elektroda je polarizovatelná a referenční elektroda polarizovatelná není a slouží jako srovnávací [17].

Ze závislosti proudu a napětí poté zjišťujeme, o jaký druh analytu se jedná. Tato závislost se nazývá polarizační křivka. Závislost proudu na elektrodovém potenciálu je možno měřit buď ve stavu ustáleném či za nestacionárních podmínek. Voltametrie užívá stacionárních polarizovatelných elektrod a polarografie využívá metody s odkapávající rtuťovou kapkovou elektrodou [17, 40].



Obrázek 11. Voltametrický aparát [41].

Základní součástí voltametrického aparátu je voltametrická cela, která obsahuje pracovní elektrodu, ponořenou do analyzovaného roztoku, a srovnávací elektrodu, která je spojena s analyzovaným roztokem solným můstkem. Můžeme také mít ještě třetí elektrodu a to elektrodu pomocnou. Napětí ze zdroje vkládané na pracovní a referenční elektrodu se měří voltmetrem, proud procházející článkem se měří ampérmetrem. V praxi je preferovanější tříelektrodové zapojení voltametrického článku [40].

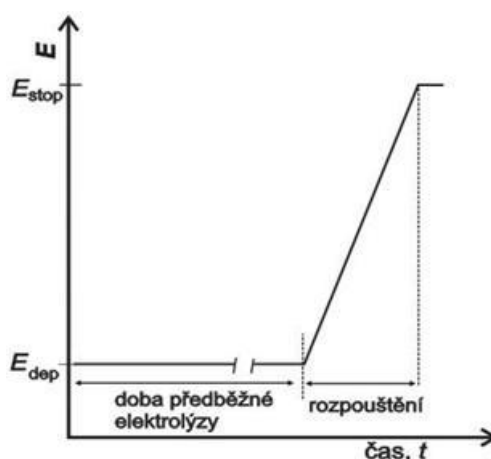


Obrázek 12. Tříelektrodové zapojení [40].

Proud v tomto případě prochází jen mezi pomocnou a pracovní elektrodou a reálný potenciál pracovní elektrody je měřen mezi pracovní a srovnávací elektrodou za bezproudového stavu. Zdrojem napětí v tomto zapojení je elektronický potenciostat, což je přístroj udržující potenciál pracovní elektrody na požadované hodnotě tím způsobem, že požadovaný potenciál neustále porovnává s aktuálně změřeným potenciálem a případný rozdíl je kompenzován změnou napětí na pomocné elektrodě [40].

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie

Tato metoda je modifikací rozpouštěcí voltametrie, odlišuje se způsobem akumulace analytů na pracovní elektrodě. U této metody se analyt nakoncentrovává na povrchu elektrody pomocí adsorpce při určitém potenciálu. Pokud jsou látky, které se adsorbují elektrochemicky aktivní, můžeme je stanovit z výšky píku při jejich redukci nebo oxidaci, a to po jejich nakoncentrování. Látky, které jsou elektrochemicky neaktivní, mohou při dosažení určitého potenciálu desorbovat a to se projeví tenzometrickým píkem, který odpovídá kapacitnímu proudu procházejícímu elektrodou za změny kapacity elektrické dvojvrstvy při desorpci. Selektivitu metody lze ovlivnit vhodnou modifikací povrchu pracovní elektrody. Zde jako pracovní elektrodu používáme stacionární rtuťovou kapku s výhodou snadno obnovitelného povrchu [17].

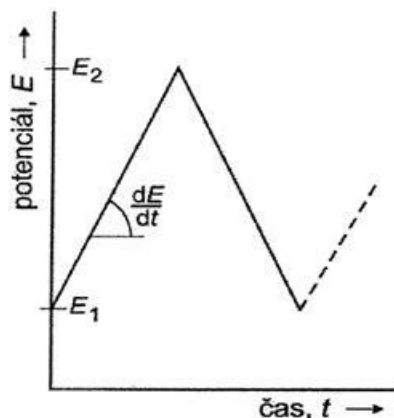


Obrázek 13. Časový průběh potenciálu a závislost proudu na potenciálu při elektrochemické rozpouštěcí voltametii [40].

Tento způsob nakoncentrovávání lze využít pro stanovení iontů kovů, které se před akumulací převádějí do vhodných komplexů s organickými ligandy. Protože adsorpce samostatných iontů nenastává, ionty navážeme do adsorbovatelných komplexů s vhodnými činidly, které již absorbovat lze. Selektivitu metody můžeme také řídit vhodnou modifikací povrchu pracovní elektrody, kde pak dochází k navázání určitých typů analytů na základě chemické interakce [17, 40].

Cyklická voltametrie

Při této metodě dochází k vkládání potenciálu trojúhelníkového průběhu na stacionární elektrodu. Tato metoda je charakterizována plynulým nárůstem potenciálu pracovní elektrody z jedné mezní hodnoty do druhé a poté zpět do výchozího bodu.



Obrázek 14. Potenciál vkládaný na elektrodu [40].

Polarizační křivky jsou ve tvaru píku a měřený proud je závislý na rychlosti časové změny potenciálu. Protože difuzi řadíme mezi relativně pomalé transportní procesy, dochází při dostatečně vysoké rychlosti polarizace k tomu, že produkty elektrodové reakce nestačí zcela oddifundovat od elektrody a můžeme je detekovat za vhodných podmínek při opačném směru potenciálové změny. Tato metoda má hlavní význam při studiu elektrodových reakcí [40].

Polarografie

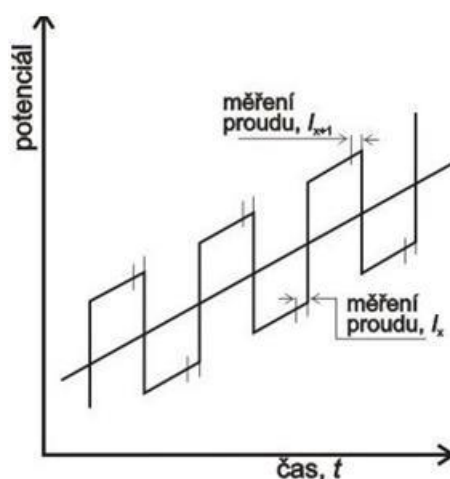
U polarografie jako pracovní elektrodu využíváme rtuťovou kapkovou elektrodu. Tato elektroda je tvořena tlustostěnnou kapilárou napojenou na zásobník rtuti [17]. Průměr kapiláry je uzpůsoben tak, že se nová kapka vytvoří a ukápne ve specifických časových úsecích, většinou co 2-6 s [42]. Dalšími elektrodami jsou elektroda referenční a pomocná.

Na rtuťové elektrodě dochází ke kolísání limitního difúzního proudu, jelikož během doby kapky dochází k narůstání jejího povrchu a tím pádem i hodnoty limitního difúzního proudu. Po odkápnutí kapky dojde k prudkému poklesu hodnoty proudu a poté k opakování celého děje. Kapacitní proud může zkreslovat měření. Vzniká na rozhraní rtuti a roztoku, které se chová jako kondenzátor, který se nabíjí díky vloženému napětí. K nejmenšímu zkreslení hodnoty limitního difúzního proudu dochází před odkápnutím kapky [17].

Při polarografii dochází k rovnoměrné změně napětí vkládaného mezi pracovní a srovnávací elektrodu. Potenciál mezi referenční a pracovní elektrodou je různý a měří se výsledná změna proudu [29]. Tento způsob měření nám umožňuje sledovat elektrický proud ze záznamu křivky, kde posléze vyhodnotíme její výšku a polohu [17]. Tato křivka se nazývá polarogram a je tvořena závislostí výsledného proudu na potenciálu. Pozice vlny na polarogramu podél potenciálové souřadnice poskytuje identifikaci látky, zatímco rozsah limitního proudu poskytuje různost koncentrace tohoto materiálu [42].

Diferenční pulsní polarografie

Tato metoda je výrazně citlivější metodou než běžná polarografie. Za použití kapkové elektrody, u které dochází k mechanickému odtrhávání kapek, snižujeme spotřebu rtuti. Napětí, které je vkládáno mezi polarizovatelnou a srovnávací elektrodu se mění po malých přírůstcích pro každou novou kapku a na konci každého přírůstku napětí vkládáme obdélníkový napěťový pulz [17].



Obrázek 15. Průběh potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu při diferenční pulsní polarografii [40].

Proud měříme před začátkem pulzu a před jeho koncem. Měření před koncem silně omezuje vliv kapacitního proudu. Nakonec zaznamenáváme rozdíl mezi těmito proudy. Tuto diferenci sledujeme v závislosti na vkládaném napětí. K největším odlišnostem dochází v oblasti půlvlnového potenciálu, což je důvodem proč má výsledná závislost tvar píku. Vrchol píku koresponduje s půlvlnovým potenciálem a výška píku s obsahem depolarizátoru ve vzorku. Průběh závislosti difference proudů na potenciálu lze poté odvodit z průběhu polarografické vlny [17].

5 Experimentální plán

Cílem práce je studium vlivu platinových cytostatik na nádorové buněčné linie. Připravená cisplatinové cytostatikum je enkapsulováno do různých liposomů. Velikost liposomů je charakterizována pomocí zeta-sizeru. Tato enkapsulovaná cisplatinová cytostatika jsou poté aplikována na nádorové buněčné linie a je sledována jejich interakce s nádorovými liniemi.

Experiment dělíme na tři části.

První částí je enkapsulace platinových cytostatik do liposomů. Připravené liposomy jsou charakterizovány pomocí zeta-sizeru, kdy zjišťujeme jejich velikost.

Druhou částí práce je ověření množství platinového léčiva v liposomech pomocí mineralizace a elektrochemického stanovení pomocí adsorpční diferenční voltametrie.

Ve třetí části budou enkapsulovaná cytostatika aplikována na nádorové buněčné linie a bude proveden MTT test.

6 Materiály a metody

6.1 Chemikálie

Na přípravu liposomů byly použity tyto chemikálie: Cholesterol ($C_{27}H_{46}O$), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-*rac*-(1-glycerol) sodíková sůl ($C_{42}H_{78}O_{10}PNa$), fosfatidylcholin ($C_{40}H_{80}NO_8P$), chloroform ($CHCl_3$), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamin ($C_{41}H_{78}NO_8P$) - DPPE, stearylamin ($C_{18}H_{39}N$).

Na přípravu pufru byly použity tyto chemikálie: kyselina sírová (H_2SO_4), hydrazin (N_2H_4), formaldehyd (CH_2O).

Na přípravu mineralizační směsi byly použity tyto chemikálie: kyselina dusičná (HNO_3), peroxid vodíku (H_2O_2).

Na přípravu roztoku cisplatiny byly použity tyto chemikálie: Cisplatina ($Cl_2H_6N_2Pt$), chlorid sodný (NaCl), ACS voda.

6.2 Přístrojové vybavení

- pH metr inolab, WTW (Weilheim, Německo)
- Analytické váhy BAS 31 (Boeco, Německo)
- Centrifuga 5417 R (Eppendorf, Německo)
- Mini-Extruder 610023 (Avanti, Spojené Státy Americké)
- 663 VA Stand (Metrohm, Švýcarsko)
- Koloidní analyzátor Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Velká Británie)
- Multiwave 3000, Microwave reaction system (Anton-Paar, Německo)

6.3 Příprava liposomů

Diplomová práce je založena na studiu chování tří různých liposomů, které se liší svým složením.

Příprava liposomu L-8

Do 15 ml zkumavky je přidáno 100 mg cholesterolu ($C_{27}H_{46}O$), 100 mg 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-*rac*-(1-glycerol) sodíkové soli ($C_{42}H_{78}O_{10}PNa$) a 100 mg fosfatidylcholinu ($C_{40}H_{80}NO_8P$), které jsou rozpuštěny v 4,5 ml chloroformu ($CHCl_3$). Tato směs je následně rozpipetována po 150 μ l do 30-ti 2 ml epinek a ponechána vypařování. V průběhu vypařování je nutné tuto směs rozlít na stěny epinky, aby se vytvořil lipidový film. Zbytek směsi je opatrně vyfoukán dusíkem. Každá epinka obsahuje 10 mg liposomu.

Příprava liposomu L-10

Do 15 ml zkumavky je přidáno 100 mg 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-*rac*-(1-glycerol) sodíkové soli ($C_{42}H_{78}O_{10}PNa$) a 100 mg fosfatidylcholinu ($C_{40}H_{80}NO_8P$) které jsou rozpuštěny v 3 ml chloroformu ($CHCl_3$). Tato směs je následně rozpipetována po 150 μ l do 20-ti 2 ml epinek a ponechána vypařování. V průběhu vypařování je nutné tuto směs rozlít na stěny epinky, aby se vytvořil lipidový film. Zbytek směsi je opatrně vyfoukán dusíkem. Každá epinka obsahuje 10 mg liposomu.

Příprava liposomu L-15

Příprava tohoto liposomu je identická jako u liposomu L-8 s tím rozdílem, že místo 100 mg 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-*rac*-(1-glycerol) sodíkové soli ($C_{42}H_{78}O_{10}PNa$) je přidáno 100 mg 1,2-dioleoyl- *sn*-glycero- 3-fosfoetanolaminu ($C_{41}H_{78}NO_8P$).

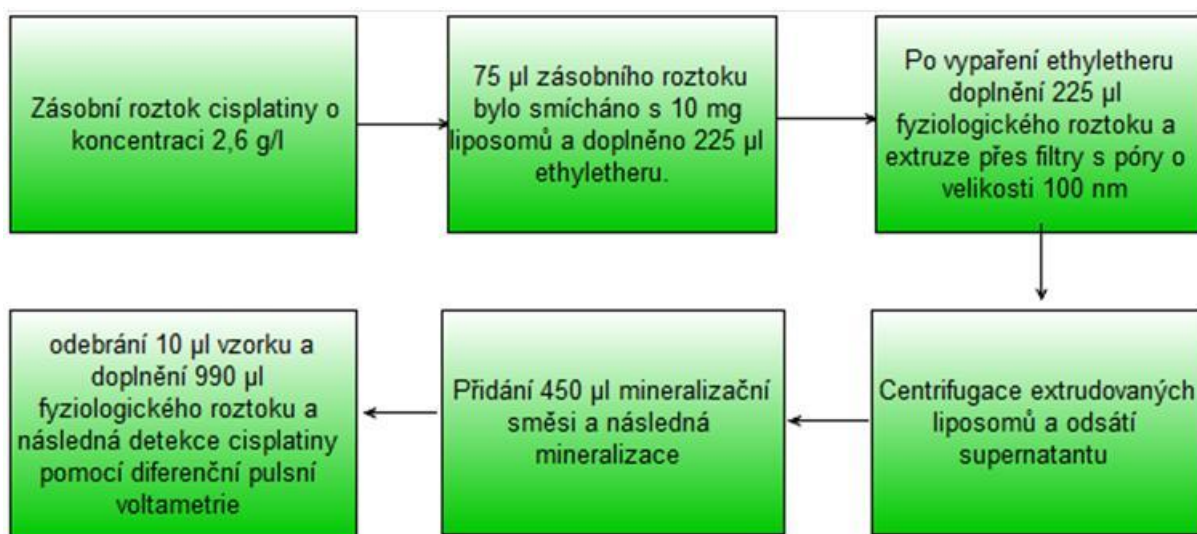
6.4 Příprava roztoků

Příprava pufru pro měření cisplatiny: K 10 ml 0,36 M kyseliny bylo přidáno 0,8 ml 37% formaldehydu a 0,05 ml 15 mM hydrazinu.

Příprava roztoku cisplatiny: 0,9 g chloridu sodného bylo smícháno s 100 ml ACS vody. Takto vytvořený fyziologický roztok byl dále použit na přípravu cisplatinového roztoku o koncentraci 2,6 g/l. Do 10 ml fyziologického roztoku přidáme 26,09 mg cisplatiny. Směs dále necháme jednu hodinu při teplotě 65 °C do úplného rozpuštění cisplatiny v 0,9 % roztoku chloridu sodného (fyziologického roztoku).

Příprava mineralizační směsi: 315 μ l kyseliny dusičné ($M= 63,01$ g/mol) bylo smícháno se 135 μ l peroxidu vodíku ($M= 34,01$ g/mol).

6.5 Uzavírání cisplatiny do liposomů



Obrázek 16. Schéma uzavírání cisplatiny do liposomů.

Pro enkapsulaci cisplatiny byl použit zásobní roztok o koncentraci 2,6 g/l. Z tohoto zásobního roztoku bylo odebráno 75 μ l (obsahujících 196 μ g cisplatiny) a smícháno s 10 mg liposomů. Poté k této směsi bylo přidáno 225 μ l ethyletheru ($M=74,12$ g/mol) sloužícího k otevření liposomu a možnosti enkapsulace cytostatika. Zásobní roztok a ethylether byly smíchány v poměru 1:3. Výsledná směs byla rozmíchána na vodně-olejovou emulzi. Poté došlo k odpaření ethyletheru a k zformování liposomů s enkapsulovanou cisplatinou. Dále je přidáno 225 μ l fyziologického roztoku (9 % roztok chloridu sodného). Pomocí extrudéru skládajícího se z filtru s póry o velikosti 100 nm byla provedena standardizace velikostí liposomů. Výsledkem extruze jsou asi 110 nm liposomy obsahující cisplatinu ve fyziologickém roztoku.

Liposomy ve fyziologickém roztoku byly poté centrifugovány při 4 °C po dobu 1 hodiny za účelem odstranění neuzavřené cisplatiny. Z jednotlivých epinek byl centrifugací odstraněn supernatant. Takto připravené liposomy byly připraveny k testování na rakovinných buňkách.

Pro stanovení koncentrace cisplatiny uzavřené v liposomech pomocí elektrochemických metod, bylo nutné před samotným stanovením vzorky zmineralizovat. Mineralizace byla provedena přidáním 450 μ l mineralizační směsi skládající se z kyseliny dusičné a peroxidu vodíku (koncentraci doplním v laboratoři). Mineralizace byla provedena pomocí mikrovlnného rozkladu po dobu jedné hodiny. Z této směsi pak bylo odebráno 10 μ l roztoku a přidáno k 990 μ l fyziologického roztoku. Do 1980 μ l pufru bylo přidáváno 20 μ l této směsi. Takto připravený vzorek byl použit pro stanovení množství cisplatiny pomocí diferenční pulsní voltametrie.

6.6 Charakterizace liposomů pomocí koloidního analyzátoru ZetaSizer Nano

Pomocí koloidního analyzátoru byly charakterizovány velikosti připravených liposomů. Liposomy byly extrudovány přes filtr s póry o velikosti 100 nm, aby bylo dosaženo co nejrovnoměrnější velikostní distribuce připravených liposomů. U liposomů s enkapsulovanou cisplatinou jsem očekávala nárůst jejich velikostí okolo 110 nm z důvodu přítomnosti uzavřené cisplatiny, jelikož se póry filtru při extruzi mohou zvětšovat v důsledku přítomnosti kovu. Tuto velikost také uvádějí vědecké články [28, 43]. Před měřením byly jak samotné, tak enkapsulované liposomy naředěny 500 μ l ACS vody, a to z důvodu přílišné polydisperzity a nemožnosti detekovat velikosti jednotlivých liposomů. Přístroj byl nastaven na automatický režim, což znamená, že si přístroj sám vybírá optimální pozici pro měření vzorku v kyvetě. Do plastové kyvety byl napipetován vzorek o objemu 50 μ l. Refrakční index byl zvolen 1,456 [44, 45].



Obrázek 17. Přístroj Zeta-sizer Nano

6.7 Diferenční pulsní voltametrie

Stanovení platiny bylo provedeno elektrochemickou metodou diferenční pulsní voltametrie pomocí přístroje 663 VA Stand (Metrohm) v klasickém tříelektrodevém zapojení. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapka, referenční elektroda byla argentchloridová elektroda a jako pomocná slouží uhlíková elektroda. Koncentrace platiny byla měřena za přítomnosti 2 ml pufru. Analyzované vzorky byly probublávány argonem (99,999%) za účelem odstranění kyslíku po dobu 120 s. Poté byl platinovo-formazonový komplex akumulován na povrch HMDE po dobu 30 s při potenciálu $-0,5\text{ V}$ za stálého promíchávání. Koncentrace platiny byla odečtena z průměru třech po sobě následujících měření vzorků jednotlivých koncentrací. Potenciálové okno bylo nastaveno v rozmezí $-0,5\text{ V}$ do $-1,2\text{ V}$. Modulační čas pulsu byl nastaven na $0,057\text{ s}$, trvání intervalu na $0,1\text{ s}$, potenciálový krok na $1,95\text{ mV}$ a modulační amplituda byla nastavena na $49,5\text{ mV}$. Výsledkem měření je voltamogram, ze kterého lze pomocí velikosti proudového píku kvantifikovat množství cisplatiny ve vzorku [46].



Obrázek 18. Přístroj pro měření pomocí diferenční pulsní adsorpční voltametrie.

6.8 MTT test

Tento test se používá k určení viability nádorových buněk po inkubaci s cytostatiky. Při tomto testu je suspenze nádorových buněk přenesena do kultivační desky a po následné adhezi jsou buňky kultivovány s cytostatiky o zvoleném počtu různých koncentrací. Poté je k buňkám přidáván substrát, který jsou schopny metabolizovat pouze živé buňky a tím pádem umožní sledovat vliv cytostatika [47]. Přežití buněk je vyhodnoceno za užití spektrofotometrie. Metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan. Tato chemická reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan je následně rozpuštěn přidáním silného detergentu a fialové zabarvení je spektrofotometricky vyhodnocováno při vlnové délce 570 nm. Hodnota absorbance roztoku je přímo úměrná množství živých buněk [48]. Výsledek chování buněk za jednotlivých podmínek umožňuje vytvoření křivky závislosti na dávce a stanovení IC_{50} , což je efektivní koncentrace léčiva s 50 % mortalitou buněčné populace, z čehož pak lze vyvodit citlivost vzorku k danému cytostatiku [47].

Do 96jamkové destičky bylo vloženo 50 μ l média s 5000 buňkami, které se inkubovaly 24 hodin při 37 °C v atmosféře s 5% CO_2 . Poté bylo k buňkám přidáno 50 μ l média s danou koncentrací liposomální cisplatiny, ve vzestupné řadě od samotného média k maximální koncentraci. Působení látky bylo 24 hod při 37 °C v atmosféře s 5% CO_2 . Následně bylo do každé jamky přidáno 10 μ l 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (5 mg/l) doba inkubace byla 52 hod, poté bylo odsáto médium a přidáno 100 μ l DMSO. Vyhodnocení proběhlo absorbancí při vlnové délce 570 nm.

Test byl proveden na buněčných liniích MDA-MB-231 (prsní nádorová buněčná linie), A2780 (rakovinné buňky vaječníku) a UKF-NB-4 (nádorové buněčné linie neuroblastomu) a UKF-NB-4-CDDP (nádorové buněčné linie neuroblastomu rezistentní na cisplatinu).



Obrázek 19. MTT test - titrační destička.

7 Experimentální část

7.1 Elektrochemické stanovení cisplatiny a jeho optimalizace

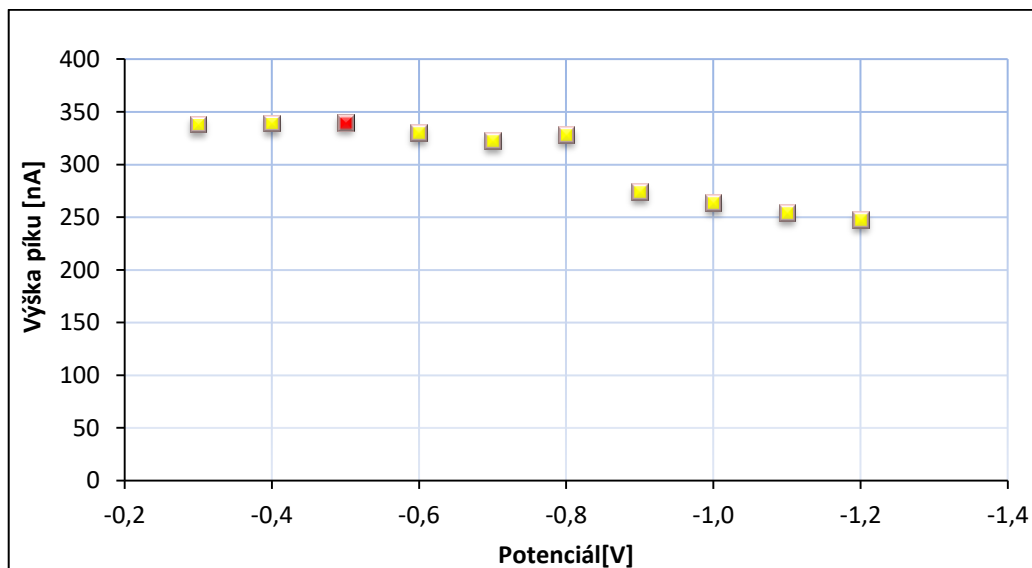
Elektrochemické metody jsou vhodné pro detekci kovových iontů, což bylo prokázáno v mnoha vědeckých pracích [49, 50, 51]. Tyto metody jsou také citlivé na detekci platinových skupin, u kterých je stále velkou komplikací kvantifikace pomocí spektroskopických technik [52, 53].

Elektrochemická detekce cisplatiny na HMDE

Katalytické vyvíjení vodíku je jednou z nejvíce citlivých elektrochemických metod užívaných pro detekci biologicky významných sloučenin [46]. Proto jsem tuto metodu použila i pro stanovení platiny.

Jako u každé elektrochemické metody bylo i zde nutné nejprve provést optimalizaci nastavení měření na HMDE. Rozsah testovaných hodnot jednotlivých parametrů byl zvolen na základě vědeckého článku [46] a následně testován na vzorku cisplatiny o koncentraci 0,05 $\mu\text{g/l}$. Pro měření byly poté vybrány nejvhodnější parametry.

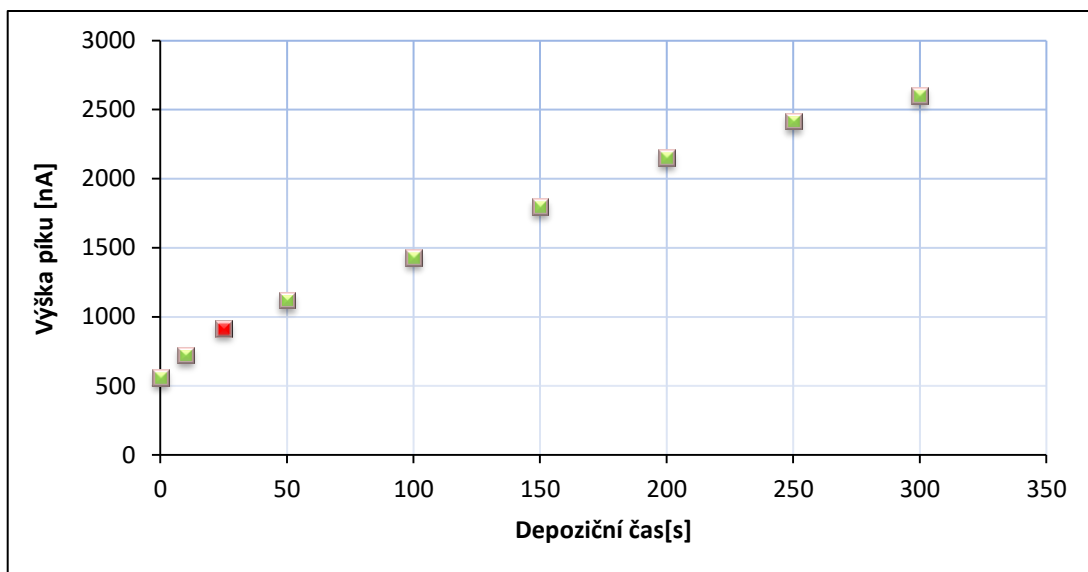
Optimalizace depozičního potenciálu a času



Obrázek 20. Optimalizace depozičního potenciálu.

Optimalizace depozičního potenciálu byla proměřena v rozmezí -0,2 V až -1,2 V. V tomto případě byl zvolen potenciál -0,5 V na základě hodnot naměřených pro testovací vzorek. Jak lze vidět z Obrázek 20, výška píku cisplatiny byla při tomto potenciálu největší.

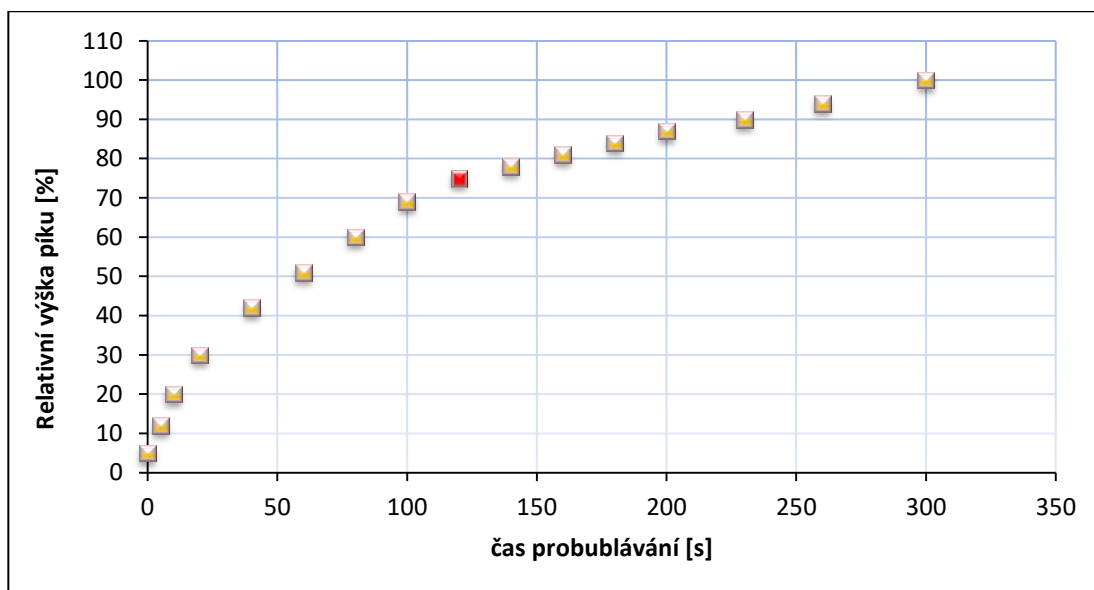
Optimalizace depozičního času



Obrázek 21. Optimalizace depozičního času.

Depoziční čas byl proměřen v rozmezí 0 až 350 s. Na základě kompromisu mezi dostatečnou výškou píku, kontaminací měřicí cely a trváním jednoho měření byl jako nejvhodnější čas zvolen čas 30 s.

Optimalizace času probublávání argonem

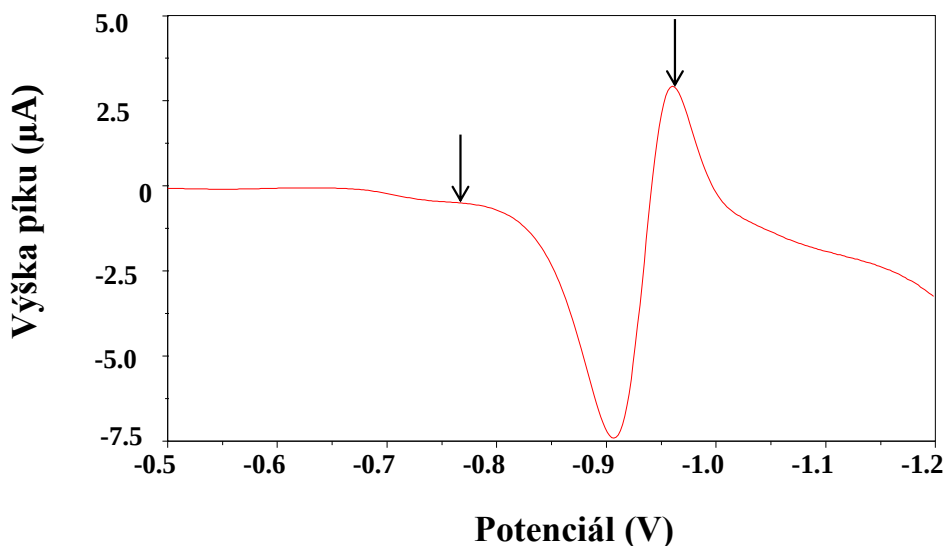


Obrázek 22: Optimalizace času probublávání.

Vliv doby probublávání měřeného elektrolytu argonem byl testován v rozmezí 0-350 s. I přesto, že výška píku rostla s prodlužujícím se časem probublávání i v čase delším než 120 s, bylo jako optimum zvoleno právě 120 s. Opět jako kompromis mezi dostatečnou citlivostí metody a trváním jednoho měření.

Volba počátečního a koncového potenciálu

Počáteční a koncový potenciál měřeného skenu byl volen na základě výskytu píku daného kovu. Cisplatinový pík se vyskytuje v oblasti mezi -0,65 V a -1,00 V. Při každém měření byl pík odečítán v rozmezí mezi -0,78 V a -0,97 V.



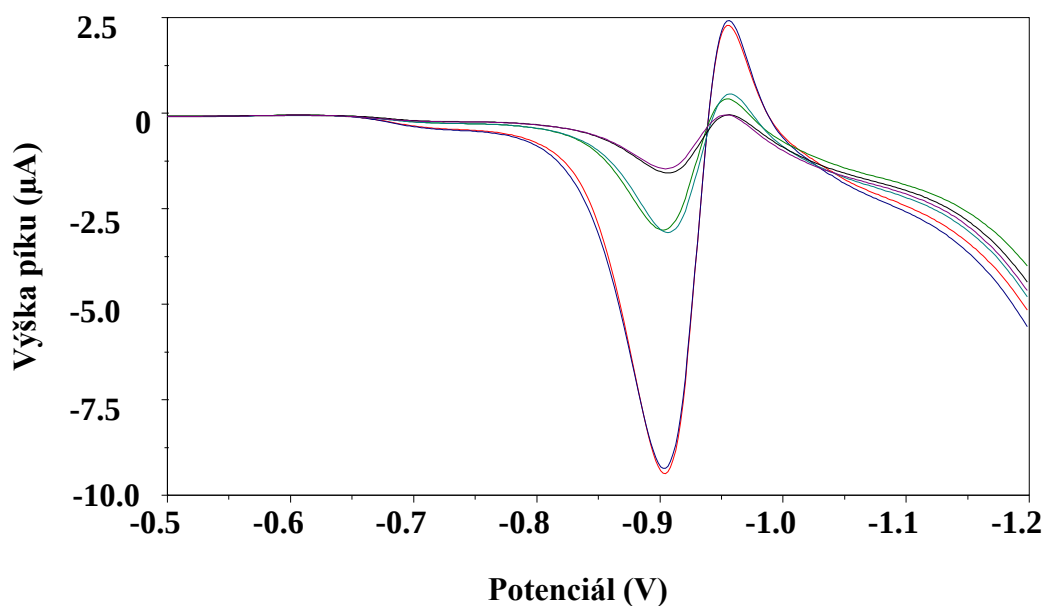
Obrázek 23. Optimalizace volby počátečního a koncového potenciálu.

Z důvodu přesnější a viditelnější detekce platinového píku byl jako počáteční potenciál zvolen potenciál -0,5 V a koncový potenciál -1,2 V.

Stanovení cisplatiny uzavřené v liposomech

Množství uzavřené platiny v liposomech bylo měřeno pomocí diferenční pulsní voltametrie s využitím pufru použitým pro detekci cisplatiny, jehož složení je popsáno v části Materiály a metody. Neuzavřená cisplatina byla odstraněna z povrchu liposomů pomocí centrifugace (po dobu 1h). Aby bylo možno měřit množství uzavřené cisplatiny, musely se liposomy rozbít pomocí mineralizace. V takto vzniklé směsi bylo následně detekováno množství cisplatiny.

Proto jsem zjišťovala, zda má přítomnost liposomů ve vzorku vliv na měření cisplatiny pomocí DPV, respektive zda je použitá mineralizační směs dostatečně účinná pro rozklad liposomů. Pro tento experiment bylo zmineralizováno šest vzorků. Každé dva vzorky vždy o stejné koncentraci cisplatiny, s tím rozdílem, že k jednomu bylo přidáno 10 mg liposomů L10 o velikosti 100 nm. Tyto vzorky byly zmineralizovány byla u nich stanovena koncentrace cisplatiny.



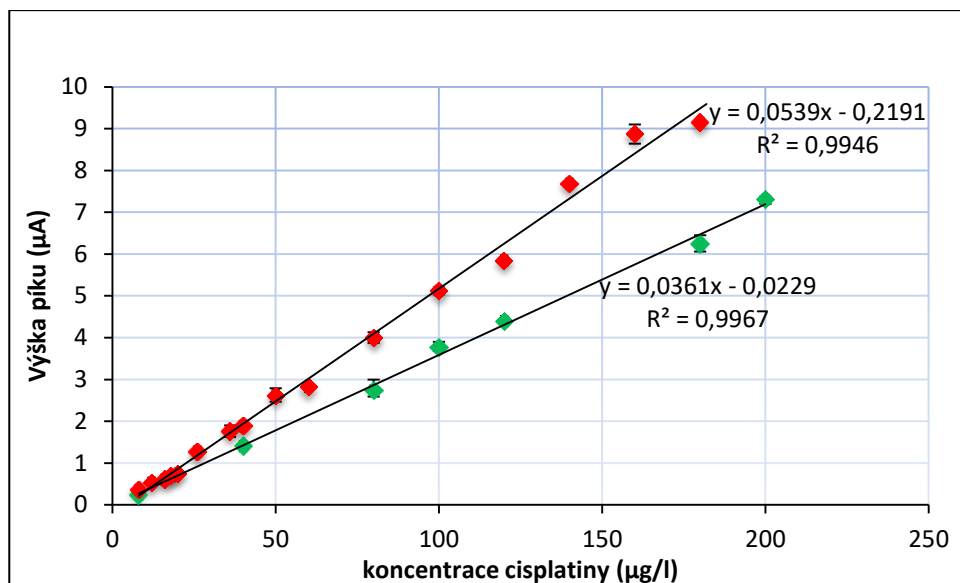
Obrázek 24. Srovnání voltamogramů naměřených pro vzorky cisplatiny s liposomy a bez liposomů, červená barva-cisplatina s liposomy o koncentraci 300 µg/l, tmavě modrá-pouze cisplatina o stejné koncentraci (300 µg/l), zelená- cisplatina s liposomy o koncentraci 120 µg/l, tyrkysová- cisplatina o stejné koncentraci (120 µg/l), černá- cisplatina s liposomy o koncentraci 40 µg/l, fialová- cisplatina o koncentraci 40 µg/l.

Tabulka 1. Vliv přítomnosti liposomů ve vzorku na výšku detekovaného signálu cisplatiny.

Koncentrace cisplatiny (µg/l)	Naměřená výška píku cisplatiny s liposomem (µA)	Směrodat. odchylka	Naměřená výška píku cisplatiny bez liposomu (µA)	Směrodat. odchylka	Výška píku cisplatiny z kalibrační křivky (µA)	Směrodat. odchylka
40	1,47	0,03	1,46	0,08	1,40	0,03
120	4,59	0,41	4,35	0,09	4,40	0,05
300	11,25	0,18	11,38	0,38	11,89	0,07

Jak lze vidět z Obrázek 24 a z Tabulky 1, rozbité liposomy v mineralizační směsi nemají vliv na výslednou výšku signálu cisplatiny, což znamená, že použitá mineralizační směs a zvolený mineralizační proces jsou dostatečně efektivní pro rozklad liposomů.

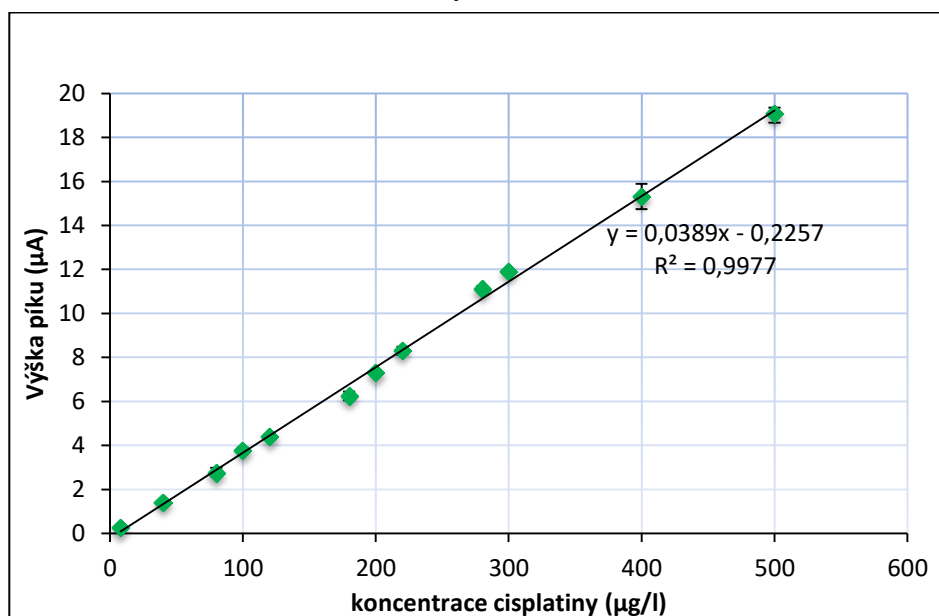
Pro stanovení cisplatiny byla naměřena kalibrační křivka standardu cisplatiny a následně cisplatiny v mineralizační směsi, a to za účelem zjištění, zda proces mineralizace ovlivňuje výšku detekovaného píku cisplatiny.



Obrázek 25. Kalibrační křivky cisplatiny před mineralizací (červeně) a po mineralizaci (oranžově).

Jak lze vidět z Obrázek 25, přítomnost mineralizační směsi snižuje citlivost stanovení cisplatiny. Kalibrační křivka cisplatiny bez mineralizační směsi disponuje vyšší citlivostí (0,0539) než kalibrační křivka cisplatiny v mineralizační směsi (0,0361). Přesnější hodnoty má však křivka mineralizované cisplatiny (0,9967). Pokud tedy vzorek před samotným elektrochemickým stanovením projde mineralizačním procesem, hodnoty koncentrace musí být odečítány z kalibrační křivky mineralizovaného standardu cisplatiny.

Nakonec byla naměřena optimální kalibrační křivka, která byla měřena v rozmezí koncentrací od 8 µg/l do 500 µg/l. Vyšší hodnoty koncentrace cisplatiny nebyly měřeny z důvodů přílišné kontaminace měřící cely, kdy každé další měření již není tak přesné jako předchozí z důvodu kontaminace měřící cely.



Obrázek 26. Kalibrační křivky mineralizované cisplatiny.

Z této kalibrační křivky jsou následně odečítány naměřené hodnoty koncentrace cisplatinu uzavřené v liposomech.

7.2 Příprava liposomů a studium jejich stability

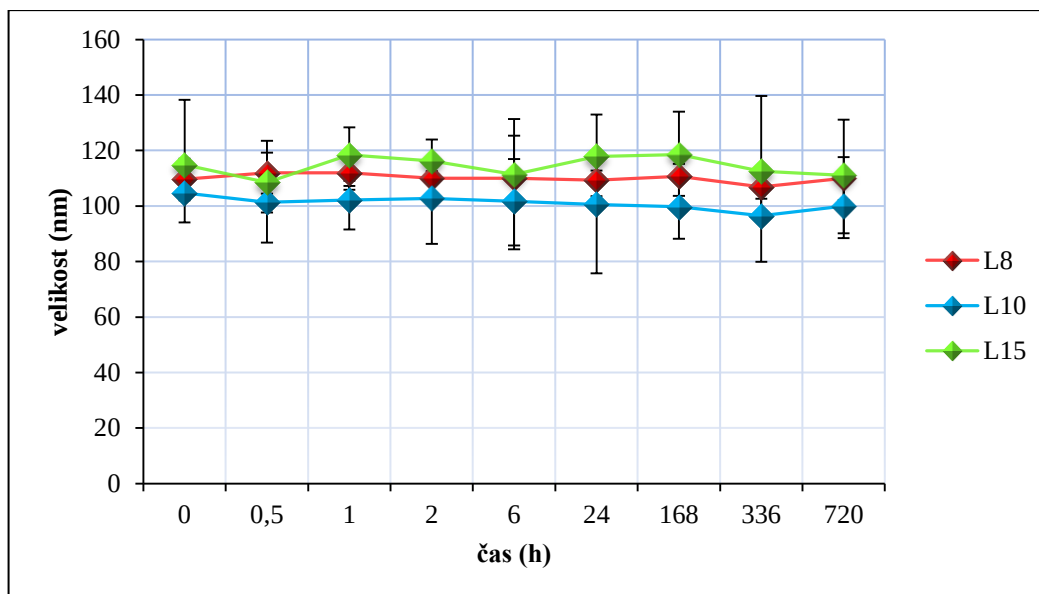
Pro tuto práci byly připraveny tři druhy liposomů, do kterých bylo následně uzavíráno cisplatinové cytostatikum. Aby byly jednotlivé druhy liposomů od sebe odlišeny, byly nazvány číselnými zkratkami L-8, L-10 a L-15. Liposomy byly dále extrudovány přes filtr o velikosti 100nm.

Studium stability liposomů napomocí Zeta sizeru

Velikost extrudovaných liposomů byla měřena pomocí koloidního analyzátoru v průběhu jednoho měsíce a tím byla sledována jejich stabilita. Předpoklad o stabilitě velikosti liposomů extrudovaných přes filtry vychází z práce, kde byl již tento faktor studován [54]. Liposomy byly měřeny v devíti opakováních v každém daném časovém okamžiku. Poté byla vypočtena střední hodnota jejich velikostí, přičemž na základě testu odlehlosti, kdy dolní hranice byla rovna $D = \mu_{0,025}$ a horní hranice byla rovna $H = \mu_{0,975}$, byly vyřazeny odlehlé hodnoty. Následně byla data testována pomocí Shapiro-Wilkova testu aplikovaného v programovém prostředí R, jestli splňují podmínky normality.

Tabulka 2. P-hodnoty Shapiro-Wilkova testu pro testování normality dat z velikostí tří druhů liposomů měřených v průběhu jednoho měsíce.

Čas (h)	p-hodnota liposomu L8	p-hodnota liposomu L10	p-hodnota liposomu L15
0	0,48	0,15	0,09
0,5	0,53	0,28	0,25
1	0,53	0,13	0,45
2	0,63	0,38	0,11
6	0,53	0,96	0,83
24	0,76	0,18	0,79
168	0,30	0,85	0,54
336	0,85	0,50	0,26
720	0,77	0,24	0,93

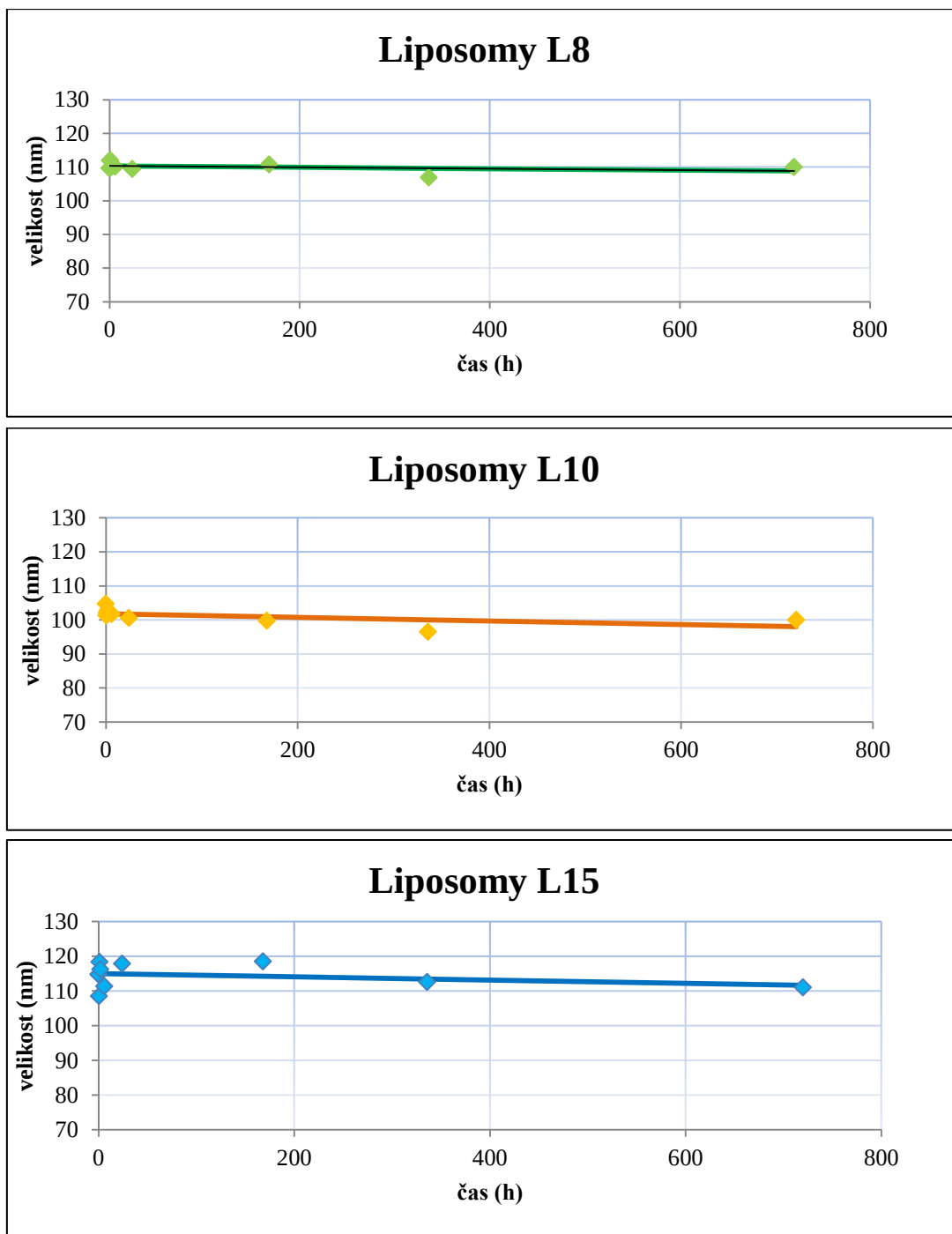


Obrázek 27. Změna velikosti prázdných 100 nm liposomů v čase.

Jak lze vidět z Tabulky 2., naměřená data mají normální rozložení (žádná p-hodnota neklesla pod hodnotu 0,05), proto na ně bez dalších úprav můžeme aplikovat lineární test regrese.

Tabulka 3. P-hodnoty testu regrese vypočtené z hodnot velikostí liposomů v průběhu jednoho měsíce

druh liposomu	p-hodnota fyziologický roztok
L8	0,37
L10	0,12
L15	0,41



Obrázek 28. Změna velikostí liposomů L8, L10 a L15 v časovém úseku jednoho měsíce - test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data.

Jak lze vidět z Obrázek 27 a Obrázek 28, velikost liposomů se v průběhu času statisticky významně nemění. Žádná p-hodnota neklesla pod hodnotu 0,05. Chybové úsečky jsou poměrně velké, což je způsobeno rozptylem naměřených hodnot nebo polydisperzitou vzorku. Takto vyrobené liposomy tedy považují za stabilní v čase.

7.3 Uzavírání cisplatiny do liposomů

Cisplatina byla uzavírána do liposomů dle popisu uvedeném v části Materiály a metody. Koncentrace cisplatiny byla stanovena podle postupu uvedeném ve stejné části práce.

Obvyklá terapeutická dávka cisplatiny je 3 µg/ml [55]. Pro další práci bylo nutné zjistit, kolik cisplatiny jsme schopni uzavřít do jednotkového množství námi připravených liposomů. Účinnost enkapsulace byla testována na 10 mg liposomů L8 a to v rozmezí 3,8 až 15 µg cisplatiny na 1 vzorek.

Tabulka 4. Stanovení schopnosti liposomu L8 uzavírat cisplatinu o dané koncentraci

množství cisplatinového roztoku o koncentraci 0,2 g/l	Naměřené množství cisplatiny v µg	očekávané množství cis Pt (µg)	uzavřená cisplatina v %
19 µl	0,24	3,80	6,41
	0,17	3,80	4,55
	0,17	3,80	4,46
38 µl	0,32	7,60	4,15
	0,46	7,60	6,02
	0,57	7,60	7,50
75 µl	1,38	15,00	9,21
	1,35	15,00	8,99
	1,34	15,00	8,92

Z výsledků experimentu plyne, že nejvyšší účinnost uzavírání cisplatiny byla přibližně 9 %, a to když dojde k přidání 75 µl roztoku cisplatiny o koncentraci 0,2 g/l do 10 mg liposomů. Při nižších množstvích cisplatiny byla tato účinnost menší, zhruba poloviční. Bylo tedy rozhodnuto, že bude uzavíráno 75 µl cisplatiny o koncentraci 2,6 g/l, díky které bude v každé epince s liposomy obsahující 10 mg liposomů jedna terapeutická dávka uzavřené cisplatiny.

Do všech druhů liposomů bylo tedy uzavíráno 75 µl roztoku cisplatiny o koncentraci 2,6 g/l dle postupu popsáném v kapitole Materiály a metody. Po mineralizaci byla měřena koncentrace cisplatiny jak v liposomech, tak v supernatantu a ta byla následně porovnána s očekávanými hodnotami, které byly vypočteny na základě znalosti původního množství cisplatiny (196 µg), které bylo do liposomů uzavíráno.

Tabulka 5. Množství uzavírané cisplatiny do tří druhů liposomů, supernatantu a výpočet ztráty množství cisplatiny v průběhu extruze

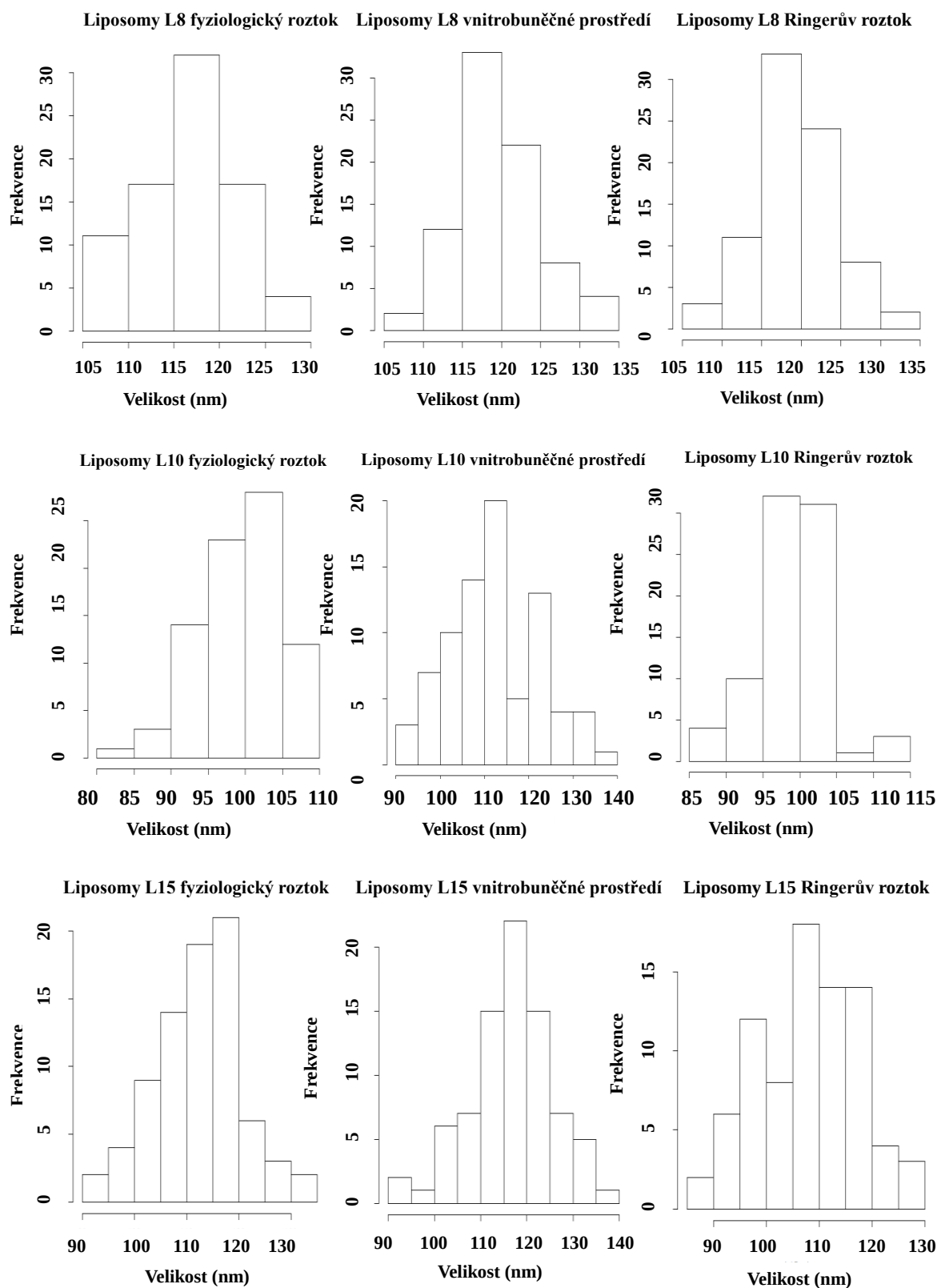
Typ liposomu	Množství cisplatiny uzavřené v liposomech (μg)	Množství cisplatiny v supernatantu (μg)	Vypočítané očekávané množství cisplatiny (μg)	Rozdíl (μg)	Rozdíl v %
L8	13,14	145,73	196,00	23,98	12,24
	14,71	141,59	196,00	25,00	12,75
	14,61	139,74	196,00	27,04	13,80
L10	10,29	152,08	196,00	23,34	11,91
	10,95	153,53	196,00	20,57	10,49
	11,70	153,31	196,00	19,30	9,85
L15	7,49	130,89	196,00	50,13	25,58
	7,74	133,81	196,00	62,19	27,78
	8,53	133,62	196,00	62,40	27,49

Jak je vidět z Tabulky 5, rozdíl mezi očekávaným množstvím a změřeným množstvím se pohybuje v rámci 30 %, což je způsobeno ztrátou cisplatiny v průběhu extruze pomocí extrudéru. Liposomy L10 byly schopny uzavřít 5,5 % cisplatiny, liposomy L8 okolo 7 % a liposomy L15 3,5 %. Uzavírání cisplatiny o vyšší koncentraci sice nedosáhlo očekávaných 8 %, ale ve všech případech je v liposomech uzavřena alespoň jedna terapeutická dávka.

7.4 Studium stability liposomů s uzavřenou cisplatinou

Stabilita liposomů s uzavřenou cisplatinou byla studována pomocí měření jejich velikostí v čase. Velikost liposomů byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla. Chování liposomů bylo studováno ve třech různých prostředích, ve fyziologickém roztoku, ve vnitrobuněčném roztoku a v Ringerově roztoku (analog lidské plazmy).

Liposomy byly měřeny v devíti opakováních při každém časovém okamžiku. Poté byla vypočtena jejich střední hodnota a na základě testu odlehlosti, kdy dolní hranice byla rovna $D = \mu_{0,025}$ a horní hranice byla rovna $H = \mu_{0,975}$, byly vyřazeny odlehlé hodnoty. Dále byla data testována, zda splňují podmínku normality.



Obrázek 29. Histogramy rozložení naměřených hodnot velikostí liposomů v jednotlivých prostředích po dobu jednoho měsíce v rámci tří druhů liposomů L10, L8, L15.

Rozložení naměřených dat v průběhu jednoho měsíce lze vidět na Obrázek 29. Normalita dat byla testována na základě Shapiro-Wilkova testu. Pokud by byla hodnota $p < 0,05$, data nesplňují podmínku normality. Pro přehlednost jsou p-hodnoty jednotlivých liposomů v jednotlivých prostředích vyjádřeny v Tabulce 6-8.

Tabulka 6. P-hodnota Shapiro-Wilkova testu pro testování normality naměřených dat pro liposomy L8.

druh liposomu	čas (h)	fyziologický roztok (p-hodnota)	vnitrob. prostředí (p-hodnota)	Ringerův roztok (p-hodnota)
L8	0	0,34	0,37	0,31
	0,5	0,79	0,64	0,41
	1	0,68	0,29	0,11
	2	0,78	0,80	0,78
	6	0,68	0,83	0,80
	24	0,70	0,47	0,33
	168	0,44	0,14	0,59
	336	0,95	0,95	0,09
	720	0,71	0,80	0,45

Tabulka 7. P-hodnota Shapiro-Wilkova testu pro testování normality naměřených dat pro liposomy L10.

druh liposomu	čas (h)	fyziologický roztok (p-hodnota)	vnitrob. prostředí (p-hodnota)	Ringerův roztok (p-hodnota)
L10	0	0,42	0,65	0,95
	0,5	0,37	0,52	0,36
	1	0,08	0,09	0,89
	2	0,32	0,32	0,13
	6	0,33	0,57	0,96
	24	0,51	0,52	0,25
	168	0,95	0,38	0,42
	336	0,84	0,39	0,11
	720	0,27	0,34	0,82

Tabulka 8. P-hodnota Shapiro-Wilkova testu pro testování normality naměřených dat pro liposomy L15.

druh liposomu	čas (h)	fyzilogický roztok (p-hodnota)	vnitrob. prostředí (p-hodnota)	Ringerův roztok (p-hodnota)
L15	0	0,42	0,47	0,16
	0,5	0,37	0,96	0,74
	1	0,08	0,38	0,52
	2	0,32	0,66	0,89
	6	0,68	0,56	0,90
	24	0,51	0,84	0,95
	168	0,90	0,95	0,94
	336	0,84	0,95	0,05
	720	0,49	0,07	0,46

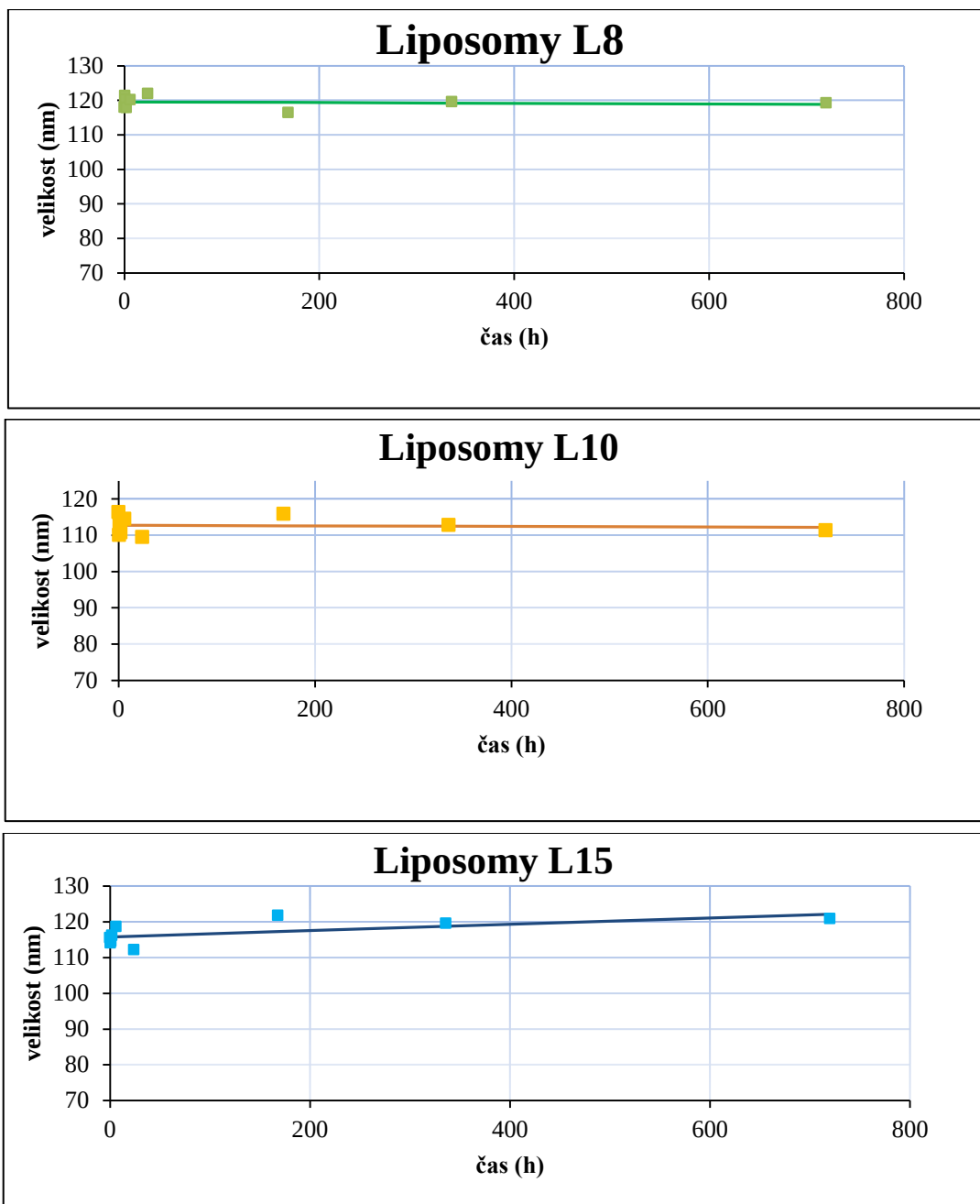
Jak lze vidět z těchto tabulek, žádná z p-hodnot v žádném prostředí v průběhu jednoho měsíce není menší než 0,05, tato data tedy považujeme za data s normálním rozdělením.

Takto zpracovaná data byla použita pro další analýzu. V další části jsem se zabývala ověřením, zda jsou daná data v rámci jednotlivých prostředí stabilní, tj. jejich velikost je stálá. Byly provedeny testy stability pomocí t-testu regresního parametru v rámci jednotlivých liposomů v jednotlivých prostředích.

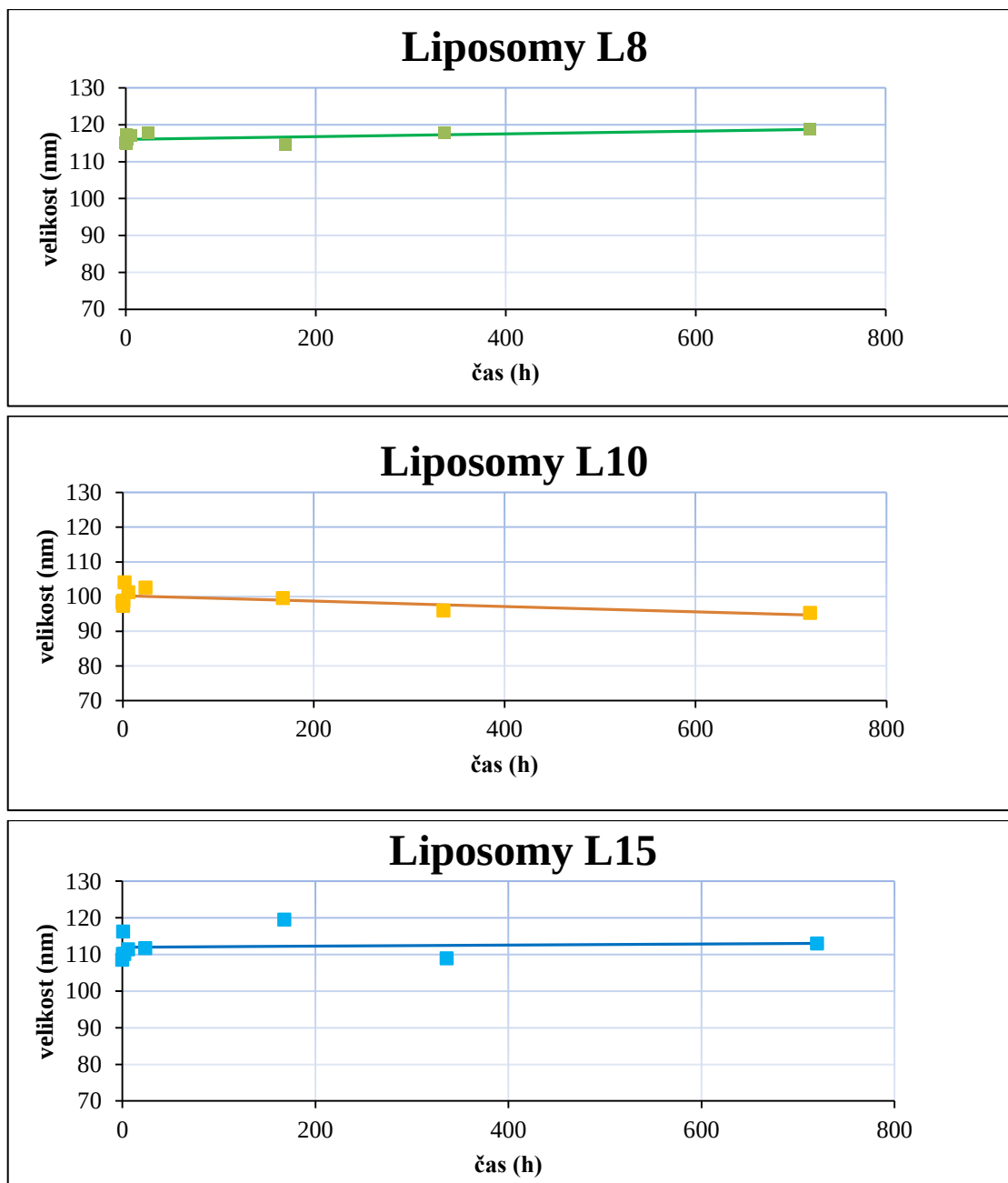
Tabulka 9. P-hodnota testu lineární regrese jednotlivých liposomů v rámci každého prostředí

druh liposomu	fyzilogický roztok	vnitrobuněčný roztok	Ringerův roztok
L8	0,09	0,71	0,99
L10	0,06	0,83	0,85
L15	0,80	0,05	0,06

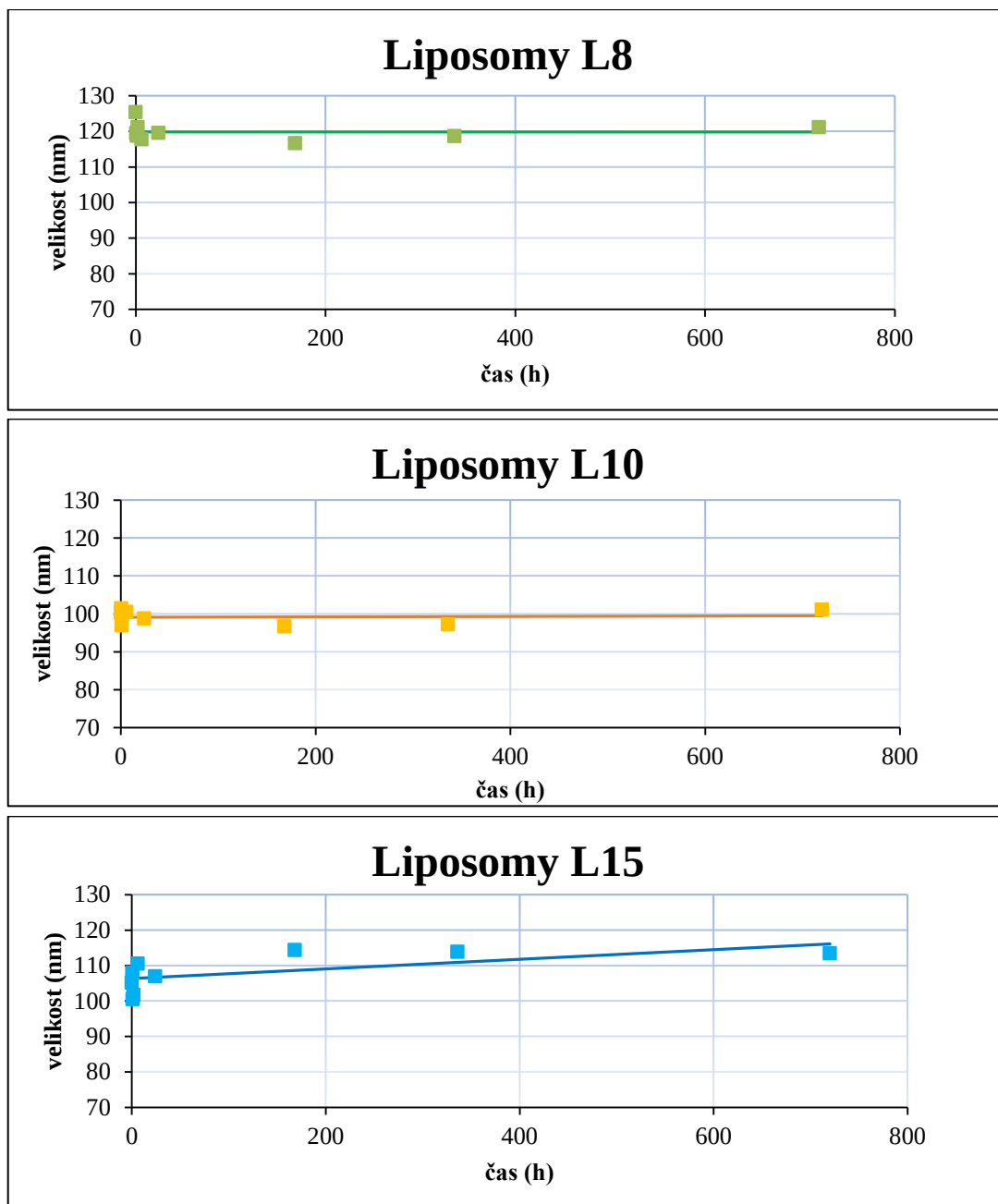
Jak lze vidět z Tabulky 9., byla hodnota p-hodnota u regresního parametru nad prahovou hodnotu 0,05. Můžeme tedy říct, že rozměry liposomů se s časem v rámci jednotlivých prostředí statisticky významně nemění. Tuto skutečnost lze vidět i v následujících třech obrázcích, které graficky znázorňují výsledky testu lineární regrese.



Obrázek 30. Velikost liposomů L8, L10 a L15 s uzavřenou cisplatinou v časovém úseku jednoho měsíce ve vnitrobuněčném prostředí- test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data

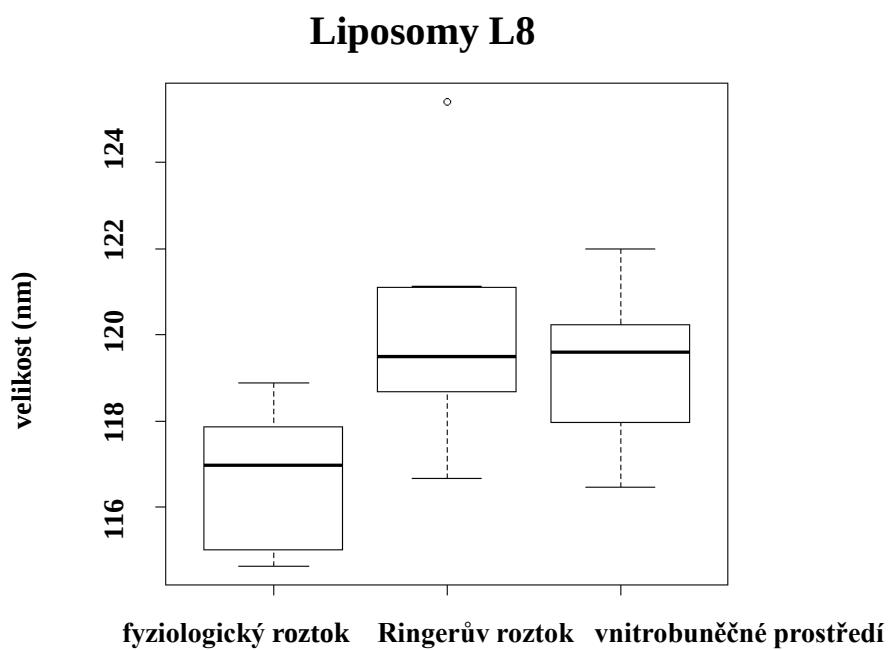


Obrázek 31. Velikost liposomů L8, L10 a L15 s uzavřenou cisplatinou v časovém úseku jednoho měsíce ve fyziologickém roztoku- test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data

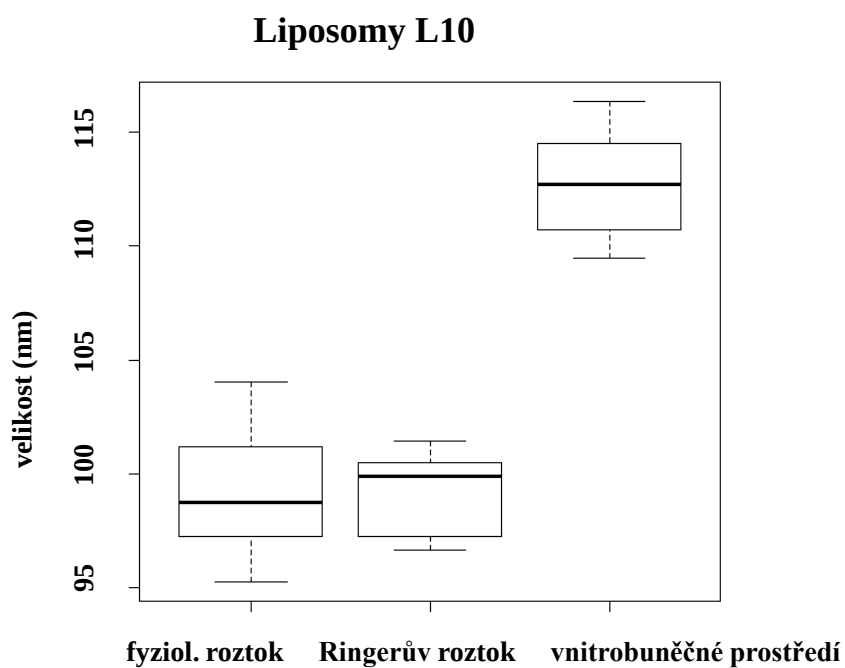


Obrázek 32. Velikost liposomů L8, L10 a L15 s uzavřenou cisplatinou v časovém úseku jednoho měsíce v Ringerově roztoku- test lineární regrese, přímka značí očekávaná data, body originální data

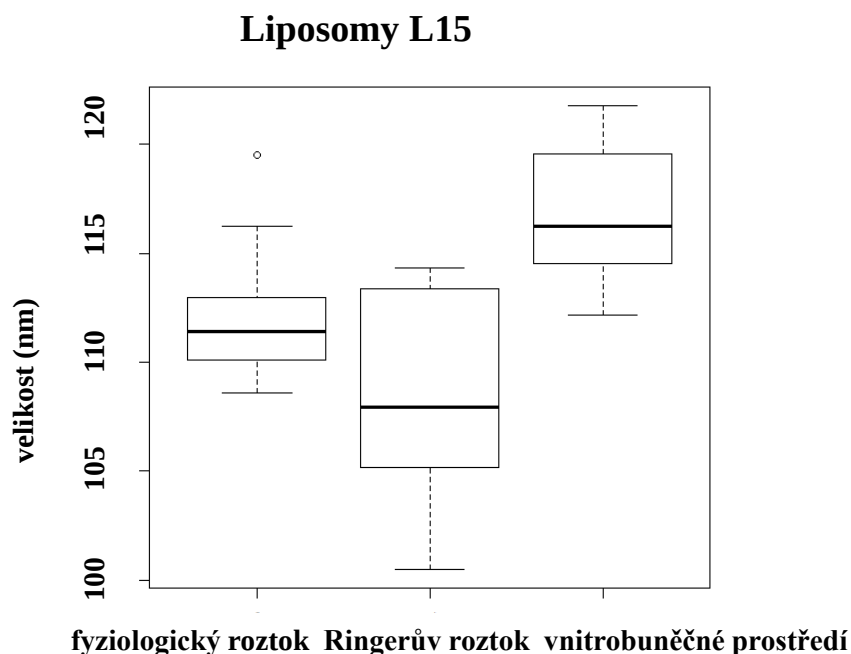
Dále bylo testováno pomocí testu ANOVA, zda se velikosti liposomů mění ve srovnání mezi jednotlivými prostředními. Výsledkem testu ANOVA bylo, že liposomy L10 se v rámci prostředí liší s p-hodnotou 0,004, Liposomy L8 s p-hodnotou taktéž 0,004 a liposomy L15 se liší s p-hodnotou 0,0006. Tyto hodnoty jsou nižší než prahová hodnota 0,05, proto pozorujeme mezi těmito daty statisticky významný rozdíl.



Obrázek 33. Boxplot velikostí liposomů L8 v jednotlivých prostředcích.



Obrázek 34. Boxplot velikostí liposomů L10 v jednotlivých prostředcích.



Obrázek 35. Boxplot velikostí liposomů L15 v jednotlivých prostředích.

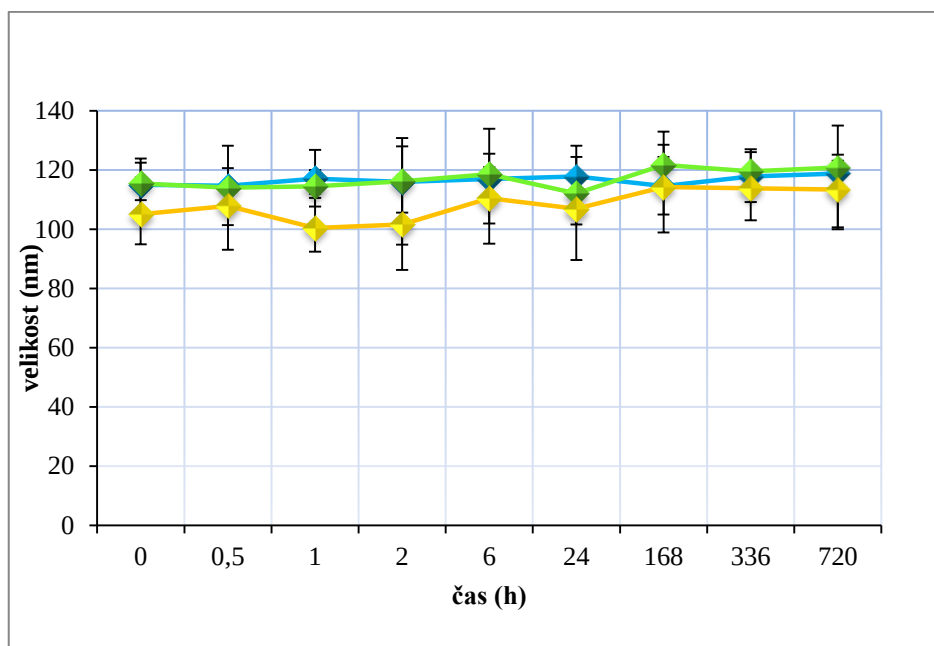
ANOVA prokázala statisticky významný rozdíl v jednotlivých skupinách, proto jsem provedla následný Tukeyův test pro porovnání jednotlivých dvojic prostředí.

Tabulka 10. P-hodnoty z Tuckeyho testu rozdílů mezi velikostmi liposomů v rámci rozdílných prostředí

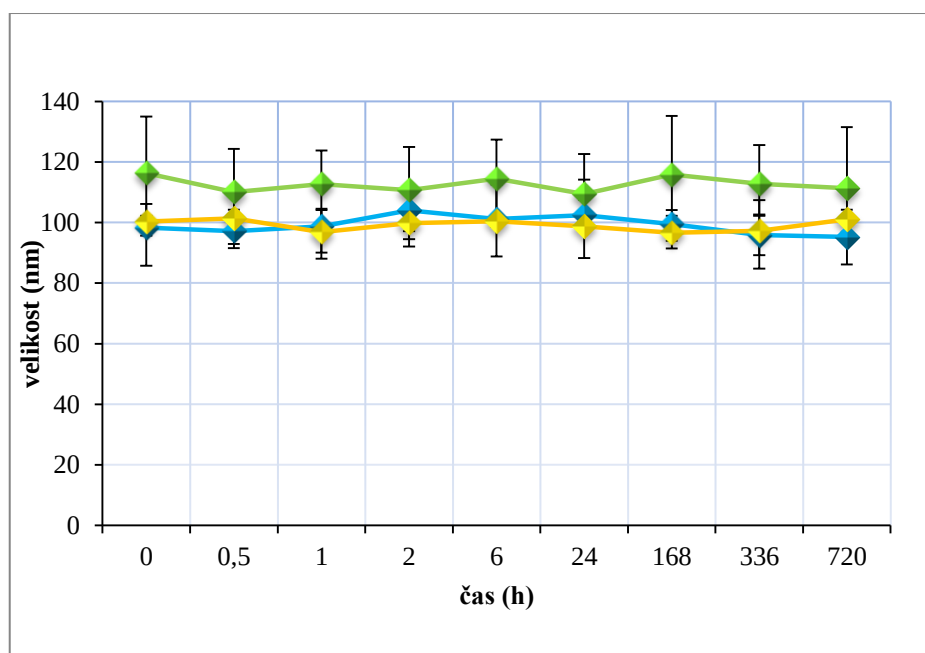
	p-hodnota L10	p-hodnota L8	p-hodnota L15
plazma-fyziologický roztok	0,990	0,005	0,127
vnitrobuněčné prostředí-fyziologický roztok	0,000	0,015	0,049
vnitrobuněčné prostředí-Ringerův roztok	0,000	0,904	0,00039

Jak lze vidět z výsledků ANOVY a Tuckeyho testu a z vykreslených boxplotů, byl prokázán rozdíl mezi velikostmi liposomů v různých prostředích. U liposomu L10 se nejvíce odlišovaly velikosti liposomů ve vnitrobuněčném prostředí, kdy statistický rozdíl mezi naměřenými hodnotami byl významný, od liposomů ve fyziologickém roztoku a v Ringerově roztoku. To samé můžeme pozorovat v případě liposomů L15, kde ale není rozdíl mezi jednotlivými prostředími tak velký. V případě liposomů L8 nepozorujeme v rámci měření žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými prostředími, jelikož p-hodnota neklesla pod 0,05.

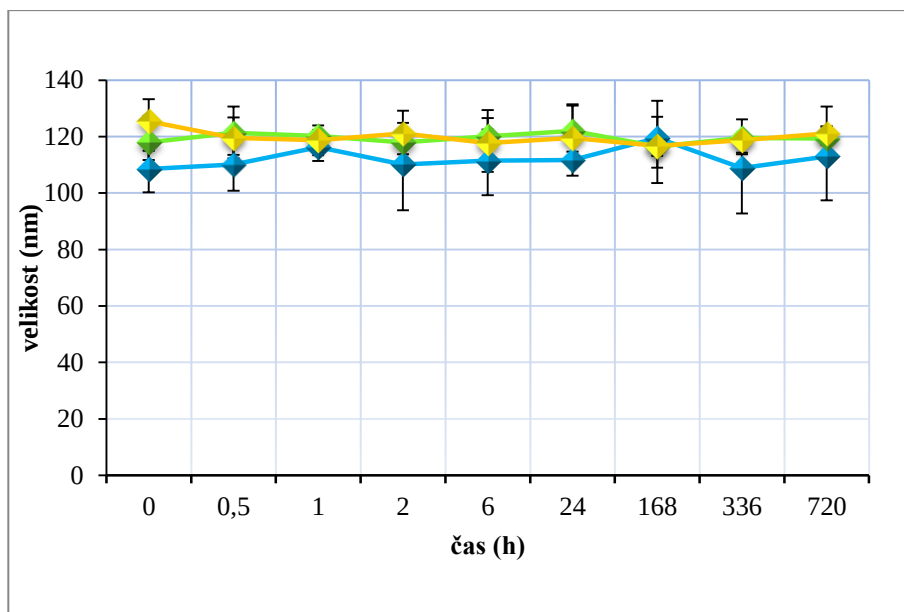
Jednotlivé stability liposomů v čase v různých prostředích jsou názorně vykresleny v následujících třech grafech.



Obrázek 36. Změna velikosti liposomů s uzavřenou cisplatinou v průběhu času liposomy L8 (modrá-fyzilogický roztok, zelená-vnitrobuněčné prostředí, žlutá-Ringerův roztok).



Obrázek 37. Změna velikosti liposomů s uzavřenou cisplatinou v průběhu času liposomy L10 (modrá-fyzilogický roztok, zelená-vnitrobuněčné prostředí, žlutá-Ringerův roztok).



Obrázek 38. Změna velikosti liposomů s uzavřenou cisplatinou v průběhu času liposomy L15 (modrá-fyziologický roztok, zelená-vnitrobuněčné prostředí, žlutá-Ringerův roztok).

Jak lze vidět i z těchto grafů, velikost liposomů s uzavřenou cisplatinou se v průběhu času nemění, mění se velikosti pouze v rámci různých prostředí. Díky těmto poznatkům budeme předpokládat, že odtok uzavřené cisplatin v čase je minimální. Dále bylo provedeno měření pomocí diferenční pulsní voltametrie, ve kterém byl tento předpoklad ověřován.

Měření stability liposomů s uzavřenou cisplatinou pomocí diferenční pulsní voltametrie

Stabilita liposomů s uzavřenou cisplatinou byla studována v závislosti na čase. Bylo provedeno měření jednotlivých druhů liposomů v daných časových intervalech.

Množství cisplatin uzavřené v liposomech bylo měřeno následujícím způsobem. Cisplatina byla do liposomů uzavřena dle návodu uvedeném v části Materiály a metody a byl vyroben směsný vzorek, který byl alikvótně rozdělen. Vzorky byly centrifugovány a poté z nich byl odsát supernatant. Dále byly vzorky mineralizovány, a to přidavkem 450 μ l mineralizační směsi. Z mineralizované směsi bylo odebráno 10 μ l roztoku a zředěno 990 μ l fyziologického roztoku z důvodu nutného snížení koncentrace měřeného vzorku (aby byla detekovaná koncentrace v rámci lineárního rozsahu detekce). Z tohoto vzorku bylo poté odebíráno 20 μ l a měřeno s 1980 μ l pufru pro měření platiny.

Tabulka 11. Množství cisplatiny uzavřené v liposomech v průběhu 24 hodinového časového úseku ve třech různých prostředích

Druh liposomu	Čas (h)	Množství (μg) cisplatiny v 10 mg liposomů fyziologický roztok	Množství (μg) cisplatiny v 10 mg liposomů vnitrobuněčné prostředí	Množství (μg) cisplatiny v 10 mg liposomů Ringerův roztok
L8	0	12,63	13,68	11,94
	1	14,50	13,43	12,01
	6	17,76	11,69	11,58
	24	17,76	10,88	10,19
L10	0	13,40	14,72	13,59
	1	15,86	14,22	12,89
	6	14,22	13,68	7,19
	24	14,15	8,42	6,28
L15	0	5,45	5,15	4,60
	1	5,27	5,19	1,99
	6	5,81	3,33	15,41
	24	3,58	2,21	15,64

Jak lze vidět z Tabulky 4, liposomy s uzavřenou cisplatinou jsou ve fyziologickém roztoku v čase stabilní, nezaznamenáváme zde výrazný odtok cisplatinového léčiva. Ve vnitrobuněčném prostředí naopak po šesti hodinách dochází k částečnému odtoku cisplatiny, to samé proběhlo v Ringerově roztoku. Měření bylo prováděno pouze v časovém rozmezí 24 h, z toho důvodu, že doba účinnosti liposomu s léčivem nebude v těle delší než 24 h, a to z důvodu interakce s biomolekulami organismu.

7.5 Studium účinku připravených liposomálních cisplatin na živé buňky

Stanovení koncentrace cisplatiny v liposomech

Do liposomů bylo uzavíráno takové množství cisplatiny, aby každá dávka aplikovaná na buňky obsahovala koncentraci nejméně 30 μg /ml kvůli testování pomocí MTT testu. Byl vytvořen jeden kontrolní vzorek samotné cisplatiny o koncentraci 45,2 μg/l. Každý vzorek byl poté změřen pomocí diferenční pulsní voltametrie stejným způsobem, jak bylo popsáno v předchozích kapitolách. Každé měření bylo provedeno čtyřikrát, na základě testu odlehlosti vyřazeny odlehlé hodnoty a následně byl použit průměr naměřených hodnot již bez hodnot odlehlých.

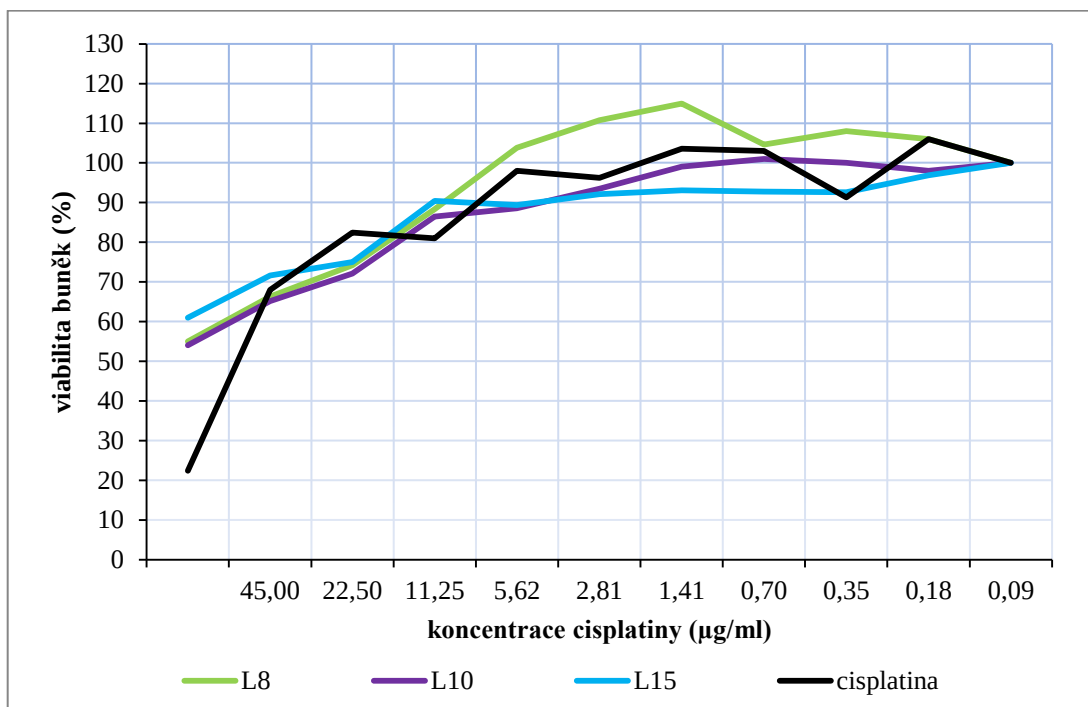
Tabulka 12. Koncentrace cisplatiny uzavřené v liposomech, které byly aplikovány na nádorové buňky.

Druh liposomu	Koncentrace cisplatiny (µg/ml)
L8	66,77
L10	45,38
L15	101,28
cisplatina	45,20

Jak lze vidět z této tabulky, jednotlivé koncentrace uzavřené cisplatiny v liposomech se liší. Množství liposomů s cisplatinou, které interagovalo s buňkami, bylo počítáno dle měření v kapitole 7.3. Průměrné množství uzavřené cisplatiny u liposomů L15 okolo 7 µg v 10 mg liposomu, u L8, přibližně 14 µg a u L10 přibližně 11 µg. Na základě těchto znalostí bylo použito konkrétní množství liposomů s uzavřenou cisplatinou, které se lišilo dle druhu liposomu. Liposomy L15 nejsou schopny uzavírat dostatečné množství cisplatiny, proto jich bylo přidáno více mg a to je důvodem vysoké koncentrace cisplatiny.

MTT test- reakce liposomů s uzavřenou cisplatinou s nádorovými buňkami

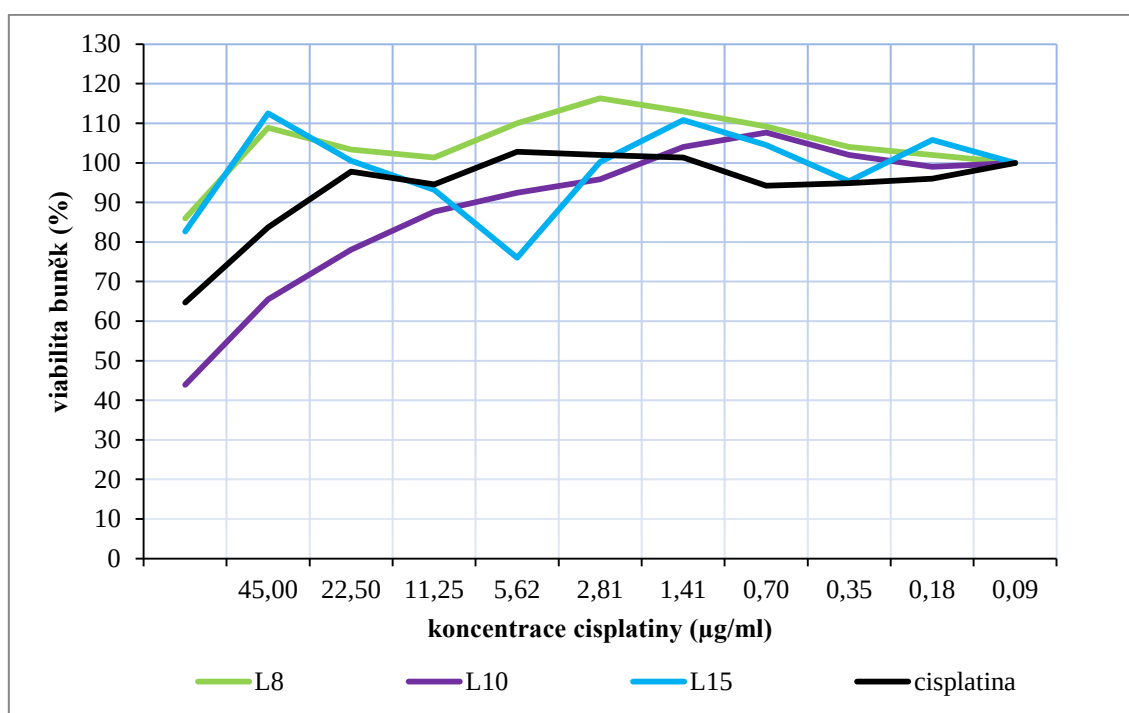
Buňky NB4



Obrázek 39. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami NB4 (nádorové linie neuroblastomu).

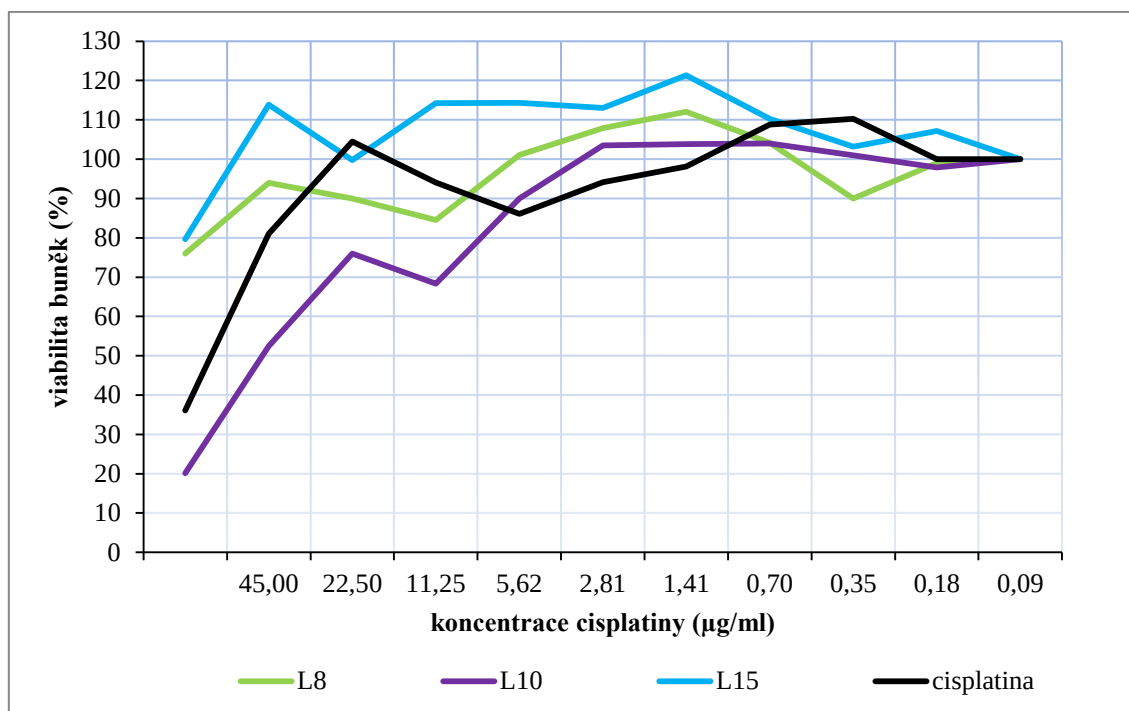
Jak lze vidět z Obrázek 39, z osy y, ze které můžeme vyčíst viabilitu buněk nádoru nervové tkáně neuroblastomu, největší účinnost na nádorové buňky NB4 má samotná cisplatina, kdy po aplikaci koncentrace 45 $\mu\text{l/ml}$ dojde k přežití pouze 20 % nádorových buněk. Z liposomů s uzavřenými cytostatiky mají největší účinnost liposomy L10 a L8, které byly schopny dopravit dostatečné množství cytostatika, aby viabilita buněk klesla alespoň k 50 %. Naopak nejnižší účinnost má cisplatina uzavřená v liposomech L15.

Buňky MDA-MB231



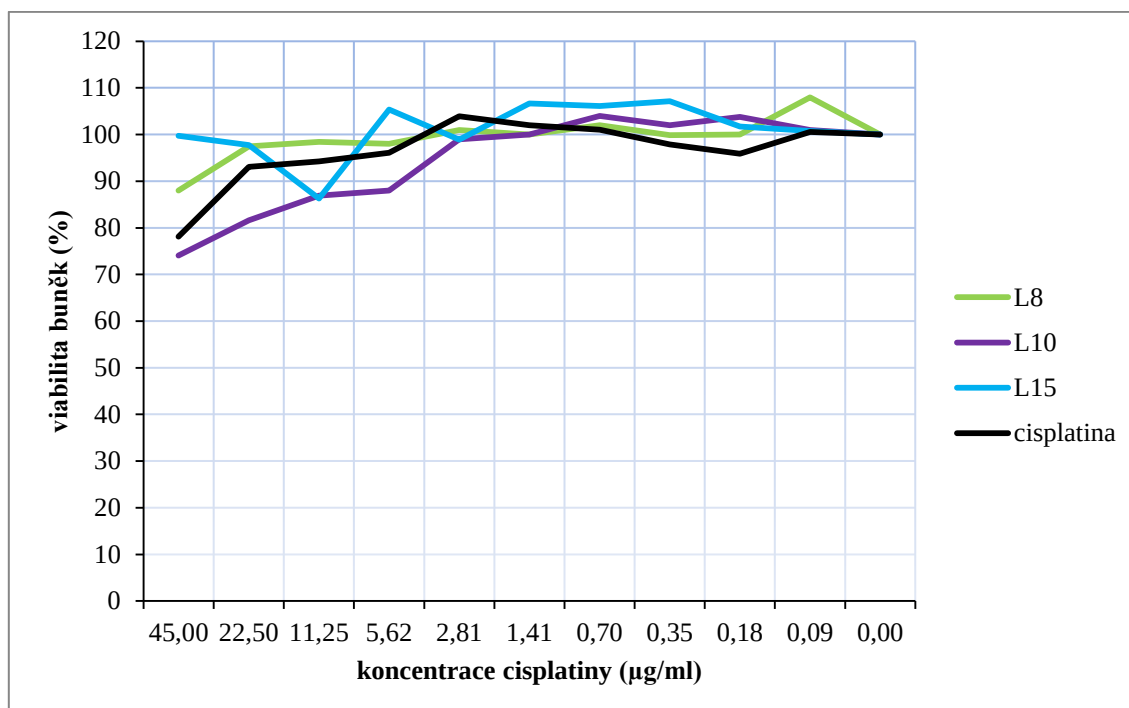
Obrázek 40. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami MDA-MB231 (nádorové buňky prsu).

Jak lze vidět z viability buněk na Obrázek 40, největší účinnost na nádorové buňky prsu MDA-MB231 mají liposomy L10, kdy po aplikaci liposomální platiny o koncentraci 45 $\mu\text{l/ml}$ dojde k 45 % přežití nádorových buněk. Nejnižší účinnost má cisplatina uzavřená v liposomech L8 a L15, kde se viabilita buněk i při nejvyšší koncentraci pohybovala okolo 85 %.



Obrázek 41. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami A2780 (nádorové buňky vaječníku)

Jak lze vidět z Obrázek **41**, největší účinnost na nádorové buňky vaječníku A2780 má cisplatina s liposomy L10, kdy po aplikaci koncentrace 45 µl/ml dojde k 20 - 35% přežití nádorových buněk. Nejnižší účinnost má znovu cisplatina uzavřená v liposomech L15, kdy viabilita buněk při nejvyšší koncentraci byla 80 %.



Obrázek 42. Interakce liposomů s enkapsulovanou cisplatinou s nádorovými buňkami NB4 rezistentními na cisplatinu (nádorové buněčné linie neuroblastomu).

Jak lze vidět z viability buněk u nádorových buněčných linií rezistentních na cisplatinu, viabilita buněk ve všech případech byla větší než 65 %, a to dle očekávání. Účinnost cisplatinového léčiva byla tedy snížena z důvodu rezistence nádorových buněk na platinová cytostatika. Na tuto nádorovou linii působily nejúčinněji liposomy L10 a samotné platinové cytostatikum, které byly schopny dopravit dostatečné množství cytostatika, aby viabilita byla menší než 80 %. Nejnižší účinnost měly liposomy L15, kdy viabilita buněk i při nejvyšší koncentraci přesahovala 95 %.

8 Diskuse

Pro dosažení hlavního cíle práce bylo nutné nejdříve provést optimalizaci detekční metody pro elektrochemické stanovení platiny. Základní nastavení metody bylo provedeno dle článku [46]. Po testování byly zvoleny jako optimální následující hodnoty. Depoziční potenciál byl zvolen -0,5 V, protože výška píku cisplatiny byla při tomto potenciálu nejvyšší. Depoziční čas byl zvolen na základě kompromisu mezi dostatečnou výškou píku, zvýšenou kontaminací měřicí cely a délkou depozičního času 30 s. Čas probublávání argonem byl zvolen 120 s. Tato hodnota byla vybrána proto, aby se příliš neprodlužoval čas jednotlivých analýz a nedocházelo ke zvýšené kontaminaci měřicí cely, což mělo za následek zkreslení jednotlivých analýz měření. Počáteční a koncový potenciál byl po testování nastaven na -0,5 a -1,2 V z důvodu toho, že cisplatinový pík se vyskytuje v oblasti mezi -0,65 V a -1,00 V. Takto nastavené parametry byly používány po celou dobu měření.

Dále bylo optimalizováno stanovení cisplatiny v liposomech pomocí diferenční pulsní voltametrie. Pufr na detekci cisplatiny byl stejného složení, jako pufr použitý v článku [46]. Dalším krokem bylo testování vlivu liposomů na výšku naměřeného píku cisplatiny. Bylo zjištěno, že liposomy o velikosti 100 nm nemají na výšku píku cisplatiny žádný vliv. Poté byl testován vliv mineralizační směsi na elektrochemickou detekci cisplatiny. Zjistila jsem, že použitá mineralizační směs při detekci snižuje výšku signálu cisplatiny. Proto byla kalibrační křivka, která byla následně použita pro výpočet koncentrace cisplatiny, měřena v mineralizační směsi, abych tím odstranila vliv mineralizace vzorku před samotným elektrochemickým stanovením.

Následně byly připravovány dle ověřeného postupu tři druhy liposomů [56]. L8 se liší od liposomu L10 tím, že obsahuje cholesterol. Liposomy L10 neobsahující cholesterol, budou v agresivním prostředí lidského těla méně stabilní [57]. Cholesterol pomáhá udržovat stabilitu liposomové membrány a snižuje její propustnost, čímž zabraňuje unikání látek uzavřených v liposomech [57]. L15 obsahuje oproti liposomům L10 a L8 syntetický DPPE. DPPE se vyskytuje v buněčných membránách [58]. Tato molekula má tvar kužele a díky tomu je schopna navázat proteiny na ionizovatelnou aminoskupinu přes vodíkový můstek [58]. Příliš velké liposomy jsou v lidském těle vychytávány endoretikulárním systémem [59]. Velikost liposomálních léčiv se proto pohybuje v rozmezí 50 až 500 nm [60]. Naproti tomu příliš malé liposomy ale nedokáží uzavřít dostatečně velké množství cytostatika, proto zde musí být kompromis mezi velikostí liposomu a jeho schopnosti

uzavřít cytostatikum. V této práci jsem jako optimální zvolila velikost 100 nm. Tato velikost je nejčastěji používanou velikostí při výrobě tohoto léčiva [28,43]. Protože jsem se chtěla přesvědčit o stabilitě připravených liposomů, ve své práci jsem sledovala velikost liposomů v časovém intervalu jeden měsíc. Po dobu jednoho měsíce byly všechny tři připravené druhy liposomů stabilní, nebyl mezi jednotlivými časovými okamžiky nalezen žádný statisticky významný rozdíl.

Cisplatinu jsem do připravených liposomů uzavírala dle publikovaného postupu [21]. Nejdříve byla testována nižší koncentrace cisplatinu a celková schopnost liposomu uzavřít cisplatinu v daných laboratorních podmínkách. Úspěšnost enkapsulace byla testována na liposomech L8 a pohybovala se okolo 8 %. Na základě toho faktu byla zvolena koncentrace vyšší, která už ve výsledném liposomu obsahovala terapeutickou dávku 3 µg/ml [58]. Takto koncentrovaná cisplatina (2,6 g/l) byla uzavřena do všech tří druhů liposomů a pomocí diferenční pulsní voltametrie byla změřena její koncentrace, která byla poté přepočítána na množství cisplatinu v 10 mg liposomů. V důsledku extruze liposomů pomocí extrudéru přes filtry o velikosti 100 nm docházelo přibližně k 30 % ztrátě cisplatinu. Tyto ztráty se lišily v rámci různých druhů liposomů. Každý druh liposomů je také schopen uzavírat jiné množství cisplatinu. Nejvíce cisplatinu dokáží uzavřít liposomy L8, nejméně liposomy L15.

Dále byla znovu testována velikost liposomů, tentokrát s enkapsulovanou cisplatinou v časovém intervalu jeden měsíc ve třech různých prostředích (fyziologický roztok, vnitrobuněčné prostředí, Ringerův roztok). Po dobu jednoho měsíce byly všechny druhy liposomů v rámci jednotlivých prostředí stabilní, nebyl mezi jednotlivými časovými okamžiky nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Liposomy tedy považuji v rámci jednotlivých prostředí po dobu jednoho měsíce za stabilní. Rozdíl ve velikostech byl však zaznamenán mezi jednotlivými prostředími. V případě liposomu L10 se nejvíce odlišovaly velikosti liposomů ve vnitrobuněčném prostředí, kdy statistický rozdíl mezi naměřenými hodnotami byl významný (p-hodnota byla menší než 0,05 -viz. Tabulka 10), od liposomů ve fyziologickém roztoku a v Ringerově roztoku. Tento rozdíl mohl být způsoben tím, že liposomy ve vnitrobuněčném prostředí na svůj povrch navázaly další látky, které obsahovalo toto prostředí, a tím jejich velikost vzrostla. To samé se dělo v případě liposomů L15, kde ovšem není rozdíl mezi jednotlivými prostředími tak značný. Naopak v případě liposomů L8 nepozorujeme v rámci měření žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými prostředími, jelikož p-hodnota neklesla pod 0,05. Dále bylo provedeno měření pomocí diferenční pulsní voltametrie, ve kterém byl tento předpoklad ověřován.

Liposomy s uzavřenou cisplatinou jsou ve fyziologickém roztoku v čase stabilní, nezaznamenáváme zde výrazný odtok cisplatinového léčiva. Ve vnitrobuněčném prostředí naopak po šesti hodinách dochází k částečnému odtoku cisplatiny, to samé se děje v Ringerově roztoku. Předpoklad z měření velikosti se tedy potvrdil pouze v případě fyziologického roztoku, v dalších dvou prostředích dochází k částečnému odtoku cisplatiny.

Na závěr byl proveden MTT test, ve kterém byly použity liposomy s uzavřenou cisplatinou na nádorové buněčné linie. Nejdříve byla změřena koncentrace cisplatiny v jednotlivých druzích liposomů pomocí diferenční pulsní voltametrie. Množství použitých liposomů bylo zvoleno na základě měření množství, které jsou jednotlivé liposomy schopny uzavřít. Z toho důvodu se liposomu L15 dávalo větší množství, jelikož je jeho účinnost enkapsulace velmi nízká. Nejnižší schopnost ničit nádorové buňky měly liposomy L15, kdy ani v jednom případě nebyla viabilita rakovinných buněk nižší než 50 %. Tento druh liposomů tedy není příliš vhodný pro uzavírání cisplatiny. Ani liposomy L8 nebyly schopny snížit viabilitu rakovinných buněk pod 55 %, nejúspěšnější byly v případě nádorové buněčné linie neuroblastomu. U těchto liposomů by mohlo být řešením zvýšení terapeutické dávky, což by znamenalo přidat další liposomy s uzavřenou cisplatinou a zvýšit tak množství cisplatiny působící na nádorové buněčné linie. Nejlépe fungovaly liposomy L10, které měly stejné chemické složení jako liposomy L8 s tím rozdílem, že neobsahovaly cholesterol, kdy po aplikaci liposomální platiny dojde k 45 % přežití nádorových buněk prsu a pouze 20 % přežití nádorových buněčných linií vaječníku. U neuroblastomu nesnížily viabilitu buněk pod 50 %.

9 Závěr

Léčba rakoviny je v dnešní době jedním z hlavních témat výzkumů v oblasti medicíny. V průběhu posledních dvaceti let je snaha produkovat nové, efektivnější a méně cytotoxická léčiva. Cisplatina se řadí k jednomu z nejefektivnějších prostředků k léčbě rakoviny varlat, vaječníku, hlavy a krku, rakoviny plic a dalších nádorových onemocnění [61].

Novou formulací cisplatiny je liposomální cisplatina, která nahrazuje původní cisplatinu a snižuje její toxicitu a zvyšuje efektivitu [61].

Tato práce se zabývá uzavíráním cisplatiny do liposomů a studiem efektů takto připravených komplexů. K tomu bylo využito elektrochemických metod, které jsou vhodnými a velice citlivými metodami pro detekci kovových iontů. Tyto metody jsou také citlivé na detekci platinových skupin, proto bylo měření množství cisplatiny provedeno právě elektrochemickou metodou diferenční pulsní voltametrie [52,53].

V práci byla provedena optimalizace metody pro měření cisplatiny a byly testovány vlivy liposomů a mineralizační směsi na detekci cisplatiny.

Dále byl optimalizován postup uzavírání cisplatiny do liposomů. Dle optimalizovaného postupu pak byla uzavírána cisplatina o koncentraci 2,6 g/l do 10 mg třech druhů liposomů o rozdílném chemickém složení. Každý z těchto liposomů disponoval jinou schopností uzavřít cytostatikum.

Poté byla studována stabilita takto připravených liposomů pomocí diferenční pulsní voltametrie a koloidního analyzátoru. Tyto studie dokazují, že cisplatinové léčivo je stabilní ve fyziologickém roztoku nejméně po dobu 24 h, což z něj dělá vhodné médium pro uchování tohoto léčiva.

Liposomy s takto uzavřenou cisplatinou byly na závěr aplikovány na rakovinné buňky. Jejich efekt na viabilitu těchto nádorových buněk nebyl tak vysoký, jak bylo očekáváno. Tento problém mohl být způsoben malou koncentrací cisplatinových liposomů, jelikož terapeutická dávka bývá specifická pro každý typ rakoviny a je udávána pro čistou cisplatinu, nikoliv její liposomální formulaci.

Lipoplatina je v dnešní době hojně testována a je nadějnou formou cisplatiny, která redukuje její markantní vedlejší účinky.

Literatura

- [1] SOUČKOVÁ, Jitka. *Studium liposomů fyzikálně-chemickými metodami* [online]. Olomouc, 2011 [cit. 2017-05-10].
Dostupné z: <http://theses.cz/id/bmkucd>. Dizertační práce. Univerzita Palackého Olomouc, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petr Barták.
- [2] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [3] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-715-8.
- [4] BUTLER, Jennifer S a Peter J SADLER. Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2013, **17**(2), 175-188 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.01.004. ISSN 13675931.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593113000057>
- [5] ZERZÁNKOVÁ, Lenka. *Studium interakcí protinádorově účinných komplexů těžkých kovů s biomakromolekulami* [online]. Brno, 2011 [cit. 2017-04-23].
Dostupné z: http://is.muni.cz/th/87540/prif_d. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jana Kašpárková.
- [6] SIDDIK, Zahid H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(47), 7265-7279 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1038/sj.onc.1206933. ISSN 0950-9232.
Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206933>
- [7] CORNELISON, Terri L. a Eddie REED. Nephrotoxicity and Hydration Management for Cisplatin, Carboplatin, and Ormaplatin. *Gynecologic Oncology* [online]. 1993, **50**(2), 147-158 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1006/gyno.1993.1184. ISSN 00908258.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825883711844>
- [8] MANDERY, K, H GLAESER a MF FROMM. Interaction of innovative small molecule drugs used for cancer therapy with drug transporters. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2012, **165**(2), 345-362 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01618.x. ISSN 00071188.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01618.x>
- [9] SANCHEZ-CANO, Carlos, Michael J. HANNON a MF FROMM. Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. *Dalton Transactions* [online]. 2009, **165**(48), 10702- [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1039/b912708a. ISSN 1477-9226.
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b912708a>
- [10] HIRAI, M., H. MINEMATSU, Y. HIRAMATSU, et al. Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, **391**(1-2), 274-283 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.030. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517310001717>

- [11] SHARMA, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1997, **154**(2), 123-140 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/S0378-5173(97)00135-X. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851739700135X>
- [12] VEMURI, Sriram a C.T RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* [online]. 1995, **70**(2), 95-111 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/0031-6865(95)00010-7. ISSN 00316865.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031686595000107>
- [13] LOMBARDO, Domenico, Pietro CALANDRA, Davide BARRECA, Salvatore MAGAZÙ a Mikhail KISELEV. Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. *Nanomaterials* [online]. 2016, **6**(7), 125- [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.3390/nano6070125. ISSN 2079-4991.
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-4991/6/7/125>
- [14] HEURTAULT, B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(23), 4283-4300 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00331-4. ISSN 01429612.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203003314>
- [15] Malvern_Instruments, *Zetasizer nano Series User Manual*. 2004, Malvern Instruments Worcestershire.
- [16] CARRIÓN, F.J., A. DE LA MAZA a J.L. PARRA. The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1994, **164**(1), 78-87 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1006/jcis.1994.1145. ISSN 00219797.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979784711453>
- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [18] PELEG-SHULMAN, Tal, Dan GIBSON, Rivka COHEN, Robert ABRA a Yechezkel BARENHOLZ. Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2001, **1510**(1-2), 278-291 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00359-X. ISSN 00052736.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527360000359X>
- [19] *La nanoscience* [online]. [cit. 2016-12-18].
Dostupné z: <http://medecinesinnovantes.e-monsite.com/pages/les-nouvelles-formes-de-medecine/la-nanoscience.html>
- [20] SHARMA, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1997, **154**(2), 123-140 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/S0378-5173(97)00135-X. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851739700135X>
- [21] CARVALHO JÚNIOR, A.D., F.P. VIEIRA, V.J. DE MELO, et al. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological*

- Research* [online]. 2007, **40**(8), 1149-1157 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1590/S0100-879X2006005000125. ISSN 1414-431x.
Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [22] RAMACHANDRAN, Srinivasan, Arjan P. QUIST, Sashi KUMAR a Ratnesh LAL. Cisplatin Nanoliposomes for Cancer Therapy: AFM and Fluorescence Imaging of Cisplatin Encapsulation, Stability, Cellular Uptake, and Toxicity. *Langmuir* [online]. 2006, **22**(19), 8156-8162 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1021/la0607499. ISSN 0743-7463.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0607499>
- [23] TORO-CÓRDOVA, Alfonso, Fabricio LEDEZMA-GALLEGOS, Laura MONDRAGON-FUENTES, Rafael JURADO, Luis A. MEDINA, Jazmin M. PÉREZ-ROJAS a Patricia GARCIA-LOPEZ. Determination of Liposomal Cisplatin by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application in Pharmacokinetic Studies. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2016, **54**(6), 1016-1021 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1093/chromsci/bmw039. ISSN 0021-9665.
Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bmw039>
- [24] CALLARI, Manuela, Janice R. ALDRICH-WRIGHT, Paul L. DE SOUZA a Martina H. STENZEL. Polymers with platinum drugs and other macromolecular metal complexes for cancer treatment. *Progress in Polymer Science* [online]. 2014, **39**(9), 1614-1643 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.05.002. ISSN 00796700.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670014000562>
- [25] HAMELERS, Irene HL a Anton IPM DE KROON. Nanocapsules: a novel formulation technology for platinum-based anticancer drugs. *Future Lipidology* [online]. 2007, **2**(4), 445-453 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.2217/17460875.2.4.445. ISSN 1746-0875.
Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460875.2.4.445>
- [26] Svoboda J., Syslová K., Kačer P., Cílený transport cytostatik. *Chemické listy* [online]. 2016, (110), 909-916 [cit. 2017-05-10].
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_909-916.pdf
- [27] YANG, Feng, Chen JIN, Yongjian JIANG, Ji LI, Yang DI, Quanxing NI a Deliang FU. Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: From bench to bedside. *Cancer Treatment Reviews* [online]. 2011, **37**(8), 633-642 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.01.006. ISSN 03057372.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737211000223>
- [28] WANG, Andrew, Wenbin LIN, Demin LIU a Chunbai HE. Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2013, **2013**(8), 3309-3319 [cit. 2017-05-06]. DOI: 10.2147/IJN.S38354. ISSN 1178-2013.
Dostupné z: <http://www.dovepress.com/application-of-liposomal-technologies-for-delivery-of-platinum-analogs-peer-reviewed-article-IJN>
- [29] MYLONAKIS, N., A. ATHANASIOU, N. ZIRAS, et al. Phase II study of liposomal cisplatin (Lipoplatin™) plus gemcitabine versus cisplatin plus gemcitabine as first line treatment in inoperable (stage IIIB/IV) non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* [online].

- 2010, **68**(2), 240-247 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.06.017. ISSN 01695002.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169500209003717>
- [30] CASAGRANDE, N., M. CELEGATO, C. BORGHESE, M. MONGIAT, A. COLOMBATTI a D. ALDINUCCI. Preclinical Activity of the Liposomal Cisplatin Lipoplatin in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 2014, **20**(21), 5496-5506 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0713. ISSN 1078-0432.
Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-0713>
- [31] FARHAT, Fadi S., Sally TEMRAZ, Joseph KATTAN, et al. A Phase II Study of Lipoplatin (Liposomal Cisplatin)/Vinorelbine Combination in HER-2/neu–Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* [online]. 2011, **11**(6), 384-389 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.clbc.2011.08.005. ISSN 15268209.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820911001625>
- [32] IINUMA, Hisae, Kazuo MARUYAMA, Kota OKINAGA, et al. Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *International Journal of Cancer* [online]. 2002, **99**(1), 130-137 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1002/ijc.10242. ISSN 0020-7136.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.10242>
- [33] LOCATELLI, Clinio. Voltammetric Analysis of Trace Levels of Platinum Group Metals – Principles and Applications. *Electroanalysis* [online]. 2007, **19**(21), 2167-2175 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1002/elan.200704026. ISSN 10400397.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.200704026>
- [34] BAREFOOT, R. Recent advances in the determination of the platinum group elements and gold. *Talanta* [online]. **49**(1), 1-14 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/S0039-9140(98)00347-6. ISSN 00399140.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914098003476>
- [35] ZIMMERMANN, Sonja, Jürgen MESSERSCHMIDT, Alex VON BOHLEN a Bernd SURES. Determination of Pt, Pd and Rh in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry as compared with adsorptive cathodic stripping voltammetry and total-reflection X-ray fluorescence analysis. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2003, **498**(1-2), 93-104 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.aca.2003.08.061. ISSN 00032670.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003011334>
- [36] POZIO, A, M DE FRANCESCO, A CEMMI, F CARDELLINI a L GIORGI. Comparison of high surface Pt/C catalysts by cyclic voltammetry. *Journal of Power Sources* [online]. 2002, **105**(1), 13-19 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/S0378-7753(01)00921-1. ISSN 03787753.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378775301009211>
- [37] XING, Yangchuan. Synthesis and Electrochemical Characterization of Uniformly-Dispersed High Loading Pt Nanoparticles on Sonochemically-Treated Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2004, **108**(50), 19255-19259 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1021/jp046697i. ISSN 1520-6106.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp046697i>

- [38] ARJMAND, Farukh, Mubashira AZIZ a Sartaj TABASSUM. Cyclic Voltammetry-An Electrochemical Approach to Study Metal-based Potential Antitumor Drug-DNA Interaction. *Current Analytical Chemistry* [online]. 2011, 7(1), 71-79 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.2174/157341111793797635. ISSN 15734110.
Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [39] NYGREN, Olle., Gary T. VAUGHAN, T. Mark. FLORENCE, Gregory M. P. MORRISON, Ian M. WARNER a Leslie S. DALE. Determination of platinum in blood by adsorptive voltammetry. *Analytical Chemistry* [online]. 1990, 62(15), 1637-1640 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1021/ac00214a020. ISSN 0003-2700.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00214a020>
- [40] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
- [41] M. CARDOSO, Luciana, Fernando B. MAINIER a José A. P. ITABIRANO. Analysis Voltammetry of Cyanide and Process Electrolytic Removal of Cyanide in Effluents. *American Journal of Environmental Engineering* [online]. 2014-12-1, 4(6), 182-188 [cit. 2016-12-18]. DOI: 10.5923/j.ajee.20140406.07. ISSN 2166-465x.
Dostupné z: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajee.20140406.07.html>
- [42] Polarography - Determination of Unknown Concentration of Vitamin C. *Virtual Amrita Laboratories Universaling Education* [online]. 2012 [cit. 2017-04-23].
Dostupné z: <http://vlab.amrita.edu/?sub=2&brch=294&sim=1350&cnt=1>
- [43] VAIL, David, Ilene KURZMAN, Phyllis GLAWE, et al. STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2002-8-1, 50(2), 131-136 [cit. 2017-05-06]. DOI: 10.1007/s00280-002-0469-8. ISSN 0344-5704.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-002-0469-8>
- [44] KOVACEVIC, A., S. SAVIC, G. VULETA, R.H. MÜLLER a C.M. KECK. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, 406(1-2), 163-172 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.036. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311000081>
- [45] MITRI, Khalil, Ranjita SHEGOKAR, Sven GOHLA, Cecilia ANSELMINI a Rainer H. MÜLLER. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, 414(1-2), 267-275 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.008. ISSN 03785173.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311004030>
- [46] DOSPIVOVA, D. et al. Catalytic Electrochemical Analysis of Platinum in Pt-DNA Adducts. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2012, 7(4), 3072-3088 [cit. 2017-05-07]. ISSN 1452-3981.
Dostupné z: <http://electrochemsci.org/papers/vol7/7043072.pdf>

- [47] MICHALOVÁ, E., A. POPRACH, I. NĚMEČKOVÁ, R. NENUTIL, D. VALÍK, J. ŽALOUDEK, R. VYZULA a B. VOJTĚŠEK. Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům ex vivo-úskali a limitace vlastní metody. *Klinická onkologie* [online]. 2008, **21**(3), 93-97 [cit. 2017-05-08].
- [48] *Laboratoř experimentální medicíny* [online]. Olomouc: Lékařská Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci [cit. 2017-05-08].
Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
- [49] VACEK, Jan, Jiří PETŘEK, René KIZEK, Ladislav HAVEL, Bořivoj KLEJDUS, Libuše TRNKOVÁ a František JELEN. Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture. *Bioelectrochemistry* [online]. 2004, **63**(1-2), 347-351 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2003.08.007. ISSN 15675394.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567539404000635>
- [50] P. Majzlik, A. Stransky, V. Adam, M. Nemec, L. Trnkova, J. Zehnalek, J. Hubalek, I. Provaznik and R. Kizek. Electrochemical Behaviour of Apoferritin Encapsulating of Silver(I) Ions and Its Application for Treatment of Staphylococcus aureus. *International Journal of Electrochemical Science*. [online]. 2012, **2012**(7), 6378 - 6395 [cit. 2017-05-07].
Dostupné z: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol7/7076378.pdf>
- [51] D. Hynek, J. Prasek, J. Pikula, V. Adam, P. Hajkova, L. Krejcova, L. Trnkova, J. Sochor, M. Pohanka, J. Hubalek, M. Beklova, R. Vrba and R. Kizek, Interactions of Platinum - Based Cytostatics with Metallothionein Revealed by Electrochemistry. *International Journal of Electrochemical Science*. [online]. 2013, **2013**(8), 4472 - 4484 [cit. 2017-05-07].
Dostupné z: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol8/80404472.pdf>
- [52] ZIMMERMANN, Sonja, Jürgen MESSERSCHMIDT, Alex VON BOHLEN a Bernd SURES. Determination of Pt, Pd and Rh in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry as compared with adsorptive cathodic stripping voltammetry and total-reflection X-ray fluorescence analysis. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2003, **498**(1-2), 93-104 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2003.08.061. ISSN 00032670.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003011334>
- [53] HAUS, Nadine, Tanja EYBE, Sonja ZIMMERMANN a Bernd SURES. Is microwave digestion using TFM vessels a suitable preparation method for Pt determination in biological samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry? *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **635**(1), 53-57 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.12.043. ISSN 00032670.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008021983>
- [54] DAVID, Smola. *Příprava a studium vlastností liposomů s vybranými platnatými komplexy*. Olomouc, 2014 cit. 2017-05-10].
Dostupné z: http://theses.cz/id/fbu7nt/David_SMOLA_prceB_1_3_1.pdf. Bakalářská práce. Univerzita Palackého Olomouc. Vedoucí práce Pavel Štarha.
- [55] XIONG, Yang, Yi ZHAO, Lei MIAO, C. Michael LIN a Leaf HUANG. Co-delivery of polymeric metformin and cisplatin by self-assembled core-membrane nanoparticles to treat

- non-small cell lung cancer. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **244**, 63-73 [cit. 2017-05-18]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.11.005. ISSN 01683659.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916311956>
- [56] GURAN, Roman, KOMINKOVA, Marketa., et al. (2013). Liposomes as drug carriers and their characterization using different analytical methods. *Mendelnet 2013* [online]. 2013, 913-918. [cit. 2017-04-23].
Dostupné z: https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2013/articles/48_guran_902.pdf
- [57] GURÁN, Roman. *Studium vlastností liposomů jako přenašečů léčiv pomocí různých analytických metod*. Brno, 2014 [cit. 2017-05-18].
Dostupné z: <http://theses.cz/id/93bx0n> .Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. Vedoucí práce Ondřej Zítka.
- [58] AOCS LIPID LIBRARY. *Phosphatidylethanolamine and related lipids: structure, occurrence, biochemistry and analysis*[online]. Scotland, 2014, 1.6.2014 [cit. 2015-05-03].
Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pe/index.htm>
- [59] KAŠNÁ, Andrea. *Liposomy jako nosiče imunomodulátorů a cytostatik [rukopis] : příprava a testování jejich biologických účinků*. Brno, 2004. Dizertační práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jaroslav Turánek.
- [60] LOMBARDO, Domenico, Pietro CALANDRA, Davide BARRECA, Salvatore MAGAZÙ a Mikhail KISELEV. Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. *Nanomaterials* [online]. 2016, **6**(7), 125- [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.3390/nano6070125. ISSN 2079-4991.
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-4991/6/7/125>
- [61] STATHOPOULOS, G. P. a T. BOULIKAS. Lipoplatin Formulation Review Article. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2012, **2012**, 1-10 [cit. 2017-05-17]. DOI: 10.1155/2012/581363. ISSN 2090-3014.
Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2012/581363/>

Seznam zkratek

EPR	efekt zvýšené propustnosti a retence
ER	estrogen reagující
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
ATR	serin/threonin kináza
p53	tumor supresorový gen, senzor poškození DNA
p73	tumor supresorový gen
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
SUV	malé unilamelární liposomy
LUV	velké unilamelární liposomy
MLV	multilamelární vesikuly
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
NTU	nefelometrické turbiditní jednotky
HMDE	visící rtuťová kapka
DPPG	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosforylglycerol sodná sůl
DPPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoetanolamin
MTT	solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu

Přílohy

Tabulka 13. Uzavírání cisplatiny o koncentraci 0,2 g/l v různém množství, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 5.

množství cisplat. roztoku o koncentraci 0,2 g/l	průměr. výška píku cisplatiny (μA)	Směr od. odch.	Horní hranice	Dolní hranice	konc. (μg/l)	množství (μg) na epinku	Očekávan. množství cisplatiny μg na epinku
19 μl	1,88	0,15	2,17	1,59	541,31	0,24	3,80
	1,27	0,44	2,13	0,40	384,22	0,17	3,80
	1,24	0,07	1,38	1,10	376,73	0,17	3,80
38 μl	2,50	0,03	2,57	2,43	700,75	0,32	7,60
	3,73	0,31	4,33	3,13	¹ 016,93	0,46	7,60
	4,70	0,14	4,98	4,43	¹ 267,32	0,57	7,60
75 μl	0,97	0,02	1,01	0,93	³ 068,95	1,38	15,00
	0,94	0,03	1,01	0,88	² 996,96	1,35	15,00
	0,93	0,02	0,97	0,89	² 972,38	1,34	15,00

Tabulka 14. Uzavírání 75 ul cisplatiny o koncentraci 2,6 g/l do 4 druhů liposomů, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 6.

druh liposomu	průměrná výška píku cisplatiny (μA)	směrodatná odchylka	Horní hranice	Dolní hranice	koncentrace (μg/l)	množství cisplatiny v μg na epinku
L15	6,25	1,03	8,28	4,22	16 639,50	7,49
	6,46	0,23	6,91	6,01	17 189,71	7,74
	10,60	0,67	11,92	9,29	27 835,04	12,53
L10	8,67	0,35	9,35	7,99	22 865,23	10,29
	9,24	0,47	10,17	8,32	24 333,36	10,95
	9,89	0,74	11,34	8,43	25 989,58	11,70
L8	10,27	0,29	10,54	9,40	26 982,66	12,14
	13,35	4,57	22,31	4,40	34 905,77	15,71
	15,86	0,47	19,78	17,95	41 355,95	18,61

Tabulka 15. Měření supernatantu z uzavírání cisplatiny o koncentraci 2,6 g/l do liposomů měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 6.

druh supernatantu	průměr	směrodatná odchylka	Horní hranice	Dolní hranice	koncentrace (μg/l)
L15 supernatant	2,96	0,11	3,18	2,74	81 806,33
	2,84	0,01	2,86	2,82	78 799,44
	2,40	0,11	2,63	2,18	67 609,19
L10 supernatant	2,46	0,21	2,87	2,06	69 129,15
	2,49	0,16	2,80	2,18	69 787,00
	2,68	0,14	2,96	2,41	74 783,91
L8 supernatant	2,54	0,01	2,57	2,51	71 088,25
	2,89	0,24	3,36	2,41	79 992,45
	2,79	0,09	2,97	2,61	77 632,04

Tabulka 16. Stabilita liposomů ve vnitrobuněčném prostředí, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 11.

Druh liposom.	čas (h)	průměrná výška píku cisplatin y (μA)	směrodatná odchylka	Horní hranice	Dolní hranice	koncentrace (μg/l)	množství cisplatiny v μg na epinku
L8	0,00	11,60	0,47	12,51	10,69	30 401,69	13,68
	1,00	11,39	0,62	12,61	10,17	29 848,67	13,43
	6,00	9,88	0,35	10,56	9,20	25 974,66	11,69
	24,00	9,18	0,69	10,53	7,83	24 167,08	10,88
L10	0,00	12,50	0,98	14,41	10,59	32 702,78	14,72
	1,00	12,07	0,83	13,69	10,44	31 595,68	14,22
	6,00	13,91	0,47	12,51	10,69	30 401,69	13,68
	24,00	7,05	0,74	8,49	5,61	18 700,31	8,42
L15	0,00	4,23	0,01	4,25	4,21	11 452,73	5,15
	1,00	4,26	0,01	4,28	4,24	11 527,12	5,19
	6,00	2,66	0,01	2,67	2,64	7 409,71	3,33
	24,00	1,68	0,01	1,70	1,67	4 908,49	2,21

Tabulka 17. Stabilita liposomů ve fyziologickém roztoku, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 11.

Druh liposom.	čas (h)	průměrná výška píku cisplatiny (μA)	směrodatná odchylka	Horní hranice	Dolní hranice	koncentrace (μg/l)	množství cisplatiny v μg na epinku
L8	0	10,70	0,76	12,18	9,22	28 076,43	12,63
	1	12,31	0,41	13,12	11,50	32 220,86	14,50
	6	15,13	1,12	17,33	12,94	39 474,66	17,76
	24	15,13	0,21	15,55	14,71	39 471,10	17,76
L10	0	11,36	0,79	12,91	9,80	29 774,74	13,40
	1	13,49	0,96	15,38	11,60	35 255,20	15,86
	6	12,07	2,29	16,55	7,59	31 606,21	14,22
	24	12,01	0,48	12,94	11,07	31 443,19	14,15
L15	0	4,48	0,03	4,53	4,43	12 104,44	5,45
	1	4,33	0,02	4,37	4,29	11 712,43	5,27
	6	4,80	0,00	4,81	4,79	12 912,32	5,81
	24	2,87	0,01	2,89	2,85	7 965,76	3,58

Tabulka 18. Stabilita liposomů v plazmě, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 11.

Druh liposom.	čas (h)	průměrná výška píku cisplatiny (μA)	směrodatná odchylka	Horní hranice	Dolní hranice	koncentrace (μg/l)	množství cisplatiny v μg na epinku
L8	0	10,10	0,51	11,10	9,10	26 539,96	11,94
	1	10,16	0,21	10,57	9,74	26 683,89	12,01
	6	9,79	0,93	11,61	7,96	25 735,46	11,58
	24	8,59	0,11	8,80	8,37	22 651,12	10,19
L10	0	11,42	0,59	12,58	10,26	29 932,73	13,47
	1	11,52	0,36	12,23	10,81	30 189,76	13,59
	6	10,92	1,14	13,15	8,69	28 647,59	12,89
	24	5,99	0,28	6,54	5,44	15 976,09	7,19
L15	0	5,20	0,05	5,30	5,10	13 945,57	6,28
	1	4,45	0,03	4,52	4,38	12 017,86	5,41
	6	3,75	0,10	3,95	3,55	10 218,66	4,60
	24	1,49	0,05	1,60	1,39	4 417,53	1,99

Tabulka 19. Koncentrace cisplatina uzavřená v liposomech pro reakci s nádorovými buňkami, měřeno 4x, vzata průměrná hodnota a vypočítána směrodatná odchylka, doplňující informace k Tabulce 12.

druh liposomu	průměrná výška píku cisplatiny (μA)	směrodatná odchylka	Horní hranice	Dolní hranice	koncentrace (μg/ml)
L15	3,71	0,38	4,50	2,99	101,28
L8	2,37	0,72	4,26	1,44	66,67
L10	1,54	0,04	1,68	1,51	45,38