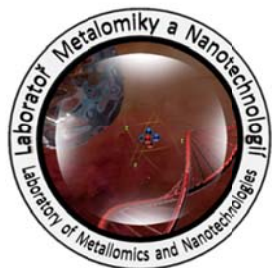


Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



## Analýza doxorubicinu a apoferitinu metodou kapilární elektroforézy

### Anotace

Rakovina patří mezi nejzávažnější a stále častěji se objevující onemocnění. Hlavními faktory vzniku tohoto onemocnění jsou nesprávná výživa, nedostatek fyzické aktivity, alkohol a kouření. Jedním z nejčastěji podávaných léčiv je antracyklinové cytostatikum doxorubicin. Účinky tohoto léčiva jsou limitovány vysokou kardiotoxicitou a při překročení kumulativní dávky ( $550 \text{ mg/m}^2$ ) se zvyšuje riziko výskytu srdečních onemocnění, např. kardiomyopatie. Možností, jak zefektivnit léčbu a snížit tyto nežádoucí účinky, je cílený transport léčiva pomocí směrovaných léčiv, což jsou látky, které jsou schopny enkapsulovat léčivo a dopravit jej přímo do postižené tkáně. Mezi jeden z nejpoužívanějších nanotransportérů patří protein apoferitin.

Enkapsulací DOX do apoferitinu můžeme docílit snížení nežádoucích účinků léčiva a snížit kumulativní dávku a tím výrazně snížit velmi závažné riziko kardiotoxicity. Doxorubicin je do apoferitinu navázán pomocí změny pH. Struktura apoferitinu se rozpadá při pH 3 na jednotlivé podjednotky, po přidavku doxorubicinu a následném zvýšení pH na 7 dochází k enkapsulaci léčiva do dutiny apoferitinu. Účinnost enkapsulace byla monitorována pomocí kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí.

### Použitý materiál

- doxorubicin HCl
- apoferitin
- kyselina chlorovodíková (HCl)
- hydroxid sodný (NaOH)
- dimethylulf oxid (DMSO)
- acetonitril (ACN)
- ethanol





## Pracovní postup

### PŘÍPRAVA VZORKŮ

- Fluorescenční vlastnosti DOX - doxorubicin (5, 10, 20, 30, 40 a 50 µg/ml) byl rozpuštěn ve vodě, dále v 12.5, 25, 50 a 100 % organickém rozpouštědle ( ethanol, DMSO, ACN) a v pufrch v rozmezí pH 4 – 10 (acetát pH 4 a 5, fosfát pH 6, 7, 8, borát pH 9 a 10). Fluorescence byla měřena na přístroji TECAN (ex. 480nm, em.600nm)
- Enkapsulace DOX do apoferitinu - bylo připraveno 5 vzorků DOX (25, 50, 75, 10 a 125 µg/ml) a doplněno na objem 300µl vodou + 20µl apoferitinu. Ve vzorku bylo sníženo pH na 3 (HCl), po 15 minutách bylo pH opět zvýšeno na 7 (NaOH). Vzorky byly dialyzovány a doplněny na objem 1ml.
- Separace DOX a APODOXU metodou CE-LIF, separace apoferitinu metodu CE-UV

### ANALÝZA APODOXU POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Analýza DOX byla provedena na kapilární elektroforéze s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF). Byl použit fosfátový pufr 20 mM o pH 7. Separace probíhala při 20kV, s dávkováním pod tlakem 3psi po dobu 10 s. Délka kapiláry – 54/64,5 cm, průměr 75 µm. Analýza apoferitinu byla provedena na kapilární elektroforéze s UV detekcí (CE-UV), veškeré podmínky separace byly sodné jako při separaci DOX.

Komplex APODOX byl analyzován v CE-LIF, opět za stejných podmínek. Závěrem byl komplex léčiva s apodoxem otevřen snížením pH na 3 (HCl) a volný DOX byl separován v CE-LIF. Pro porovnání migračních časů otevřeného APODOXU s DOX, jsme provedli snížení pH i u vzorku DOX. Došlo k překryvu migračních časů a tedy průkazu otevření komplexu a separace uvolněného DOX.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

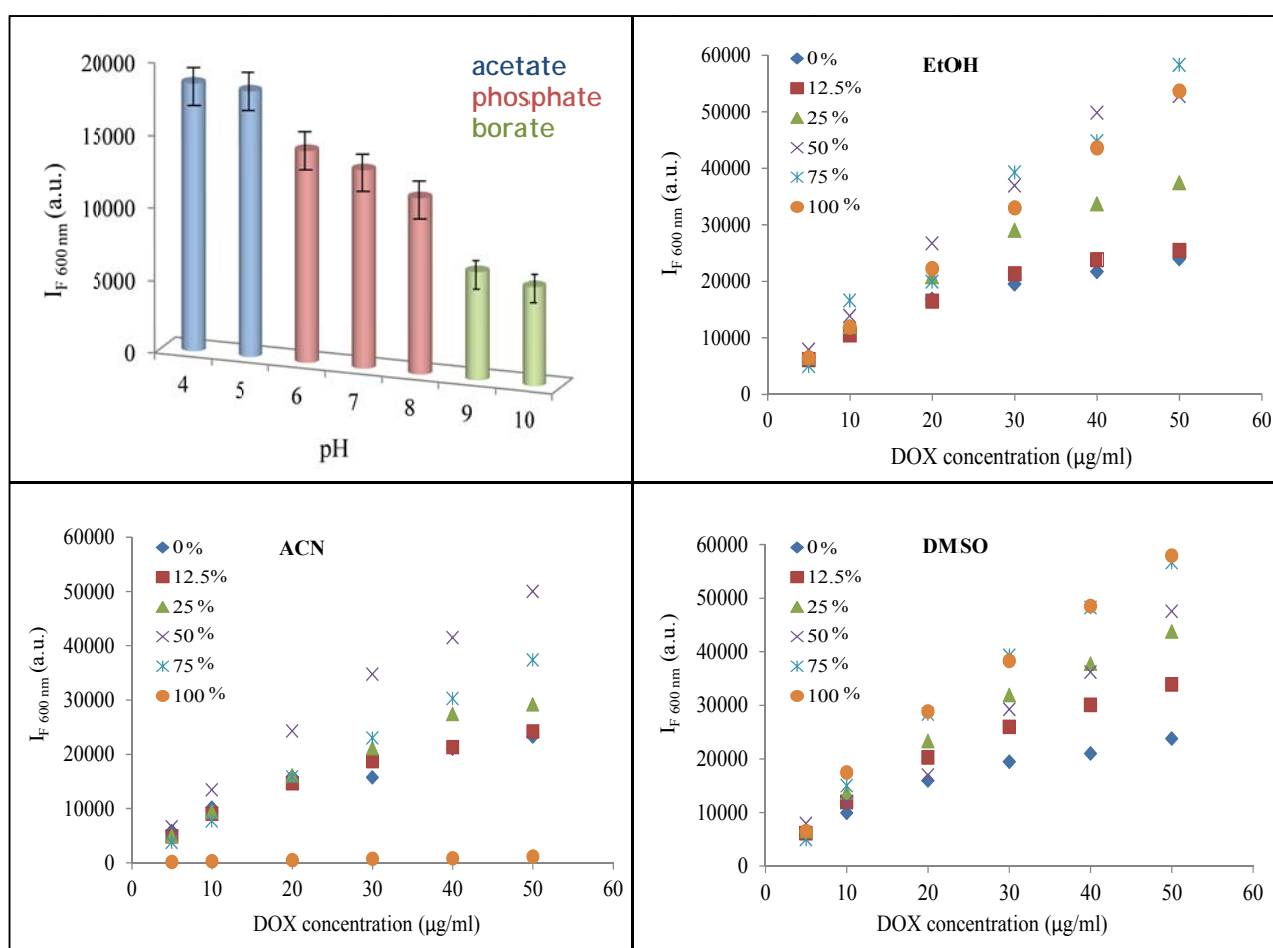


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

**Obrázek 1:**

A) Fluorescence DOX (50 $\mu$ g/ml) v pufru acetát pH 4 a 5, fosfát pH 6,7,8 a borát pH 9 a 10. Se zvyšujícím se pH se snižovala fluorescence DOX.

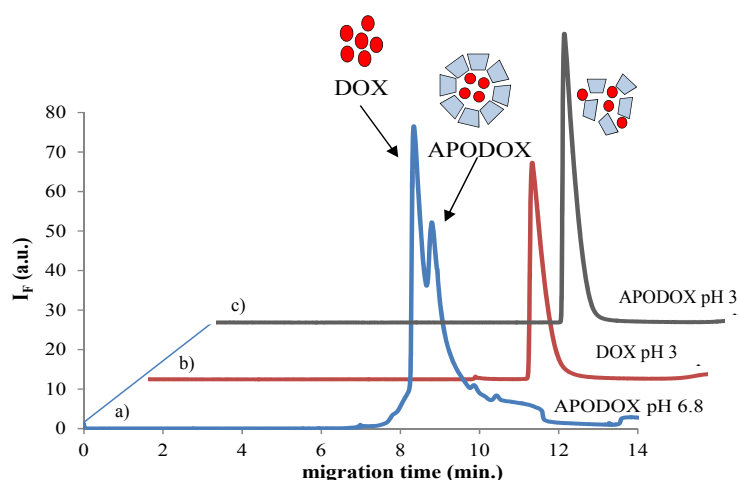
B – D) DOX (50 $\mu$ g/ml) byl rozpuštěn ve vodě, 12.5, 25, 50 a 100 % organickém rozpouštědle (EtOH, ACN, DMSO). Nejlepší fluorescenční vlastnosti vykazoval DOX v ethanolu a DMSO. ACN zvyšoval fluorescenci DOX pouze málo a ve 100% ACN nebyl DOX rozpustný.



### Obrázek 2:

Separace metodou kapilární elektroforézy s LIF detekcí.

- Apodox při pH 6.8
- DOX o pH 3
- Otevřený APODOX o pH 3



### Závěr:

Uzavřením léčiva doxorubicinu do apofेरitinu můžeme výrazně ovlivnit jeho vedlejší účinky a snížit kardiotoxický efekt léčiva. Apofेरitin se díky svým vlastnostem může považovat za velmi vhodný nanotransportér pro přenos léčiv. Kapilární elektroforéza je vhodnou a účinnou metodou pro separaci a analýzu komplexu APODOX.