

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Veronika Meskařová

Příprava mitotických inhibitorů ve formě nanotransportérů

Preparation of mitotic inhibitors in the form of nanotransporters

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Veronika Meskařová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala mému školiteli Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za odborný dohled, cenné rady a připomínky během sepisování mé diplomové práce.

V neposlední řadě bych poděkovala své rodině za podporu při psaní mé diplomové práce a během studia.

Věnováno mému dědovi. Doufám, že jsi na mě pyšný...

Abstrakt

Rakovina patří k nejrozšířenějším onemocněním, se kterým se podle statistik setká každý třetí člověk. Jedná se o onemocnění vznikající náhlým růstem a rychlým dělením vlastních buněk. Navzdory pokroku v léčbě, není její účinnost dostatečná a rakovina tak představuje druhou nejčastější příčinu úmrtí. Navíc je léčba spojena s řadou nežádoucích účinků. V současné době se pro léčbu rakoviny využívá mimo jiné i nanomedicína, která používá nanomateriál pro transport léčiv. Vazbou léčiva do vhodného nanotransportéru lze nejen dopravit léčivo do cílového místa, ale i snížit systémovou toxicitu léčiva.

Tato diplomová práce pojednává o nalezení vhodného hmotnostního poměru protinádorových léčiv, kolchicinu a docetaxelu, a nanotransportéru apoferritinu. Cílem bylo nalézt příznivé podmínky pro vysokou míru enkapsulace daných léčiv do nanotransportéru. Enkapsulace léčiv probíhala při pasivních a aktivních podmínkách, kdy aktivní enkapsulace probíhala za otevření a uzavření nanotransportéru pomocí změn pH prostředí. Pro zlepšení vázanosti léčiva do nanotransportéru byla léčiva rozpuštěna v DMSO nebo ve vodě s přídavkem HCl za účelem nabití molekul léčiva a snadnější enkapsulaci do nanotransportéru. V rámci pasivní enkapsulace byla léčiva inkubována v prostředí močoviny či bivalentních iontů kovů.

Celkově lze konstatovat, že míra enkapsulace léčiv do apoferritinu byla velmi nízká. Obecně byla vyšší míra enkapsulace pozorována pro docetaxel. Nejvhodnější podmínky pro enkapsulaci jsou při hmotnostním poměru léčiva ku nanotransportéru 1:10 při hmotnostní koncentraci 0,75 mg/vzorek.

V další části diplomové práce byl připravený vzorek docetaxelu testován z hlediska uvolňování a metabolické stability. Docetaxel enkapsulovaný v apoferritinu byl podroben metabolické studii za pomoci jaterních mikrosomů z potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrem. Zjistilo se, že docetaxel byl jaterními mikrosomy potkana přeměňován na dva metabolity, kdy se jejich množství lišilo mezi vázaným a volným docetaxelem. Celkově bylo více metabolitů v případě vázaného docetaxelu.

Klíčová slova:

nádorové onemocnění, nanotransportéry, protinádorová léčiva, apoferritin, kolchicin, docetaxel

Abstract

Cancer is one of the most widespread diseases that every third person will encounter it. It is a disease arising from the sudden growth and rapid division of own cells. Despite progress in treatment, an effectiveness is not sufficient, and cancer is the second most common cause of death. In addition, the treatment is associated with several side effects. Currently nanomedicine uses nanomaterials for transport drugs in cancer treatment. It is possible to deliver the drug to the target site, but also to reduce the systemic toxicity of the drug by binding the drug to a suitable nanotransporter.

This diploma thesis deals with seeking the appropriate mass ratio of antitumor drugs, colchicine and docetaxel, and the nanotransporter apoferritin. The aim was to find suitable *in vitro* conditions for high drugs encapsulation into the nanotransporter. Drugs encapsulation took place under active and passive conditions. Active encapsulation was under way on opening and closing nanotransporter by changing pH environment in test tube. Drugs were dissolved in DMSO or water with addition of HCl to charge the drug molecules and improve the binding of the drug into nanotransporter. As part of passive encapsulation, drugs were incubated in surroundings of urea or bivalent metal ions.

Overall, it can be concluded that the rate of drug encapsulation into apoferritin was very low. Generally, higher encapsulation rates were observed for docetaxel. The most suitable conditions for drug encapsulation into the nanotransporter are mass ratio of 1:10 and a mass concentration of 0.75 mg/sample.

Next part of the thesis was about testing docetaxel release and metabolic stability. Docetaxel encapsulated in apoferritin was subjected to a metabolic study using liver microsomes from rats premedicated with pregnenolone carbonitrile. Docetaxel was converted into two metabolites by rat liver microsomes. Amount of the metabolites differed between bound and free docetaxel. Overall, there were more metabolites in the case of bound docetaxel.

Key words:

cancer diseases, nanotransporters, anticancer drugs, apoferritin, colchicine, docetaxel

[IN CZECH]

Obsah

Seznam zkratk	9
1 Úvod	11
1.1 Nanočástice	12
1.1.1 Uhlíkové nanotrubic	13
1.1.2 Dendrimery	13
1.1.3 Liposomy	13
1.1.4 Virové nanočástice	14
1.1.5 Proteinové nanočástice	14
1.2 (Apo)ferritin	15
1.3 Buněčný cyklus	17
1.4 Kolchicin	20
1.5 Docetaxel	21
2 Cíl práce	23
3 Materiál a metody	24
3.1 Materiál	24
3.2 Přístroje	24
3.3 Metody	25
3.3.1 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10	25
3.3.2 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí Cu^{2+} iontů	26
3.3.3 Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí Zn^{2+} iontů	27
3.3.4 Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí močoviny	27

3.3.5	Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10	28
3.3.6	Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:5	29
3.3.7	Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:20	29
3.3.8	Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno v DMSO)	30
3.3.9	Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno ve vodě s HCl)	30
3.3.10	Příprava ApoKol pomocí „obrácené“ aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10.....	31
3.3.11	Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z rekombinantního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10.....	31
3.3.12	Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10	32
3.3.13	Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:5	33
3.3.14	Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru	33
3.3.15	Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:0,025 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru	34
3.3.16	Studium kinetiky uvolňování docetaxelu z ApoDoc	34
3.3.17	Metabolismus docetaxelu potkaními jaterními mikrosomy.....	35
3.3.18	Metody HPLC.....	36
4	Výsledky	38
4.1	Kolchicin.....	38
4.1.1	Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml ve vodném prostředí do komerčního apoferritinu	40

4.1.2	Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěného ve vodě s HCl do komerčního apoferritinu	44
4.1.3	Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěného v DMSO do komerčního apoferritinu	46
4.1.4	„Obrácená“ aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml v DMSO prostředí / ve vodném prostředí s HCl do komerčního apoferritinu	48
4.1.5	Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml ve vodném prostředí do rekombinantního apoferritinu.	51
4.1.6	Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml v prostředí močoviny.....	53
4.1.7	Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml v prostředí Cu^{2+} iontů	55
4.1.8	Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml pomocí zinečnatých iontů.....	57
4.2	Docetaxel.....	59
4.2.1	Pasivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml ve vodném prostředí	60
4.2.2	Pasivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml v prostředí Cu^{2+} iontů	61
4.2.3	Aktivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 10 mg/ml ve vodném prostředí	62
4.2.4	Aktivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 10 mg/ml v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru	68
4.2.5	Aktivní enkapsulace docetaxelu o koncentraci 10 mg/ml v prostředí glycin-acetátovém a Tris pufru do komerčního apoferritinu	70
4.2.6	Metabolismus docetaxelu potkaními jaterními mikrosomy.....	72
5	Diskuze	73
6	Závěr	77
7	Citace	78

Seznam zkratek

ApoKol	apokolchicin, kolchicin enkapsulovaný v apoferritinu
ApoDoc	apodocetaxel, docetaxel enkapsulovaný v apoferritinu
Apo	apoferritin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Doc	docetaxel
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>z angl. high – performance liquid chromatography</i>)
Kol	kolchicin
MDR	mnohočetná léková rezistence (<i>z angl. multidrug resistance</i>)
Tfr 1	transferrinový receptor 1
QD	kvantová tečka (<i>z angl. quantum dot</i>)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (<i>z angl. Enhanced Permeability and Retention effect</i>)
kApo	komerční koňský apoferritin

rApo

rekombinantní protein založený na těžké podjednotce lidského ferritinu, kde jsou C-terminální aminokyseliny nahrazeny pozitivně nabitými aminokyselinami

1 Úvod

Nádorové onemocnění patří spolu se srdečním onemocněním k nejobávanějším nemocem v rozvinutých zemích. Jedná se o nekontrolované zmnožení somatických buněk. Běžně lidské buňky rostou a množí se s cílem vytvoření nových buněk v rámci přísně regulovaného a kontrolovaného buněčného cyklu. Toho se účastní tzv. protoonkogeny, tumor supresorové geny a geny pro opravu DNA. Pokud jsou tyto geny určitým způsobem změněny (je změněna jejich aktivita), mohou tyto geny způsobit rakovinu. Vzniklé poškozené buňky, jsou jako transformované buňky rozpoznány imunitním systémem a zničeny. Uniknou-li tyto buňky zničení či řízené smrti neboli apoptóze, mohou se zmnožit a vytvořit novotvar = *nádor*.

Zůstávají-li nádorové buňky na původním místě, mluvíme o tzv. benigním (nezhoubném) nádoru, který lze odstranit chirurgicky. Nacházejí-li se nádorové buňky i mimo původní místo, tzn. ztrácejí kontakt se sousedními buňkami a jsou rozšiřovány do ostatních tkání pomocí oběhového systému, mluvíme o nádorech maligních (zhoubných). Rozšiřování nádorových buněk mimo původní místo se nazývá metastázování (*Patel 2020*).

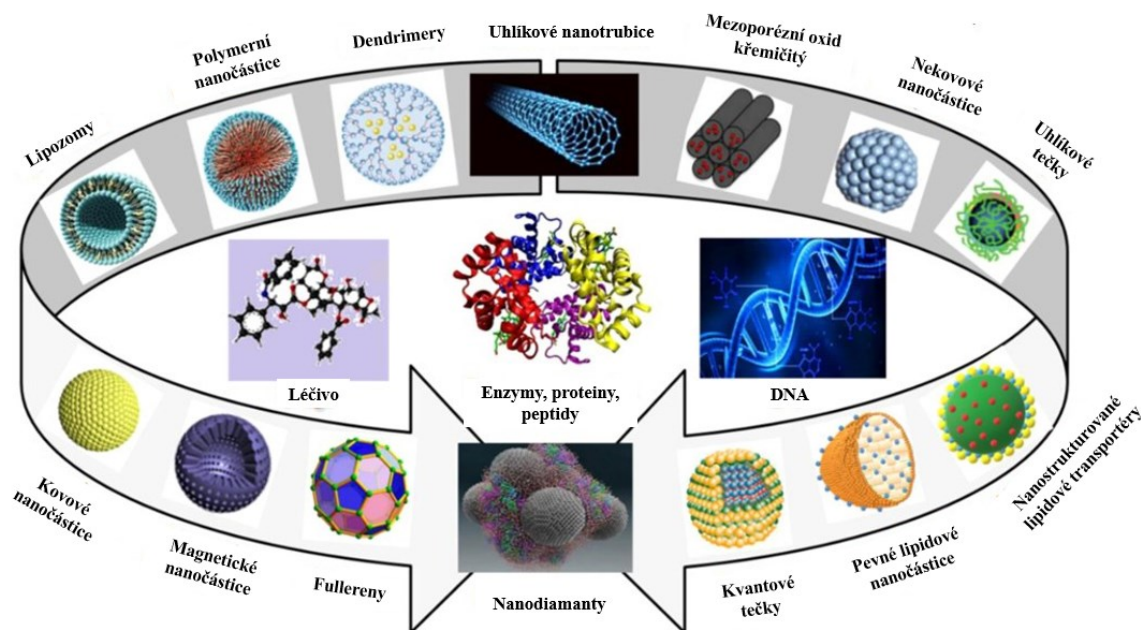
Mezi nejčastější metody léčby onkologických onemocnění patří chemoterapie, radioterapie a chirurgické řešení, případně jejich kombinace. V poslední době zaznamenává rozvoj nanomedicína. Jedná se o použití nanomateriálů pro diagnostiku, monitorování, kontrolu, prevenci a léčbu nemocí (*Tinkle a kol. 2014*). Nanomateriály mají fyzikálně-chemické vlastnosti, které se liší od vlastností objemných chemických ekvivalentů díky jejich malé velikosti. Tyto vlastnosti výrazně zvyšují potenciál nanomateriálů ve vývoji léků (*Bleeker a kol 2013*). Klasické formy léčby rakoviny vycházející z chemoterapie či radioterapie jsou spojeny s nežádoucími účinky v důsledku úzkého terapeutického indexu. Novější formy léčby označující se jako cílená léčba se snaží minimalizovat tyto nežádoucí účinky zacílením na určitý enzym či receptor. Mezi cílenou léčbu můžeme zařadit třeba inhibitory tyrosinkinasy, neboť tyrosinkinasy které jsou v nádorových buňkách často nadměrně aktivovány (*Paul a Mukhopadhyay 2004*), či monoklonální protilátky, které mohou cílit na receptory na povrchu buněk nebo na ligandy těchto receptorů. Do cílené léčby můžeme zahrnout i léčbu pomocí nanočástic (*Shishir a kol. 2018*).

1.1 Nanočástice

Nanočástice jsou částice o velikosti 1 až 100 nm, které mohou být klasifikovány dle vlastností, velikosti nebo tvaru (Khan a kol. 2019), viz. Obr. 1.

V rámci léčby rakoviny lze nanočástice využít dvěma způsoby. První možností je jejich využití v diagnostice, kdy mohou nanočástice sloužit k transportu kontrastních látek či mohou být samy využity jako „kontrastní látka“ (Baetke a kol. 2015). Příkladem takovýchto nanočástic jsou třeba kvantové tečky (QD), což jsou trojrozměrné částice s rozměry pod 100 nm. Ve srovnání s klasickými organickými barvivy mají QD dvě hlavní výhody. Mají široké excitační spektrum, takže mohou být excitovány celou řadou vlnových délek, ale zároveň mají poměrně úzké spektrum emisní. Takže jednou excitační vlnovou délkou můžeme současně excitovat několik QD. Druhá výhoda vychází z faktu, že emisní vlnovou délku můžeme ovlivnit velikostí a složením QD (Liu a kol. 2019).

Druhá možnost použití, a z hlediska léčby důležitější, je využití nanočástic jako transportérů protinádorových léčiv. Existuje široká škála různých nanočástic, které mohou sloužit k transportu léčiva. Patří mezi ně kovové nanočástice, uhlíkové nanotrubic, micely, dendrimery, liposomy, virové nanočástice, či proteinové nanočástice (Cho a kol. 2008).



Obr. 1: Struktury různých transportérů, které mohou nést rozličné molekuly jako jsou léčiva, enzymy, peptidy, proteiny či DNA. Převzato a upraveno dle (Kanwar a kol. 2019).

K zacílení vybrané nanočástice na rakovinné buňky můžeme použít dva způsoby. První způsob představuje pasivní cílení díky patofyziologickým změnám v nádoru takovým jako je změna vaskularity spojená s efektem zvýšené permeability a retence (EPR), pH či teplota (*Danhier a kol. 2010*). EPR efekt je obzvláště důležitý, neboť umožňuje vstup nanočástice k nádoru v důsledku poškození stěn krevních cév a zároveň snižuje jejich odstranění v důsledku sníženého pohybu lymfy. Druhý způsob cílení představuje aktivní cílení pomocí specifických ligandů na povrchu nanočástic. Díky specifické reakci mezi ligandem a patřičným receptorem může být dosaženo cílení na konkrétní typ buněk (*Wicki a kol. 2015*).

1.1.1 Uhlíkové nanotrubičky

Uhlíkové nanotrubičky představují formu anorganického nanotransportéru. Samotné nanotrubičky složené pouze z uhlíku jsou nerozpustné ve vodě, a proto je nezbytné modifikovat jejich povrch. Podle počtu vrstev, které nanotrubičky tvoří, rozlišujeme jednovrstvé a vícevrstvé trubičky (*Yazdan a kol. 2011*). Léčivo může být adsorbováno na povrchu trubičky, nebo se může nacházet uvnitř. Díky svému tvaru mohou vstupovat dovnitř buněk podobně jako injekční jehla (*Liu a kol. 2009*).

1.1.2 Dendrimery

Unikátní vlastnosti dendrimerů jako jsou velký stupeň větvení a dobře definovaná molekulová hmotnost, dělají z dendrimerů ideální prostředky pro transport léčiv (*Gillies a Fréchet 2005*). Díky definované molekulové hmotnosti mohou poskytovat reprodukovatelnou farmakokinetiku a díky velkému stupni větvení mohou současně vázat několik léčiv. Jsou obzvláště vhodné pro transport takových protinádorových léčiv jako je cis-platina nebo doxorubicin (*Lee a Feijen 2012*).

1.1.3 Liposomy

Liposomy představují nejčastější a nejvíce prozkoumanou formu nanotransportéru. Jedná se o lipidové váčky, které mohou vázat jak hydrofilní, tak hydrofobní molekuly. Díky tomu mohou liposomy stabilizovat dané léčivo, zlepšit jeho biodistribuci, či příjem tkání (*Sanvicens a Marco 2008*). Liposomy jsou charakteristické svým lipidovým složením, nábojem, velikostí částic, či povrchovými modifikacemi. Jako nanotransportéry poskytují biokompatibilitu a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti mohou být modifikovány, aby byla

zajištěna jejich biologická charakterizace (*Sercombe a kol. 2015*). V současné době existuje několik léčiv schválených Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) či Evropskou lékovou agenturou (EMA) ve formě liposomů, jako např. doxorubicin, jehož liposomální forma je k dostání pod názvem DOXIL (*Tzogani a kol. 2020*).

1.1.4 Virové nanočástice

Virové nanočástice jsou tvořeny kapsidovým proteinem nebo proteiny, ale neobsahují genetickou informaci příslušného viru. Protože virové částice v rámci svého životního cyklu musí vstoupit do buňky, představují virové nanočástice způsob transportu až dovnitř buňky. Jsou ve velké míře využívány ve vakcinologii či např. k transportu genů. Pro využití k transportu léčiv v rámci rakoviny je však zpravidla třeba modifikovat povrch viru, abychom dosáhli nádorově-specifického zacílení (*Steinmetz 2011*)

1.1.5 Proteinové nanočástice

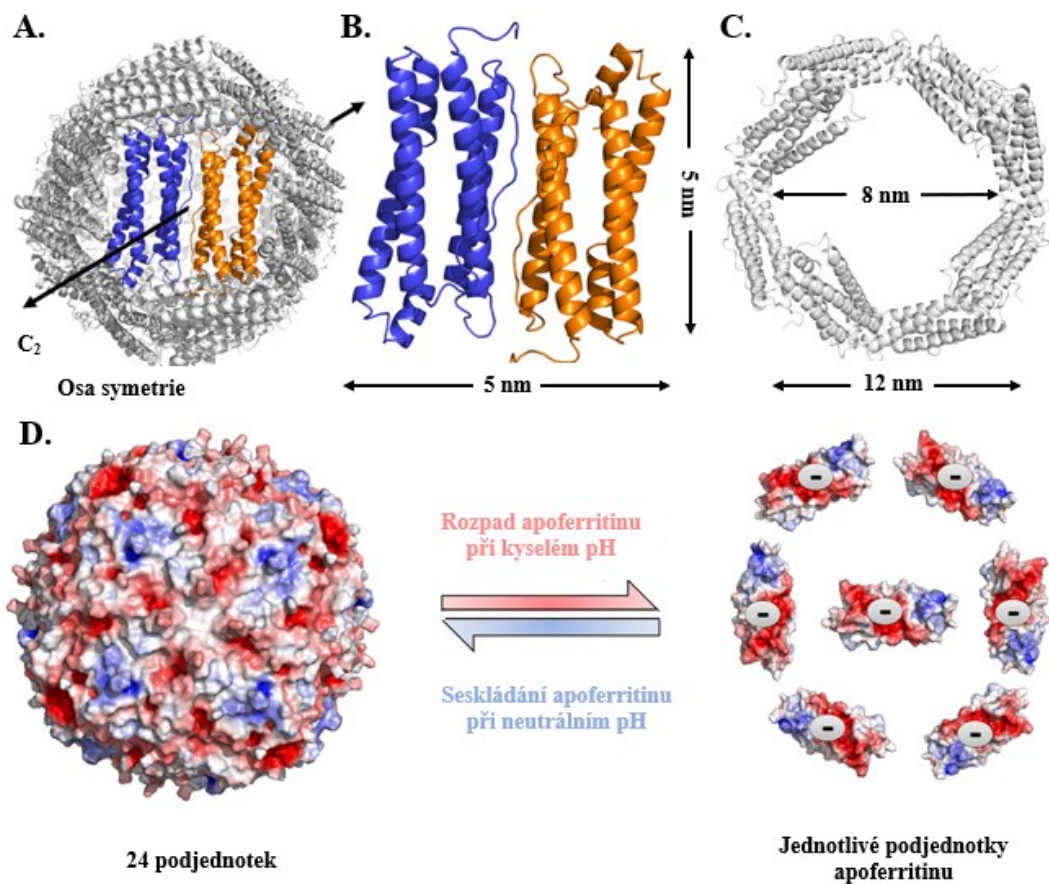
Proteiny představují velmi zajímavou skupinu látek sloužících jako nanotransportéry. Mají totiž několik výhod, mezi které patří biodegradovatelnost, stabilita, snadná kontrola velikosti, či možnost vstupu do buňky skrz endocytózu. Jako proteinový nanotransportér může sloužit např. fibroin, lidský sérový albumin, gliadin, želatina, či ferritin (*Hong a kol. 2020*). Obzvláště proteiny lidského těla jsou velmi dobré transportéry, neboť se jedná o tělu vlastní proteiny, které jsou tedy netoxické a nevyvolávají ani imunitní odpověď, se kterou se můžeme setkat v případě použití jiných forem nanotransportérů (*Kianfar 2021*).

1.2 (Apo)ferritin

Ferritin je protein, který slouží k uskladnění a transportu iontů železa (*Arosio a kol. 2009*). Samotný ferritin se skládá z 24 podjednotek, které dohromady vytváří sférickou strukturu o vnějším průměru ≈ 12 nm (viz. Obr. 2). Vnitřek ferritinu je tvořen dutinou o velikosti ≈ 8 nm, ve které jsou za normálních okolností uloženy ionty železa (*Crichton, 2019*). Pokud protein připravíme rekombinantně v prostředí bez těchto iontů, nebo odstraníme ionty pomocí difuze, získáme proteinovou strukturu, která se nazývá apoferritin. Vnitřní dutina apoferritinu tak může být využita pro uskladnění léčiv. Podjednotky, které tvoří (apo)ferritin jsou dvojího druhu, a to lehké a těžké. Lehké podjednotky zajišťují nukleaci iontů železa, zatímco těžké podjednotky, které jsou větší, se chovají jako feroxidasa. Poměr mezi těžkými a lehkými podjednotkami je tkáňově specifický a pohybuje se mezi 2:22 po 20:4 (*Harrison a Arosio 1996*). Jeho změna může ovlivnit dostupnost iontů železa. Např. nadměrná exprese těžké podjednotky vede k snížení hladiny cytosolického železa a jeho zvýšené inkorporaci do ferritinu (*Harned a kol. 2010*).

Vstup ferritinu do buňky je zprostředkován pomocí dvou typů receptorů. Prvním typem je transferrinový receptor 1 (TfR1) (*Montemiglio a kol. 2019*), který zajišťuje na clathrinu závislou endocytózu ferritinu. Tento typ receptoru interaguje s těžkými podjednotkami ferritinu (*Li a kol. 2009*). Druhý typ receptoru, který se účastní ferritinové internalizace, je SCARA5, jenž je schopen interagovat jak s lehkým, tak těžkým řetězcem (*Yu a kol. 2020*). Nádorové buňky mají vyšší potřebu železa a s tím spojenou pozměněnou hladinu příslušných receptorů (*Brown a kol. 2020*). Nadměrná exprese transferinového receptoru 1 byla pozorována u rakoviny prsu, střev, jater, prostaty, či plic (*Shen a kol. 2018*). Snížená exprese SCARA5 byla naopak pozorována u rakoviny prsu, kde korelovala s pokročilejším stádiem a horší prognózou (*You a kol. 2017*). Změněnou hladinu exprese TfR1 je možné využít k pasivnímu cílení apoferritinu s enkapsulovaným léčivem vůči nádoru (*Liang a kol. 2014*). Kromě toho je možné povrch apoferritinu modifikovat za účelem aktivního cílení. Bohužel tyto modifikace mohou vést k aktivaci imunitního systému (*Kuriakose a kol. 2016*). Apoferritin vykazuje širokou pH stabilitu (3,4-10) a při hodnotě pod 2 se rozpadá na jednotlivé podjednotky. Nicméně zvýšením pH může dojít k opětovnému složení do nativní struktury (*Kim a kol. 2011*). Tento proces může být využit k enkapsulaci léčiva, kdy je nejprve snížením pH apoferritin rozložen a poté opětovně složen v přítomnosti léčiva. Přičemž dochází k uzavření léčiva. Takovýto proces enkapsulace léčiva byl využit například pro enkapsulaci doxorubicinu (*Dostálová a kol. 2016*), či ellipticinu (*Indra a kol. 2019*). Jiná

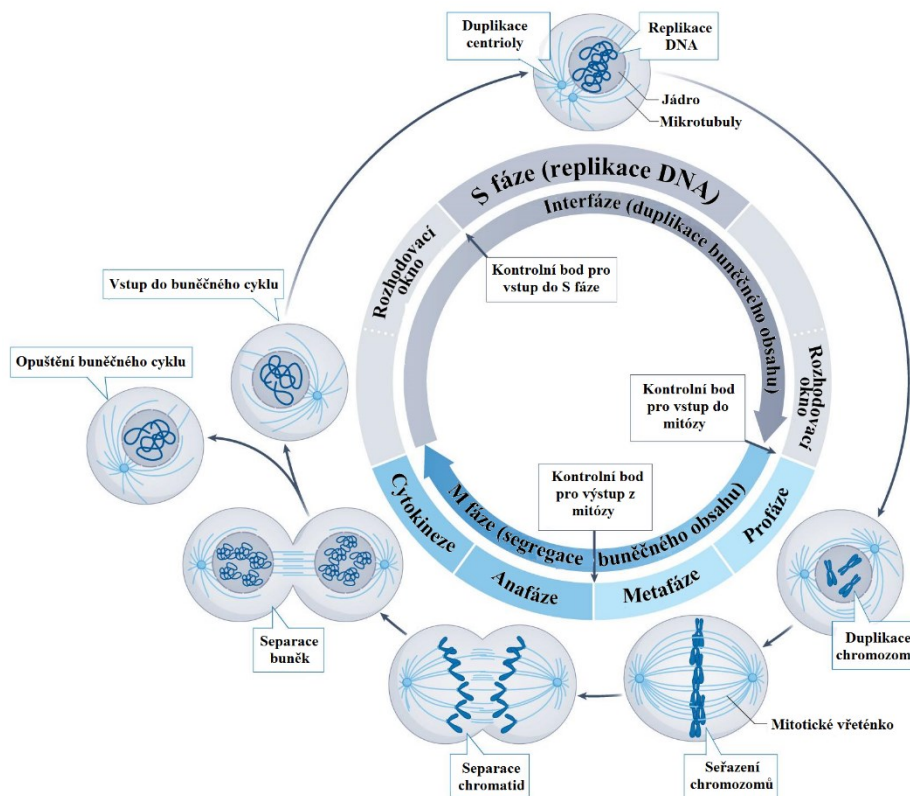
možnost pro enkapsulaci léčiva vycházející z rozložení a složení apoferritinu využívá prostředí 8M močoviny (Liang 2014). Ne všechny metody enkapsulace vyžadují disociaci podjednotek. Zvýšení teploty (Yang a kol. 2017) nebo nízká koncentrace močoviny (Yang a kol. 2017) vedou k změně velikosti pórů mezi podjednotkami, kterými mohou léčiva vstupovat dovnitř. Některá léčiva mohou vstoupit do apoferritinu skrz póry i v nativním stavu. Příkladem takového léčiva jsou tyrosinkinase inhibitory gefitinib (Kuruppu a kol. 2015) a vandetanib (Jáková a kol. 2021).



Obr. 2: Struktura, velikost a reverzní složení apoferritinu. (A.) Apoferritin sestavený z 24 podjednotek znázorněný podél jedné z dvanácti dvojitých os symetrie. (B.) Podjednotky apoferritinu se skládají z těžkých (modrá) a lehkých (oranžová) podjednotek. (C.) Struktura apoferritinu se skládá má vnější průměr 12 nm a vnitřní průměr 8 nm. (D.) Rozložení a složení apoferritinu při různé hodnotě pH. Převzato a upraveno dle (Mohanty a kol. 2021).

1.3 Buněčný cyklus

U eukaryot je buněčný cyklus (Obr. 3) složitý a skládá se ze čtyř samostatných fází G_1 , S, G_2 a M. Buňka tráví většinu času v interfázi, což je společný název pro G_1 , S a G_2 fázi, během níž buňka roste, replikuje své chromozomy a připravuje se na buněčné dělení. Během interfáze jsou chromozomy dekondenzovány a distribuovány po celém jádře. V M fázi buňka separuje dceřiné chromozomy a dochází k cytokinezi neboli dělení buňky (*Britannica*, 2022). Typický buněčný cyklus lidské buňky probíhá přibližně 24 hodin, kdy až 95 % času buněčného cyklu je stráveno v interfázi (*Cooper*, 2000). Po dokončení dělení vstoupí dceřiná buňka do své vlastní interfáze a zahájí nový buněčný cyklus (*National Human Genome Research Institute*, 2022). Některé buňky se dělí pouze příležitostně při potřebě nahrazení v důsledku poškození nebo buněčné smrti. Takovéto buňky se vyskytují v G_0 fázi (klidová fáze cyklu), kde jsou metabolicky aktivní, ale nemnoží se (neproliferují). Buňky se nemnoží až do okamžiku, kdy jsou potřeba nové buňky a kdy pod vlivem signalizace opouští G_0 fázi a vrátí se do G_1 fáze buněčného cyklu (*Matthews a kol.* 2021).



Obr. 3: Znáornění buněčného cyklu, který se skládá z interfáze tzv. přípravné fáze a mitózy. Převzato a upraveno dle (*Matthews a kol.* 2021).

Buněčného dělení se účastní proteiny, které jej stimulují. Mezi zúčastněné proteiny patří růstové faktory, receptory růstových faktorů, signální „převodníky“ a jaderné regulační proteiny neboli transkripční faktory. Pro „zapnutí“ buněčného dělení se musí stimul dostat do jádra. Růstový faktor zpravidla aktivuje receptor umístěný na buněčné membráně. Aktivací se přenese signál z receptoru na buněčném povrchu do jádra buňky. Následně transkripční faktory iniciují transkripci genů zapojených do buněčné proliferace (*Britannica, 2022*).

Pro správnost buněčného cyklu produkují buňky speciální proteiny a signalizační systémy, které pracují na bázi kontrolních bodů. Kontrolní body se nacházejí na konci G_1 a na začátku G_2 fáze. V G_1 fázi je sledována přítomnost vhodných růstových faktorů buňky. Je-li vše v pořádku, buňky projdou restričním bodem a vstoupí do S fáze. Nejsou-li dostupné vhodné růstové faktory, dělení buňky se zastaví v bodě restrikce a buňka putuje do G_0 fáze. Příkladem jsou fibroblasty, které vstupují do G_0 fáze, kde setrvávají do doby výskytu destičkového růstového faktoru. Destičkový růstový faktor se uvolňuje z krevních destiček během poranění tkáně a signalizuje proliferaci fibroblastům (*Cooper, 2000*). Druhý kontrolní bod se nachází na konci G_2 fáze a bezprostředně rozhoduje o vstupu buňky do mitózy. Průchod tímto kontrolním bodem je regulován řadou faktorů, který rozhodují o připravenosti vstupu buňky do další dělicí fáze. Před vstupem do mitózy je v buňce již zkopírovaná DNA. Chromozomy se v jádře skládají ze dvou „totožných“ kopií, nazývaných sesterské chromatidy. Buňka také obsahuje dva centrozomy, které organizují mikrotubuly (*Alberts a kol. 1998*).

Mitóza se skládá z pěti základních fází: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze. Při mitóze dochází ke vzniku dvou nových (dceřiných buněk) z buňky jedné (mateřské). Dceřiné buňky jsou geneticky totožné s mateřskou buňkou. Cílem mitózy je zajištění distribuce úplné sady chromozomů pro dceřiné buňky (*Campbell a Reece, 2002*). Během profáze se buňka začíná postupně rozkládat a připravovat se na dělení chromozomů. Chromozomy začínají kondenzovat a tvoří se dělicí vřeténka, která se skládají z mikrotubulů. Mikrotubuly jsou silná vlákna, která pohybují s chromozomy během mitózy. Během profáze dochází také k přípravě rozpadu jádra (*Cooper, 2000*). V prometafázi začínají mitotická vřeténka zachycovat a organizovat chromozomy. Dochází k zahuštění chromozomů a rozpadu jaderného obalu (*Campbell a Reece, 2002*).

V metafázi dochází k navázání všech chromozomů na dělicí vřetenko a k uspořádání chromozomů do ekvatoriální polohy (*Alberts a kol. 1998*).

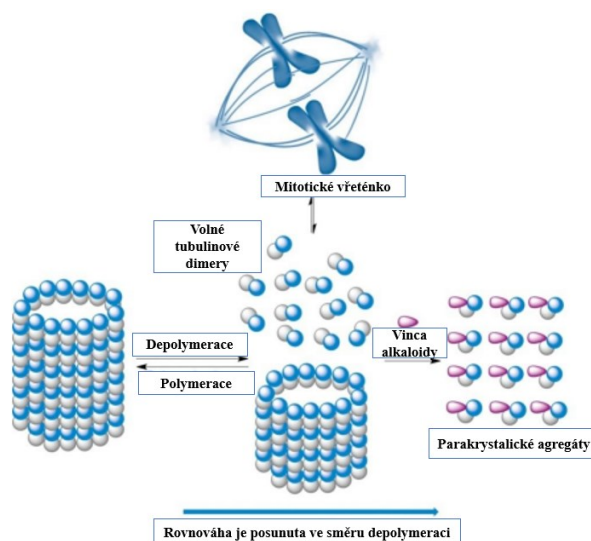
Než vstoupí buňka do anafáze, dochází ke zkontrolování, zda jsou všechny chromozomy správně připevněny k mikrotubulům. Jedná se o další kontrolní bod během buněčného cyklu. Tento kontrolní bod pomáhá zajistit rovnoměrné rozdělení chromatid mezi obě dceřiné buňky. Vyskytne-li se problém, buňka zastaví dělení, dokud nebude problém vyřešen (*Britannica, 2022*).

Během anafáze jsou sesterské chromatidy odděleny a taženy k opačným koncům buňky. Mikrotubuly, které nejsou připojeny k chromozomům se oddělují a prodlužují buňku.

V telofázi jsou buňky téměř vytvořené a začínají obnovovat své struktury. Mitotické vřetenko je rozloženo a dochází ke vzniku jádra. Chromozomy začínají dekonenzovat a vracet se do vláknité formy (*Stanton a kol. 2011*).

V anafázi a telofázi dochází rovněž k cytokinezi, při které dochází k sevření buňky na dvě části pomocí stahovacích vláken tvořených z aktinu (*Alberts a kol. 1998*) za vzniku dvou nových dceřiných buněk (*Campbell a Reece, 2002*).

Mikrotubuly díky své klíčové roli při buněčném dělení slouží jako ověřené cíle pro protinádorovou léčbu, viz Obr. 4. Vybraná léčiva zasahují do struktury mikrotubulů, čímž dochází k inhibici jejich dynamiky a destabilizaci. Díky inhibici dynamiky mikrotubulů dochází k zastavení buněčného dělení, které může vést k mitotické smrti buňky (*Stanton a kol. 2011*).



Obr. 4: Inhibice mikrotubulů během buněčného cyklu pomocí vinca alkaloidů. Převzato a upraveno dle (*Matthews a kol. 2021*).

1.4 Kolchicin

Kolchicin je alkaloid pocházející z jedovaté rostliny ocúnu jesenního (*Colchicum autumnale*) (Ashok a kol. 2017).

Používá se jako léčivo k léčbě dny a familiární středomořské horečky. Ačkoliv není kolchicin používán k léčbě rakoviny kvůli toxicitě, vykazuje inhibiční účinky buněčného cyklu ve fázi G₂/M (Ashok a kol. 2017). Během buněčného cyklu se váže na tubulin, jednu ze stavebních jednotek mikrotubul (*Detrich III a kol. 1982; Banerjee a Luduena 1992; Sackett a Varma 1993*), čímž blokuje jejich následné zmnožení (*Sackett a Varma 1993*), inhibuje transport vezikul, sekreci cytokinů a dělení buněk. Kolchicin také omezuje mitochondriální metabolismus rakovinných buněk prostřednictvím inhibice aniontových kanálů mitochondriální membrány (*Maldonado a kol. 2010*).

Díky vysoké toxicitě Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) neschválil intravenózní použití kolchicinu, avšak orální podání je bezpečnou léčbou (*Banerjee a Luduena 1992; Rochdi a kol. 1994*). S cílem použití struktury kolchicinu, bylo syntetizováno mnoho analogů v naději na nalezení nového užitečného léku s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi (Ashok a kol. 2017).

Pro snížení nežádoucích účinků kolchicinu, lze využít vazbu léčiva na vhodný transportér. Jeden z vhodných transportérů pro vázanost kolchicinu by mohl být apoferritin, který specificky cílí na nádorové tkáně a je schopný minimalizovat nežádoucí účinky cytostatika či překonat případný vývoj lékové rezistence.

Metabolismus kolchicinu nebyl dosud u člověka zkoumán. Nynější data pocházejí pouze z experimentů in vitro (*Niel a Scherrmann 2006*) a je zřejmé, že kolchicin je v lidském těle ovlivněn dvěma proteiny. První protein je P-glykoprotein, který reguluje distribuci kolchicinu ve tkáních a jeho vylučování žlučovými cestami a ledvinami (*Terkeltaub a kol. 2011*). Zároveň je P-glykoprotein zodpovědný za rezistenci na kolchicin (*Ling 1992*). Druhým proteinem je cytochrom P450 3A4 (CYP3A4), který se účastní biotransformace kolchicinu (*Tateishi a kol. 1997*). Silné inhibitory CYP3A4 inhibují oxidaci kolchicinu na demetylované produkty, které jsou méně aktivní než původní molekula, a proto jsou inhibitory spojeny se zvýšeným rizikem toxicity kolchicinu (*Joshi a kol. 2010*).

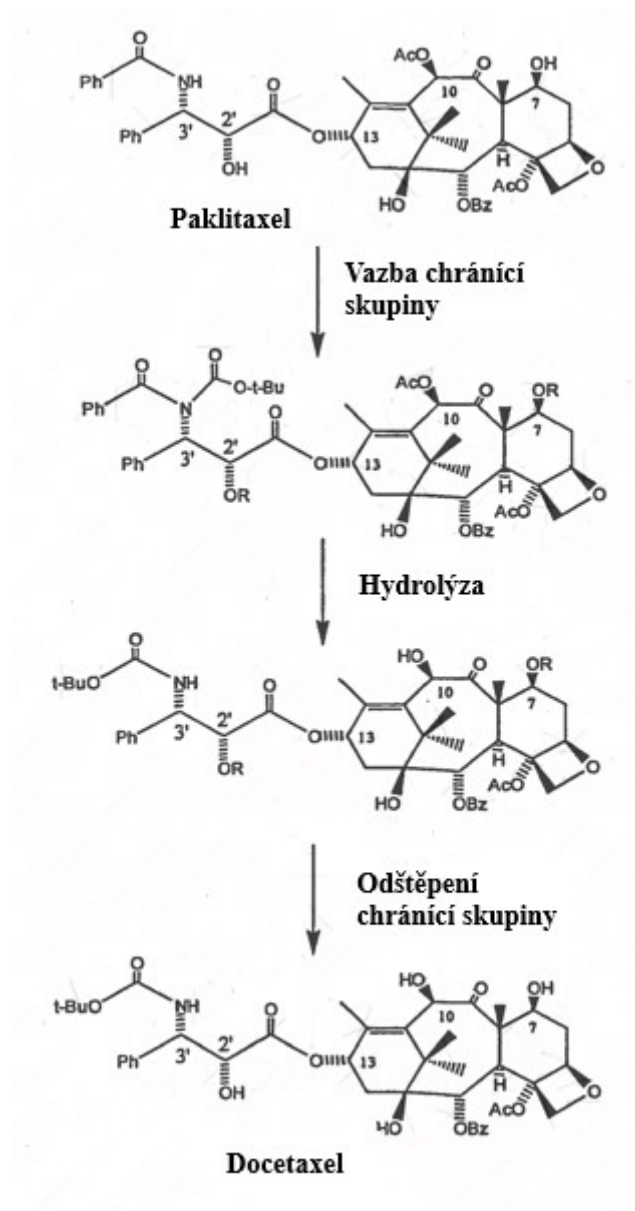
1.5 Docetaxel

Docetaxel je polysyntetická látka, která vzniká úpravou molekuly paklitaxelu ze skupiny taxanů (Obr. 5). Taxany představují jednu z nejučinnějších tříd protinádorových látek. Bohužel úspěch této třídy léčiv je omezen díky rychlému nárůstu buněčné rezistence, zprostředkované především expresí fenotypu pro MDR nebo změnami mikrotubulů (*Galleti a kol. 2007*). Gen MDR1 kóduje P-glykoprotein (transportér léčiv), který hraje klíčovou roli při vylučování léčiv. P-glykoprotein je velmi důležitá složka hematoencefalické bariéry, která brání vstupu mnoha potenciálně toxických sloučenin do centrální nervové soustavy. MDR protein také podporuje vylučování léků do žluče a moči (*Genomia*). V posledních desetiletích bylo vyvinuto velké úsilí o identifikaci nových derivátů taxanů se zlepšenými vlastnostmi vůči rezistenci nádorových buněk. Bylo zjištěno několik strukturně odlišných derivátů (paklitaxel, docetaxel) vykazujících dlouhodobější aktivitu proti rezistentním nádorovým buňkám (*Galleti a kol. 2007*).

Docetaxel je antimikrotubulinová látka bránící depolymeraci mikrotubulů. Ta má za následek inhibici buněčného cyklu (*Lyseng-Williamson a Fenton 2005*). Jedná se o vysoce účinný chemoterapeutický lék používaný při léčbě různých typů rakoviny, včetně karcinomu plic či rakoviny prsu. Léčivo je podáváno intravenózně díky nízké orální biologické aktivitě v důsledku snížené rozpustnosti ve vodě, špatné permeability membrán a náchylnosti k metabolismu při prvním průchodu játry (*Razak a kol. 2021*).

Docetaxel je metabolizován jaterními enzymy cytochromu P450 izoformy CYP3A4 a CYP3A5, přičemž byly identifikovány 4 aktivní metabolity (*Fulton a Spencer 1996, Kenmotsu a Tanigawara 2015*).

Metabolismus docetaxelu *in vitro* snižují léky, které jsou substráty izoformy cytochromu 3A4 (erytromycin, ketokonazol, nifedipin, troleandomycin, testosteron, orfenadrin a midazolam). Určitou *in vitro* inhibici metabolismu docetaxelu vyvolal také vinorelbin, vinblastin a doxorubicin. Jiné léky včetně cisplatiny, fluorouracilu, cyklofosfamidů a etoposidu však měly na metabolismus docetaxelu *in vitro* malý vliv.



Obr. 5: Syntéza docetaxelu z paklitaxelu. Syntéza probíhá přes navázání chránící skupiny, hydrolyzu a odštěpení chránící skupiny. *Převzato a upraveno dle (Naidu a kol. 2012).*

2 Cíl práce

Cíle diplomové práce se dají shrnout do následujících bodů:

- 1) Nalezení vhodného hmotnostního poměru mezi léčivem (kolchicinem/docetaxelem) a apoferritinem
- 2) Nalezení vhodných podmínek (vysoká míra enkapsulace) pro enkapsulaci léčiv do apoferritinu
- 3) Porovnání metabolismu volného docetaxelu s docetaxelem enkapsulovaným v apoferritinu

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Lach-Ner (ČR): NaOH, HCl; diethylether; KH_2PO_4 ; močovina; CuSO_4 ; ZnSO_4 ; glycin, octová kyselina, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; MgCl_2

MedChemExpress (Švédsko): kolchicin

Merck (Německo): apoferritin (equine spleen, 50 mg/ml)

Masarykova Univerzita, Brno: apoferritin typu: Rk (rekombinantní protein založený na těžké podjednotce lidského ferritinu, kde jsou C-terminální aminokyseliny nahrazeny pozitivně nabitými aminokyselinami, 15 mg/ml).

Sigma, Aldrich (USA): DMSO; Tris; glukosa-6-fosfát; NADP^+ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Scintila (ČR): docetaxel

VWR: acetonitril, methanol

3.2 Přístroje

analytické váhy: Discovery, Ohaus (Švýcarsko);

centrifuga: Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (Německo)

HERMLE Z383k, výkyvný rotor – LaborTechnik (Německo)

dialyzační systém: MiliPore DuraporeTM, 0,22 μM , Merck (Německo)

filtrační mikrozkmavky: Amicon Ultra-0,5 a 4, 3 kDa, Millipore (Německo)

HPLC systém 1: UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex (USA): RS Pump, RS Autosampler, RS Diode Arra Detector, RS Column compartment, RS Degasys

HPLC systém 2: Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, Degasys DG-1210

pH metr: ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (MiniTrode, Hamilton (USA))

Thermo scientific (USA); HI-2211, kombinovaná elektroda – Hanna Instruments (UK)

předvážky: Kern 440-35A, Sigma, Aldrich (USA)

sonikátor: Ultrasonic Compact Cleaner Teson1 Tesla (Česká republika)

třepačka: Thermomixer compact (Eppendorf, Německo)

Yellow line O52 basic (IKA, Německo)

3.3 Metody

Enkapsulace kolchicinu i docetaxelu probíhala pomocí stejných metod. Na základě získaných výsledků viz kapitola 4. *Výsledky (str. X)* byly některé metody upravené pro konkrétní léčivo.

3.3.1 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10

V hmotnostním poměru 1:10 mezi léčivem a nanotransportérem byly vytvořeny 2 typy vzorků, nanotransportéru a léčiva, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok kolchicinu je rozpuštěn ve vodě/docetaxel je v DMSO. Oba zásobní roztoky měly koncentraci 1 mg/ml. Zásobní roztok apoferritinu byl o koncentraci 50 mg/ml.

Při pasivní enkapsulaci docházelo pouze k inkubaci léčiva a nanotransportéru ve vodném prostředí. Nejdříve byl inkubován apoferritin ve vodném prostředí za neustálého třepání (450 RPM; 30 minut; 25 °C). Poté bylo přidáno léčivo a vzorky byly opět inkubovány za neustálého třepání (450 RPM; 30 minut; 25 °C). Množství jednotlivých složek ve vzorcích je vyjádřeno v Tab. 1.

Tab. 1: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro pasivní enkapsulaci léčiva do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μ l. Zásobní roztok apoferritinu měl koncentraci 50 mg/ml. Zásobní roztok rozpuštěného kolchicinu ve vodném prostředí/docetaxelu v DMSO byl o koncentraci 1 mg/ml

C _{kApo} [mg/vzorek]	V _{kApo} [μ l]	V _{H₂O - prostředí} [μ l]	V _{l_éč} [μ l]
1	20	200	100
0,75	15	230	75

Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány (7500 g; 2,5 minuty). Vzniklé supernatanty byly převedeny do mikrofiltračních zkumavek o maximální propustnosti 3 kDa. Vzorky byly centrifugovány (15 000 x g; 5 minut), promyty 320 μ l ultračisté vody a opět centrifugovány (15 000 x g; 5 minut). Promytí vzorků v mikrofiltračních zkumavkách bylo zopakováno ještě jednou při stejných podmínkách. Vzniklý komplex apoferritin-léčivo byl jímán a analyzován pomocí HPLC, viz kapitola 3.3.18 *Metody HPLC*.

Do připravených vialek bylo napipetováno 25 μ l acetonitrilu a 25 μ l vzorku. Připravené vzorky byly měřeny při vlnové délce 245 nm v případě kolchicinu a při 230 nm u docetaxelu. Výsledné množství vázaného a nevázaného léčiva v měřených vzorcích bylo vypočítáno z připravené kalibrační křivky. Kalibrační křivka kolchicinu i docetaxelu byla o rozsahu 0 až 10 mg/ml a byla pro každé léčivo jiná.

3.3.2 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí Cu^{2+} iontů

V hmotnostním poměru 1:10, léčiva ku apoferritinu, byly vytvořeny 2 sady po 2 typech vzorků o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl koncentraci 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodě/docetaxelu v DMSO byl o koncentraci 1 mg/ml.

Inkubace jedné sady vzorků obsahujících kolchicin a apoferritin probíhala ve vodném prostředí 10 mM CuSO_4 . Druhá sada vzorků apoferritinu a kolchicinu byla inkubována v 10 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.

Docetaxel spolu s apoferritinem byl inkubován pouze ve vodném prostředí 10 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.

Nejprve bylo do mikrozkušavky napipetováno prostředí, následně přidáno léčivo, a nakonec napipetován nanotransportér. Objemy jednotlivých látek v mikrozkušavkách jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro pasivní enkapsulaci léčiva do apoferritinu v prostředí 10 mM CuSO_4 /10 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μ l. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodném prostředí/docetaxelu v DMSO měl koncentraci 1 mg/ml.

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [μ l]	$V_{10 \text{ mM } \text{CuSO}_4/\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}}$ [μ l]	$V_{L\acute{e}c}$ [μ l]
1	20	200	100
0,75	15	230	75

Další postup již byl analogický, viz kapitola 3.3.1 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10.*

3.3.3 Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí Zn^{2+} iontů

V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 2 typy vzorků, kolchicinu a nanotransportéru, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl koncentraci 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodě byl o koncentraci 1 mg/ml.

Inkubace vzorků obsahujících kolchicin a apoferritin probíhala ve vodném prostředí 10 mM $ZnSO_4$.

Nejprve bylo do mikrozkušavky napipetováno prostředí 10 mM $ZnSO_4$, následně byl přidán kolchicin, a nakonec napipetován nanotransportér. Objemy jednotlivých látek obsažených v mikrozkušavkách jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro pasivní enkapsulaci kolchicinu do apoferritinu v prostředí 10 mM $ZnSO_4$ v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μ l. *Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodném prostředí měl koncentraci 1 mg/ml.*

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [μl]	V_{10 mM ZnSO₄} [μl]	V_{Kol} [μl]
1	20	200	100
0,75	15	230	75

Další postup již byl analogický, viz kapitola 3.3.1 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10.*

3.3.4 Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí močoviny

Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu probíhala také pomocí močoviny. Nejprve byl apoferritin spolu s kolchicinem inkubován po dobu 45 minut v 8 M močovíně. Po inkubaci byl vzorek přepipetován do dialyzační cely. Pod celu bylo přidáno

14,5 ml 6 M močoviny spolu s kolchicinem. Inkubace vzorku v 6 M močovíně spolu s kolchicinem probíhala 6 hodin. Následně bylo vyměněno promývací prostředí za 4 M močovinu spolu s kolchicinem. Následující den bylo prostředí opět vyměněno za 2 M močovinu s kolchicinem a inkubace vzorku probíhala dalších 6 hodin. Po uplynutí 6 hodin bylo prostředí vyměněno za vodu s kolchicinem. Nakonec byl vzorek vyjmut z dialyzační cely a promýván dle kapitoly 3.3.1 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*. Koncentrace kolchicinu ve vzorku i ve všech dialyzačních roztocích byla 0,3 mg/ml, resp. 0,225mg/ml.

3.3.5 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10

V hmotnostním poměru 1:10, léčiva ku apoferritinu, byly vytvořeny 2 typy vzorků o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodě/docetaxelu v DMSO měl koncentraci 1 mg/ml.

Při aktivní enkapsulaci docházelo k inkubaci nanotransportéru a léčiva ve vodném prostředí o pH < 3. Inkubace nanotransportéru a léčiva spolu s vodným prostředím o zvoleném pH probíhala na třepačce (450 RPM; 30 minut; 25 °C). Množství jednotlivých složek ve vzorcích je vyjádřeno v Tab. 4.

Tab. 4: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro aktivní enkapsulaci léčiva do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 µl. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok léčiva ve vodném prostředí/docetaxelu v DMSO měl koncentraci 1 mg/ml.

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [µl]	V_{H2O - prostředí} [µl]	V_{Léč} [µl]
1	20	200	100
0,75	15	230	75

Po inkubaci bylo pH vzorků zvýšeno pomocí 1M NaOH nad pH 7. Vzorky byly opět inkubovány na třepačce (450 RPM; 30 minut; 25 °C).

Po inkubaci látek v mikrozkušavkách byly vzorky centrifugovány (7500 x g; 2,5 minuty). Vzniklé supernatanty byly převedeny do mikrofiltračních zkumavek o maximální propustnosti 3 kDa. Vzorky byly centrifugovány (15 000 x g; 5 minut), promyty 320 µl

ultračisté vody a opět centrifugovány ($15\,000 \times g$; 5 minut). Promytí vzorků v mikrofiltračních zkumavkách bylo provedeno ještě jednou při stejných podmínkách. Vzniklý komplex komerčního apoferritinu spolu s léčivem byl jímán do vialek a analyzován pomocí HPLC, viz kapitola 3.3.18 *Metody HPLC*.

Do vialek bylo napipetováno 25 μl acetonitrilu a 25 μl vzorku. Připravené vzorky byly měřeny při vlnové délce 245 nm v případě kolchicinu a při 230 nm u docetaxelu.

Výsledné množství vázaného a nevázaného léčiva v měřených vzorcích bylo vypočítáno z připravené kalibrační křivky léčiva.

3.3.6 Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:5

V hmotnostním poměru 1:5 byly vytvořeny 2 typy vzorků, kolchicinu a apoferritinu, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu byl o koncentraci 1 mg/ml.

Pokus probíhal analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*, pouze objemy jednotlivých složek byly jiné, viz. Tab. 5.

Tab. 5: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro aktivní enkapsulaci kolchicinu do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:5. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μl . Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodném prostředí měl koncentraci 1 mg/ml.

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [μl]	V_{H_2O} - prostředí [μl]	V_{Kol} [μl]
0,5	10	210	100
0,25	7,5	237,5	75

3.3.7 Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:20

V hmotnostním poměru 1:20, byl vytvořen vzorek, kolchicinu a nanotransportéru, o množství léčiva 0,05 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodě měl koncentraci 0,5 mg/ml.

Pokus probíhal analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*. Pouze koncentrace zásobního roztoku kolchicinu činila 0,5 mg/ml, viz. Tab. 6.

Tab. 6: Objemy jednotlivých složek ve vzorku pro aktivní enkapsulaci kolchicinu do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:20. Celkový objem ve zkumavce byl 320 μ l. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodném prostředí měl koncentraci 0,5 mg/ml.

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [μ l]	V_{H_2O} - prostředí [μ l]	V_{Kol} [μ l]
1	20	200	100

3.3.8 Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno v DMSO)

V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 2 typy vzorků, kolchicinu a nanotransportéru, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu byl rozpuštěný v DMSO o koncentraci 1 mg/ml. Pokus probíhal analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*.

3.3.9 Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno ve vodě s HCl)

V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 2 typy vzorků, kolchicinu a nanotransportéru, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu byl rozpuštěný ve vodě s HCl (150:1) o koncentraci 1 mg/ml. Pokus probíhal analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*.

3.3.10 Příprava ApoKol pomocí „obrácené“ aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10

V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 4 typy vzorků, kolchicinu a nanotransportéru, o množství kolchicinu 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Jeden zásobní roztok kolchicinu byl rozpuštěný ve vodě o koncentraci 1 mg/ml a druhý zásobní roztok kolchicinu rozpuštěný v DMSO o koncentraci 1 mg/ml.

Při aktivní enkapsulaci docházelo k inkubaci nanotransportéru a léčiva v prostředí o $\text{pH} > 12$. Inkubace nanotransportéru a léčiva spolu s prostředím o zvoleném pH probíhala na třepačce (450 RPM; 30 minut; 25 °C). Množství jednotlivých složek ve vzorcích je vyjádřeno v Tab. 7.

Tab. 7: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro „obrácenou“ aktivní enkapsulaci kolchicinu do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μl . Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu ve vodě nebo DMSO měl koncentraci 1 mg/ml.

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [μl]	V_{H_2O} - prostředí [μl]	V_{Kol} [μl]
1	20	200	100
0,75	15	230	75

Po inkubaci bylo pH vzorků sníženo pomocí 1M HCl na hodnotu pod pH 8. Vzorky byly opět inkubovány na třepačce (450 RPM; 30 minut; 25 °C).

Následné promývání vzorků v mikrofiltračních zkumavkách probíhalo analogicky podle kapitoly 3.3.5 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10.

3.3.11 Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z rekombinantního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10

V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 2 typy vzorků, kolchicinu a nanotransportéru, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 15 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml byl rozpuštěný v DMSO.

Pokus probíhal analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*. Pouze objemy jednotlivých složek se lišily od předchozích kapitol, viz. Tab. 8.

Tab. 8: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro aktivní enkapsulaci kolchicinu do rekombinantního apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μl . Zásobní roztok apoferritinu měl 15 mg/ml. Zásobní roztok kolchicinu v DMSO měl koncentraci 1 mg/ml.

C_{rApo} [mg/vzorek]	V_{rApo} [μl]	V_{H_2O} - prostředí [μl]	V_{Kol} [μl]
1	66	153,2	100
0,75	50	195	75

3.3.12 Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10

V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 2 typy vzorků docetaxelu a nanotransportéru o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu o koncentraci 10 mg/ml byl rozpuštěný v DMSO.

Při aktivní enkapsulaci docházelo k inkubaci nanotransportéru a léčiva ve vodném prostředí o $\text{pH} \leq 3$. Pokus probíhal poté analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*. Pouze objemy jednotlivých složek se lišily od předchozích kapitol, viz. Tab. 9.

Tab. 9: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro aktivní enkapsulaci docetaxelu do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:10. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μl . Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu v DMSO měl koncentraci 10 mg/ml.

C_{kApo} [mg/vzorek]	V_{kApo} [μl]	V_{H_2O} - prostředí [μl]	V_{Doc} [μl]
1	20	290	10
0,75	15	297,5	7,5

3.3.13 Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:5

V hmotnostním poměru 1:5 byly vytvořeny 2 typy vzorků léčiva a nanotransportéru o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu o koncentraci 10 mg/ml byl rozpuštěný v DMSO.

Při aktivní enkapsulaci docházelo k inkubaci nanotransportéru a léčiva ve vodném prostředí o $\text{pH} < 2,5$. Výsledné objemy látek lze pozorovat v Tab. 10. Pokus probíhal poté analogicky jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*.

Tab. 10: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro aktivní enkapsulaci docetaxelu do apoferritinu ve vodném prostředí v poměru 1:5. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μl . Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu rozpuštěný v DMSO o koncentraci 10 mg/ml.

CkApo [mg/vzorek]	VkApo [μl]	V _{H₂O} - prostředí [μl]	V _{Doc} [μl]
0,5	10	300	10
0,325	7,5	305	7,5

3.3.14 Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru

Postup metody byl dle (Ghosh a kol. 2016) s drobnými modifikacemi. V hmotnostním poměru 1:10 byly vytvořeny 2 typy vzorků docetaxelu a nanotransportéru, o množství léčiva 0,1 mg a 0,075 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu o koncentraci 10 mg/ml byl rozpuštěný v DMSO. Komerční apoferritin spolu s docetaxelem byl inkubován v 0,2 M glycin-acetátovém pufru o $\text{pH} 2,5$ (450 RPM; 45 minut; 25 °C). Následně bylo pH vzorků zvýšeno pomocí Tris-pufu na $\text{pH} 7,4$. Vzorky byly následně opět inkubovány (450 RPM; 30 minut; 25 °C). Poté byly vzorky přeneseny do mikrofiltrační zkumavky, kdy postup filtrace byl analogický jako v kapitole 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*. Analogické byly i jednotlivé objemy.

3.3.15 Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:0,025 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru

V hmotnostním poměru 1:0,025 (Ghosh a kol. 2016) byly vytvořeny 2 typy vzorků, léčiva a nanotransportéru, o množství léčiva 0,025 mg a 0,01875 mg. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu byl rozpuštěný v DMSO a měl koncentraci 10 mg/ml. Pokus probíhal analogicky jako v kapitole 3.3.13 Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru. Pouze se lišily objemy jednotlivých látek v mikrozkušných, viz Tab.11.

Tab. 11: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro aktivní enkapsulaci docetaxelu do apoferritinu v prostředí glycin-acetátovém a Tris pufru v poměru 10:1. Celkový objem ve zkumavkách byl 320 μ l. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu rozpuštěný v DMSO o koncentraci 10 mg/ml.

C _{kApo} [mg/vzorek]	V _{kApo} [μ l]	V _{prostředí (pufr)} [μ l]	V _{Doc} [μ l]
1	20	297,5	2,5
0,75	15	303,1	1,9

3.3.16 Studium kinetiky uvolňování docetaxelu z ApoDoc

Pro studium kinetiky uvolňování byl připraven vzorek apoferritin-docetaxel o množství léčiva 0,75 mg v komerčním apoferritinu, dle kapitoly 3.3.5 Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10. Celkový objem vzorku činil 6400 μ l. Objemy jednotlivých složek vzorku jsou zobrazeny v Tab. 12.

Tab. 12: Objemy jednotlivých složek ve vzorcích pro studium kinetiky uvolňování docetaxelu z ApoDoc. Celkový objem ve zkumavkách byl 6400 μ l. Zásobní roztok apoferritinu měl 50 mg/ml. Zásobní roztok docetaxelu rozpuštěný v DMSO o koncentraci 1 mg/ml.

C _{kApo} [mg/vzorek]	V _{kApo} [μ l]	V _{H₂O - prostředí} [μ l]	V _{Doc} [μ l]
0,75	300	5950	150

Pro pokus byly připraveny 2 fosfátové pufrы (0,1 M KH_2PO_4) o pH 6,5 a 7,4 a vytemperovány na 37 °C.

Do dialyzačních zkumavek bylo přidáno 14,5 ml fosfátového pufru o příslušném pH (dva triplety). Do dialyzačního filtru bylo přidáno 500 μl připraveného ApoDoc, který byl předtím naředěn na objem 4 ml. Připravené vzorky v dialyzačních zkumavkách byly inkubovány ve vodní lázni při 37 °C. Ve zvolených časech (0 - 24 hod) bylo z dialyzační zkumavky odebráno 500 μl dialyzačního pufru spolu s uvolněným léčivem a extrahováno. Objem fosfátového pufru v dialyzační zkumavce byl vždy dorovnán na objem 14,5 ml.

Extrakce vzorku probíhala pomocí diethyletheru. K odebraným 500 μl vzorku byl přidán 1 ml diethyletheru. Následně byly vzorky třepány (1400 RPM; 2 minuty; 37 °C) a centrifugovány (15000 x g; 5 minut). Poté bylo ze zkumavky odebráno 750 μl organické části spolu s léčivem. Extrakce probíhala ještě jednou za stejných podmínek. Odebrané organické fáze byly poté odpařeny do sucha a do doby analýzy uchovány při -20 °C. Před analýzou byly vzorky rozpuštěny v 50 μl methanolu a analyzovány pomocí HPLC, viz kapitola 3.3.18 *Metody HPLC*.

Bohužel ze získaných výsledků je patrné, že došlo k výraznému naředění vzorků, v důsledku čehož nebylo možné pozorovat žádné uvolňování.

3.3.17 Metabolismus docetaxelu potkaními jaterními mikrosomy

Inkubační směsi o objemu 0,5 ml byly vždy připraveny ve třech paralelních vzorcích a obsahovaly:

- ❖ 0,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce
- ❖ 1,2 μM docetaxel (1,2 mM zásobní roztok v DMSO, resp. 0,12 mM zásobní roztok ApoDoc)
- ❖ 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ❖ fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)

Reakce byla „startována“ přidáním 50 μl NADPH-generujícího systému. Kontrolní vzorky byly připraveny bez NADPH-generujícího systému. Směs byla důkladně promíchána a inkubována 20 minut za stálého míchání při 450 RPM a 37 °C v otevřených mikrozkušných. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml diethyletheru a následným intenzivním protřepáním. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny

centrifugací při 15 000 RCF po dobu 5 minut (Centrifuge 5418, Eppendorf). Extrakce byla provedena dvakrát.

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha. Vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C do doby analýzy pomocí HPLC, viz kapitola 3.3.18 *Metody HPLC*. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Excel 2013 a hladina významnosti byla stanovena na 0,05. Byl použit dvouchvostový studentův t-test.

3.3.18 Metody HPLC

1) Kolchicin

HPLC systém	UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex
Mobilní fáze	50 % metanol, 50 % KH ₂ PO ₄ (pH 5)
Typ eluce	Izokratická
Kolona	Nucleosil®EC 100-5 C18 reverse phase column (150 x 4.6 mm, Macherey Nagel)
Teplota kolony	37 °C
Průtok	0,6 ml/min
Doba analýzy	15 min
Nástřik	10 µl
Detekční vlnová délka	245 nm

2) Docetaxel

HPLC systém	Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S
Mobilní fáze A	acetonitril
Mobilní fáze B	voda
Typ eluce	Gradientová
Kolona	Nucleosil®EC 100-5 C18 reverse phase column (150 x 4.6 mm, Macherey Nagel)

Teplota kolony	25 °C
Průtok	1 ml/min
Doba analýzy	18 min
Nástřik	20 µl
Detekční vlnová délka	230 nm

Podmínky gradientu

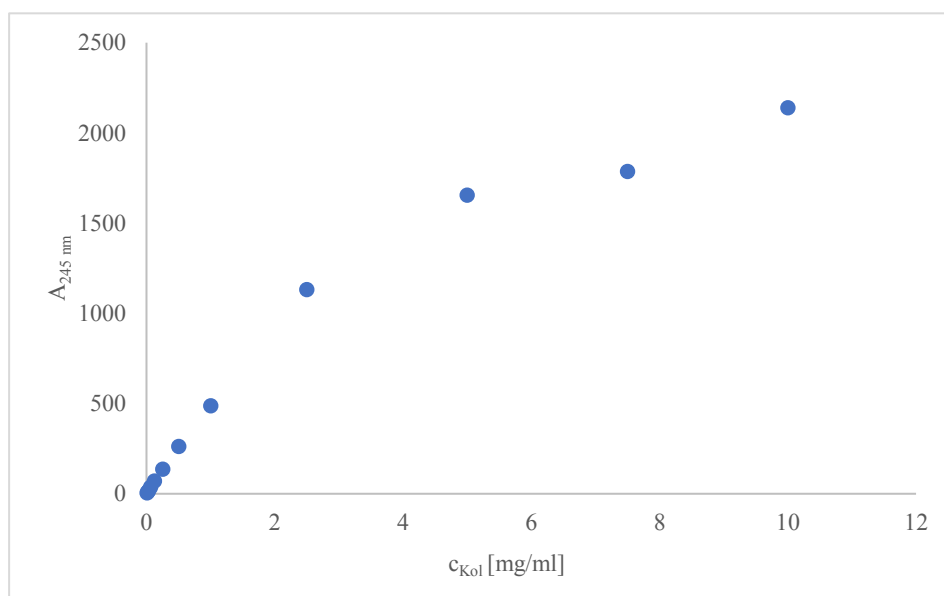
Čas	% mobilní fáze A
0 min	35
15 min	65
18 min	35

4 Výsledky

Cílem práce bylo nalézt vhodný hmotnostní poměr a podmínky pro enkapsulaci kolchicinu a docetaxelu do apoferritinu. Za tímto účelem byl použit komerční koňský apoferritin od společnosti Merck. Výsledná enkapsulace byla měřena a vyhodnocena pomocí HPLC viz kapitola 3.3.18 *Metody HPLC*. Ukázkové chromatogramy jsou součástí přílohy.

4.1 Kolchicin

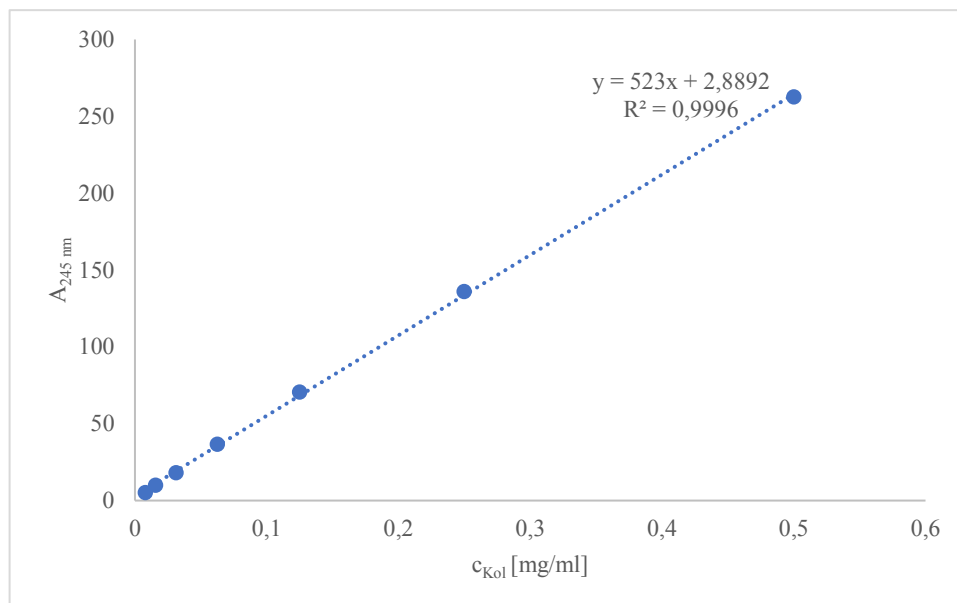
Výsledné množství enkapsulovaného kolchicinu bylo zjištěno z kalibrační křivky znázorňující závislost absorpance kolchicinu na jeho koncentraci (Obr. 6).



Obr. 6: Kalibrační křivka znázorňující závislost absorpance kolchicinu na jeho koncentraci [mg/ml].

Jak je patrné z Obr. 6 není kalibrační křivka v celém rozsahu lineární, a proto byla využita pro analýzu výsledků pouze její počáteční část, která vykazuje lineární závislost (Obr. 7).

Získaná rovnice přímky byla následně využita k stanovení množství kolchicinu enkapsulovaného uvnitř apoferritinu.



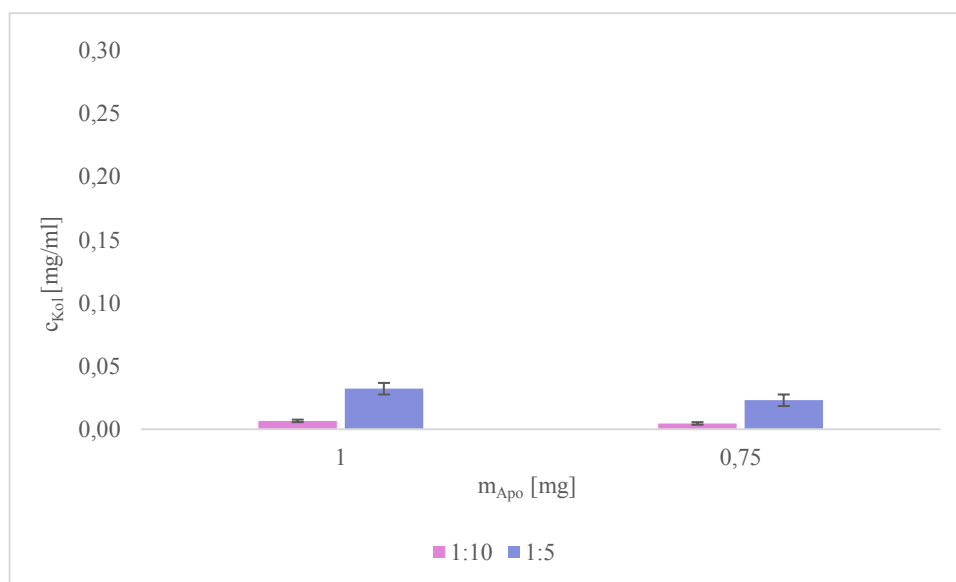
Obr. 7: Počáteční úsek (z Obr.6) kalibrační křivky znázorňující závislost absorpance kolchicinu na jeho koncentraci [mg/ml].

Enkapsulace kolchicinu byla studována pomocí aktivní a pasivní enkapsulace. Stanovení léčiva uzavřeného v nanotransportéru bylo sledováno ve třech hmotnostních poměrech kolchicinu ku apoferritinu, konkrétně v poměrech 1:20, 1:10 a 1:5. Při poměru 1:10 byl kolchicin rozpuštěn ve vodném prostředí spolu s apoferritinem o množství proteinu 1 mg nebo 0,75 mg. Při poměru 1:5 byl kolchicin vložen do vodného prostředí spolu s apoferritinem o množství proteinu 0,5 mg nebo 0,375 mg ve vzorku.

4.1.1 Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml ve vodném prostředí do komerčního apoferritinu

Vzorky byly připraveny dle kapitoly 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10* resp. 3.3.6 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:5*.

Ze změřených výsledků (Obr. 8) je patrné, že nižší hmotnostní poměr má vyšší množství enkapsulovaného kolchicinu oproti poměru vyššímu. U poměru 1:5 probíhá enkapsulace do zvoleného nanotransportéru při obou zvolených hmotnostních koncentracích, přibližně 5x lépe.



Obr. 8: Hmotnostní koncentrace kolchicinu enkapsulovaného do apoferritinu. Růžová barva znázorňuje hmotnostní poměr kolchicinu ku apoferritinu 1:10. Fialová barva zobrazuje hmotnostní poměr kolchicinu ku apoferritinu 1:5. Zobrazená data jsou průměry a směrodatné odchylky ze 2 měření.

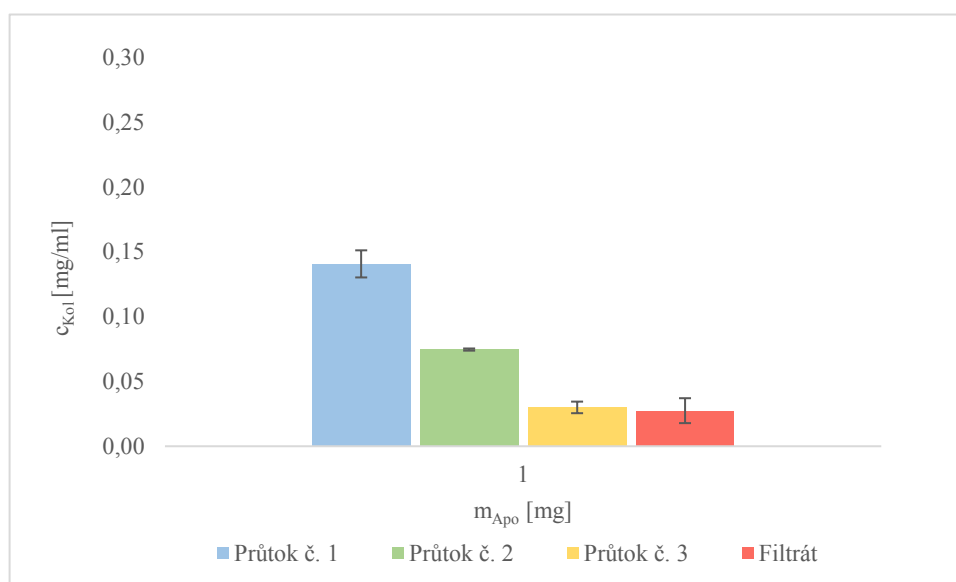
Výsledné hodnoty enkapsulovaného kolchicinu do apoferritinu v hmotnostním poměru 1:10 a 1:5 jsou znázorněny v Tab. 13. Z výsledných hodnot je patrné, že při nižším hmotnostním poměru se léčivo váže do nanotransportéru více oproti poměru vyššímu.

Tab. 13: Celkové enkapsulované množství kolchicinu v komerčním apoferritinu u hmotnostních poměrů 1:5 a 1:10.

Míra enkapsulace		1:10	1:5
		Poměr léčivo:Apo	Poměr léčivo:Apo
m_{Apo} [mg]	1	1,5 %	6 %
	0,75	1 %	6 %

Nízká procentuální úspěšnost enkapsulace kolchicinu v obou zmíněných hmotnostních poměrech zapříčinila opakování pokusu aktivní enkapsulace, dle kapitoly 3.3.5 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*, při němž byly jímány průtoky při jednotlivých promýváních vzorků a následně analyzovány spolu s výsledky z filtru.

Z grafu pro hmotnostní poměr 1:10 (Obr. 9) jsou pozorovatelná vyšší množství promytého volného kolchicinu vůči kolchicinu enkapsulovanému. Je patrné, že s opakující se centrifugací daného filtrátu klesá množství volného kolchicinu, tzn. nejvíce volného kolchicinu bylo jímáno při 1. centrifugaci, kdy byl centrifugován pouze samotný vzorek. Průtok č. 2 byl jímán po promytí vzorku ultračistou vodou. Nejméně neenkapsulovaného kolchicinu bylo naměřeno u průtoku č. 3, tedy po druhém promytí ultračistou vodou.



Obr. 9: Znárodnění koncentrace kolchicinu v ApoKol (filtrát) a jednotlivých průtocích u hmotnostního poměru 1:10. Jednotlivé průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené

a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulovaný kolchicin.*

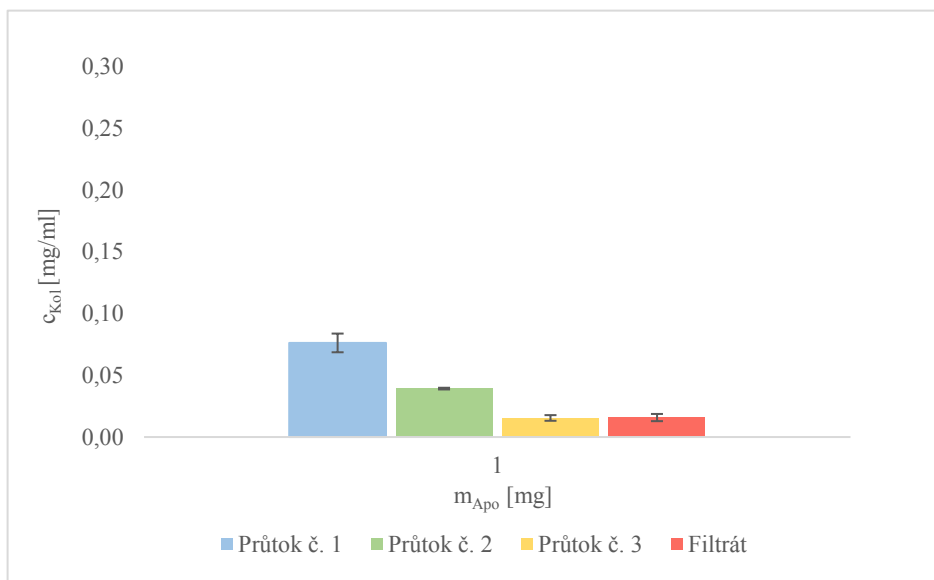
Množství kolchicinu v jednotlivých průtocích lze najít v Tab. 14. Hodnoty potvrzují, že velké množství kolchicinu uvnitř vzorků je nenavázáno. Nejvíce kolchicinu bylo eliminováno při 1. centrifugaci.

Tab. 14: Procentuální množství kolchicinu při hmotnostním poměru kolchicinu ku apoferritinu, 1:10. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10	
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg
Průtok č. 1	42 %
Průtok č. 2	30 %
Průtok č. 3	12 %
Filtrát	5,5 %

Při velmi nízkých hodnotách aktivní enkapsulace při koncentraci zásobního roztoku kolchicinu 1 mg/ml byla pozměněna koncentrace kolchicinu z 1 mg/ml na 0,5 mg/ml. S nově zvolenou koncentrací 0,5 mg/ml kolchicinu probíhala vyšší enkapsulace při hmotnostním poměru 1:20. Celkový vznik zásobních roztoků probíhal podle kapitoly 3.3.7 *Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:20.*

Z Obr. 10 je patrné, že při centrifugaci a promývání jednotlivých vzorků, dochází ke snížení obsahu kolchicinu. Porovnáním jednotlivých průtoků lze pozorovat exponenciální pokles uvolněného kolchicinu v analyzovaných vzorcích. Průtok č. 3 a filtrát obsahují přibližně stejnou koncentraci kolchicinu.



Obr. 10: Znárodnění koncentrace kolchicinu v ApoKol (filtrát) a jednotlivých průtocích u hmotnostního poměru 1:20. Jednotlivé průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulovaný kolchicin.

Tab. 15 znázorňuje procentuální zastoupení léčiva v analyzovaných vzorcích. Opět lze pozorovat velmi malé množství vázaného léčiva uvnitř nanotransportéru.

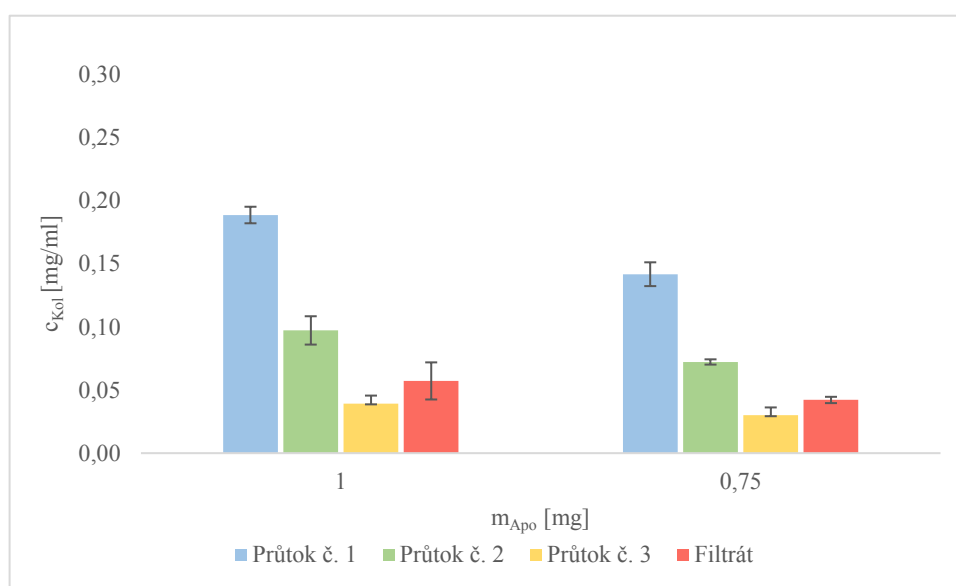
Tab. 15: Procentuální množství kolchicinu při hmotnostním poměru kolchicinu ku apoferritinu 1:20. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:20	
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg
Průtok č. 1	30,5 %
Průtok č.2	23,5 %
Průtok č. 3	9 %
Filtrát	6 %

4.1.2 Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěného ve vodě s HCl do komerčního apoferritinu

Při tomto pokusu byl kolchicin rozpuštěn ve vodě s HCl (150:1). Vzorky byly připravené dle kapitoly 3.3.9 *Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno ve vodě s HCl)*.

Z Obr. 11 lze vyčíst zvýšené množství uvolněného a navázaného kolchicinu u hmotnostní koncentrace nanotransportéru 1 mg oproti koncentraci 0,75 mg ve vzorku. Vyšší hmotnostní koncentrace apoferritinu vykazuje vyšší množství vázaného i nevázaného léčiva oproti nižší hmotnostní koncentraci nanotransportéru.



Obr. 11: Koncentrace kolchicinu (léčivo rozpuštěno ve vodě s HCl) ve vzorcích obsahujících 1 resp. 0,75 mg apoferritinu na vzorek v poměru 1:10, kolchicinu ku apoferritinu. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.*

Tab. 16 znázorňuje procentuální zastoupení kolchicinu v jímáných frakcích. Při obou použitých množstvích kolchicinu jsou hodnoty průtoků i filtrátu prakticky totožné.

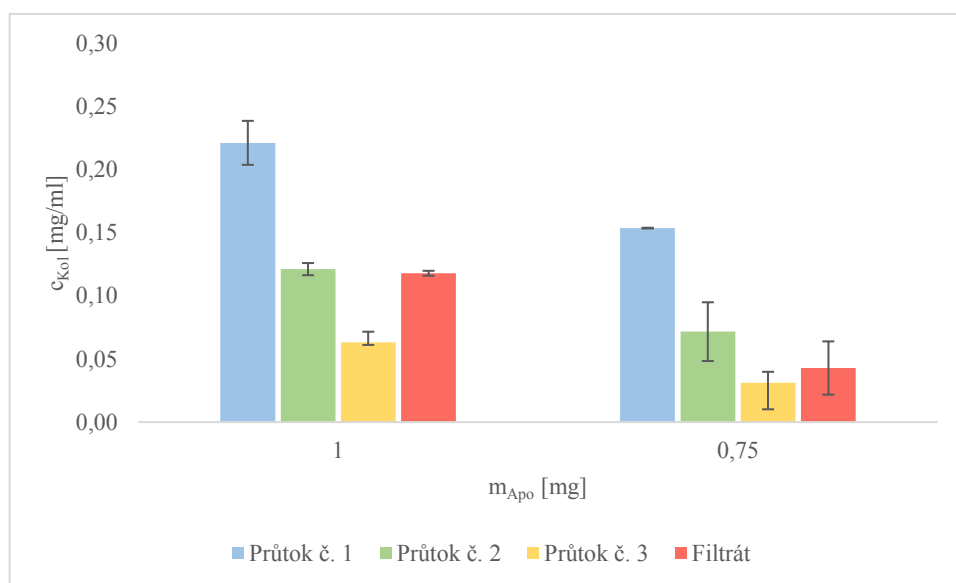
Tab. 16: Procentuální hodnoty neenkapsulovaného a enkapsulovaného (Filtrát) kolchicinu v apoferritinu (léčivo rozpuštěno ve vodě s HCl). Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	38 %	38 %
Průtok č. 2	29,5 %	28,5 %
Průtok č. 3	11,5 %	12 %
Filtrát	11,5 %	11,5 %

4.1.3 Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěného v DMSO do komerčního apoferritinu

Vzorčky s kolchicinem rozpuštěným v DMSO byly vytvořeny na základě kapitoly 3.3.8 *Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 10:1 (léčivo rozpuštěno v DMSO)*.

Jak je patrné z Obr. 12. při vyšší hmotnostní koncentraci se vymyje více nevázaného léčiva oproti koncentraci nižší. Zároveň lze pozorovat vyšší koncentraci enkapsulovaného kolchicinu u vyšší koncentrace.



Obr. 12: Koncentrace kolchicinu (léčivo rozpuštěno v DMSO) ve vzorcích obsahujících 1 resp. 0,75 mg apoferritinu na vzorek v poměru 1:10, kolchicinu ku apoferritinu. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.

V Tab. 17. jsou rozepsaná procenta volného a vázaného kolchicinu u hmotnostních poměrů 1:10, koncentrací Apo 1 mg a 0,75 mg na vzorek. Nejvíce kolchicinu bylo analyzováno v průtoku č. 1. Filtrát u hmotnostní koncentrace 1 mg/vzorek obsahuje 2x vyšší množství vázaného kolchicinu oproti nižší zvolené hmotnostní koncentraci.

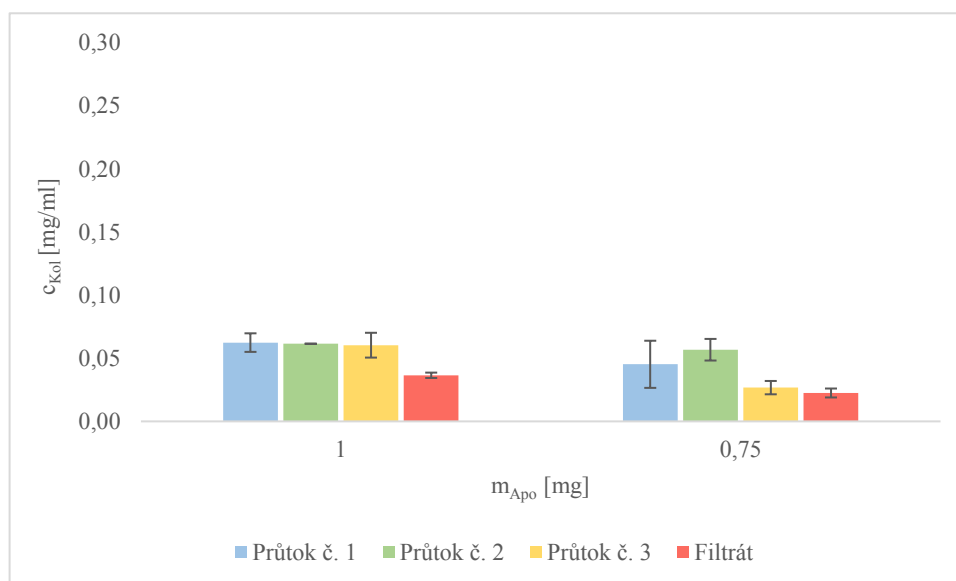
Tab. 17: Procentuální hodnoty uvolněného a vázaného kolchicinu v apoferritinu (léčivo rozpuštěno v DMSO). Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	66,5 %	61,5 %
Průtok č.2	36 %	28,5 %
Průtok č. 3	19 %	12,5 %
Filtrát	23,5 %	11%

4.1.4 „Obrácená“ aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml v DMSO prostředí / ve vodném prostředí s HCl do komerčního apoferritinu

Z nízkých hodnot enkapsulace léčiva do nanotransportéru v DMSO prostředí a vodném prostředí s HCl, viz kapitola 4.1 *Výsledky*, byl pozměněn průběh dosavadních pokusů. Nové pokusy probíhaly dle kapitoly 3.3.10 *Příprava ApoKol pomocí obrácené aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10*. Jedna sada vzorků byla inkubována s kolchicinem rozpuštěným v DMSO a druhá sada vzorků byla inkubována s kolchicinem rozpuštěným ve vodě. Při pokusu bylo pH nejdříve zvýšeno nad 12 a po inkubaci vzorků naopak sníženo pod pH 8.

Na Obr. 13 lze pozorovat výsledky pro kolchicin rozpuštěný v DMSO. Koncentrace enkapsulovaného kolchicinu jsou opět velmi nízké. Lze konstatovat, že je pozorována vyšší koncentrace vázaného kolchicinu u koncentrace nanotransportéru 1 mg/vzorek oproti 0,75 mg.



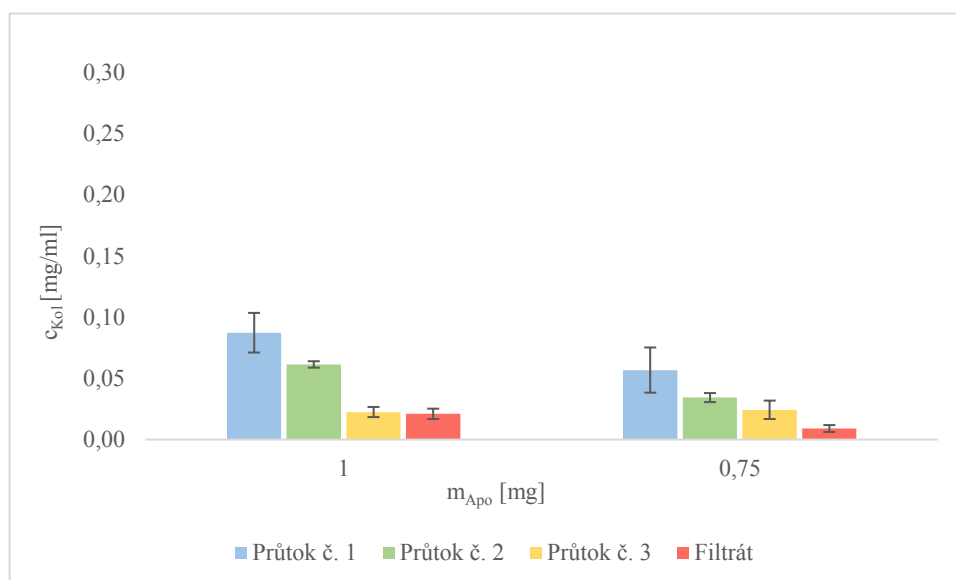
Obr. 13: Koncentrace kolchicinu (rozpuštěného v DMSO) ve vzorcích připravených „ obrácenou „ aktivní enkapsulací. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.*

Tab. 18 znázorňuje procentuální zastoupení kolchicinu v komerčním apoferritinu. Při vyšší koncentraci lze pozorovat mírně zvýšené množství enkapsulovaného léčiva do nanotransportéru oproti nižší koncentraci.

Tab. 18: Procentuální zastoupení neenkapsulovaného a enkapsulovaného kolchicinu v apoferritinu připraveném „ obrácenou,, aktivní enkapsulací. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	31,5 %	30 %
Průtok č. 2	31 %	38 %
Průtok č. 3	30,5 %	17,5 %
Filtrát	18,5 %	15,5 %

Obr. 14 znázorňuje výsledky pro kolchicin rozpuštěný ve vodě. Množství enkapsulovaného kolchicinu je velmi nízké u obou hmotnostních koncentrací nanotransportéru. U průtoků obou koncentrací lze pozorovat postupné snižování koncentrací léčiva.



Obr. 14: Koncentrace kolchicinu (rozpuštěného ve vodě) ve vzorcích připravených „obrácenou,, aktivní enkapsulací. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté

barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.*

Tab. 19 znázorňuje procentuální zastoupení kolchicinu v komerčním apoferritinu. U nižší hmotnostní koncentrace kolchicinu ve vzorku lze pozorovat skoro 2x nižší množství vázaného léčiva v nanotransportéru. U vyšší hmotnostní koncentrace lze pozorovat podobná procentuální zastoupení léčiva u průtoku č. 3 a filtrátu.

Tab. 19: Procentuální zastoupení neenkapsulovaného a enkapsulovaného kolchicinu v apoferritinu připraveném „ obrácenou,, aktivní enkapsulací. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

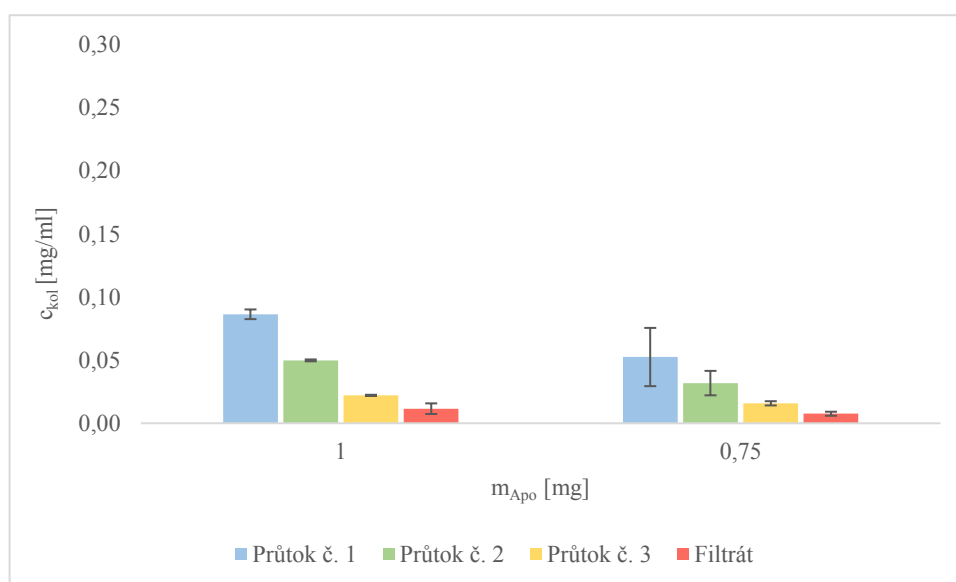
1:10		
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	43,5 %	39 %
Průtok č. 2	31 %	23 %
Průtok č. 3	11,5 %	16,5 %
Filtrát	10,5 %	5,5 %

4.1.5 Aktivní enkapsulace kolchicinu o koncentraci 1 mg/ml ve vodném prostředí do rekombinantního apoferritinu.

Analyzované hodnoty kolchicinu enkapsulovaného do komerčního apoferritinu, byly velmi nízké, a proto byl použit rekombinantní apoferritin vytvořený ve spolupráci s Mendelovou univerzitou v Brně.

Vzorky byly získány dle metody 3.3.11 *Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z rekombinantního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10.*

Získané hodnoty na Obr. 15 jsou velmi nízké. Nejvyšší hodnoty nevázaného množství léčiva vykazuje u obou hmotnostních koncentrací průtok č. 1. Všechny získané hodnoty u obou hmotnostních koncentrací se postupně snižují. Nejnižší množství nevázaného kolchicinu v apoferritinu vykazuje průtok č. 3 u obou koncentrací. Nejnižší množství vázaného kolchicinu vykazuje filtrát u nižší hmotnostní koncentrace.



Obr. 15: Koncentrace kolchicinu ve vzorcích připravených s rekombinantním apoferritinem. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.*

Procentuální obsah kolchicinu v analyzovaných vzorcích lze pozorovat v Tab. 20. Nejvyšší množství kolchicinu je u průtoku č. 1 u vyšší hmotnostní koncentrace. Průtoky č. 3 obsahují

u obou hmotnostních koncentrací stejné procentuální množství vyskytujícího se kolchicinu. Nejnižší hodnoty kolchicinu vykazují filtráty obou hmotnostních koncentrací. Míra enkapsulace je tedy opět nízká.

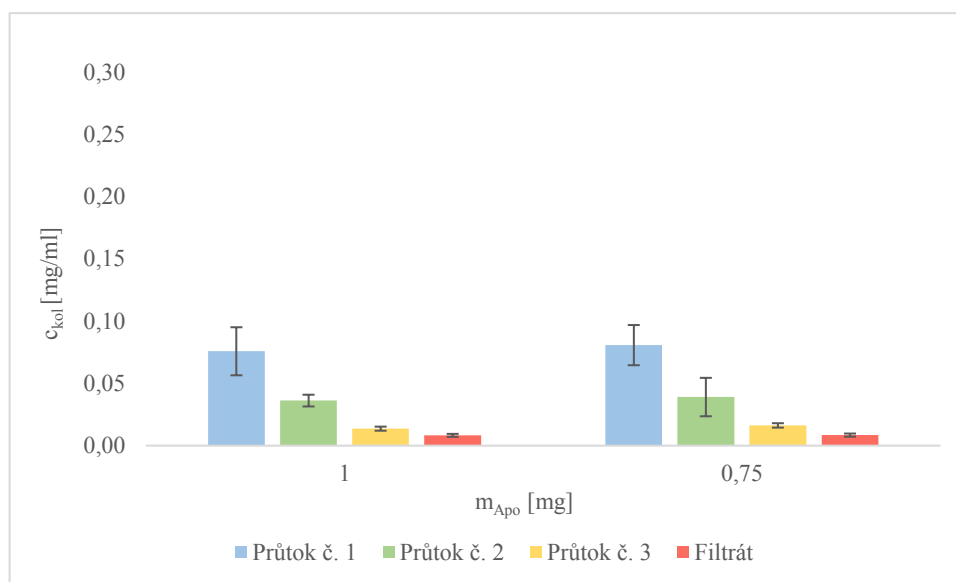
Tab. 20: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného kolchicinu v apoferritinu při použití rekombinantního apoferritinu. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	43 %	35 %
Průtok č. 2	25 %	21 %
Průtok č. 3	11 %	11 %
Filtrát	6 %	5 %

4.1.6 Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml v prostředí močoviny

Dle článku (Lei, 2016) lze provést pasivní enkapsulaci v prostředí močoviny. Během pokusu dochází k inkubaci léčiva a nanotransportéru v různých koncentracích močoviny. Pokus proběhl dle kapitoly 3.3.4 *Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (v prostředí močoviny)*.

Obr. 16 znázorňuje výsledné hodnoty průtoků i filtrátu při inkubaci v močovinně. Lze pozorovat postupné snižování nenavázaného množství kolchicinu do nanotransportéru u obou hmotnostních koncentrací. Lze také pozorovat přibližně stejné množství vázaného léčiva do apoferritinu u obou koncentrací.



Obr. 16: Koncentrace kolchicinu ve vzorcích obsahujících 1 resp. 0,75 mg apoferritinu v prostředí močoviny. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.*

Procentuální enkapsulaci a neenkapsulaci kolchicinu v analyzovaných vzorcích lze najít v Tab. 21. Při vyšší hmotnostní koncentraci je pozorovatelné nižší množství enkapsulovaného léčiva oproti hmotnostní koncentraci 0,75 mg. Lze také pozorovat vyšší

obsah kolchicinu ve všech vzorcích při nižší hmotnostní koncentraci než u koncentrace vyšší.

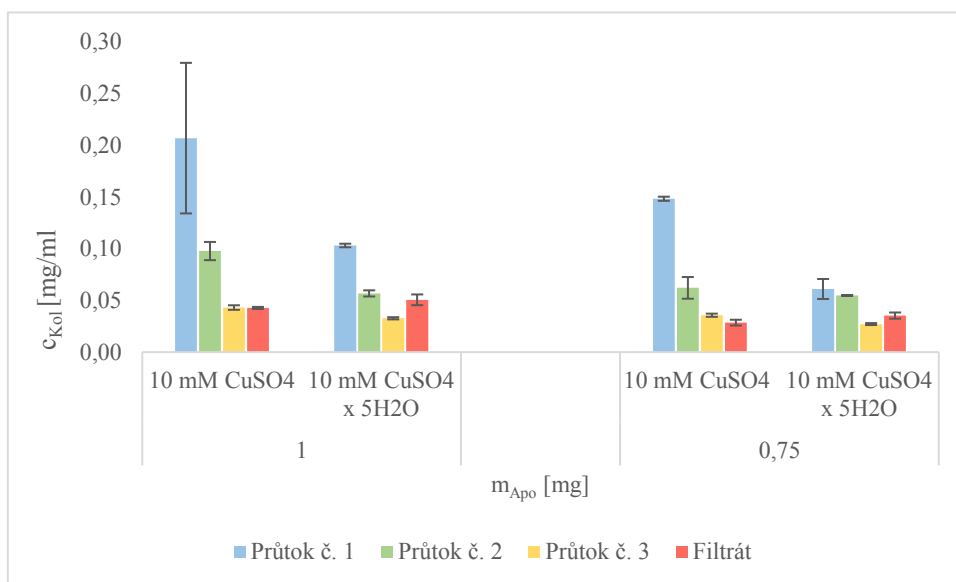
Tab. 21: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného kolchicinu v apoferritinu připraveného v prostředí močoviny. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	38 %	54 %
Průtok č. 2	18 %	26 %
Průtok č. 3	7 %	11 %
Filtrát	4 %	6 %

4.1.7 Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml v prostředí Cu^{2+} iontů

Pokus probíhal podle (Zhen 2013; Mazzucchelli 2017) dle kapitoly 3.3.2 Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (v prostředí Cu^{2+} iontů). Jedna sada vzorků byla inkubována v 10 mM síranu mědnatém a druhá sada vzorků byla inkubována v 10 mM pentahydrátu síranu mědnatého.

Obr. 17 porovnává analyzované hodnoty průtoků a filtrátů v různých zvolených prostředích. Vzorky inkubované v pentahydrátu síranu mědnatého vykazují snížené množství nevázaného léčiva. Naopak výsledný komplex ApoKol je oproti komplexu inkubovanému v prostředí síranu mědnatého vyšší. Lze také pozorovat zvýšený efekt enkapsulace léčiva u koncentrace s vyšší hodnotou než u koncentrace s hodnotou nižší.



Obr. 17: Koncentrace kolchicinu ve vzorcích obsahujících 1 resp. 0,75 mg apoferritinu na vzorek v poměru 1:10 v prostředí Cu^{2+} iontů. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.

Procentuální vázanost kolchicinu v analyzovaných vzorcích lze najít v Tab. 22. Při vyšší hmotnostní koncentraci léčiva jsou ve většině případů pozorovatelné vyšší procentuální hodnoty vázanosti do nanotransportéru oproti hmotnostní koncentraci 0,75 mg u obou

prostředí. Lze také pozorovat vyšší obsah enkapsulovaného kolchicinu u vzorků inkubovaných v prostředí pentahydrátu síranu mědnatého oproti vzorkům inkubovaných v prostředí síranu mědnatého.

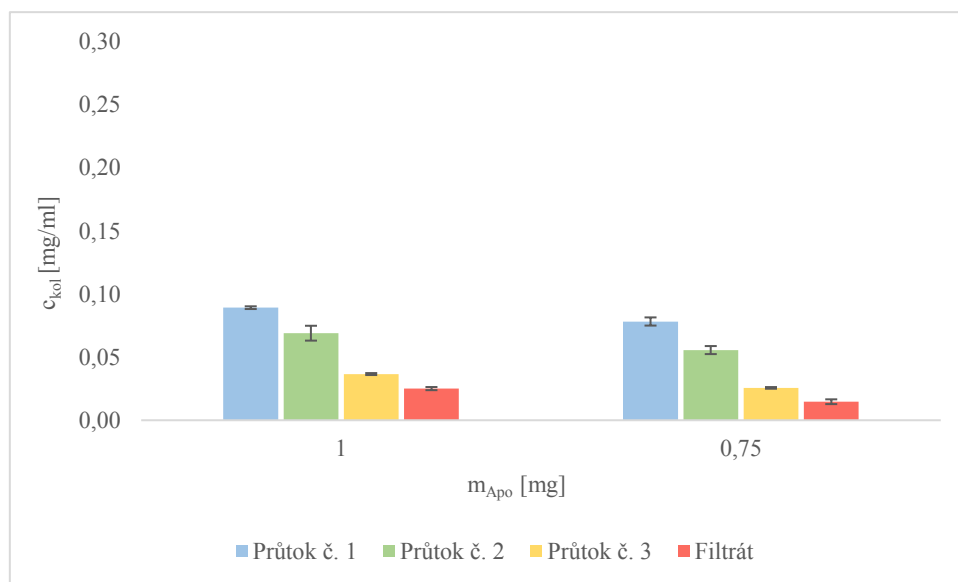
Tab. 22: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného kolchicinu v apoferritinu při poměru 1:10 v prostředí Cu^{2+} iontů. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		1:10		
	Prostředí 10 mM CuSO_4		Prostředí 10 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	
	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,075 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg	Množství kolchicinu ve vzorku 0,1 mg
Průtok č. 1	62 %	59 %	31 %	24 %
Průtok č. 2	29 %	25 %	19 %	22 %
Průtok č. 3	13 %	14 %	10 %	11 %
Filtrát	11 %	11 %	15 %	14 %

4.1.8 Pasivní enkapsulace kolchicinu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml pomocí zinečnatých iontů.

Získání produktů probíhalo dle kapitoly 3.3.3 *Příprava ApoKol pomocí pasivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 10:1 (v prostředí Zn^{2+} iontů)*.

Na Obr. 18 lze pozorovat velmi snížené množství enkapsulovaného a neenkapsulovaného léčiva v nanotransportéru oproti předešlým měřením. Vzorky o hmotnostní koncentraci apoferritinu 1 mg na vzorek korespondují s podobnými výsledky průtoků jako u hmotnostní koncentrace 0,75 mg na vzorek. U filtrátu je u vyšší koncentrace přibližně 2x více vázaného léčiva než u filtrátu o nižší koncentraci.



Obr. 18: Koncentrace kolchicinu ve vzorcích obsahujících 1 resp. 0,75 mg apoferritinu na vzorek v poměru 1:10 v prostředí Zn^{2+} iontů. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje enkapsulované léčivo.

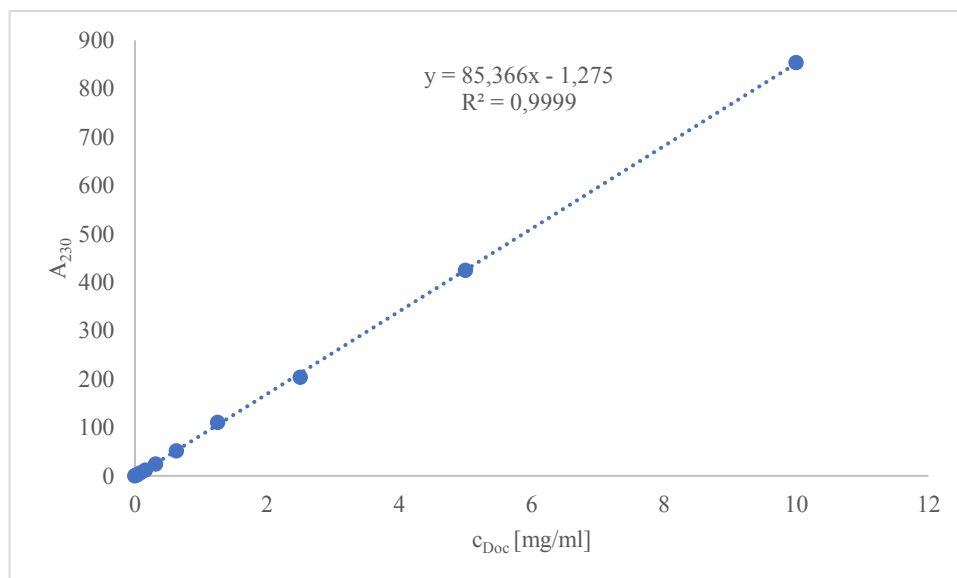
Procentuální enkapsulaci a neenkapsulaci kolchicinu v analyzovaných vzorcích lze pozorovat v Tab. 23. Vyšší hmotnostní koncentrace vykazuje vyšší množství enkapsulovaného léčiva oproti koncentraci nižší. Nenavázaný kolchicin byl analyzován nejvíce v průtocích č. 1 u obou hmotnostních koncentrací.

Tab. 23: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného kolchicinu v apoferritinu při poměru 1:10 v prostředí Zn^{2+} iontů. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný kolchicin. Filtrát označuje kolchicin enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství kolchicinu 1 mg	Množství kolchicinu 0,75 mg
Průtok č. 1	27 %	31 %
Průtok č. 2	21 %	22 %
Průtok č. 3	11 %	10 %
Filtrát	8 %	6 %

4.2 Docetaxel

Analyzované vzorky enkapsulovaného docetaxelu byly vyhodnocovány pomocí kalibrační přímky (Obr. 19). Kalibrační přímka vyobrazuje závislost absorbance docetaxelu na jeho koncentraci. Získaná rovnice kalibrační přímky byla použita pro stanovení navázaného docetaxelu do komerčního apoferritinu.



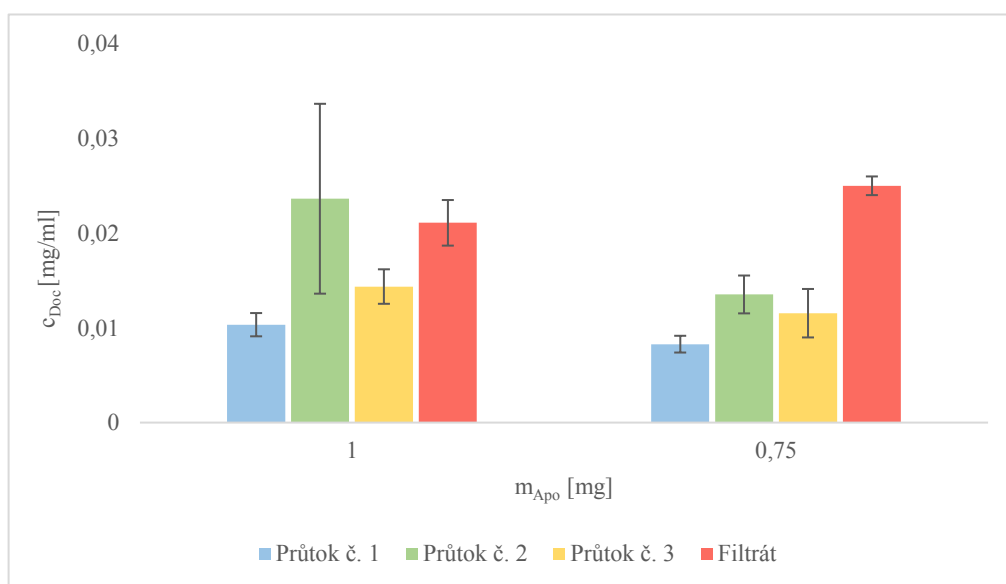
Obr. 19: Kalibrační přímka vyjadřující závislost absorbance docetaxelu na jeho koncentraci [mg/ml].

Enkapsulace docetaxelu byla studována pomocí pasivní a aktivní enkapsulace. Stanovení léčiva uzavřeného v nanotransportéru bylo sledováno ve třech hmotnostních poměrech docetaxelu ku apoferritinu, konkrétně v poměrech 1:10, 1:5 a 1:40.

4.2.1 Pasivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml ve vodném prostředí

Vzorky byly vytvořeny dle kapitoly 3.3.1 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10.*

Na Obr. 20 je zjevné, že se snižující se hmotnostní koncentrací nanotransportéru, se zvyšuje vázanost docetaxelu do léčiva. Naopak jednotlivé průtoky u hmotnostní koncentrace 1 mg/vzorek mají vyšší hodnoty oproti průtokům nižší hmotnostní koncentrace.



Obr. 20: Koncentrace docetaxelu při poměru 1:10, docetaxelu ku apoferritinu v hmotnostních koncentracích nanotransportéru 1 a 0,75 mg/vzorek připravených pasivní enkapsulací. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného docetaxelu.*

Procentuální množství docetaxelu v analyzovaných vzorcích lze pozorovat v Tab. 24. Nižší hmotnostní koncentrace vykazuje vyšší množství enkapsulovaného léčiva. Nejvíce nenavázaného docetaxelu bylo nalezeno v průtocích č. 2.

Tab. 24: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu připraveného pasivní enkapsulací. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	10 %	11 %
Průtok č. 2	24 %	18 %
Průtok č. 3	14 %	15 %
Filtrát	21 %	33 %

4.2.2 Pasivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 1 mg/ml v prostředí Cu^{2+} iontů

Postup probíhal dle (Zhen, 2013; Mazzucchelli, 2017) viz kapitola 3.3.2 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10 (v prostředí Cu^{2+} iontů)*.

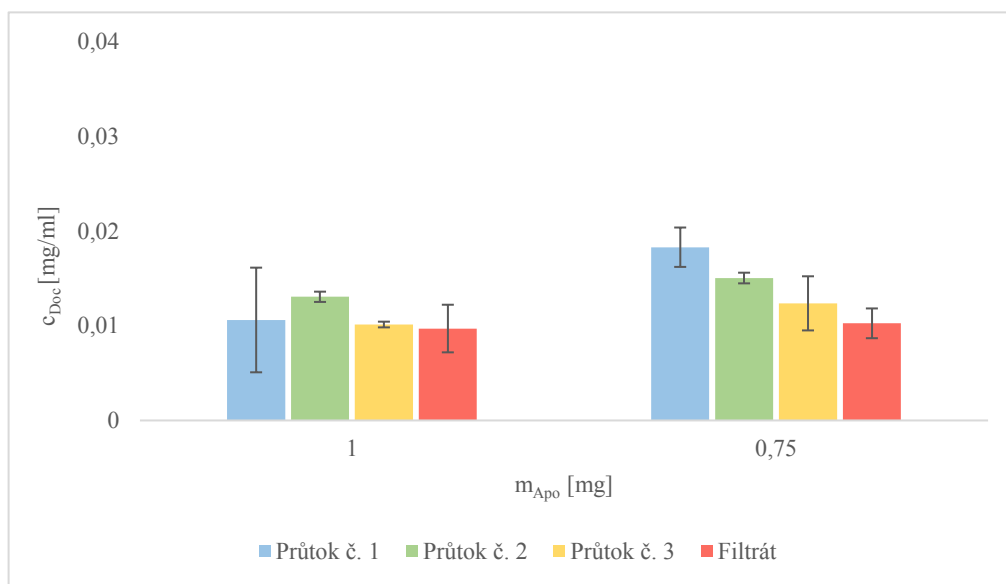
Během pokusu došlo ke vzniku sraženiny, která obsahovala nanotransportér i nevázané léčivo. V důsledku toho nebylo při analýze HPLC prakticky pozorovatelné žádné léčivo. Množství se pohybovalo na hranici detekce, a proto nebylo kvantifikováno.

4.2.3 Aktivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 10 mg/ml ve vodném prostředí

Postup aktivní enkapsulace léčiva do nanotransportéru byl prováděn dle kapitoly 3.3.12 *Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10.*

Na Obr. 21 jsou vyobrazené výsledné hodnoty analyzovaných vzorků. U nižší hmotnostní koncentrace nanotransportéru jsou pozorovatelná sestupná množství nevázaného docetaxelu na rozdíl od průtoků hmotnostní koncentrace vyšší.

U hmotnostní koncentrace apoferritinu 1 mg/vzorek vykazují průtoky č. 1, 3 a filtrát velmi podobného hodnoty koncentrace. Naopak zvýšené hodnoty koncentrace nevázaného docetaxelu vykazuje průtok č. 2.



Obr. 21: Koncentrace docetaxelu ve vzorcích obsahujících 1 nebo 0,75 mg proteinu pomocí aktivní enkapsulace při poměru 1:10. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného léčiva.

Procentuální množství docetaxelu je vyobrazeno v Tab. 25. Nižší hmotnostní koncentrace léčiva vykazuje přibližně 2x vyšší množství nevázaného léčiva oproti zvolené vyšší

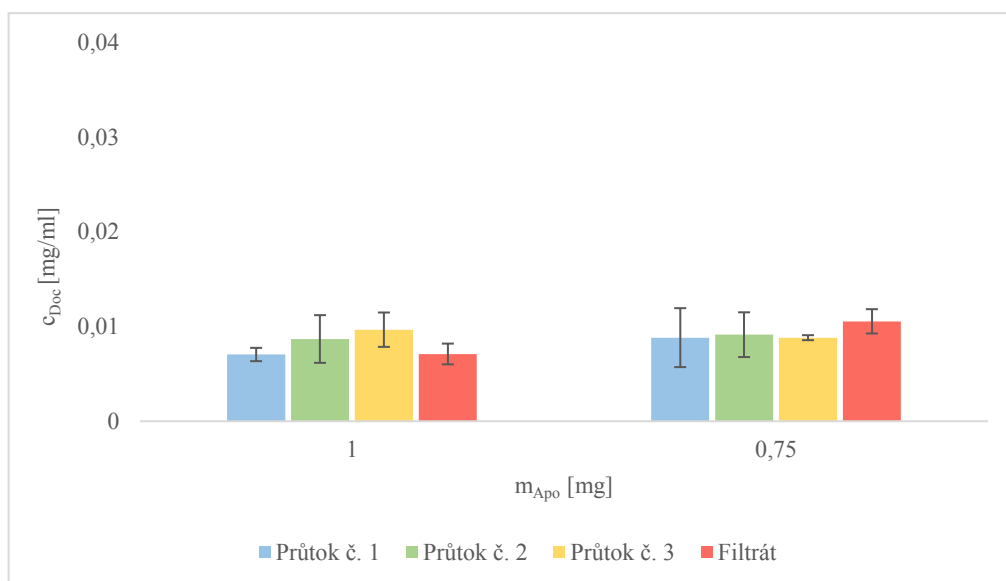
hmotnostní koncentraci u průtoku č. 1. Průtoky č. 2 a 3 se zvýšily 1,5x oproti koncentraci 1 mg/vzorek. U nižší hmotnostní koncentrace bylo taktéž analyzováno vyšší množství enkapsulovaného docetaxelu.

Vzhledem k nízkým hodnotám docetaxelu při práci s aktivní enkapsulací bylo změněno pH inkubace vzorků pod 3 dle kapitoly 3.3.12 *Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčním apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10.*

Tab. 25: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při poměru 1:10. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	11 %	24 %
Průtok č. 2	13 %	20 %
Průtok č. 3	10 %	16 %
Filtrát	10 %	14 %

Na Obr. 22 jsou vyobrazeny hodnoty množství vázaného a nevázaného léčiva do nanotransportéru. Vzhledem k velikostem směrodatných odchylek u nižší i vyšší hmotnostní koncentrace lze konstatovat, že vzorky obsahují prakticky stejné množství vázaného a nevázaného docetaxelu.



Obr. 22: Koncentrace docetaxelu ve vzorcích obsahujících 1 nebo 0,75 mg proteinu pomocí aktivní enkapsulace při poměru 1:10 (pH < 3). Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného léčiva.

Tab. 26 znázorňuje procentuální množství docetaxelu u jímaných vzorků. Vyšší hmotnostní koncentrace nanotransportéru vykazuje nižší množství nenavázaného a vázaného léčiva oproti nižší zvolené hmotnostní koncentraci. Výsledné vázané množství docetaxelu uvnitř apoferritinu je 2x vyšší u nižší hmotnostní koncentrace oproti koncentraci vyšší.

Tab. 26: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při poměru 1:10 (pH < 3). Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

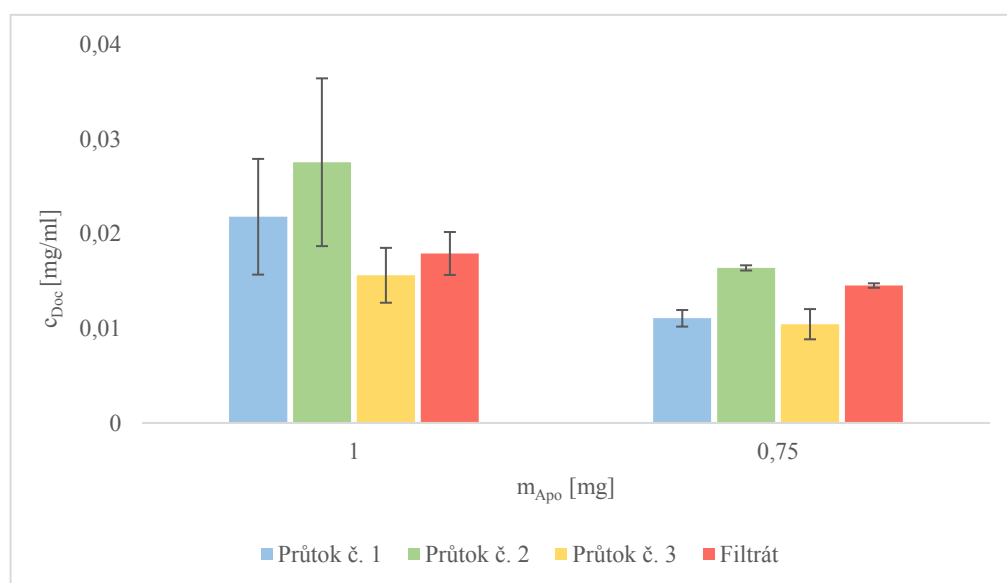
1:10		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	8 %	12 %
Průtok č. 2	9 %	12 %

Průtok č. 3	10 %	12 %
Filtrát	7 %	14 %

Nízké hodnoty z Obr. 17 zapříčinily změnu postupu, kdy pH prostředí bylo sníženo z hodnoty pod 3 na hodnotu pod 2,5. Postup jinak probíhal dle 3.3.12 *Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčním apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10*.

Výsledné hodnoty vázaného a nevázaného docetaxelu jsou graficky znázorněny na Obr. 23. U vyšší hmotnostní koncentrace apoferritinu lze pozorovat 1,5x vyšší hodnoty průtoků č. 1 a 2 oproti nižší hmotnostní koncentraci. Hodnoty průtoku č. 3 a filtrátu jsou také vyšší u koncentrace 1 mg/vzorek oproti koncentraci 0,75 mg/vzorek.

Celkově lze tedy pozorovat vyšší hodnoty koncentrace docetaxelu ve vzorcích u vyšší hmotnostní koncentrace.



Obr. 23: Koncentrace docetaxelu ve vzorcích obsahujících 1 nebo 0,75 mg proteinu pomocí aktivní enkapsulace při poměru 1:10 (pH < 2,5). Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství léčiva při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného docetaxelu.

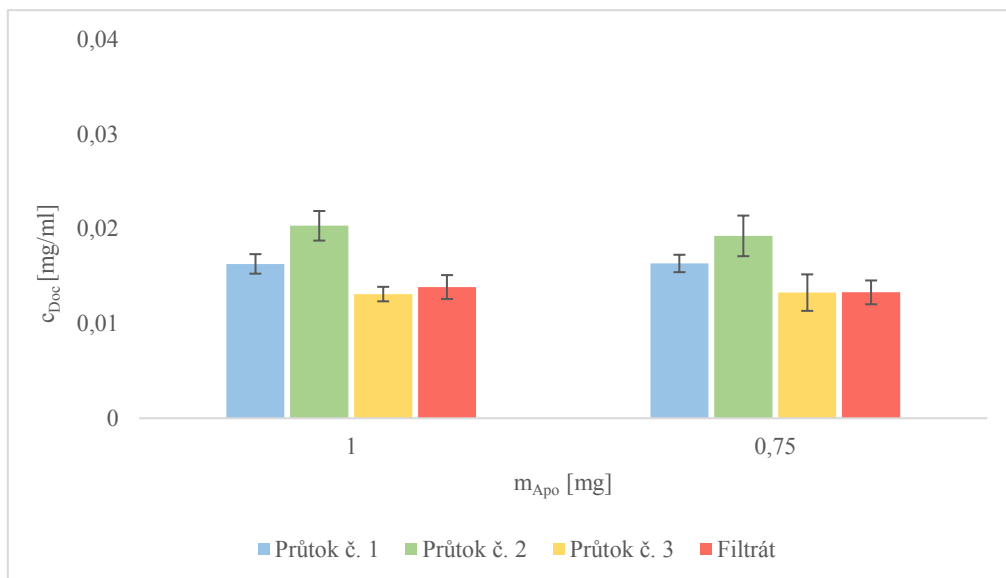
Tab. 27 zobrazuje procentuální množství docetaxelu. Hmotnostní koncentrace apoferritinu 1 mg/vzorek vykazuje vyšší množství nevázaného docetaxelu ve všech průtocích. U obou hmotnostních poměrů lze pozorovat nejvyšší množství léčiva v průtoku č. 2. O 1 % vyšší enkapsulace docetaxelu je u nižší hmotnostní koncentrace.

Tab. 27: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při poměru 1:10 (pH < 2,5). Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	22 %	15 %
Průtok č. 2	28%	22 %
Průtok č. 3	18 %	14 %
Filtrát	18 %	19 %

Dle dosavadních získaných výsledků mezi apoferritinem a docetaxelem v hmotnostním poměru, 1:10, byl změněn hmotnostní poměr na 5:1 dle kapitoly 3.3.13 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:5.*

Na Obr. 24 jsou graficky znázorněny výsledné koncentrace jímaných vzorků. U obou hmotnostních poměrů lze pozorovat velmi totožné výsledky. Nejvyšší hodnotu docetaxelu zastupuje průtok č. 2. Filtrát je u vyšší hmotnostní koncentrace nepatrně vyšší oproti průtoku č.3, naopak u nižší hmotnostní koncentrace je filtrát skoro totožný s průtokem č. 3. Průtoky č. 1 i 2 jsou u obou hmotnostních poměrů přibližně stejné.



Obr. 24: Koncentrace docetaxelu pomocí aktivní enkapsulace ve vodném prostředí při poměru 1:5. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného docetaxelu.

Tab. 28 zobrazuje procentuální množství docetaxelu. Hmotnostní koncentrace 0,75 mg/ml vykazuje celkově vyšší množství docetaxelu ve všech analyzovaných vzorcích. Nejvyšší procentuální množství docetaxelu je u nižší hmotnostní koncentrace, u průtoku č.2. Vyšší enkapsulované množství docetaxelu je u hmotnostní koncentrace 0,75 mg/ml.

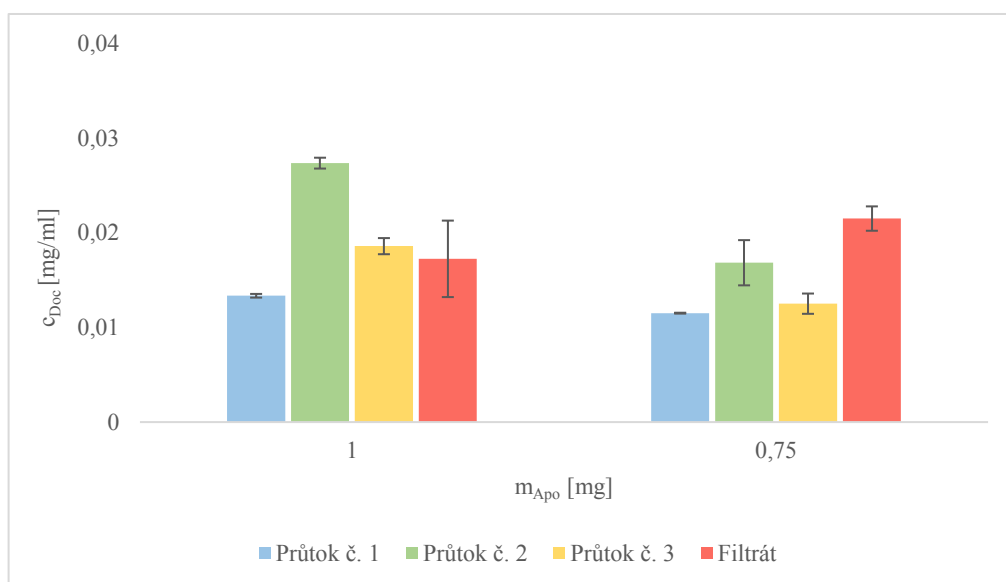
Tab. 28: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu při poměru 1:5. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:5		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	16 %	22 %
Průtok č. 2	20 %	26 %
Průtok č. 3	13 %	18 %
Filtrát	14 %	18 %

4.2.4 Aktivní enkapsulace docetaxelu do komerčního apoferritinu o koncentraci 10 mg/ml v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru

Aktivní enkapsulace docetaxelu do apoferritinu pomocí acetátového a Tris pufru dle kapitoly 3.3.14 *Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru*.

Obr. 25 vykazuje vyšší množství nenavázaného docetaxelu u hmotnostní koncentrace 1 mg/vzorek oproti hmotnostní koncentraci 0,75 mg/vzorek. Nejvyšší množství docetaxelu je u průtoku č. 2. u vyšší hmotnostní koncentrace. Nejnižší množství nevázaného léčiva je pozorováno u nižší hmotnostní koncentrace, u průtoku č. 1. Filtrát u vyšší hmotnostní koncentrace je nižší než průtok č. 3. Nižší hmotnostní koncentrace vykazuje nejvyšší množství docetaxelu u filtrátu.



Obr. 25: Koncentrace docetaxelu pomocí aktivní enkapsulace ve vodném prostředí při poměru 1:10 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. *Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného docetaxelu.*

Tab. 29 zobrazuje procentuální množství docetaxelu. Hmotnostní koncentrace vyobrazují celkové množství docetaxelu ve všech analyzovaných vzorcích. Nejvyšší procentuální množství neenkapsulovaného docetaxelu je u vyšší hmotnostní koncentrace, u

průtoku č. 2. Celkově lze vyčíst, že vyšší množství nenávaného docetaxelu je u hmotnostní koncentrace 1 mg/vzorek. Naopak vyšší množství vázaného docetaxelu je u nižší hmotnostní koncentrace.

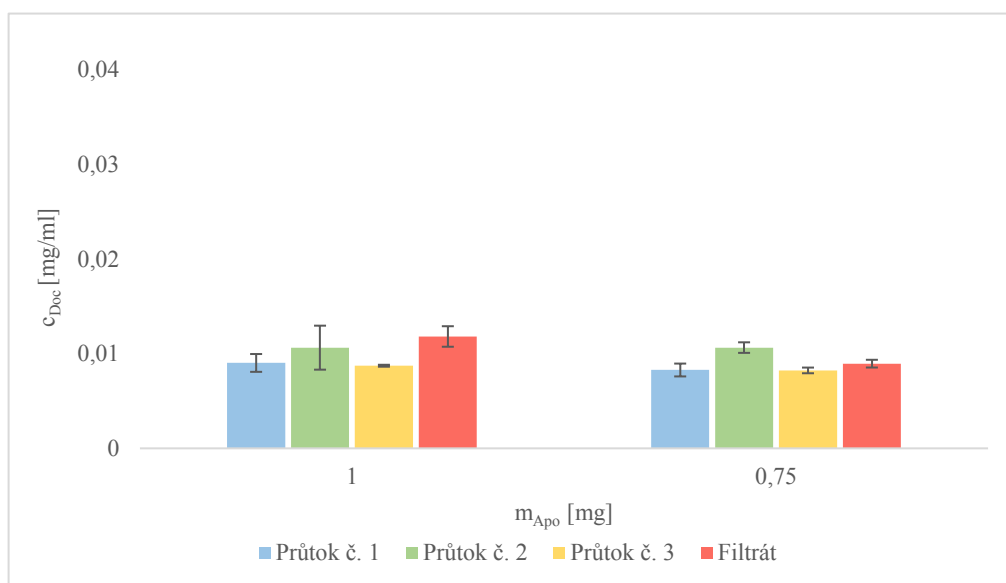
Tab. 29: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu při poměru 1:10 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufu. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:10		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	13 %	15 %
Průtok č. 2	27 %	22 %
Průtok č. 3	19 %	17 %
Filtrát	17 %	19 %

4.2.5 Aktivní enkapsulace docetaxelu o koncentraci 10 mg/ml v prostředí glycin-acetátovém a Tris pufru do komerčního apoferritinu

Dle článku (Ghosh a kol. 2016) byly změněny objemy léčiva a nanotransportéru, viz 3.3.15 Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:0,025 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru (upravená metoda). V mikroskopických vzorcích bylo 40x více apoferritinu oproti docetaxelu. Jednalo se tedy o hmotnostní koncentraci 1 mg/vzorek ku 0,025 mg/vzorek.

Obr. 26 znázorňuje koncentrace vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu. Vyšší hmotnostní koncentrace obsahuje nejvyšší koncentraci docetaxelu v enkapsulované formě. Naopak nižší hmotnostní koncentrace obsahuje nejvyšší množství docetaxelu u průtoku č. 2. Průtoky č. 1 a 3 obsahují přibližně stejné množství nevázaného docetaxelu. Množství vázaného docetaxelu je vyšší než průtoky č. 1 a 3.



Obr. 26: Koncentrace docetaxelu pomocí aktivní enkapsulace ve vodném prostředí při poměru 1:0,025 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru. Průtoky jsou znázorněny pomocí modré, zelené a žluté barvy, filtrát je znázorněn pomocí barvy červené. Průtok č. 1 znázorňuje uvolněné množství při centrifugaci. Průtoky č. 2 a 3 představují uvolněné léčivo při promytí ultračistou vodou. Filtrát znázorňuje koncentraci enkapsulovaného docetaxelu.

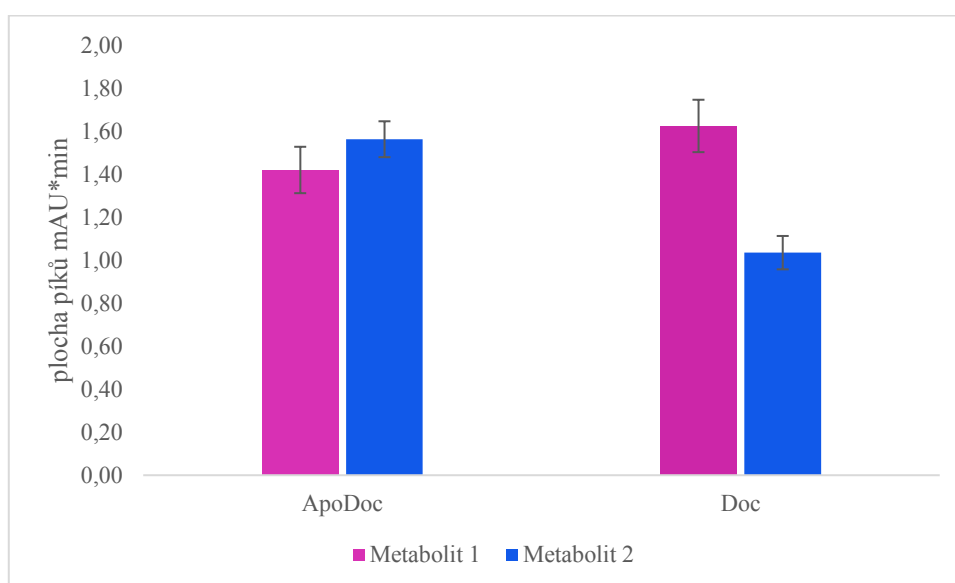
Tab. 30 zobrazuje procentuální množství docetaxelu. Hmotnostní koncentrace apoferritinu 0,75 mg/vzorek vykazuje celkově vyšší množství docetaxelu ve všech analyzovaných vzorcích. Nejvyšší procentuální množství docetaxelu je u nižší hmotnostní koncentrace, u průtoku č.2. Vyšší hmotnostní koncentrace obsahuje nejvyšší množství docetaxelu ve filtrátu. Množství enkapsulovaného docetaxelu je v obou hmotnostních poměrech stejné.

Tab. 30: Procentuální zastoupení vázaného a nevázaného docetaxelu v apoferritinu při poměru 1:0,025 v prostředí glycin-acetátového a Tris pufru. Průtoky č. 1 až 3 znázorňují neenkapsulovaný docetaxel. Filtrát označuje docetaxel enkapsulovaný v komerčním apoferritinu.

1:0,025		
	Množství docetaxelu ve vzorku 0,1 mg	Množství docetaxelu ve vzorku 0,075 mg
Průtok č. 1	9 %	11 %
Průtok č. 2	11%	14 %
Průtok č. 3	9%	11 %
Filtrát	12%	12 %

4.2.6 Metabolismus docetaxelu potkaními jaterními mikrosomy

Docetaxel enkapsulovaný v apoferritinu byl podroben metabolické studii za pomoci jaterních mikrosomů z potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem. Chromatografický záznam je součástí přílohy. Za účelem stanovení vlivu apoferritinu byla také provedena studie s volným docetaxelem. Jak plyne z obr. 27. je docetaxel jaterními mikrosomy potkana přeměňován za vzniku dvou metabolitů, jejichž množství se mezi volnou formou a formou vázanou v apoferritinu liší. Metabolit 1 je nepatrně, ale nesignifikantně více tvořen v případě použití volné formy docetaxelu. Metabolit 2 je signifikantně více ($p < 0,01$) tvořen v případě docetaxelu enkapsulovaného v apoferritinu.



Obr. 27: Množství metabolitů docetaxelu tvořené jaterními mikrosomy potkanů premedikovanými pregnenolonkarbonitrilem. Data jsou průměry a směrodatné odchylky ze 3 měření.

5 Diskuze

Rakovina je jednou z nejnebezpečnějších onemocnění na světě. Proto se vědci v dnešní době snaží zahrnout nanotechnologie do protinádorové léčby. Nalezení vhodné nanotechnologie může být jednou z nejdůležitějších inovací v léčbě. Nanonosiče z různých materiálů pro zlepšení účinnosti současných léčebných postupů se stále vyvíjí (*Imran a kol. 2016*).

Nalezením vhodného nanotransportéru lze zesílit cílové účinky léčiva a minimalizovat účinky mimo cíl (*Lühmann, Meinel 2016*). Vybrané přírodní sloučeniny, které cílí na mikrotubuly nádorových buněk a jsou schopné zničit funkci mitotických vřetének, se považují za jedny z nejlepších chemoterapeutik (*Mukhtar a kol. 2014*). Kombinace vhodného mitotického inhibitoru s vhodnou nanočásticí může tedy mít obrovský význam.

Cílem diplomové práce bylo nalezení vhodného hmotnostního poměru a podmínek pro enkapsulaci u léčiv, kolchicinu a docetaxelu, do apoferritinu.

Kolchicin je rostlinný alkaloid používaný v léčbě proti dně a familiární středomořské horečce. Léčivo zatím není klinicky testováno pro léčbu rakoviny, protože je pro tělo velmi toxické. Z dosud zjištěných informací vykazuje kolchicin protiproliferační schopnosti zahrnující inhibici mikrotubulů buněk v G2/M fázi vedoucí k apoptóze. Díky vysoké toxicitě kolchicinu se vědci snaží syntetizovat analogy kolchicinu, které mají stejné cílené účinky, ale jsou méně toxické (*Ashok a kol. 2017*). Z jiné studie vyplývá, že při enkapsulaci kolchicinu do lipozomů a jejich alternativ, speciálně niozomů, dochází ke snížení vedlejších účinků léčiva (*Hao a kol. 2002*). Kolchicin byl v minulosti pasivně enkapsulován také do biodegradčních mikrokuliček potažených polyethylenglykolem. Výtěžek enkapsulace činil kolem 30-50% (*Das a kol. 2000*).

V předpokládané práci jsme se zaměřili na apoferritin jako nanotransportér pro enkapsulaci. Apoferritin se v minulosti ukázal jako vhodný nosič pro enkapsulaci léčiv jako ellipticin, vandetanib a doxorubicin (*Indra a kol. 2019; Jáklová a kol. 2021; Dostálová a kol. 2016*). Protože je kolchicin dobře rozpustný ve vodě, byl první pokus o enkapsulaci spojen s aktivní enkapsulací spojenou se změnami pH. Předpokládalo se, že v důsledku snížení pH dojde k rozpadu struktury apoferritinu a opětovným zvýšením pH k obnovení struktury a uzavření léčiva, podobně jako se to děje u doxorubicinu (*Dostálová a kol. 2016*).

Mé dosažené výsledky enkapsulace kolchicinu se pohybovaly kolem 15% a byly tedy níže než se čekalo.

Doxorubicin je antracyklinové léčivo nejčastěji používané k léčbě rakoviny prsu, močového měchýře a akutní lymfocytární leukémie (*Smith a kol. 2003*). Molekula doxorubicinu obsahuje dva fenolové kruhy a aminovou skupinu. Úprava pH vzorku obsahující léčivo dává za vznik polaritě, díky níž lze doxorubicin lépe enkapsulovat do nanotransportéru, speciálně apoferritinu (*Tewes a kol. 2007*). I přes snížení pH v našem roztoku však kolchicin nezměnil svoji polaritu. Lze tedy usuzovat, že enkapsulace kolchicinu byla díky nenabitému povrchu výrazně snížena. Pro vznik náboje na povrchu kolchicinu a vyšší enkapsulaci léčiva do dutiny apoferritinu byl kolchicin rozpuštěn ve vodném prostředí s HCl. Předpokládalo se, že disociované molekuly kyseliny by mohly interagovat s kolchicinem. Nicméně tento postup nevedl ke zlepšení, protože kolchicin nemá žádnou skupinu, která by při daném pH nesla náboj (viz. kapitola 3.3.9 *Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno ve vodě s HCl)*). Kolchicin byl také rozpuštěn v DMSO za účelem ovlivnění skladby proteinu s vhodnější interakcí s kolchicinem (viz kapitola 3.3.8 *Příprava ApoKol pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 (léčivo rozpuštěno v DMSO)*). Nicméně ani tento postup nevedl k podstatnému zvýšení efektivity enkapsulace. Zhen (2013) popsali způsob zvýšení účinnosti enkapsulace doxorubicinu pomocí inkubace v prostředí Cu^{2+} iontů. Ani tato změna však nevedla k zlepšení enkapsulace kolchicinu.

Posledním pokusem pro zvýšení efektivity enkapsulace kolchicinu do apoferritinu bylo inkubování léčiva v prostředí močoviny. Močovina dokáže narušit strukturu apoferritinu za účelem lepšího vmezeření léčiva. (*Zhang a kol. 2020*). I tato metoda bohužel v mém měření selhala a nevedla k vyšší míře enkapsulace.

Druhé léčivo, které bylo v rámci diplomové práce testováno za účelem jeho enkapsulace do apoferritinu byl docetaxel. Docetaxel patří do skupiny tzv. taxanů. Spolu s paklitaxelem, patří docetaxel mezi protinádorová léčiva. Docetaxel je v medicíně používán jako cytostatikum pro léčbu rakoviny prsu (*Zhao a Astruc, 2012*).

Enkapsulace docetaxelu byla prováděna do micel. Micely dokáží minimalizovat vedlejší účinky docetaxelu a jsou schopné se pasivně akumulovat v blízkosti nádorových buněk. Výsledná enkapsulace docetaxelu do micel činila kolem 85% (*Andisheh a kol. 2021*).

Docetaxel je léčivo nerozpustné ve vodě, a proto bylo rozpuštěno v DMSO. Lze tedy předpokládat, že přítomnost molekul DMSO by mohla ovlivnit skladbu nanonosiče. Vhodnost DMSO jako rozpouštědla léčiv při enkapsulaci do apoferritinu byla potvrzena při aktivní i pasivní enkapsulaci vandetanibu (*Jáková a kol. 2021*) či třeba gefitinibu (*Kuruppu a kol. 2015*).

Docetaxel byl do nanotransportéru enkapsulován aktivně i pasivně. Podle zjištěných výsledků se lze domnívat, že aktivní enkapsulace léčiva do nanotransportéru je vhodnější a efektivnější. Při pasivní enkapsulaci byl použit klasický postup pasivní enkapsulace, viz kapitola 3.3.1 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10*, u kterého byla enkapsulace léčiva nízká. Efektivita enkapsulace u gefitinibu činila při pasivní enkapsulaci nejméně 55 % (*Kuruppu a kol. 2015*). V případě vandetanibu byla ještě vyšší (*Jáková a kol. 2021*). Jedním z možných vysvětlení je složitost molekuly, kdy molekula vandetanibu je nejjednodušší a nejmenší. Naopak molekula docetaxelu je největší a nejsložitější. Proto byla následně pasivní enkapsulace obohacena inkubací s Cu^{2+} ionty, o kterých se předpokládalo, že by mohly zvýšit efektivitu enkapsulace, viz kapitola 3.3.2 *Příprava léčiv enkapsulovaných v komerčním apoferritinu pomocí pasivní enkapsulace při hmotnostním poměru 1:10 (v prostředí Cu^{2+} iontů)*. Nicméně tento postup ještě více snížil efektivitu enkapsulace léčiva v důsledku tvorby sraženiny.

Aktivní enkapsulace docetaxelu byla zaměřena na změny pH prostředí. Se snižujícím se pH prostředí mohlo docházet k vyšší míře otevření proteinu. Z výsledků je však patrné, že aktivní enkapsulace založená na změnách pH prostředí u docetaxelu nemá výrazný vliv. S velkým cílem nalézt vhodný postup pro zvýšení efektivity enkapsulace přes 50 %, byl zvolen postup dle (*Ghosh a kol., 2016*), viz kapitola 3.3.14 *Příprava ApoDoc pomocí aktivní enkapsulace z komerčního apoferritinu při hmotnostním poměru 1:10 v prostředí glycinacetátového a Tris pufr.* Ve zmíněném článku jsou popsány výsledky s úspěšností aktivní enkapsulace kolem 80 %. Ani použití podmínek popsaných v článku však nevedlo k výraznému nárůstu efektivity enkapsulace.

Jedním z důvodů, který by mohl vysvětlovat nízkou účinnost enkapsulace by mohl být množství poměr mezi apoferritinem a jednotlivými léčivy.

Velikost vnitřní dutiny apoferritinu umožňuje uskladnění až 4500 iontů železa (*Theil a kol. 2016*). Množství molekul léčiva, které má být do apoferritinu enkapsulována, je však podstatně menší. V případě doxorubicinu je například odhadováno, že ve vnitřní

dutině apoferritinu se nachází pouze zhruba 30 molekul léčiva (*Kilic a kol. 2012; Liang a kol. 2014*).

Také jiná léčiva se do apoferritinu dostávají pouze v počtu několika mála desítek molekul (*Liu a kol. 2020; Kuruppu a kol. 2015*). Vzhledem k hmotnostnímu poměru 1:10, který byl během této práce nejčastěji používán, to znamená že na 1 molekulu apoferritinu připadalo cca 120 molekul kolchicinu a 60 molekul docetaxelu. Nízká účinnost enkapsulace tak mohla být prostě způsobena jen nevhodným poměrem. Výsledky docetaxelu v prostředí glycinacetátového pufru však byly provedeny i v podmínkách, kdy poměr mezi apoferritinem a léčivem byl pouze 1:15. přesto nedošlo k významné pozitivní změně míry enkapsulace, ačkoliv publikace, z níž se vycházelo popisovala míru enkapsulace za daných podmínek kolem 80 % (*Ghosh a kol. 2016*). Naše podmínky se od podmínek v článku lišily pouze celkovým objemem. Takže vysvětlení pro nízkou míru enkapsulace je třeba hledat někde jinde. Efektivita enkapsulace docetaxelu do apoferritinu byla vyšší než u kolchicinu. Dalo by se tedy konstatovat, že docetaxel je vhodnější léčivo pro enkapsulaci do apoferritinových částic. Otázkou však zůstává, zda dokáže apoferritin snížit vedlejší účinky léčiva, po navázání do aktivního místa, jako je tomu u micel (*Andisheh a kol. 2021*).

Protože docetaxel dosahoval vyšší účinnosti enkapsulace byly u něj provedeny další pokusy, které se zabývaly kinetikou uvolňování a metabolismem. Že mohou být léčiva enkapsulovaná v apoferritinu, účinně metabolizována mikrosomálními enzymy bylo dříve potvrzeno například u ellipticinu (*Indra a kol. 2019*). Volný i apoferritinově vázaný docetaxel byl v přítomnosti jaterních mikrosomů potkanů přeměňován za vzniku dvou metabolitů. Na základě informací z literatury byly tyto metabolity identifikovány jako hydroxyoxazolidinony (*Václavíková a kol. 2004*). Tvorba jednoho z metabolitů je signifikantně ($p < 0,01$) ovlivněna přítomností apoferritinu. V jeho přítomnosti je metabolit tvořen více. Vysvětlení pro toto zvýšení není známo, ale mohlo by souviset se zakoncentrováním v apoferritinu a následným uvolněním při interakci s mikrosomální membránou. Pozitivní vliv apoferritinu v rámci metabolismu enkapsulovaných léčiv byl v minulosti pozorován u ellipticinu (*Wilhelm 2020*).

6 Závěr

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Enkapsulace kolchicinu do apoferritinu při zvolených podmínkách byla velmi nízká. Ze zvolených hmotnostních koncentrací, lze konstatovat, že nejvhodnější postup pro enkapsulaci léčiva do nanotransportéru je aktivní enkapsulace při hmotnostním poměru 10:1 pro hmotnostní koncentraci 0,75 mg/vzorek.
- 2) Účinnost enkapsulace docetaxelu do apoferritinu při zvolených podmínkách byla nepatrně vyšší než u kolchicinu, avšak stále je efekt enkapsulace nízký. Nejvhodnější postupem pro enkapsulaci docetaxelu do apoferritinu byla aktivní enkapsulace při poměru 10:1 a hmotnostní koncentraci 0,75 mg/vzorek.
- 3) Docetaxel se jeví jako vhodnější cytostatikum pro enkapsulaci do apoferritinových částic, a to jak pasivním, tak aktivním způsobem.
- 4) Jak volný, tak enkapsulovaný docetaxel může podstoupit metabolickou přeměnu cytochromy P450

7 Citace

Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Essential Cell Biology*, New York, Garland Publishing, 1998.

Andisheh, F., Oroojalian, F., Shakour, N., Ramezani, M., Shamsara, J., Khodaverdi, E., Nassirli, H., Hadizadeh, F., Alibolandi, M.: Docetaxel encapsulation in nanoscale assembly micelles of folate-PEG-docetaxel conjugates for targeted fighting against metastatic breast cancer in vitro and in vivo, *International Journal of Pharmaceutics*, 605 (2021).

Arosio, P.; Ingrassia, R.; Cavadini, P.: Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(7), str. 589-599 (2009).

Ashok, K., Parduman, S., E., Dilip, M., M.: Potencial anticancer role of colchicine-based derivatives, *Anti-Cancer Drugs*, 28(3), str. 250-262 (2017).

Baetke, S., C.; Lammers, T.; Kiessling, F.: Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer, *The British Journal of Radiology*, 88(1054) (2015).

Banerjee, A.; Luduena, R., F.: Kinetics of colchicine binding to purified beta-tubulin isotypes from bovine brain, *Journal of Biological Chemistry*, 267(19), str. 13335-13339 (1992).

Bleeker, E., A.; de Jong, W., H.; Geertsma, R., E.; Groenewold, M.; Heugens, E., H.; Koers-Jacquemijns, M.; Meent, D.; Popma, J., K.; Rietveld, A., G.; Wijnhoven, S., W., P.; Cassee, F., R.; Oomen, A., G.: Considerations on the EU definition of a nanomaterial: science to support policy making, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(1), str. 119–125 (2013).

Brown, R., A., M.; Richardson, K., L.; Kabir, T., D.; Trinder, D.; Ganss, R.; Leedman, P., J.; Altered Iron Metabolism and Impact in Cancer Biology, Metastasis, and Immunology, *Frontiers in Oncology*, 10(476) (2020).

Campbell, N.; A., Reece, J., B.: *Biology*, 6th ed London, Pearson Education, 2002.

Cell cycle (National Human Genome Research Institute) [online], cit. 04.05.2022, dostupný z <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>

Cell cycle [online], cit. 04.05.2022, dostupný z <https://www.britannica.com/science/cell-cycle>

Cooper, G., M.: *The Cell*, 2th ed. Sunderland, Sinauer Associates, 2000.

Crichton, R.: *Biological Inorganic Chemistry*, 3th ed. Academic Press, 2019.

Danhier, F.; Feron, O.; Pr at, V.: To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 148(2), str. 135-146 (2010).

Das., G., S., Rao., G., H., Wilson, R., F., Chandry, T.: Colchicine encapsulation within poly(ethyleneglycol)-coated poly(lactic acid)/poly(epsilon-caprolactone) microspheres – controlled release studies, *Drug Delivery.*, 7(3), str.12-138 (2000).

Detrich III, H., W.; Williams Jr, R., C.; Wilson, L.: Effect of colchicine binding on the reversible dissociation of the tubulin dimer, *Biochemistry.* 21(10), str. 2392-2400 (1982).

Dostalova, S., Vasickova, K., Hynek, D., Krizkova, S., Richtera, L., Heger, Z., Vaculovicova, M., Stiborova, M., Adam, V.: *23rd International PhD Students Conference (MendelNet) Conference Location Brno, CZECH REPUBLIC. MENDEL UNIV BRNO, FAC AGRONOMY Location BRNO* (2016).

Fulton, B.; Spencer, C., M.: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of Metastatic Breast Cancer, *Drugs*, 51, str. 1075-1092 (1996).

Galleti, E., Magnani, M., Renzulli, M., Botta, M.: Paclitaxel and docetaxel resistance: Molecular mechanisms and development of new generation taxanes, *ChemMedChem*, 2(7), p. 920-942 (2007).

Ghosh, S., Mohapatra, S., Thomas, A., Bhunia, D., Saha A., Das, G., Jana., B., Ghosh, S.: Apoferritin nanocage delivers combination of mikrotubule and nukleus targeting anticancer drugs, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(45) (2016).

Gillies, E., R.; Fréchet, J., M., J.: Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discovery Today*, 10(1), str. 35-43 (2005).

Hao, Y., Zhao, F., Li, N., Yang, Y., Li, K.: Studies on a high encapsulation of colchicine by a niosome system, *International Journal of Pharmaceutics*, 244 (1-2), str. 73-80 (2002).

Harrison, P.; Arosio, P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1275(3), str. 161-203 (1996).

Harned, J.; Ferrell, J.; Lall, M.; Fleisher, L., N.; Nagar, S.; Goralska, M.; McGahan, M., Ch.: Altered ferritin subunit composition: Change in iron metabolism in lens epithelial cells and downstream effects in glutathione levels and VEGF secretion, *Investigative ophthalmology & visual science*, 51, str. 4437-4446 (2010).

Hong, S.; Choi, D., W.; Kim, H., N; Park, Ch., G.; Lee, W.; Park, H., H.: Protein-Based nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmaceutics*, 12(7), (2020).

Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D., M.: Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clinical cancer research*, 14(5), str. 1310-1316 (2008).

Imram, I., Mohammad, N., L., Mohammad, S., Sofi, D., M., Leonid, A.: Advances in nanocarriers for anticancer drugs delivery, *Current Medicinal Chemistry*, 23 (20), str. 2159-2187 (2016).

Indra, R., Černá, T., Heger, Z., Hraběta, J., Wilhelm, M., Dostálová, S., Lengálová, A., Martínková, M., Adam, V., Eckschlager, T., Schmeiser, H., H., Arlt, V., M., Stiborová, M.: Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells, *Toxicology*, 419, str.40-54 (2019).

Jákllová, K., Feglarová, T., Rex, S., Heger, Z., Eckschlager, T., Hraběta, J., Hodek, P., Kolárik, M., Indra, R.: Apoferritin/Vandetanib association is long-term stable but does not improve pharmacological properties of vandetanib, *International Journal of Pharmaceutics.*, 22(8) (2021).

Joshi, C., S.; Priya, E., S.; Mathela, C., S.: Isolation and anti-inflammatory activity of colchicinoids from *Gloriosa superba* seeds. *Pharmaceutical. Biology*, 48(2), str. 206-209 (2010).

Kanwar, R.; Rathee, J.; Salunke, D. B.; Mehta, S., K.: Green nanotechnology -driven drug delivery assemblies, *American Chemical Society Omega*, 4(5), str. 8804-8815 (2019).

Kenmotsu, H.; Tanigawara, Y.: Pharmacokinetics dynamics and toxicity of docetaxel: Why the Japanese dose differs from the Western dose, *Cancer Science*, 106(5), str. 495-504 (2015).

Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I.: Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), str. 908-931 (2019).

Kianfar, E.: Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(159) (2021).

Kilic, M., A.; Ozlu, E.; Calis, S.: A Novel Protein-Based Anticancer Drug Encapsulating Nanosphere: Apoferritin-Doxorubicin Complex, *Journal of Biomedical Nanobiotechnology*, 8(3), str. 508-514 (2012).

Kim, M.; Rho, Y.; Jin, K., S.; Ahn, B.; Jung, S.; Kim, H.; Ree, M.: pH-dependent structures of Ferritin and Apoferritin in solution: disassembly and reassembly, *Biomacromolecules*, 12(5), str. 1629-1640 (2011).

Kumar, A.; Sharma, P., R.; Mondhe, D., M.: Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview, *Anticancer Drugs*; 28(3), str. 250-262 (2017).

Kuriakose, A.; Chirmule, N.; Nair, P.: Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications, *Journal of immunology research*, 2016(1298473) (2016).

Kuruppu, A., I.; Zhang, L.; Collins, H.; Turyanska, L.; Thomas, N., R.; Bradshaw, T., D.: An apoferritin-based drug delivery system for the tyrosine kinase inhibitor gefitinib, *Advanced Healthcare Materials*, 4(18), str. 2816-2821 (2015).

Lee, J., S.; Feijen, J.: Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *Journal of Controlled Release*, 161(2), str. 473-483 (2012).

Li, L.; Fang, J.; Rayn, J., C.; Niemi, E., C.; Lebrón, J., A.; Björkman, P., J.; Arase, H.; Torti, F., M.; Torti, S., V.; Nakamura, M., C.; Seaman, W., E.: Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), str. 3505–3510 (2010).

Liang, M.; Fan, K.; Zhou, M.; Yan, X.: H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(41), str. 14900-14905 (2014).

Ling, V.: P- glycoprotein and resistance to anticancer drugs, *Cancer*, 69(10), str. 2603-2609 (1992).

Liu, B.; Jiang, B.; Zheng, Z.; Liu, T.: Semiconductor quantum dots in tumor research, *Journal of Luminescence*, 209, str. 61-68 (2019).

Liu Z.; Tabakman S.; Weshler K., A.; Dai H.: Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Research.*, 2(2), str. 85-120 (2009).

Liu, W.; Lin, Q.; Fu, Y.; Huang, S.; Guo, C.; Li, L.; Wang, L.; Zhang, Z.; Zhang, L.: Target delivering paclitaxel by ferritin heavy chain nanocages for glioma treatment. *Journal of Controlled Release*, 323, str. 191-202 (2020).

Lühmann, T., Meinel, L.: Nanotransporters for drug delivery, *Current Opinion in Biotechnology*, 39, str. 35-40 (2016).

Lyseng-Williamson, K., Fenton, C.: Docetaxel, *Adis Drug Evaluation*, 65, str. 2513-2531 (2005).

Maldonado, E., N.; Patnaik, J.; Mullins, M., R.; Lemasters, J., J.: Free tubulin modulates mitochondrial membrane potential in cancer cells, *Cancer research*, 70(24), str. 10192-10201 (2010).

Matthews, H., K.; Bertoli, C.; Bruin, R., A., M.: Cell cycle control in cancer, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, str. 74-88 (2021).

MDR1 [online], cit. 17.07.2022, dostupný z <https://www.genomia.cz/cz/test/mdr1/>

Mohanty, A.; Mithra, K.; Jena, S., S.; Behera, K., R.: Kinetics of Ferritin Self-assembly by Laser Light Scattering: Impact of Subunit Concentration, pH and Ionic Strength, *Biomacromolecules*, 22(4), str. 1389-1398 (2021).

Montemiglio, L.C., Testi, C., Ceci, P.; Falvo, E.; Pitea, M.; Savino, C.; Arcovito, A.; Peruzzi, G.; Baiocco, P.; Mancina, F.; Boffi, A.; Georges, A.; Vallone, B.: Cryo-EM structure of the human ferritin–transferrin receptor 1 complex. *Nature Communications* 10(1121) (2019).

Mukhtar, E., Adhami, V., M., Mukhtar H.: Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy, *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(2), str. 275-284 (2014).

Naidu, R.; Foo, S., S., K.; Xue, B.; Fan, B.: Semi-synthetic conversion of paclitaxel to docetaxel, *European patent office*, (2012).

Niel, E.; Scherrmann, J., M.: Colchicine today. *Joint Bone Spine*, 73(6), str. 672-678 (2006).

Patel, A.: Benign vs Malignant Tumors, *JAMA Oncology*, 6(9), str.1488 (2020).

Paul, M., K.; Mukhopadhyay, A., K.: Tyrosine kinase – Role and significance in cancer, *International Journal of Medical Sciences*, 1(2), str. 101-115 (2004).

Razak, A., S., A.; Gazzali, M., A.; Fisol, F.A.; Abdulbaqi, I., M.; Parumasivam, T.; Mohtar, N.; Wahab, H., A.: Advances in Nanocarriers for Effective Delivery of Docetaxel in the Treatment of Lung Cancer, *Cancers*, 13(3), str. 400 (2021).

Rochdi, M.; Sabouraud, A.; Girre, C.; Venet, R.; Scherrmann, J., M.: Pharmacokinetics and absolute bioavailability of colchicine after iv and oral administration in healthy human volunteers and elderly subjects, *European Journal of clinical Pharmacology*, 46(4), str. 351-354 (1994).

Sackett, D., L.; Varma, J., K.: Molecular mechanism of colchicine action: Induced local unfolding of β -tubulin, *Biochemistry*, 32(49), str. 13560-13565 (1993).

Sanvicens, N.; Marco, M., P.: Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine, *Trends in Biotechnology*, 26(8), str. 425-433 (2008).

Shen, Y.; Li, X.; Dong, D.; Zhang, B.; Xue, Y.; Shang, P.: Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy, *American journal of cancer research*, 8(6), str. 916-931 (2018).

Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S., Y.; Sood, A., K.; Hua, S.: Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(286) (2015).

Shishir, M., R., I.; Xie, L.; Sun, Ch.; Zheng, X.; Chen, W.: Advance in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters, *Trends in Food Science & Technology*, 78, str. 34-60 (2018).

Smith, R., E.; Bryant, J.; DeCillis, A.; Anderson, S.: Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience, *Journal of clinical oncology*, 21(7), str. 1195-1204 (2003).

Stanton, R., A.; Gernert, K., M.; Nettles, J., H.; Aneja, R.: Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective, *Medicinal Research Reviews*, 31(3), str. 443-481 (2011).

Steinmetz, N., F.: Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices, *Nanomedicine*, 6(5), str. 634-641 (2010).

Tateishi, T.; Soucek, P.; Caraco, Y.; Guengerich, F., P.; Wood, A., J.: Colchicine biotransformation by human liver microsomes: identification of CYP3A4 as the major isoform responsible for colchicine demethylation. *Biochemistry Pharmacology*, 53(1), str. 111-11 (1997).

Terkeltaub, R., A.; Furst, D., E.; DiGiacinto, J., L.; Kook, K., A.; Davis, M., W.: Novel evidence- based colchicine dose- reduction algorithm to predict and prevent colchicine toxicity in the presence of cytochrome P450 3A4/P- glycoprotein inhibitors, *Arthritis & Rheumatology*, 63(8), str. 2226-2237 (2011).

Tewes, F., Munnier, E., Antoon, B., Okassa L., M., Cohen-Jonathan, S., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Souce, M., Dubois, P., Chourpa, I.: Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66, str. 488–492 (2007).

Theil, E., C.; Tosha, T.; Behera, R., K.: Solving Biology's Iron Chemistry Problem with Ferritin Protein Nanocages, *Accounts of Chemical Research*, 49(5), str. 784-791 (2016)

Tinkle, S.; McNeil, S., E.; Mühlebach, S.; Bawa, R.; Borchard, G.; Barenholz, Y., C.; Tamarkin, L.; Desai, N.: Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1313(1), str. 35–56 (2014).

Tzogani, K.; Penttilä, K.; Lapveteläinen, T.; Hemmings, R.; Koenig, J.; Freire, J.; Márcia, S.; Cole, S.; Coppola, P.; Flores, B.; Barbachano, Y.; Roige, S., D.; Pignatti, F.: EMA Review of Daunorubicin and Cytarabine Encapsulated in Liposomes (Vyxeos, CPX-351) for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed, Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia or Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes, *Oncologist*, 25(9), str. 1414-1420 (2020).

Václavíková, R.; Souček, P.; Svobodová, L.; Anzenbacher, P.; Šimek, P.; Guengerich, P.; Gut, I.: Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs and minipigs, *Drug metabolism and disposition*, 32(6) (2004).

Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J.: Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications, *Journal of Controlled Release*, 28(200), str. 138-157 (2015).

Wilhelm, M.: Vliv cytochromů P450 na metabolismus protinádorových léčiv vázaných v apoferritinové nanočástici. *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha (2020).

Yang, R.; Liu, Y.; Meng, D.; Chen, Z.; Blanchard, Ch., L.; Zhou, Z.: Urea-driven epigallocatechin gallate (EGCG) permeation into the ferritin cage, an innovative method for fabrication of protein-polyphenol co-assemblies, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 65(7), str. 1410-1419 (2017).

Yang, R.; Tian, J.; Liu, Y.; Yang, Z.; Wu, D.; Zhou, Z.: Thermally induced encapsulation of food nutrients into phytoferritin through the flexible channels without additives, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 65(46), str. 9950-9955 (2017).

Yazdan, M., S.; Naderi, N.; Dissanayake, O.; Tan, A.; Seifalian, A.: A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools, *International Journal of Nanomedicine*, 2011(6), str. 2963-2979 (2011).

You, K.; Su, F.; Liu, L.; Lv, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Liu, B.: SCARA5 plays a critical role in the progression and metastasis of breast cancer by inactivating the ERK1/2, STAT3, and AKT signaling pathways, *Molecular and cellular biochemistry*, 435(1-2), str. 47-58 (2017).

Yu, B.; Cheng, C.; Wu, Y.; Guo, L.; Kong, D.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Zheng, E.; Liu, Y.; He, Y.: Interactions of ferritin with scavenger receptor class A members, *Journal of Biological Chemistry*, 295(46), str. 15727-15741 (2020).

Zhang, CH., Zhang X., Zhao G.: Ferritin Nanocage: A Versatile Nanocarrier Utilized in the Field of Food, Nutrition, and Medicine, *Nanomaterials* (2020).

Zhao, P., Astruc, D.: Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy, *ChemMedChem*, 7(6), str. 952-972 (2012).