

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: biologie
Studijní obor: biologie



Regina Kondělková

Ovlivnění viability buněk při interakci s nanočásticemi oxidů titanu a
antracyklinovými cytostatiky

Cell viability changes after interaction with TiO₂ nanoparticules and anthracycline cytostatics

Bakalářská práce

Školitel: PharmDr. Irena Štenglová Netíková, Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Ireně Štenglové Netíkové, Ph.D., za rady, čas a trpělivost při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda též poděkovala Mgr. Václavu Štenglovi, Ph.D., D.Sc. za cenné připomínky.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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 _____

Podpis autora: _____

Abstrakt

Cílem práce je provedení literární rešerše na téma ovlivnění viability buněk při interakci s antracyklinovými cytostatiky a nanočásticemi TiO₂. Antracyklinová cytostatika jsou jednou ze skupin nejvíce používaných chemoterapeutických léčiv, obzvláště často využívaný je pak jejich zástupce doxorubicin. Závažným nežádoucím účinkem antracyklinů při para podání léčiva (extravazaci) je nekrotizace okolní tkáň. Zatím není k dispozici účinná léčba tohoto nežádoucího účinku. Jednou z cest by mohlo být využití sorpčních a degradačních vlastností pro lidské tělo netoxických nanočástic TiO₂. Pro antracykliny je charakteristická rychlá adsorpce na povrch nanočástic TiO₂ a následná degradace na netoxické produkty. Proto se v rešerši dále zabývám využitím nanočástic TiO₂, jejich unikátními chemickými vlastnostmi a způsobem, jakým ovlivňují viabilitu buněk, zejména buněčné linie keratinocytů *in vitro*. Z rešerše vyplývá, že nedochází ke snížení viability buněk keratinocytů při jejich kultivaci společně s nanočásticemi TiO₂, a tím se otevírá prostor pro další studie na využití nanočástic TiO₂ pro léčbu nekrotizujících extravazací antracyklinů.

Klíčová slova

Antracyklinová cytostatika, doxorubicin, nanočástice TiO₂, buněčná viabilita, keratinocyty, extravazace

Abstract

The goal of this thesis is to conduct a literary research about cell viability changes after interaction with TiO₂ nanoparticules and anthracycline cytostatics. Anthracycline cytotoxic agents are one of the most commonly used groups of antineoplastic drugs, particularly doxorubicin. A serious side effect of anthracyclines in para drug administration (extravasation) is necrosis of the surrounding tissue. Effective treatment for this side effect is not available as of yet. One possible way could be to use sorption and degradation characteristics of nanoparticles of TiO₂, which are non-toxic to the human body. Anthracyclines are characterized by rapid adsorption to the surface of nanoparticles of TiO₂ and subsequent degradation to non-toxic products. Therefore further I deal with the use of nanoparticles of TiO₂, their unique chemical properties and the way they affect cell viability, especially keratinocyte cell lines *in vitro*. It has been shown that there is no reduction in cell viability when culturing keratinocytes together with TiO₂ nanoparticles and thus it opens the door for further studies on the use of nanoparticles of TiO₂ for the treatment of necrotizing anthracycline extravasation.

Keywords

Anthracycline cytostatics, doxorubicin, TiO₂ nanoparticles, cell viability, keratinocytes, extravasation

Obsah

1	ÚVOD	1
2	EXTRAHAZACE	2
2.1	KLINICKÁ PREVENCE EXTRAHAZACE.....	3
2.2	LÉČBA.....	5
2.3	BUNĚČNÁ SMRT ZPŮSOBENÁ ANTRACYKLINY.....	6
2.4	MECHANISMUS NEKROTICKÉHO ÚČINKU DOXORUBICINU.....	7
2.4.1	<i>PARP-1</i>	7
2.4.2	<i>NF-κB</i>	8
3	ANTRACYKLINOVÁ CYTOSTATIKA	10
3.1	MECHANISMUS PROTINÁDOROVÉHO ÚČINKU.....	12
3.1.1	<i>Interkalace do DNA</i>	12
3.1.2	<i>Inhibice topoizomerázy II</i>	12
3.1.3	<i>Další mechanismy zodpovědné za rozvoj nežádoucí toxicity</i>	13
3.2	VEDLEJŠÍ ÚČINKY.....	15
3.2.1	<i>Kardiotoxicita</i>	15
3.2.2	<i>Nekrotizace tkání po extravazaci</i>	16
4	NANOČÁSTICE TiO₂	17
4.1	TiO ₂	17
4.2	NANOČÁSTICE TiO ₂	18
4.2.1	<i>Příprava</i>	18
4.2.2	<i>Vazebnost na antracykliny</i>	19
4.2.3	<i>Drug Delivery System antracyklinů s TiO₂</i>	20
4.3	MOŽNOSTI VYUŽITÍ DOXORUBICINU A TiO ₂ PŘI EXTRAHAZACÍCH.....	20
5	TESTOVÁNÍ BUNĚK <i>IN VITRO</i>	23
6	ZÁVĚR	27
7	POUŽITÁ LITERATURA	28

Zkratky

ACL	Aclarubicin	Aclarubicin
ADP	Adenosin Diphosphate	Adenosindifosfát
AIF	Apoptosis Inducing Factor	Faktor indukující apoptózu
ATP	Adenosin Triphosphate	Adenosintrifosfát
CVC	Central Venous Catheter	Centrální žilní katetr
DAU	Daunorubicin	Daunorubicin
DDS	Drug Delivery System	Systém uvolňující léčivo
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Deoxyribonukleová kyselina
DOX	Doxorubicin	Doxorubicin
EBM	Evidence Based Medicine	Medicína založena na důkazech
EPI	Epirubicin	Epirubicin
FADH	Flavin Adenin Dinucleotide+ H	Flavinadenindinukleotid+ H
HRSEM	High Resolution Scanning Electron Microscopy	Skenovací elektronový mikroskop
IDA	Idarubicin	Idarubicin
IKK	IκB Kinase	Kináza IκB
MIT	Mitaxantrone	Mitaxantrone
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Nikotinamidadenindinukleotid
NK κB	Nuclear Factor κB	Nukleární faktor κB
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase I	Poly (ADP- ribóza) polymeráza I
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktivní formy kyslíku
TEM	Transmission Electron Microscopy	Transmisní elektronový mikroskop
TNF α	Tumor Necrosis Factor α	Tumorový nekrotizující faktor α
TNFR	Tumor Necrosis Receptor Factor	Tumorový nekrotizující receptorový faktor

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve světě a léčebné metody, které máme momentálně k dispozici, jsou nedostačující. To je důvodem intenzivního onkologického výzkumu, zaměřeného na nové molekuly cílené léčby, imunoterapii a nové lékové formy cytostatik s výhodnější distribucí léčiva v organismu. Další rychle se rozvíjející výzkumnou oblastí v medicíně jsou nanotechnologie, kde momentálně probíhá rapidní nárůst preklinických a klinických studií využívajících interakce mezi léčivými látkami a nanočásticemi. Tento trend se objevuje například v léčbě malignit. Cílem je zvýšit účinnost protinádorové terapie změnou farmakokinetických vlastností antineoplastik ve smyslu zlepšení cíleného dodání léčiva do oblasti nádoru, pomalejší eliminace a snížení nežádoucích účinků díky nižšímu kontaktu léčiva se zdravými buňkami.

Léčba maligních onemocnění je dosud založena na použití cytotoxických chemoterapeutik. Nová biologická léčiva nebo molekuly cílené léčby přicházející v současné době na trh, mají vesměs podpůrný účinek ve smyslu zvýšení kvality života onkologického pacienta a jeho prodloužení, ale často jsou účinné pouze v kombinaci s cytostatiky. Chemoterapie, tedy léčba cytostatiky, tak stále patří mezi základní léčebné metody v onkologii, včetně mnoha závažných nežádoucích účinků s ní spojených.

Nové lékové formy, využívající například nanotechnologie, mohou změněnými farmakokinetickými parametry významně zvýšit účinnost léčby (cíleným působením na nádorové buňky) a na druhou stranu snížit výskyt závažných nežádoucích účinků chemoterapie (omezením kontaktu se zdravými buňkami).

Použití nanočástic může napomoci k vyřešení některých komplikací, se kterými se v chemoterapii setkáváme, jako např. rozpustnost a stabilita chemoterapeutika. Dalšími způsoby použití nanočástic jsou: ochrana chemoterapeutika před časnou degradací a exkrecí z organismu, zlepšení penetrace a cíleného doručení antineoplastika přímo do nádorových buněk.

Novou oblastí využití nanočástic by mohla být léčba extravazací cytostatik. Díky svým adsorpčním a zároveň degradačním účinkům na cytostatika a malé toxicitě pro lidský organismus se nanočástice oxidu titaničitého jeví být vhodným přípravkem pro terapii tohoto vážného nežádoucího účinku.

2 Extravazace

Extravazace je proces, při kterém proniká libovolná tekutina přes krevní řečiště do okolních tkání. V chemoterapii je extravazací myšlen neúmyslný únik protinádorového léčiva do podkoží či subdermální tkáně, která obklopuje intravenózní nebo intraarteriální místo vpichu (shrnutí v Pérez Fidalgo et al., 2012) včetně poškození žily u zavedeného centrálního žilního katetru (CVC-Central Venous Catheter-portu) (shrnutí v Schulmeister, 2011). U dospělých se frekvence extravazací pohybují mezi 0,1–6 % a rozsah poškození závisí na koncentraci a množství chemoterapeutika (shrnutí v Schrijvers, 2002).

Míra poškození tkáně dělí protinádorová léčiva na vesikanty (látky způsobující puchýře), iritanty a nevesikanty (shrnutí v Pérez Fidalgo et al., 2012).

Extravazace iritantů mají za následek zánětlivé reakce, bolesti, otoky, ale dále také hyperpigmentaci, pálení, erythem nebo zvýšenou citlivost podél žily, kde došlo k aplikaci (shrnutí v Schrijvers, 2002). Většinou nezpůsobují permanentní poškození tkáně v místě extravazace (shrnutí v Ener et al., 2004). Nevesikující látky okolní tkáň v místě extravazace nepoškozují.

Vesikanty mohou způsobovat tvorbu puchýřů a vředů, odlupování kůže a další lokální poškození související s rozvojem zánětu, včetně nekrotizace tkáně v místě, kde došlo k extravazaci (Obr. 1). Mají trvalé následky a jejich symptomy se projevují časně po para podání cytostatika. Nejčastějším případem extravazace vesikantů je para podání antracyklinových antibiotik doxorubicinu a epirubicinu (shrnutí v Schulmeister, 2011).



Obr. 1: Poškození tkání v důsledku extravazace. Vlevo: Vřed způsobený extravazací. Vpravo: Progrese extravazace do nekrotické fáze. Převzato a upraveno dle (Sauerland et al., 2006).

Vesikanty dělíme na látky tvořící vazby s DNA a látky, které se na DNA nevážou (Tab. 1).

Vesikanty, jež se na DNA nevážou, mívají nepřímý toxický efekt (shrnuo v Ener et al., 2004; shrnuo v Schulmeister, 2011). Působí jako intracelulární mikrotubulinové toxiny a topoizomerázové inhibitory interferující s mitózou, ale nedochází u nich k samotnému navázání na DNA. Mikrotubulové toxiny inhibují polymerizaci mikrotubulinových heterodimerů, brání tvorbě mitotického vřeténka a přerušují buněčný cyklus ve fázi mitózy, či naopak stabilizují mitózu inhibicí depolymerizace a mnohonásobně ji prodlužují, což vede u nádorových buněk k apoptóze. Ovlivněním polymerizace tubulinu dochází dále mimo jiné k poškození cytoskeletu a ovlivnění intracelulárního transportu. Vesikanty, které se na DNA nevážou, jsou snadněji metabolizovány a jejich clearance má mnohem vyšší hodnoty. Tyto látky jsou tedy rychleji eliminovány, takže nedochází k dalšímu poškozování tkáně (shrnuo v Ener et al., 2004; shrnuo v Schulmeister, 2011)

Vesikanty tvořící vazby s DNA jsou například inhibitory topoizomerázy, jež blokují enzymy, zodpovědné za rozpletení DNA a rekonstrukci DNA před a po replikaci a transkripci. Tyto účinky, stejně jako přímá vazba na DNA, mají za následek brzdění DNA transkripce a replikace, což je hlavní příčinou buněčné smrti (shrnuo v Sauerland et al., 2006).

Chemoterapeutické vesikanty	
Klasifikace	Příklady
<i>DNA vázající</i>	
Alkylující agens	Mechlorethamin
Antracyklinová cytostatika	Daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin
Ostatní protinádorová cytostatika	Dactinomycin, mitomycin, mitoxantron
<i>DNA nevázající</i>	
Rostlinné alkaloidy	Vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin
Taxany	Docetaxel, paclitaxel

Tab. 1: Dělení chemoterapeutických vesikantů. Převzato a upraveno dle (Schulmeister, 2011).

2.1 Klinická prevence extravazace

Extravazace vesikantů patří mezi méně časté nežádoucí události spojené s podáváním chemoterapie. Jejich příznaky se objevují časně a bez terapeutického zásahu se postupně zhoršují až k fázi nekrózy. Nejlepší prevencí je podávání vesikantů přes centrální žilní katetr

(CVC). I přes zvýšenou bezpečnost a minimalizaci rizik při použití CVC nedochází k úplné eliminaci extravazací z důvodů protékání CVC. Únik cytostatika může nastat jako následek:

1. separace katetru od tělního portu
2. zářezu ve výstupním katetru
3. trhliny či narušení katetru v portovém septu
4. vzniku fibrinové blanky na špičce výstupního katetru a následnému nadměrnému tlaku v okolí jehly
5. neúplného propíchnutí jehly přes portové septum
6. spontánní retrakce špičky katetru ze subklaviální žíly

(shruto v Ener et al., 2004; shruto v Goolsby and Lombardo, 2006).

Aplikace cytostatik periferní žílou se nedoporučuje, pokud se má jednat o dlouhodobou infuzi nebo o opakované podání. Nastane-li takový případ, musí být administrace neustále monitorována. Protože správná aplikace je stěžejní prevencí extravazací, byly sepsány následující směrnice:

1. Vesikant by měl být podáván přes recentně zavedený katetr a při aplikaci by se mělo vyhnout podávání do hřbetu ruky či v okolí kloubů, kde extravazace může vést k funkčnímu poškození.
2. Preferenčně by k podání mělo dojít přes CVC, hlavně pokud se jedná o dlouhou infuzi a opakovanou dlouhodobou léčbu.
3. Neměla by být prováděna aplikace do končetiny s narušenou cirkulací či po provedení disekce lymfatických cest.
4. Kritický je výběr správného katetru a správné zalepení místa vpichu tak, aby nebylo zakryto a byla umožněna dobrá viditelnost.
5. Správné zavedení katetru nesmí být testováno cytotoxickým léčivem.
6. Pacienti mají být upozorněni na to, že mají okamžitě hlásit jakékoliv bolesti.
7. Při pozorování zarudnutí, otoku či návratu krve do katetru má být administrace cytostatika ukončena (shruto v Ener et al., 2004).

2.2 Léčba

Pokud se vyskytne podezření, že došlo k extravazaci cytostatika, musí se okamžitě zastavit infuze, odhadnout předpokládané množství extravazovaného cytostatika a dokumentovat precizně všechny informace (shrnutí v Schulmeister, 2011).

Při extravazaci DNA vázajícího vesikantu se doporučuje jako počáteční nefarmakologická léčba aplikace chladných obkladů, jejichž cílem je způsobit konstriktci cév a tím zabránit dalšímu šíření vesikantu do přilehlých tkání. Použití teplých obkladů se osvědčilo při extravazaci DNA nevážajícího vesikantu, kdy teplo zvyšuje tok krve a tím i absorpci a distribuci vesikantu do centrálního oběhu, kde dojde k následné metabolizaci léčiva a jeho vyloučení z organismu. Další neinvazivní metodou je promývání místa fyziologickým roztokem, který má naředit koncentrované cytostatikum ve tkáních a jeho následné odsátí. Od tohoto postupu se na mnohých pracovištích ustupuje z důvodu rizika poškození okolní tkáně (shrnutí v Langer et al., 2009).

Další léčebný postup závisí na množství, koncentraci a typu vesikantu (DNA vázajícího či nevážícího) a umístění extravazace. K operativnímu zákroku odstraňujícímu nekrotické tkáně většinou dochází při extravazaci na DNA vázajícího vesikantu v delším časovém odstupu. V poslední době se ukazuje, že zákrok provedený během prvních 24 hodin má vyšší úspěšnost v prevenci rozsáhlé nekrotizace tkáně a rozvoji infekcí s ní spojených (shrnutí v Schulmeister 2011; shrnutí v Langer et al., 2009). Takovéto invazivní metody se používají v kombinaci s fluorescenční mikroskopií. Do místa extravazace se vpíchne IV fluorescenční látka a slouží jako identifikátor tkáně, která nekróze ještě nepodlehla (shrnutí v Langer et al., 2009).

Při farmakologické léčbě extravazací se aplikuje léčivo povrchově či nitrožilně na místo postižení. V dosavadní léčbě extravazací antracyklinů se nejčastěji používá lokálně dimethylsulfosid (DMSO). V případě rozsáhlejší extravazace je indikován parenterálně i . v. infuzí dexrazoxan (shrnutí v Schulmeister, 2011).

DMSO má antioxidační a protizánětlivé účinky a zpomaluje či zcela zabraňuje tvorbě vředů (Lebredo et al., 1992). Podáním koncentrovaného roztoku se zvyšuje kožní permeabilita, čímž dochází k podpoře absorpce extravazovaných vesikantů a odstranění volných radikálů. DMSO se používá samostatně nebo v kombinaci s jinými léčebnými metodami, např. s aplikací studených suchých obkladů, v pozdějších fázích s lokální aplikací

krémů s kortikosteroidy nebo antibiotiky. Jeho účinnost je empiricky ověřená, ale není založená na EBM (EBM-Evidence Based Medicine) studiích (shrnutí v Ener et al., 2004; shrnutí v Goolsby and Lombardo, 2006; shrnutí v Langer et al., 2009; shrnutí v Schulmeister, 2011).

Další možností léčby extravazací je již zmíněný i. v. dexrazoxan, jenž se váže na Fe^{2+} v buňce a tím zabraňuje tvorbě volných radikálů. Dále se váže i na DNA topoizomerázu II, ale v jiném stádiu katalytického cyklu než antracykliny a s časovým omezením a tím znemožňuje navázání antracyklinů a dlouhodobou inhibici DNA topoizomerázy II (shrnutí v Jordan et al., 2009; shrnutí v Schulmeister, 2011). V prováděných studiích při parenterální aplikaci dexrazoxanu po extravazaci antracyklinového antibiotika došlo v časovém odstupu ke zmenšení tkáňové léze a následně k celkově menšímu poškození tkáně v souvislosti s extravazací (Mouridsen et al., 2007).

2.3 Buněčná smrt způsobená antracykliny

Bylo popsáno několik navrhovaných mechanismů buněčné smrti indukované antracykliny. Patří mezi ně nekróza, apoptóza, autofagie a senescence (shrnutí v Zhang et al., 2009). Pro poškození tkáně související s extravazací cytostatik jsou nejdůležitější první dva mechanismy, tedy nekróza a apoptóza.

Programovaná buněčná smrt neboli apoptóza je regulovaná aktivní forma buněčné smrti, závislá na dodané energii a nevyvolávající zánětlivou reakci. Jednodušeji řečeno je při apoptóze zachována membránová integrita vytvořením apoptotických tělísek, díky nimž je možné odstranit apoptotické zbytky buňky pomocí fagocytózy. Mezi morfologické změny typické pro apoptózu patří smrštění buňky, vakuolizace, kondenzace chromatinu a DNA fragmentace (shrnutí v Dartsch et al., 2002; shrnutí v Zhang et al., 2009).

Nekróza je typická prasknutím buněčné stěny a vede k zánětu a mobilizaci imunitního systému. Zdá se být účinnější cestou v eliminaci nádorových buněk než apoptóza (shrnutí v Dartsch et al., 2002). Jedná se o nekontrolovatelný, energeticky nezávislý proces. Dochází při něm k zmožnění cytoplazmatických organel, což je obzvláště patrné u mitochondrií. Jedním z důvodů se zdá být oxidativní stres, kdy ROS (Reactive Oxygen Species) způsobují přetížení mitochondrií vápníkem, vyprázdnění zásob ATP a buněčnou smrt. Antracykliny, v tomto případě doxorubicin, způsobují poškození DNA mitochondrií, poruchy v mitochondriální respiraci, mitochondriální dysfunkce a nedostatek ATP, což vede k nekróze

(shrnutí v Zhang et al., 2009). V *in vitro* studiích bylo popsáno, že antracyklinová cytostatika indukují v *in vitro* podmínkách jak apoptózu, například aclarubicin, tak i nekrózu, například doxorubicin, daunorubicin a mitaxantron (shrnutí v Dartsch et al., 2002; Koceva-Chyła et al., 2005).

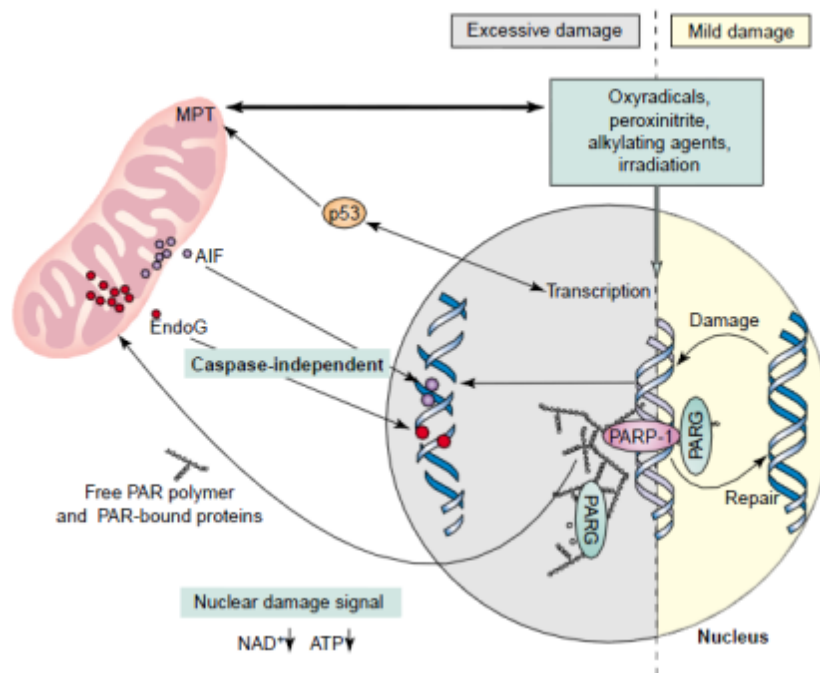
2.4 Mechanismus nekrotického účinku doxorubicinu

Prvotním iniciátorem nekrózy je receptor indukující buněčnou smrt TNFR 1 (tumor nekrotizující receptor 1). Samotné zahájení buněčné smrti nastává po navázání TNF α (tumor nekrotizujícího faktoru) na receptor TNFR 1 a dle změny intracelulárního signálu od TNFR 1 dochází k buď k apoptóze, nekróze či autofágii (shrnutí v Vandenabeele et al., 2010).

2.4.1 PARP-1

Jedna z cest buněčné smrti, kterou může indukovat doxorubicin, je bioenergetická nekróza (shrnutí v Vandenabeele et al., 2010). Genotoxický stres může vzniknout nadměrným poškozením DNA reaktivními formami kyslíku (ROS). ROS jsou molekuly odvozené od kyslíku, které snadno oxidují jiné molekuly. Intracelulární ROS jsou nejčastěji odvozeny od superoxidu $O_2^{\cdot-}$, jenž se tvoří jedoelektronovou redukcí O_2 . $O_2^{\cdot-}$ je pak přeměněn superoxidodismutázou na peroxid vodíku H_2O_2 (shrnutí v Sena and Chandel, 2012).

Tento stres způsobuje hyperaktivitu nukleárního enzymu (poly-(ADP-ribose) polymeráza I) PARP-1 (Los et al., 2002; shrnutí v Minotti et al., 2004; shrnutí v Tacar et al., 2013). PARP-1 je nukleární enzym, který je součástí opravného mechanismu DNA a jeho transkripční regulace (Kraus, 2008). Jeho hyperaktivita vede k úniku NAD^+ a ATP z buňky, což vede k jejímu energetickému kolapsu, uvolní se AIF (apoptosis-inducing-factor, apoptózu indukující faktor) z vnitřní mitochondriální membrány (Obr. 2), dojde k jeho relokaci do jádra, kde katalyzuje DNA fragmentaci, tím ještě zvýší produkci PARP-1 a cyklus se neustále opakuje (Kroemer et al., 2007; shrnutí v Tacar et al., 2013; shrnutí v Vandenabeele et al., 2010).

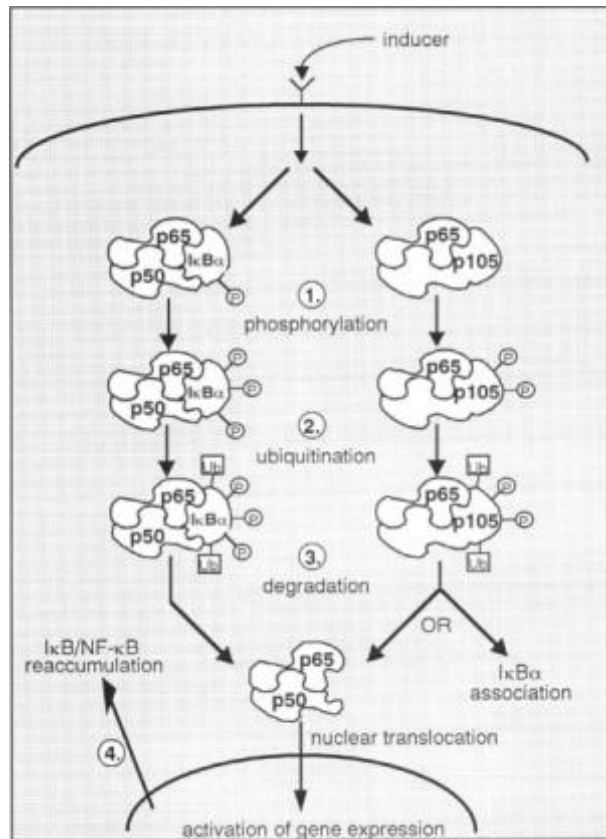


Obr. 2: PARP-1 (poly - (ADP-ribose) polymeráza I) zprostředkovaná buněčná smrt nezávislá na kaspázách. Hyperaktivace PARP-1 způsobuje nekrotizaci tím, že vyprázdní buněčné zásoby NAD^+ a ATP, což vede k přesunutí AIF z mitochondrií do jádra, kde AIF působí jako transkripční faktor. Převzato a upraveno dle (Hong et al., 2004).

2.4.2 NF- κ B

Další signální kaskáda indukovaná doxorubicinem a vedoucí k zánětu, nekróze a např. kardiomyopatii je nukleární faktor κ B (nuclear factor κ B) (shrnutí v Tacar et al., 2013). NF κ B patří do heterogenní skupiny dimerických transkripčních faktorů, které se řadí do rodiny proteinů REL. Aktivace NF κ B probíhá pomocí TNFR 1, a to sice po navázání patogenů, toxinů, ale i léků a oxidantů (shrnutí v Vandenabeele et al., 2010). Je zodpovědný za buněčnou proliferaci, imunitní odpověď způsobenou expresí určitých genů a celkové přežití buňky. V závislosti na oxidativní stimulaci může indukovat jak buněčné dělení, tak buněčnou smrt (Wang et al., 2002).

Jak již bylo zmíněno, ROS stojí na počátku spuštění kaskády. V nestresovaných buňkách je aktivní forma NF κ B v cytosolu navázána na inhibitor I κ B α . Přejde-li stimulace od zánětlivých cytokinů či oxidantů, I κ B α je fosforizováno upstreamovou kinázou I κ B (IKK), což vede k polyubiquitinaci a degradaci I κ B proteázami (Obr. 3). To má za následek vypuštění a translokaci NF κ B komplexu do jádra (shrnutí v Chen et al., 1999). Aktivovaný NF κ B se váže na specifickou sekvenci DNA a reguluje expresi genů řídících zánětlivou reakci, apoptózu, nekrózu či karcinogenezi (Wang et al., 2002).



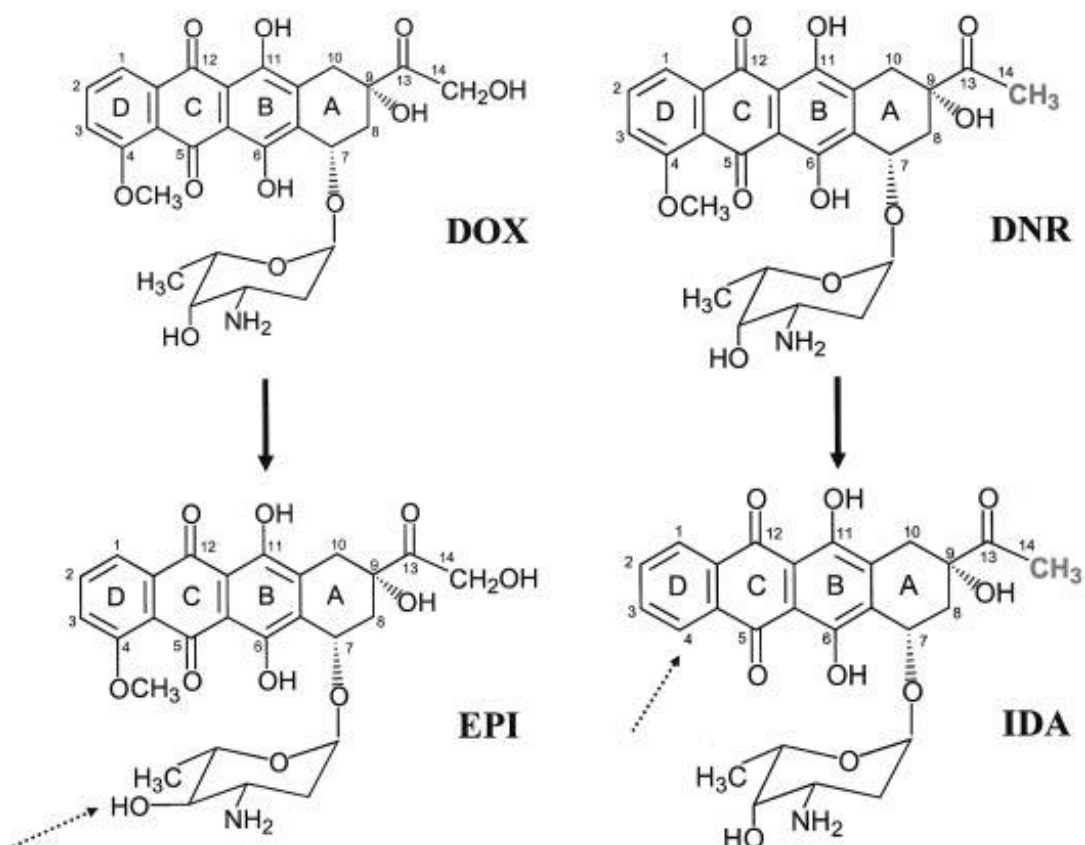
Obr. 3: Zjednodušené schéma aktivace dimeru NF-κB. Po stimulaci dojde k fosforylaci dimeru za pomoci IKK, polyubiquitinaci a degradaci. Uvolněný NF κB je translokalizován do jádra, kde reguluje genovou expresi. Převzato a upraveno dle (Albert S. Baldwin, 1996).

3 Antracyklinová cytostatika

Antracykliny jsou používány v protinádorové terapii již od počátku 60. let a jsou řazeny mezi jedny z nejefektivnějších protinádorových léčiv. Jsou získávány fermentačními procesy z půdní bakterie *Streptomyces peucetius*. První z izolovaných antracyklinů byl daunorubicin (DNR) v roce 1963, následně pak doxorubicin (DOX) v roce 1968 a epirubicin (EPI) v roce 1975 či analog daunorubicinu – idarubicin (IDA), izolovaný v roce 1976. V dnešní době antracykliny zaujímají dominantní pozici v léčbě karcinomu plic, prsu, štítné žlázy, žaludku a vaječníků. Dále se využívají k léčbě lymfoblastické a myeloidní leukémie, Non-Hodgkinova a Hodgkinova lymfomu, sarkomů měkkých tkání, osteosarkomů, neuroblastomů a nefroblastomů (shrnutí v Kizek et al., 2012; shrnutí v Verrill, 2001).

DOX sdílí s DNR stejné necukerné složky, které se skládají z tetracyklických kruhů s přilehlými chinonovými a hydrochinonovými skupinami v kruzích B a C (Obr. 4), methyloxy substituenty na C4 v kruhu D a z krátkého vedlejšího řetězce na C9 v kruhu A, kde je na C13 napojena karbonylová skupina. Jediný rozdíl mezi daunorubicinem a doxorubicinem je právě tato karbonylová skupina, která je doxorubicinu zakončena primárním alkoholem, zatímco u daunorubicinu methylovou skupinou. Tento malý rozdíl v chemickém složení má velký dopad na aktivitu a účinnost doxorubicinu a daunorubicinu.

Sacharid napojený na C7 kruhu A glykosidickou vazbou se nazývá daunosamin. Skládá se z 3-amino-2,3,6-trideoxy-fucosyl skupiny a epimerizační změnou polohy hydroxylové skupiny z axiální do ekvatoriální roviny získáme semisyntetický derivát doxorubicinu – epirubicin (EPI). Účinnost zůstává zachována, ale tato epimerizace má za následek změnu ve farmakokinetických a metabolických vlastnostech epirubicinu. Idarubicin je analogem daunorubicinu vznikající po odstranění 4- methyloxy skupiny na kruhu D.



Obr. 4: *Struktury doxorubicinu (DOX), daunorubicinu (DNR), epirubicinu (EPI), a idarubicinu (IDA). Tečkované šipky ukazují na strukturní modifikaci epirubicinu ve srovnání s doxorubicinem. Převzato a upraveno dle (Minotti et al., 2004).*

DOX se používá primárně k léčbě rakoviny prsu, nádorů dětského věku, sarkomů měkkých tkání a agresivních lymfomů. DNR má větší účinnost v léčbě akutních lymfoblastických a myeloblastických leukémií. IDA nachází využití při léčbě akutní myeloidní leukémie, mnohočetného myelomu a Hodgkinova lymfomu. EPI je účinný v léčbě karcinomu prsu, žaludku a sarkomů.

Samotné klinické využití DOX a DNR je limitováno rezistencí nádorových buněk (multidrug rezistence – MDR) a toxicitou vznikající ve zdravých tkáních (kardiomyopatie, srdeční selhání). Riziko rozvoje srdečního selhání lze omezit nepřekročením celoživotních kumulativních dávek antracyklinů (např. u doxorubicinu v rozmezí 450–600 mg/m²) (shrnuto v Kizek et al., 2012; shrnuto v Minotti et al., 2004).

Antracykliny patří mezi interkalační látky, jež se vážou na DNA. Například po interkalaci doxorubicinu do DNA zdravých buněk dochází k apoptóze a tvorbě komplexu

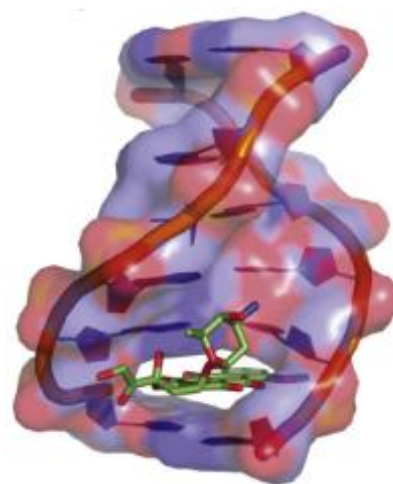
DNA-doxorubicin, který je endocytován dalšími zdravými buňkami a dochází k cyklu systematického poškozování tkáně (Mouridsen et al., 2007).

3.1 Mechanismus protinádorového účinku

3.1.1 Interkalace do DNA

Interkalační látky se na DNA vážou a vmezeřují svoje planární chromatofory mezi báze dvoušroubovice DNA a tvoří s nimi hydrofobní interakce. Samotná interkalace je stabilizována vodíkovými můstky mezi bázemi DNA.

Antracyklinový kruh se vmezeřuje mezi báze DNA svou dlouhou osou téměř kolmo k ose dvoušroubovice DNA (Obr. 5). Jeden z kruhů zastává roli kotvy, která stabilizuje komplex přes vodíkové můstky aminosacharidů ležících v malém žlábkku. Vodíkové můstky katalyzují interakci aminosacharidů s chromatofory antracyklinových antibiotik (shrnutí v Rabbani et al., 2005). Jeden z dalších mechanismů interkalace může zahrnovat tvorbu komplexu antracyklinových antibiotik s železem. Fe kationty se navážou na molekulu antracyklinu, komplex se vystaví oxidativnímu stresu, dojde k reakci reaktivních forem kyslíku s buněčnou složkou za vzniku formaldehydu a ten se kovalentně naváže na aminoskupinu antracyklinu za tvorby Schiffovy báze. Komplex se vmezeří do DNA a Schiffova báze vytvoří kovalentní vazbu na 2-amino skupinu guaninu v malém žlábkku DNA (Taates and Koch, 2001).



Obr. 5: Interkalace doxorubicinu do DNA dvoušroubovice.

Převzato a upraveno dle (Yang et al., 2014)

3.1.2 Inhibice topoizomerázy II

Topoizomerázy jsou vysoce konzervované enzymy přítomné skoro ve všech žijících organismech. Modifikují topologii DNA beze změny struktury deoxynukleotidů a sekvencí. Regulace topologie usnadňuje replikaci, transkripci a jiné procesy v buněčném jádře. Topoizomeráza I tvoří jednovláknové zlomy, zatímco topoizomeráza II dvouvláknové. Topoizomeráza II je ATP-dependentní enzym a v lidském organismu se vyskytuje ve dvou formách – topoizomeráza II α , jíž převážně exprimují dělicí se buňky, a topoizomeráza II β , jež se vyskytuje v nedělicích se buňkách (např. buňky myokardu). Jedním z mechanismů antracyklinů je inhibice funkce topoizomerázy II, která vede ke zlomům v molekule DNA a

k buněčné smrti (shrnutí v Minotti et al., 2004; Pommier et al., 2010; shrnutí v Yang et al., 2014; shrnutí v Zhang et al., 2012).

Při superspiralizaci dvoušroubovice DNA dojde k navázání topoizomerázy II, jež enzymatickou činností vytvoří zlomy na obou řetězcích dvoušroubovice DNA, protáhne vzniklou štěrbinou vlákna DNA a zalepí zlom. Tímto uvolňuje torzní napětí vznikající při replikaci či transkripci DNA. Inhibice antracykliny nastává v momentě, kdy se navážou na topoizomerázu II navázanou na DNA. Vznikne trojný komplex antracyklin – DNA – topoizomeráza II a dojde k zabránění opravy zlomů v dvoušroubovici. Samotná stabilizace a formace trojného komplexu je závislá na strukturních determinantech. Zatímco planární chromatofor antracyklinu je důležitý pro interkalaci, v inhibici hraje roli cukerná složka, která se neinterkaluje a leží v malém žlábků (shrnutí v Minotti et al., 2004; Pommier et al., 2010)

3.1.3 Další mechanismy zodpovědné za rozvoj nežádoucí toxicity

Jak již bylo řečeno, mezi hlavní mechanismy protinádorového účinku antracyklinů patří interkalace do DNA a inhibice DNA topoizomerázy II. Avšak jejich důsledkem jsou další mechanismy ovlivňující viabilitu buněk a také způsobující nežádoucí toxicitu.

3.1.3.1 Tvorba volných radikálů

Sekundární mechanismus toxicity antracyklinů se zakládá na jejich schopnost tvorby volných radikálů *in vivo*, které svým působením poškozují buněčnou membránu, DNA a proteiny. Doxorubicin se oxiduje na semichinonový radikál, jenž je nestabilním metabolitem reagujícím s kyslíkem a tvořícím reaktivní formy kyslíku, jako je superoxidový aniontový radikál $O_2^{\cdot -}$ a peroxid vodíku H_2O_2 . ROS způsobují poškození membrán peroxidací lipidů a dále poškozují DNA, indukují oxidativní stres a spouští apoptotické mechanismy vedoucí k buněčné smrti (Bachur et al., 1979; shrnutí v Minotti et al., 2004; Štenglová Netíková et al., 2016; shrnutí v Yang et al., 2014).

Uvolnění železa z intracelulárních zdrojů je doprovodným jevem intracelulární reakce doxorubicinu. Volné radikály se také tvoří reakcí železa a doxorubicinu za tvorby vedlejšího metabolitu doxorubicinolu. Tvorbou komplexu doxorubicin – Fe^{2+} může dojít ke katalyzaci Fentonovy reakce, tranzitní kovy Fe^{2+} a Cu^{2+} redukují peroxid vodíku na vysoce reaktivní hydroxylové radikály.

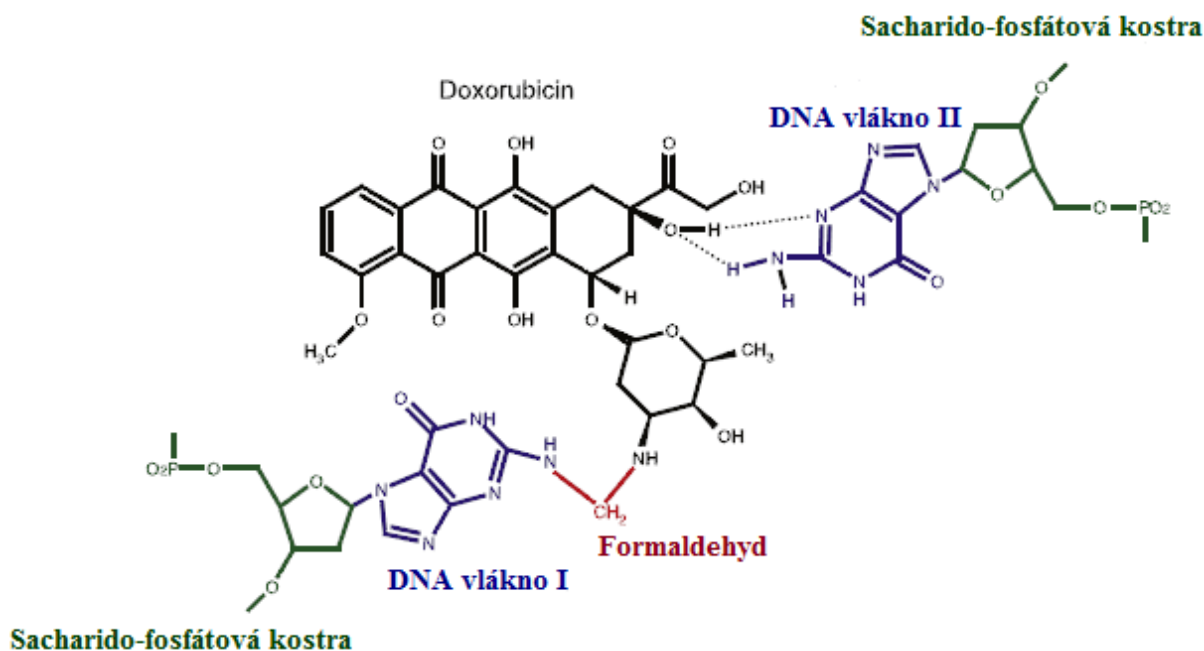


Fe^{3+} je často zpět redukováno na Fe^{2+} jinou molekulou H_2O_2 za tvorby hydroperoxylového radikálu a protonu. To má za následek disproportionaci H_2O_2 a výsledným produktem jsou dva různé kyslíkaté radikály, kde jsou H^+ a OH^- vedlejší produkty reakce (shrnutí v Minotti et al., 2004; Štenglová Netíková et al., 2016; shrnutí v Yang et al., 2014).

Kardiomyocyty mají v porovnání s nádorovou buňkou mnohem vyšší počet mitochondrií a jsou tedy mnohem citlivější vůči oxidativnímu stresu způsobenému účinkem doxorubicinu. Metabolit doxorubicinol interferuje s regulací železa a vápníku v mitochondriích a také s F_0F_1 protonovou pumpou. F_0F_1 pumpa je tvořena komplexem dvou oligomerních proteinů a je zodpovědná za uložení volné energie, která je tvořena během oxidace NADH a FADH_2 (elektron-transportní řetězec), do formy elektrického potenciálu a protonového gradientu, který je tvořen na vnitřní membráně. Tvorba ATP z ADP a P_i pomocí F_0F_1 je způsobena pohybem protonů zpět přes vnitřní membránu mitochondrie. Proces dýchacího řetězce narušuje doxorubicinol, jenž spouští uvolnění cytochromu c do prostoru mezi vnitřní a vnější membránou mitochondrií a nastává iniciace apoptózy (Štenglová Netíková et al., 2016).

3.1.3.2 Tvorba DNA aduktů

Doxorubicin je schopen vytvářet kovalentní adukty s DNA pomocí interakce s formaldehydem (Obr. 6). Ten je vedlejším produktem radikálových reakcí uhlíkatých substrátů. Formaldehyd vytvoří konjugát s dvěma molekulami doxorubicinu, dojde k hydrolyze a vytvoření monomerního metabolitu. Doxorubicin je následně navázán na DNA pomocí kovalentní vazby mezi aminoskupinou guaninu a aminoskupinou daunosaminu. Stabilita aduktů je zajišťována vodíkovými můstky mezi komplexem a druhým vláknem DNA (shrnutí v Cutts et al., 2005; shrnutí v Minotti et al., 2004; shrnutí v Yang et al., 2014).



Obr. 6: Interakce doxorubicinu s DNA pomocí formaldehydu. Doxorubicin se váže na guanin prvního vlákna DNA pomocí formaldehydu, na druhém vlákne DNA je vazba zprostředkovaná vodíkovými můstky. Převzato a upraveno dle (Yang et al., 2014).

3.2 Vedlejší účinky

Mezi časně nežádoucí účinky antracyklinů, jež se po podání projevují v rámci hodin, dnů a týdnů, patří gastrointestinální toxicita provázená nevolností, bolestí břicha a zvracením. Myelotoxicita a s ní spojená suprese tvorby bílých a červených krvinek je výrazně ovlivněna velikostí dávky. Mezi pozdní projevy toxicity patří sekundární malignity, např. leukémie a kardiotoxicita, jež se řadí mezi nejzávažnější vedlejší účinky (shrnuje ve Verrill, 2001).

3.2.1 Kardiotoxicita

Antracyklinová kardiotoxicita se projevuje pomalým zhoršováním srdeční funkce, které může pokračovat roky po dokončení terapie antracyklinovými antibiotiky. Míra poškození srdeční funkce a srdeční anomálie jsou ovlivněny věkem pacienta. Samotné použití antracyklinu k léčbě dětské leukémie vykazují dobrou účinnost, ale až u 65 % pacientů dochází ke kardiomyopatii. Pacienti vyššího věku bývají ještě citlivější. Kardiomyopatie je přímým důsledkem tvorby ROS, které v důsledku peroxidace lipidů poškozují mitochondriální membrány v buňkách (shrnuje v Elliott, 2006). K největším změnám dochází právě v mitochondriích a mitochondriálních proteinech esenciálních pro oxidativní fosforylaci a obranu proti oxidantům. Dále dochází ke změnám v proteinech mitochondriálního stresu a ke změnám v regulaci a neorganizované expresi desminu, jež hraje důležitou roli v interakci

s mitochondriemi. Dochází také k hojnému zvýšení výskytu chaperonů a proteinů podílejících se na chaperonem indukované autofágii, opravách DNA a membrán, ale též na apoptóze (Štěrbá et al., 2011). Další z mechanismů poškození srdeční tkáně je interkalace antracyklinů do DNA a tvorba komplexu s DNA topoizomerázou II. K poškození kardiomyocytů interkalací dochází pouze při vysokých dávkách antracyklinů. Byl prokázán vliv volných radikálů tvořících se recyklací chinonů a semichinonů a zvyšujících oxidativní stres. Následná kardiotoxicita je způsobena tím, že kardiomyocyty obsahují snížené množství antioxidantních mechanismů (superoxiddismutázy, antioxidantkatalázy), což je oproti normálním buňkám činí citlivějšími k poškození a apoptóze. Srdeční poškození jsou nevratná a k jejich odhalení se používají metody jako echokardiografie, identifikace kardio-specifických biochemických markerů (kardiotroponin T) nebo biopsie tkáně (shrnutí v Elliott, 2006).

3.2.2 Nekrotizace tkání po extravazaci

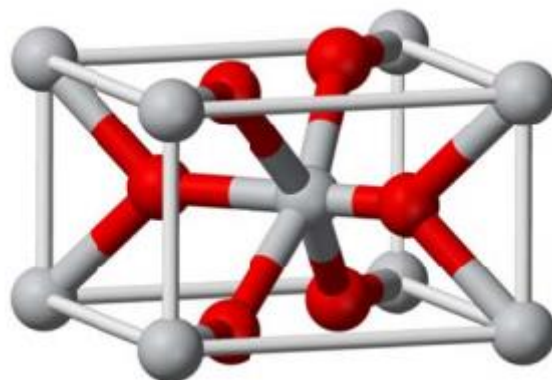
Nitrožilní podání antracyklinů a jejich extravazace do okolních tkání může vést k nekróze pokožky, podkoží, nervů, cév, vazů. Samotná extravazace je provázena intenzivní bolestí a otoky. Tvorba vředů trvá týdny až měsíce po extravazaci a jejich léčba je velice zdlouhavá.

Antracykliny způsobují lokální smrt buněk, buď přímo vazbou na DNA, nebo zvýšenou tvorbou ROS a hydroxylových radikálů. Antracykliny nemohou být pomocí lymfatických cest z místa extravazace odstraněny a následně metabolizovány, proto po endocytolýze uvolněné antracykliny přecházejí do dalších okolních buněk a způsobují jejich smrt. Proces se neustále opakuje, dochází k chronickému poškození kůže a okolních měkkých tkání. Uvedené bylo potvrzeno i tím, že doxorubicin lze nalézt v tkáních i několik měsíců po extravazaci (shrnutí v Ener et al., 2004; Goolsby and Lombardo, 2006; shrnutí v Langer et al., 2009).

4 Nanočástice TiO₂

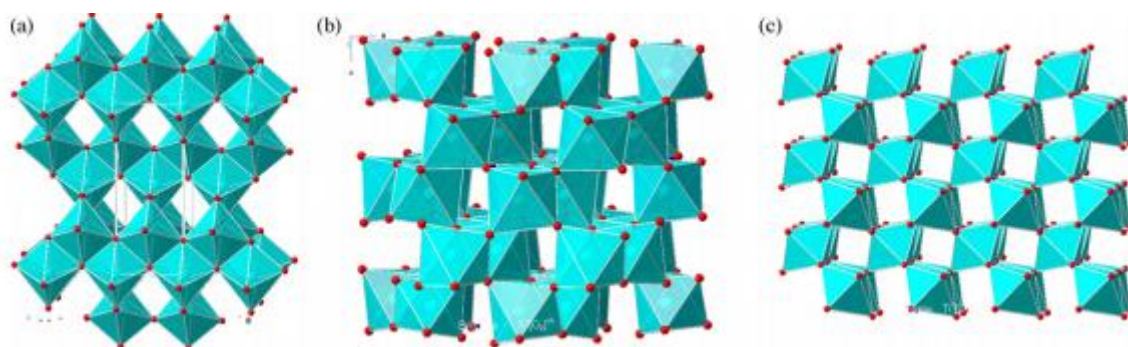
4.1 TiO₂

Oxid titaničitý se přirozeně vyskytuje ve třech přírodních polymorfních strukturách: anatasu, brookitu a rutilu. Strukturální jednotka polymorfu je oktahedron (Obr. 7), skládající se z iontu Ti⁴⁺ obklopeného šesti ionty O²⁻ (Liang, 2012).



Obr. 7: Oktahedron. Titan znázorněn šedě, kyslík červeně. Převzato a upraveno dle (Liang, 2012)

Rozdíly spočívají v mřížkových strukturách (Obr. 8) a mají za následek rozdílnou hustotu a elektrické vlastnosti.



Obr. 8: Krystalická struktura TiO₂ a) anatas b) brookit c) rutil. Převzato a upraveno dle (Štengl et al., 2009)

Komerční výroba TiO₂ započala na začátku 20. století a od té doby je hojně používán jako pigment v kosmetice (titanová běloba), malířských barvách či opalovacích krémech a v potravinářském průmyslu se zase využívají jeho bělicí účinky. V posledních letech se zkoumají jeho fotovoltaické a fotokatalytické schopnosti v souvislosti s efektivnějším

využitím solární energie (Li et al., 2009). Při použití nanočástic je žádaný velký měrný povrch, neboť zvyšuje míru interakce mezi povrchem a médiem (shrnuto v Chen and Mao, 2007).

4.2 Nanočástice TiO₂

Farmakokinetické zákonitosti zajišťují distribuci léků do celého těla. Proto je cytotoxický lék dopraven i do zdravé tkáně a může ji poškozovat (shrnuto v Oh et al., 2009). Nanočástice TiO₂ větší než 20 nm jsou v biologických systémech chemicky nereaktivní, naopak menší částice jsou v důsledku povrchových defektů velice reaktivní a vážou k sobě samovolně řadu ligandů. TiO₂ nanočástice jsou též nerozpustné ve vodě, stabilní v suspenzích a nevykazují žádnou radioaktivitu. Podle způsobu přípravy mohou mít dobrou biokompatibilitu a nemusí vykazovat chemickou toxicitu ve zvířatech ani lidech (Liang, 2012). Koncept využití nanotechnologie systémů doručujících léčivo (DDS) představuje slibnou metodu pro snížení toxicity cytotoxických léčiv. Některé studie potvrzují efektivitu využití nanočástic TiO₂ v léčbě rakoviny a jejich využití jako chytrých DDS díky jejich unikátním vlastnostem (Song et al., 2008). Ve studii Wanga (Wang et al., 2007) byla srovnána biologická reakce při orálním podání suspenze nanočástic a mikročástic TiO₂ myším. Po dvou týdnech nebyla u myši s nanočásticemi pozorována žádná akutní toxická reakce a po pitvě tkáně nevykazovaly abnormální aktivitu ani přítomnost nádorových buněk.

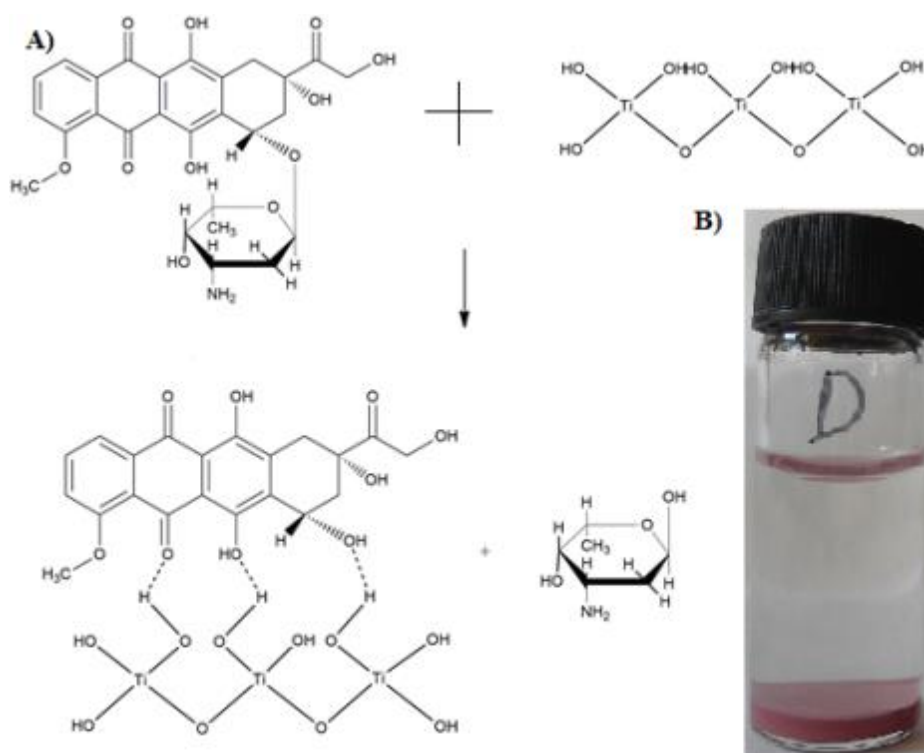
4.2.1 Příprava

Nanočástice se mohou připravovat mnoha metodami. Výsledný produkt každé z nich se liší měrným povrchem, toxicitou a typem aglomerace. Toxicita nanočástic je způsobena metodou přípravy, kdy během výroby molekula nanočástice TiO₂ může být povrchově znečištěna nezreagovanými funkčními skupinami. Viabilita buněk je pak ovlivněna podle toho, z čeho jsou nanočástice TiO₂ vyrobeny. Pokud vstupní látky pro výrobu nanočástic obsahují skupiny, které mohou být pro buňku toxické (například dusičnany, dusitany, chloritany), může i výsledný produkt na svém povrchu tyto skupiny také obsahovat. Jedna z nevhodných metod je například sol-gel metoda, kdy se při přípravě špatně vymývají organické reakční zbytky a výsledný produkt je nutno ještě tepelně upravit (Štengl et al., 2009). Metoda vhodná pro přípravu netoxických nanočástic TiO₂ je homogenní hydrolýza, kdy se k syntéze nanočástic používají biogenní prvky neobsahující žádná organická rozpouštědla či toxické látky. Vzniklé nanočástice TiO₂ jsou vhodné k adsorpci látek (Bakardjieva et al., 2005; Šubrt et al., 1999). Jednou z dalších metod je příprava TiO₂

z peroxokomplexů, přičemž se peroxokomplex rozkládá na vodu a TiO_2 a nedochází ke znečištění nanočástic reakčními produkty (Murafa et al., 2009).

4.2.2 Vazebnost na antracykliny

Vazebná místa se na antracyklinech nacházejí na chelatačním chinonu a na fenolových kyslicích (Obr. 9A) nacházejících se na obou stranách antracyklinových aromatických skupin (Barick et al., 2010). Doxorubicin má signifikantní schopnost vázat se na povrch nanočástic TiO_2 , které jsou připraveny homogenní hydrolyzou TiOSO_4 s ureou. Při smíchání roztoku doxorubicinu s nanočásticemi TiO_2 dojde k jejich adsorpci do 5 min (Obr. 9B) (Štenglová Netíková et al., 2016).



Obr. 9: Vazba doxorubicinu na nanočástice TiO_2 . A) Schématická prezentace doxorubicinu vázaného na povrch nanočástic TiO_2 pomocí slabých vazebných interakcí, jako jsou vodíkové můstky. B) Navázaný doxorubicin na povrch nanočástic TiO_2 v roztoku. Převzato a upraveno dle (Štenglová Netíková et al., 2016).

4.2.3 Drug Delivery System antracyklinů s TiO₂

V současnosti se nanočástice využívají především jako drug-delivery systémy (DDS). U protinádorových léčiv lze například využít pH dependentní DDS.

Ideální DDS by nemělo být schopno vyvézt protinádorové léky při pH krve, což je okolo 7,4, ale při snížení pH pod tyto hodnoty by mělo dojít k rychlému vyvázání. Recentní studie ukazují, že při nižším pH (5–6) dochází k mnohem rychlejšímu uvolnění antracyklinů z navázaného komplexu antracyklin–TiO₂. V cílené chemoterapii je tato žádaná vlastnost zvyšující účinnost protinádorových léčiv, protože extracelulární pH v okolí nádorových buněk mívá slabě kyselé hodnoty. V endocytických kompartmentech buněk se nachází gradienty pH v rozmezí od 4,5 do 6,5. Při endocytóze komplexu protinádorového léčiva a TiO₂ dojde při sníženém pH k jeho uvolnění z komplexu. Nanočástice představují ideální DDS, protože při transportu krevním řečištěm (pH = cca 7,4) nedojde k jejich uvolnění. (shrnuto v Zhang, 2012).

4.2.3.1 Překonávání rezistence zprostředkované p-glykoproteinem (pgp)

Jedním z dalších problémů v protinádorové terapii je rezistence buněk vůči antracyklinovým antibiotikům, zprostředkována P-glykoproteinem (Pgp), membránovým transportním proteinem. Ten aktivně pumpuje doxorubicin ven z buněk. Aplikace komplexu železo–TiO₂ nanočástic mohou sloužit jako účinný přenašeč pro doxorubicin. Tento komplex je schopen překonat P-glykoproteinem zprostředkovaný eflux překročením do buněčného prostředí a uvolněním doxorubicinu z komplexu doxorubicin–TiO₂ až acidifikací uvnitř buněčných endosomů a doxorubicin pak může vstoupit do buněčného jádra (Arora et al., 2012).

4.3 Možnosti využití doxorubicinu a TiO₂ při extravazacích

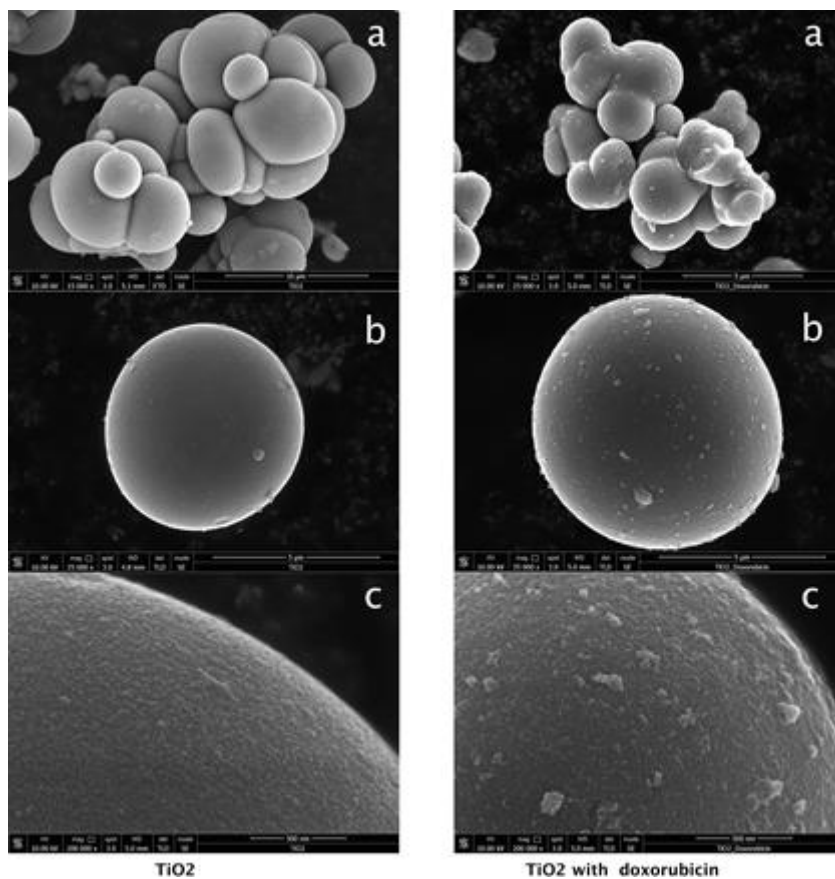
Jak již bylo řečeno, nanočástice TiO₂ mají unikátní vlastnosti, které jsou v dnešní medicíně velice dobře aplikovatelné. Mohou být použity jako cílený DDS, jenž může zlepšit výsledek protinádorové terapie tím, že dojde k přesnějšímu cílení léčiv na nádorové buňky a ke snížení toxicity a vedlejších účinků (shrnuto v Estanqueiro et al., 2015; shrnuto ve Wicki et al., 2015; shrnuto v Zhang, 2012).

Jedním z dalších možných využití je vývoj léčivého přípravku pro léčbu extravazací cytostatik. Cílem je nalezení bezpečného, netoxického způsobu degradace a eliminace antracyklinových cytostatik z místa extravazace. Prozatímne používané léčebné přípravky

jsou DMSO a dexrazoxan. Dexrazoxan je podáván do 6 hodin po extravazaci, při podání po šesti hodinách jeho účinnost klesá. Samotná administrace dexrazoxanu je podložena pouze několika preklinickými studii aplikovanými na zvířatech a dvěma multicentrickými studii, u kterých však nejsou žádná kontrolní ramena ke srovnání (Mouridsen et al., 2007). I přes poměrně malou četnost extravazací bývají jejich následky rozsáhlé a jsou doprovázeny tvorbou vředů a nekrózou, v extrémních případech může dojít až ke ztrátě končetin nebo úmrtí pacienta na sepsi jako důsledku nekrotického ložiska. Proto je jedním z cílů dnešní medicíny nalezení účinného prostředku, jenž by byl schopen zamezit následkům extravazací (Štenglová Netíková et al., 2016).

Ukazuje se, že nanokrystalické oxidy kovů mohou mít vysoký potenciál detoxifikačních účinků na antracyklinová cytostatika. Tato hypotéza byla vyslovena na základě poznatků o rozkladu bojových otravných látek typu yperitu pomocí nanočástic oxidů titanu. Při kontaminaci některých předmětů yperitem a následnou expozicí těchto předmětů nanočásticím TiO_2 došlo k jejich dekontaminaci (Štengl et al., 2013). Nanostrukturní oxidy tranzitních kovů, převážně oxidů titanu a železa, mají schopnost degradovat jedy a adsorbovat je na svůj povrch. Jejich účinky byly dokázány při stechiometrické degradaci vojenských bojových plynů yperitu, somanu a bojového plynu VX (Štengl et al., 2005). Cytostatika ze skupiny oxazofosforinů jsou odvozená od dusíkatých yperitů a podléhají stejným adsorbčním a degradačním jevům. Zdá se, že tyto mechanismy jsou účinné i pro další skupiny cytostatik, např. antracyklinová antibiotika.

Během měření fotokatalytické degradace doxorubicinu, kdy fotokatalytická degradace probíhá na základě aktivace povrchu semi-konduktivních materiálů UV světlem, bylo pozorováno, že doxorubicin má vysokou schopnost vázat se na povrch nanočástic TiO_2 (Obr. 10). Ve studii byl smíchán 1 ml doxorubicinu (2 mg/ml) s 0,25 g TiO_2 a adsorpce proběhla během 5 minut (Obr. 9B). Adsorbovaný TiO_2 nabyl tvaru sférických aglomerátů (Štenglová Netíková et al., 2016).



Obr. 10: HRSEM (High resolution scanning electron microscopy) fotografie nanočástic TiO_2 (vlevo) a nanočástic TiO_2 s navázaným doxorubicinem (vpravo). a) aglomeráty ve formě hroznů, b) sférická částice TiO_2 , c) HRSEM fotografie povrchu TiO_2 (Štenglová Netíková et al., 2016)

Tyto studie poukazují na zcela novou možnost využití nanočástic TiO_2 v léčbě extravazací po podání antracyklinových antibiotik. Pro medicínské využití nanočástic TiO_2 je třeba prokázat, že suspenze nanočástic není toxická pro lidské buňky. Proto bude probíhat testování viability buněk, ověřující tuto podmínku na keratinocytech *in vitro*.

5 Testování buněk *in vitro*

Chování nanočástic TiO₂ uvnitř buněk a metabolická odpověď buněk na jejich přítomnost není zcela jasná, proto je velice důležité sledovat jejich účinek a míru toxicity na buňkách *in vitro*.

Příjem, absorpce, distribuce a odpověď buněk na 5 různých forem nanočástic TiO₂ o různé krystalické struktuře a rozdílné výrobě byla primárně testována na epitelálních buňkách plic *in vitro* (Andersson et al., 2011; Ekstrand-Hammarström et al., 2012). Ve studii Ekstrand-Hammarströma (Ekstrand-Hammarström et al., 2012) byly kultivovány tři buněčné linie (normální lidské bronchiální epitelální buňky NHBE a plicní epitelální buňky A549 a BEAS-2B), každá z nich s každou z daných forem nanočástic TiO₂. Po kultivaci byl testován buněčný příjem nanočástic TiO₂, buněčná viabilita, tvorba ROS a zánětlivých cytokinů. Různé formy nanočástic TiO₂ měly přesně definované fyzikální (Tab. 2) a chemické vlastnosti. V tabulce si lze povšimnout formy polymorfních struktur nanočástic TiO₂ a velikosti jejich měrného povrchu. Každá z forem má v suspensi svoji typickou morfologickou strukturu (Obr. 11). Všechny tyto vlastnosti a výrobní procesy A14, R9 a R5 byly popsány a určeny v předchozích studiích (Andersson et al., 2007, 2002; Österlund, 2010).

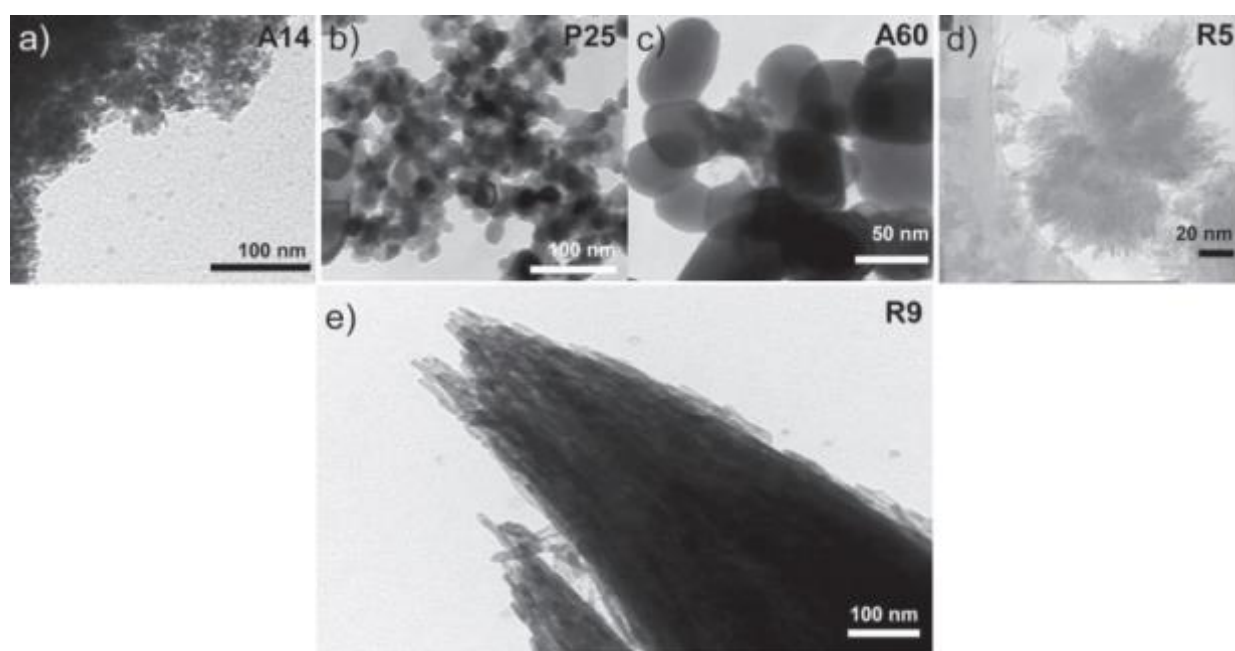
Table 1. Physical properties of TiO₂ nanoparticles

Sample	Crystal structure ¹	Specific surface area (m ² /g)	d_{XRD} (nm) ²	d_{TEM} (nm) ³	D_{TEM} (μm) ⁴	D_{SLS} (μm) ⁵
A14	A	270	14	20	0.6	5.8 (6.1)
A60	A	11	60	66	0.2, 0.4	0.6 (1.2, 1.7)
R5	R	300	5	3×5	0.8	0.7, 1.9 (2.4)
R9	R	40	9	6×80	0.7	6.1 (7.6)
P25	~80% A ~20% R	50	21	25	0.4, 0.7	0.2, 3.0 (4.2)

Tab. 2: Přehled fyzikálních vlastností nanočástic TiO₂: 1) A – anatas; R – rutil. Převzato a upraveno dle (Andersson et al., 2011).

Ukazuje se, že odpověď plicních epitelálních buněk závisí na fyzikálně chemických vlastnostech nanočástic TiO₂ a také typu buněk (Ekstrand-Hammarström et al., 2012). Buňky byly kultivovány v médiu bez sérových komponentů, protože dle studie Verantha (Veranth et al., 2007) mohou proteiny z 0,1% hovězího séra interferovat s celulárním příjmem nanočástic. Buněčná absorpce nanočástic byla viditelná již po dvou hodinách a po 24 hodinách se ještě zvýšila. Byly pozorovány aglomeráty o velikosti okolo 0,1–1 μm umístěné ve vezikulách v cytoplasmě, ale také v blízkosti jádra. Ve studii Anderssona (Andersson et al., 2011) bylo určeno, že intracelulární distribuce závisí již na aglomeračním stádiu nanočástic

TiO₂ v suspenzi před aplikací do buněčné kultury (Obr. 11). Nanočástice, jejichž aglomeráty snadno disociují, jsou snadněji absorbovány do buněk. Také měkké aglomeráty jsou oproti tvrdým mnohem snadněji pohlceny buňkami (Andersson et al., 2011). Dále bylo u studie Ekstrand-Hammarströma (Ekstrand-Hammarström et al., 2012) naměřeno, že anatasová forma P25 způsobuje zvýšenou produkci ROS ve všech třech buněčných kulturách. A14 a A60 indukovalo zanedbatelné hladiny ROS v NHBE, v BEAS-2B oproti tomu již dobře detekovatelné. Tvorba ROS anatasem A60 v buněčné kultuře A549 byla srovnatelná s BEAS-2B. Rutily R9 a R5 indukovaly podobně jako P25 zvýšenou produkci ROS. Viabilita buněk byla změřena pomocí AlamarBlue cytotoxického testu, při němž se měří schopnost živých buněk redukovat oxidované nefluorescenční modré barvivo – resazurin – na redukovanou formu resorutin, který má růžovou barvu (Gonzalez and Tarloff, 2001). Ukázalo se, že žádná forma daných pěti druhů nanočástic TiO₂ nemá signifikantní efekt na viabilitu buněk (Ekstrand-Hammarström et al., 2012), avšak docházelo k indukci zánětlivé odpovědi ve formě sekrece cytokinů, kdy forma nanočástic P25 iniciovala zvýšené uvolnění IL-8 ve všech třech kulturách ve srovnání s čistými formami anatasu a rutilu. Zvýšená zánětlivá odpověď byla pozorována i u A60 a R9 forem.



Obr. 11: TEM fotografie aglomerátů nanočástic TiO₂: a) anatas A14, b) anatas P25, c) anatas A60, d) rutil R5 a e) rutil R9. Převzato a upraveno dle (Andersson et al., 2011)

Ve studii Jaegera (Jaeger et al., 2012) bylo zkoumáno, zda je poškození mitochondrií reaktivními formami kyslíku mechanismem cytotoxického a genotoxického efektu způsobeného nanočásticemi TiO₂ formy P25. Tento výzkum probíhal na lidských

keratinocytech HaCaT *in vitro*. Bylo naměřeno, že buňky kultivované s nanočásticemi TiO₂ indukují tvorbu ROS, ale přesto nebyl naměřen zvýšený počet apoptických/nekrotických buněk v dané kultuře oproti kontrole. Autoři tento výsledek však přisuzují ztrátě mnohých pozdních apoptických buněk během promývání buněčné kultury před měřením průtokovou cytometrií.

V jedné z dalších studií Chana (Chan et al., 2011) byl také zkoumán efekt a cytotoxické mechanismy nanočástic TiO₂ o velikosti 25 nm na immortalizovanou linii keratinocytů HaCaT. Pomocí TEM snímků se ukázalo, že může docházet k poškození buňky tvorbou mitochondriálních ROS při interakci s nanočásticemi TiO₂. ROS mohou také vznikat před vstupem do buňky zprostředkovaným endocytózou či během poškození membrán penetrací nanočástic, avšak při měření se signifikantní lipidická peroxidace membrán nedokázala. Celá tato studie neindukovala sníženou viabilitu buněk při buněčné kultivaci keratinocytů s nanočásticemi TiO₂. Oproti předchozí studii, kde docházelo k internalizaci nanočástic do keratinocytů HaCaT, ve studii Kisse (Kiss et al., 2008) při použití anatasu o průměru 9 nm u keratinocytů HaCaT nedošlo k endocytóze žádných nanočástic. V tomto výzkumu byly aplikovány nanočástice TiO₂ v různých koncentracích na buněčné linie keratinocytů, melanocytů, fibroblastů a sebocytů *in vitro*. Také opalovací krém obsahující mikronové TiO₂ v hydrofobní emulzi byl aplikován na lidskou kůži transplantovanou na imunodeficientní myši *in vivo*. Při *in vivo* aplikaci nedošlo k žádné penetraci nanočástic přes stratum corneum, a nanočástice tedy nedosáhly žádných živých buněk v transplantátech. V pokusech *in vitro* byly 24 hodin po aplikaci pozorovány nanočástice TiO₂ ve fibroblastech, melanocytech, ale překvapivě oproti jiným studiím se nenacházely v HaCaT keratinocytech a SZ95 sebocytech. Také bylo pozorováno u buněčných kultur melanocytů a fibroblastů zvýšení koncentrace Ca²⁺, kdy nanočástice TiO₂ indukovaly změny v homeostáze vápníku, což je nejspíše přímým důsledkem internalizace nanočástic do buněk. Ke snížení růstu buněk docházelo překvapivě ve všech čtyřech kulturách, i přesto, že se u keratinocytů a sebocytů nanočástice nenacházely uvnitř buněk. U keratinocytů, sebocytů a melanocytů po dvou dnech i přes sníženou buněčnou proliferaci nedošlo k buněčné smrti a nanočástice nesnížily množství viabilních buněk, ale po 3–4 dnech se snížila viabilita fibroblastů. Buněčná smrt v lidských dermálních fibroblastech byla dokázána množstvím exprese annexinu-V, který je známkou apoptózy. Docházelo i k inhibici proliferace keratinocytů doprovázenou supresí jejich diferenciací.

Studie Kocbeka (Kocbek et al., 2010) se zabývá dlouhodobým efektem nanočástic TiO₂ na lidské keratinocyty buněčné linie NCTC2544. V průběhu 3 měsíců nebylo však naměřeno

žádné zvýšení intracelulární koncentrace ROS a viabilita nebyla snížena ani při krátkodobé expozici v celém koncentračním rozmezí aplikovaných nanočástic TiO₂ na buněčnou kulturu.

K podobnému výsledku došla studie Samberga (Samberg et al., 2010), kde bylo použito osm druhů nanočástic TiO₂ (vymyté/nevymyté o velikostech 20 nm, 50 nm a 80 nm; vymyté a potažené částice o velikostech 20 nm, 50 nm, 80 nm; vymyté a potažené uhlíkem o velikostech 25 nm a 35 nm). Nevymyté nanočástice snižovaly viabilitu, což je ale ve studii přisuzováno residuálním kontaminantům, které zůstaly v suspenzi a měly nejspíše nepříznivý efekt na buňky (např. formaldehyd). U kultur s aplikovanými nevymytými nanočásticemi také docházelo k sekreci zánětlivých cytokinů. Vymyté a uhlíkem potažené nanočástice v buněčné kultuře nevykazovaly žádné signifikantní snížení viability.

Zajímavé je, že ve studii Simona (Simon et al., 2011) použité nanočástice P25 TiO₂ pozměnily homeostázu vápníku v buňkách, indukovaly snížení buněčné proliferace o 13 % oproti kontrolní skupině a došlo i k reorganizaci jejich cytoskeletu, což jsou všechno jevy spojené se zvýšeným příjmem Ca²⁺. Byly zde použity primární pokožkové keratinocyty (PHFK). Byla zkoumána internalizace a intracelulární distribuce nanočástic. Po 24 hodinách byly nanočástice detekovány ve formě agregátů uvnitř buňky volně v cytoplazmě či ve vezikulách a na povrchu buňky a docházelo k perinukleární distribuci. Nedošlo k projevu morfologických změn, což bývá většinou následkem toxicity, a nanočástice nebyly nalezeny v mitochondriích, jádře ani v jiných organelách. I přes zvýšený příjem Ca²⁺, jenž může mít spojitost s indukcí buněčné smrti, série testů vyvrátila, že by nanočástice P25 TiO₂ snižovaly buněčnou viabilitu.

6 Závěr

Extravazace je závažný nežádoucí účinek doprovázející chemoterapii až v 6 % případů. Má za následek poškození tkáně, které může vést k tvorbě vředů a k nekrotizaci. Při podávání antracyklinů, nejčastěji doxorubicinu či epirubicinu, jež jsou v léčbě nejhojněji využívány, je riziko extravazace a následné nekrotizace velmi vysoké, vzhledem k jejich mechanismu působení. Jedná se o život ohrožující nežádoucí účinek (riziko sepse a orgánového selhání), v každém případě negativně ovlivňující kvalitu života postiženého pacienta.

Nanočástice TiO_2 jsou netoxické sloučeniny mající ve vztahu k antracyklinům vynikající adsorpční a degradační schopnosti. Jsou hojně využívány jako chytré systémy doručující léčiva (DDS) do místa nádoru a uvolňující léčiva například při změně pH. Ukazuje se, že způsob výroby má obrovský vliv na samotnou toxicitu nanočástic TiO_2 . Některé metody využívající organické sloučeniny, jež jsou pro buňky již do jisté míry toxické, mohou zanechávat nezreagované funkční skupiny na povrchu nanočástic, což ovlivňuje jejich toxicitu. Homogenní hydrolyza a výroba nanočástic z peroxokomplexů se jeví jako jedna z nejméně toxických příprav a je vhodná pro přípravu nanočástic TiO_2 k léčebnému využití, např. pro adsorpci a degradaci antracyklinů. Vlastnosti TiO_2 poskytují ideální podmínky pro řešení extravazací po administraci antracyklinů, kdy pro buňky netoxické nanočástice TiO_2 mohou adsorbovat a degradovat extravazované antracyklinové cytostatikum a tím i zabránit nekrotizaci tkáně a s ní spojených problémů.

V provedené literární rešerši na viabilitu buněk *in vitro* byla potvrzena minimální toxicita nanočástic TiO_2 vůči buněčným liniím lidských nádorů a keratinocytů. Ukazuje se, že i když nanočástice indukují tvorbu kyslíkových radikálů, nesnižují signifikantně viabilitu buněk oproti kontrolním skupinám. V literární rešerši nebyly nalezeny žádné práce, které by hodnotily vliv nanočástic TiO_2 na buněčné linie keratinocytů za současné kultivace s doxorubicinem. I přesto tato rešeršní práce poskytuje dostatek informací, jež mohou sloužit jako podklad k dalšímu výzkumu viability keratinocytů kultivovaných s doxorubicinem a nanočásticemi TiO_2 . Výsledky plánovaného výzkumu budou sloužit jako základ pro vývoj nového léčivého přípravku na bázi nanočástic TiO_2 pro léčbu komplikací para podání antracyklinů.

7 Použitá literatura

- Albert S. Baldwin, J., 1996. THE NF- κ B AND I κ B PROTEINS: New Discoveries and Insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649–681.
- Andersson, M., Kiselev, A., Österlund, L., Palmqvist, A. E. C., 2007. Microemulsion-mediated room-temperature synthesis of high-surface-area rutile and its photocatalytic performance. *J. Phys. Chem. C* 111, 6789–6797.
- Andersson, M., Österlund, L., Ljungstroem, S., Palmqvist, A., 2002. Preparation of nanosize anatase and rutile TiO₂ by hydrothermal treatment of microemulsions and their activity for photocatalytic wet oxidation of phenol. *J. Phys. Chem. B* 106, 10674–10679.
- Andersson, P.O., Lejon, C., Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C., Ahlinder, L., Bucht, A., Österlund, L., 2011. Polymorph- and size-dependent uptake and toxicity of TiO₂ nanoparticles in living lung epithelial cells. *Small* 7, 514–523.
- Arora, H.C., Jensen, M. P., Yuan, Y., Wu, A., Vogt, S., Paunesku, T., Woloschak, G. E., 2012. Nanocarriers enhance doxorubicin uptake in drug-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 72, 769–778.
- Bachur, N. R., Gordon, S. L., Gee, M. V., Kon, H., 1979. NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 954–957.
- Bakardjieva, S., Šubrt, J., Štengl, V., Dianez, M. J., Sayagues, M. J., 2005. Photoactivity of anatase–rutile TiO₂ nanocrystalline mixtures obtained by heat treatment of homogeneously precipitated anatase. *Appl. Catal. B Environ.* 58, 193–202.
- Barick, K. C., Nigam, S., Bahadur, D., 2010. Nanoscale assembly of mesoporous ZnO: a potential drug carrier. *J. Mater. Chem.* 20, 6446–6452.
- Chan, J., Ying, T., Guang, Y. F., Lin, L. X., Kai, T., Fang, Z. Y., Ting, Y. X., Xing, L. F., Ji, Y. Y., 2011. In Vitro Toxicity Evaluation of 25-nm Anatase TiO₂ Nanoparticles in Immortalized Keratinocyte Cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 144, 183–196.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L. M., 1999. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases. *Clin. Chem.* 45, 7–17.
- Chen, X., Mao, S. S., 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem. Rev.* 107, 2891–2959.
- Cutts, S. M., Nudelman, A., Rephaeli, A., Phillips, D. R., 2005. The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life* 57, 73–81.
- Dartsch, D. C., Schaefer, A., Boldt, S., Kolch, W., Marquardt, H., 2002. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: Programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 7, 537–548.
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C. M., Andersson, P. O., Lejon, C., Österlund, L., Bucht, A., 2012. Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology* 6, 623–634.
- Elliott, P., 2006. Pathogenesis of Cardiotoxicity Induced by Anthracyclines. *Semin. Oncol., Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Cancer Patients: The Scope of the Problem* 33, Supplement 8, 2–7.
- Ener, R. A., Meglathery, S. B., Styler, M., 2004. Extravasation of systemic hematological therapies. *Ann. Oncol.* 15, 858–862.

- Estanqueiro, M., Amaral, M. H., Conceição, J., Sousa Lobo, J. M., 2015. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 126, 631–648.
- Gonzalez, R. J., Tarloff, J. B., 2001. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol. In Vitro* 15, 257–259.
- Goolsby, T. V., Lombardo, F. A., 2006. Extravasation of Chemotherapeutic Agents: Prevention and Treatment. *Semin. Oncol., Toxicity of Chemotherapy--The Last Decade* 33, 139–143.
- Hong, S. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L., 2004. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 259–264.
- Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L., Kriehuber, R., 2012. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology* 296, 27–36.
- Jordan, K., Behlendorf, T., Mueller, F., Schmoll, H.-J., 2009. Anthracycline extravasation injuries: management with dexrazoxane. *Ther. Clin. Risk Manag.* 5, 361–366.
- Kiss, B., Bíró, T., Czifra, G., Tóth, B. I., Kertész, Z., Szikszai, Z., Kiss, Á. Z., Juhász, I., Zouboulis, C. C., Hunyadi, J., 2008. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp. Dermatol.* 17, 659–667.
- Kizek, R., Adam, V., Hrabeta, J., Eckschlager, T., Smutny, S., Burda, J. V., Frei, E., Stiborova, M., 2012. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol. Ther.* 133, 26–39.
- Kocbek, P., Teskač, K., Kreft, M. E., Kristl, J., 2010. Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO₂ Nanoparticles. *Small* 6, 1908–1917.
- Koceva-Chyła, A., Jedrzejczak, M., Skierski, J., Kania, K., Jóźwiak, Z., 2005. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: Relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 10, 1497–1514.
- Kraus, W. L., 2008. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr. Opin. Cell Biol., Nucleus and gene expression* 20, 294–302.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.
- Langer, S. W., Sehested, M., Jensen, P. B., 2009. Anthracycline extravasation: a comprehensive review of experimental and clinical treatments. *Tumori* 95, 273–82.
- Lebrede, L., Barrie, R., Woltering, E. A., 1992. DMSO protects against adriamycin-induced tissue necrosis. *J. Surg. Res.* 53, 62–65.
- Li, Q., Wang, X., Lu, X., Tian, H., Jiang, H., Lv, G., Guo, D., Wu, C., Chen, B., 2009. The incorporation of daunorubicin in cancer cells through the use of titanium dioxide whiskers. *Biomaterials* 30, 4708–4715.
- Liang, R., 2012. Miracle Titania: The Anticancer Potential of Titanium Dioxide. *Cosm. Clust.* 8.
- Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z.-Q., Schulze-Osthoff, K., 2002. Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. *Mol. Biol. Cell* 13, 978–988.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L., 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185–229.

- Mouridsen, H. T., Langer, S. ., Buter, J., Eidtmann, H., Rosti, G., De Wit, M., Knoblauch, P., Rasmussen, A., Dahlstrørn, K., Jensen, P. B., Giaccone, G., 2007. Treatment of anthracycline extravasation with Savene (dexrazoxane) : results from two prospective clinical multicentre studies. *Ann. Oncol.* 18, 546–550.
- Murafa, N., Štengl, V., Houšková, V., 2009. Monodispersed spindle-like particles of titania. *Microsc. Microanal.* 15, 1036–1037.
- Oh, K. T., Baik, H. J., Lee, A. H., Oh, Y. T., Youn, Y. S., Lee, E. S., 2009. The Reversal of Drug-Resistance in Tumors Using a Drug-Carrying Nanoparticulate System. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3776–3792.
- Österlund, L., 2010. Structure-reactivity relationships of anatase and rutile TiO₂ nanocrystals measured by in situ vibrational spectroscopy, in: *Solid State Phenomena*. Trans Tech Publ, pp. 203–219.
- Pérez Fidalgo, J. A., García Fabregat, L., Cervantes, A., Margulies, A., Vidall, C., Roila, F., 2012. Management of chemotherapy extravasation: ESMO–EONS clinical practice guidelines. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 16, 528–534.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C., 2010. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* 17, 421–433.
- Rabbani, A., Finn, R. M., Ausió, J., 2005. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays* 27, 50–56.
- Samberg, M. E., Oldenburg, S. J., Monteiro-Riviere, N. A., 2010. Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro. *Environ. Health Perspect.* 118, 407–13.
- Sauerland, C., Engelking, C., Wickham, R., Corbi, D., 2006. Vesicant Extravasation Part I: Mechanisms, Pathogenesis, and Nursing Care to Reduce Risk. *Oncol. Nurs. Forum* 33, 1134–1141.
- Schrijvers, D. L., 2002. Extravasation: a dreaded complication of chemotherapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 14, iii26–30.
- Schulmeister, L., 2011. Extravasation Management: Clinical Update. *Semin. Oncol. Nurs., The Genetics and Genomics of Cancer* 27, 82–90. doi:10.1016/j.soncn.2010.11.010
- Sena, L. A., Chandel, N. S., 2012. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell* 48, 158–167.
- Simon, M., Barberet, P., Delville, M.-H., Moretto, P., Sez nec, H., 2011. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* 5, 125–139.
- Song, M., Pan, C., Li, J., Zhang, R., Wang, X., Gu, Z., 2008. Blends of TiO₂ nanoparticles and poly (N-isopropylacrylamide)-co-polystyrene nanofibers as a means to promote the biorecognition of an anticancer drug. *Talanta* 75, 1035–1040.
- Štengl, V., Bakardjieva, S., Murafa, N., 2009. Preparation and photocatalytic activity of rare earth doped TiO₂ nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* 114, 217–226.
- Štengl, V., Grygar, T. M., Opluštil, F., Olšanská, M., 2013. Decontamination of Sulfur Mustard from Printed Circuit Board Using Zr-Doped Titania Suspension. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 3436–3440.
- Štengl, V., Maříková, M., Bakardjieva, S., Šubrt, J., Opluštil, F., Olšanská, M., 2005. Reaction of sulfur mustard gas, soman and agent VX with nanosized anatase TiO₂ and ferrihydrite. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 754–758.
- Štenglová Netíková, I. R., Slušná, M., Tolasz, J., Šťastný, M., Popelka, Š., Štengl, V., 2016. A New Possible Way of Anthracycline Cytostatics Decontamination (k 15.8. 2016 dosud nepublikováno).

- Štěrba, M., Popelová, O., Lenčo, J., Fučíková, A., Brčáková, E., Mazurová, Y., Jirkovský, E., Šimůnek, T., Adamcová, M., Mičuda, S., Stulík, J., Geršl, V., 2011. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol., Special Section: Cardiovascular Gene Therapy* 50, 849–862.
- Šubrt, J., Boháček, J., Štengl, V., Grygar, T., Bezdička, P., 1999. Uniform particles with a large surface area formed by hydrolysis of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ with urea. *Mater. Res. Bull.* 34, 905–914.
- Taatjes, D. J., Koch, T. H., 2001. Nuclear Targeting and Retention of Anthracycline Antitumor Drugs in Sensitive and Resistant Tumor Cells. *Curr. Med. Chem.* 8, 15–29.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R., 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 157–170.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G., 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714.
- Veranth, J. M., Kaser, E. G., Veranth, M. M., Koch, M., Yost, G. S., 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part. Fibre Toxicol.* 4, 2.
- Verrill, M., 2001. Anthracyclines in breast cancer: therapy and issues of toxicity. *The Breast* 10, 8–15.
- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., Sun, J., others, 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* 168, 176–185.
- Wang, S., Kotamraju, S., Konorev, E., Kalivendi, S., Joseph, J., Kalyanaraman, B., 2002. Activation of nuclear factor- κB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 367, 729–740.
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J., 2015. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Controlled Release* 200, 138–157.
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., Henikoff, S., 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1845, 84–89.
- Zhang, H., 2012. Daunorubicin-TiO. *Int. J. Nanomedicine* 7, 235–242.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.-S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., Yeh, E. T. H., 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* 18, 1639–1642.
- Zhang, Y.-W., Shi, J., Li, Y.-J., Wei, L., 2009. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 435–445.