

Nanomateriały w medycynie – właściwości ditlenku tytanu i perspektywy jego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej

JANUSZ BOGDAN, JOANNA PŁAWIŃSKA-CZARNAK, JOANNA ZARZYŃSKA

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-766 Warszawa

Otrzymano 12.12.2013

Zaakceptowano 30.06.2014

Bogdan J., Pławińska-Czarnak J., Zarzyńska J.

Nanomaterials in medicine – properties of titanium dioxide and perspectives for its application in cancer therapy

Summary

Every year, several millions of people all over the world are diagnosed with cancer. Despite the tremendous development of medical sciences, a remarkable number of people die due to late diagnosis or ineffective cancer therapy. Since most of the tumors are highly resistant to drugs, research for new effective therapy methods is continuing. Great expectations for a breakthrough in the fight against cancer are attributed to nanotechnology. A new interdisciplinary field of science dealing with the creation of nanoparticles (NPs) and nanomaterials (NMs) that are variously applied, e.g. in nanomedicine. NPs and NMs have gained an increased consideration in cancer therapy in recent years, performing as carriers of medicine, as well as photo- or sonosensitisers, compounds generating reactive oxygen species (ROS) formed by ultraviolet light (UV) excitation or ultrasound (US) activation, respectively. Targeted therapy is based upon the attachment of specific ligands or antibodies to nanoparticles. This process guarantees not only increased therapy efficiency, but it also lowers the cyto- and genotoxicity of the active compound towards the healthy cells. Nano-sized titanium dioxide (nano-TiO₂) presents an example of a substance with an increasing role in the eradication of tumor cells. Currently, studies are conducted to examine its application, i.e. in the cancer fighting photo- and sonodynamic therapies.

Keywords: nanotechnology, titanium dioxide, cancer therapy

Historia nanotechnologii sięga lat 50. XX w. Jej prekursorem był amerykański fizyk R. Feynman, który 26 grudnia 1959 r. na zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego w Caltech wygłosił wykład zatytułowany „There’s plenty of room at the bottom”. Podczas wystąpienia uczony po raz pierwszy w dziejach nauki zasugerował możliwość manipulowania materią na poziomie atomów i cząsteczek (8). W opinii Feynmana jedyne ograniczenie rozwoju nanotechnologii stanowił ówczesnie brak wystarczająco precyzyjnych narzędzi i technik. Termin „nanotechnologia” został po raz pierwszy użyty przez japońskiego naukowca N. Taniguchi jako określenie możliwości inżynierii materiałów operującej na poziomie nanometrów (46), a napisana przez K. Drexlera książka pt. „Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation” przyczyniła się do popularyzacji wiedzy z tego zakresu (6). Obecnie nanotechnologia jest bardzo prędko rozwijającą się interdyscyplinarną dziedziną nauki, łączącą najnowsze osiągnięcia biologii, chemii, fizyki, informatyki i mechaniki. Zajmuje

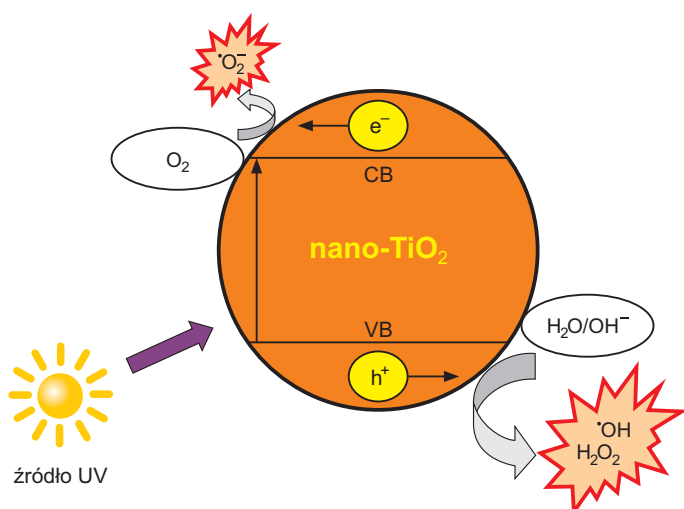
się projektowaniem, otrzymywaniem i nadawaniem pożądanymi właściwościami nanocząstkom i nanomateriałom, których co najmniej jeden wymiar wynosi od 1 do 100 nm (17). Dla porównania: średnica erythrocytu wynosi 7000 nm, a szerokość ludzkiego włosa – 80 000 nm (53). Zdaniem Sahoo i wsp. (40), dzięki osiągnięciom nanotechnologii już wkrótce będzie możliwa coraz większa, a być może nawet pełna, kontrola struktury materii, co pozwoli na pokonanie licznych trudności, które stoją obecnie przed nauką (np. diagnostyka miejsc niedostępnych do badania endoskopowego, regeneracja uszkodzonych nerwów, celowa dystrybucja leków w organizmie). Nanotechnologia, obok biotechnologii i genetyki, stała się na przestrzeni ostatnich lat najpopularniejszą dziedziną wiedzy (5). Na jej gruncie narodziła się nanomedycyna.

W ciągu minionej dekady okazało się, że wiele materiałów powszechnie używanych w różnych gałęziach przemysłu po rozdrobnieniu do nanocząstek ($1 < \phi \leq 100$ nm) wykazuje nowe, nieprezentowane w mikroskali ($0,1 < \phi \leq 100$ μ m) właściwości katal-

lityczne. Jednym z nich jest stosowana w produkcji farb biel tytanowa (TiO_2), która wg nomenklatury systematycznej Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) oraz wg starego i nowego polskiego nazewnictwa związków chemicznych określana jest – odpowiednio – terminami: tlenek tytanu (IV), dwutlenek tytanu i ditlenek tytanu. Istnieją opinie, że nanomateriały w niedalekiej przyszłości zdobędą kluczową pozycję w medycynie (40) i w przemyśle farmaceutycznym (9), m.in. jako narzędzia do niszczenia komórek nowotworowych czy transportu leków w organizmie.

Właściwości fotokatalityczne ditlenku tytanu

Zainteresowanie nanometrycznym ditlenkiem tytanu rozpoczęło się z chwilą odkrycia jego właściwości katalitycznych indukowanych promieniowaniem UV – co miało miejsce na początku lat 70. ubiegłego stulecia (11) – i wciąż wzrasta (26, 58). Właściwości katalityczne półprzewodników, do których należy nano- TiO_2 , tłumaczy ich struktura elektronowa. Mają one obsadzone elektronami pasmo walencyjne (valence band, VB) i nieobsadzone pasmo przewodnictwa (conduction band, CB). Różnica energii (ΔE) między tymi pasmami, definiowana jako pasmo wzbronione (band gap), to jednocześnie ilość energii wymagana do przeniesienia elektronu z pasma walencyjnego do pasma przewodnictwa. Dla nanometrycznego TiO_2 wartość ta wynosi ok. 3,0 eV, co odpowiada energii promieniowania elektromagnetycznego o długości fali $\lambda < 400$ nm. W eksperymentach biologicznych do wzbudzenia nano- TiO_2 wykorzystuje się bezpieczne dla człowieka promieniowanie z zakresu bliskiego ultrafioletu (UV-A, $\lambda = 315\text{-}400$ nm) (38). Wskutek wzbudzenia nanometrycznego ditlenku tytanu elektron (e^-) przechodzi z VB do CB, pozostawiając dodatnio naładowaną „dziurę elektronową” (h^+) i tworząc tym samym swoistą parę „dziura–elektron” ($h^+ + e^-$) (12) (ryc. 1).



Ryc. 1. Mechanizm powstawania reaktywnych form tlenu na powierzchni nano- TiO_2

Powstały ekscyton ($h^+ + e^-$) ma silne właściwości utleniająco-redukujące. Dodatkowo naładowane i warunkujące procesy utleniania „dziury elektronowe” oraz determinujące procesy redukcji elektrony mogą reagować z cząsteczkami wody, jonami hydroksylowymi lub molekularnym tlenem i prowadzić do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS), takich jak: rodniki hydroksylowe ($\cdot\text{OH}$), anionorodniki ponadtlenkowe ($\cdot\text{O}_2^-$), nadutlenek wodoru (H_2O_2) czy tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) (12) (ryc. 1). Powstałe na powierzchni nano- TiO_2 ROS uszkadzają komórki, w tym komórki nowotworowe, prowadząc do ich śmierci.

Toksyczność ditlenku tytanu

Problem toksyczności ditlenku tytanu jest przedmiotem badań prowadzonych przez liczne ośrodki naukowe od wielu lat. Przyjmuje się, że związek ten w mikroskali nie jest szkodliwy dla człowieka (3, 32). Coraz częściej, w związku z dynamicznym rozwojem nanotechnologii, pojawia się jednak obawa, że TiO_2 może okazać się toksyczny w postaci nanocząstek (NPs). Uważa się bowiem, że NPs są bardziej szkodliwe aniżeli większe cząstki tej samej substancji (4, 24). Jedną z podstawowych różnic między nano- i mikro- TiO_2 jest znacznie większa powierzchnia właściwa nanocząstek, co skutkuje m.in. silniejszą absorpcją promieniowania UV i większą aktywnością fotokatalityczną. W tym kontekście TiO_2 „normalnych” rozmiarów ($\phi > 100$ nm) uważany jest za biologicznie obojętny (2, 3). W odróżnieniu od mikro- TiO_2 pył ditlenku tytanu złożony z nanocząstek został przypisany przez Międzynarodową Agencję Badania Raka (International Agency for Research on Cancer, IARC) do klasy 2B (17), która grupuje substancje możliwie rakotwórcze dla człowieka (np. nitrobenzen). Przynależność tę oparto m.in. na eksperymentach, z których wynika, że pył nano- TiO_2 , wprowadzony do tchawicy szczura w ilości 5 mg/osobnika, powodował w perspektywie czterech miesięcy nowotwór dróg oddechowych (7). Ekspozycja zwierząt doświadczalnych na pylisty nanometryczny ditlenek tytanu powodowała również szereg innych negatywnych skutków zdrowotnych. Wśród nich możemy wymienić: chroniczny stan zapalny płuc u szczurów (37), reakcje alergiczne i stany zapalne płuc u myszy (49), uszkodzenia neuronów *in vitro* (59), a także oksydacyjne uszkodzenia DNA komórek nabłonka jelitowego ryb (36). Badania Long i wsp. (30, 31) przeprowadzone na komórkach mikrogleju mózgu myszy (linia BV2) wykazały, że cząstki TiO_2 o średnicy 10-20 nm stymulowały powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS), przy czym promieniowanie ultrafioletowe nie było warunkiem koniecznym generowania ROS. Istnieją jednak przeciwstawne opinie. Fujita i wsp. (13), opierając się na analizie mikromacierzowej DNA keratynocytów człowieka (linia komórkowa HaCaT), wykazali, że „naturalna” toksyczność nanocząstek ditlenku tytanu (tzn. bez napromieniowania UV) była znikoma. Z innych do-

świadczeń wynika, że nanometryczny TiO_2 wykazywał cyto- i genotoksyczność wobec oocyst pierwotniaka *Cryptosporidium parvum* (15), a także cyst *Giardia lamblia* (25) i *Acanthamoeba castellanii* (44) wyłącznie przy ekspozycji pasożytów na UV-A.

Komórki eukariotyczne, podobnie jak i prokariotyczne, wyposażone są w mechanizmy chroniące je przed reaktywnymi formami tlenu (ROS). Podstawowe narzędzie obrony komórki przed ROS stanowi układ trzech enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD; EC 1.15.1.1), katalazy (CAT; EC 1.11.1.6) i peroksydazy glutationowej (GPX; EC 1.11.1.9) (21). Istotną rolę w zmniejszaniu negatywnych skutków stresu oksydacyjnego pełnią także antyoksydanty, takie jak kwas liponowy (lipoic acid, LA) czy ubichinon (ubiquinone). Gdy koncentracja reaktywnych form tlenu przewyższa jednak możliwości naprawcze systemów obronnych, uszkodzenia stają się coraz większe i prowadzą w konsekwencji do zniszczenia komórki (41, 43).

Możliwości wykorzystania ditlenku tytanu w leczeniu onkologicznym

Obserwowany w ostatnich latach na całym świecie wzrost zapadalności na choroby nowotworowe rodzi palącą potrzebę wprowadzenia nowych, skutecznych i bezpiecznych metod ich leczenia. W ciągu minionej dekady odnotowano wyraźny wzrost roli nanotechnologii i nanomedycyny w terapii antynowotworowej. Dyscypliny te łączą swe wysiłki w poszukiwaniu nie tylko materiałów skutecznie niszczących komórki rakowe, ale i sposobów precyzyjnego dostarczania chemioterapeutyków do „ognisk nowotworowych” (34). Wykorzystanie wykazujących właściwości katalityczne nanometrycznych tlenków metali legło u podstaw rozwoju nowych strategii terapeutycznych, np. terapii fotodynamicznej (photodynamic therapy, PDT) (56) czy terapii sonodynamicznej (sonodynamic therapy, SDT) (16), podczas gdy opracowanie technik precyzyjnego dostarczania leków do komórek nowotworowych poprawiło skuteczność działania wielu obecnych na rynku środków farmakologicznych.

Duże zainteresowanie naukowców budzi możliwość wykorzystania nanometrycznego ditlenku tytanu w fotodynamicznej terapii przeciwnowotworowej (56). PDT stanowi nową metodę niszczenia komórek rakowych. Wykorzystuje ona reakcję, do której dochodzi w wyniku oddziaływania fotosensybilizatora (photosensitiser), np. TiO_2 , i promieniowania elektromagnetycznego o odpowiedniej długości fali. Przypuszcza się, że nano- TiO_2 , poddany działaniu UV-A, indukuje programowaną śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy (35), które normalnie jej nie podlegają, przy czym mechanizm tego procesu jest jeszcze słabo poznany. Komórki rakowe giną m.in. w wyniku nieodwracalnego uszkodzenia DNA (14, 48), przerwania ciągłości błony cytoplazmatycznej (57), jak również istotnego uszczuplenia lub całkowitego

wyczerpania puli związków redox niezbędnych do syntezy ATP (10, 41).

Potencjalne zastosowanie nanometrycznego TiO_2 w leczeniu onkologicznym poprzedziły liczne badania cyto- i genotoksyczności fotowzbudzonego półprzewodnika w stosunku do różnych, także zdrowych, komórek. Saquib i wsp. (41) badali toksyczność nano- TiO_2 (10 $\mu\text{g/ml}$) na ludzkich komórkach nabłonka o wodniowego (linia WISH). Autorzy ci stwierdzili u napromieniowanych UV-A komórek zmniejszenie aktywności katalazy, obniżenie poziomu glutationu (glutathione, GLH), wzrost ilości reaktywnych form tlenu, a także zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M. Shukla i wsp. (43), prowadząc analogiczne badania, zaobserwowali na przykładzie ludzkich komórek naskórki (linia A431) wzrost poziomu wodoronadtlenków lipidów (lipid hydroperoxides, LPOs), liczne uszkodzenia oksydacyjne DNA oraz powstanie wielu mikrojąder, których głównymi mechanizmami tworzenia są pęknięcia chromosomów i dysfunkcja aparatu mitotycznego. Z kolei Toyooka i wsp. (48), badając toksyczność nano- TiO_2 (15 $\mu\text{g/ml}$) względem komórek gruczołaka nabłonka płuc (linia A549), wskazali na wzmożoną fosforylację histonu HA2X, do której dochodzi zwykle w ciągu kilku minut od pęknięć podwójnej nici DNA (double-strand DNA breaks) indukowanych np. promieniowaniem ultrafioletowym czy ultradźwiękami. W domenach chromatyny zawierających ufosforylowany histon HA2X obserwuje się gromadzenie szeregu białek indukujących procesy naprawy lub degradacji DNA.

Cyto- i genotoksyczność TiO_2 została wykazana także w stosunku do wielu innych komórek, zarówno zdrowych (np. ludzkich fibroblastów skóry (42, 51), makrofagów pęcherzyków płucnych (29), jak i zmienionych nowotworowo (np. komórek gruczołaka śluzowego okrężnicy (linia Ls-174-t) (60)), komórek gruczołaka jelita grubego (linia LoVo) (54, 55), ludzkich komórek raka szyjki macicy (linia HeLa) (1, 23, 27, 50), komórek nabłonkowych raka piersi (linie MCF-7 i MDA-MB-468) (22), komórek raka wątroby (linia Bel 7402) (52), komórek raka mózgu (39) czy ludzkich komórek raka płuc (linia A549) (45)). Vamanu i wsp. (50) poddali ludzkie komórki białaczki monocytowej (linia 937) działaniu *in vitro* 0,1% koloidalnego nano- TiO_2 przez 120 min., a następnie naświetlali je promieniowaniem UV-A. Po 30 minutach napromieniowywania zaobserwowano wyraźne uszkodzenia błony cytoplazmatycznej i fragmentację DNA. Niemal identyczne uszkodzenia obserwowali w ludzkich komórkach raka okrężnicy Zhang i Sun (60). Jedną z przyczyn opisanych uszkodzeń jest powstawanie reaktywnych form tlenu (14, 19, 59). W wyniku ich oksydacyjnego działania komórki wykazywały początkowo niezmienną żywotność, ale ich błony stawały się z upływem czasu coraz bardziej przepuszczalne. W konsekwencji cząstki nano- TiO_2 wnikały bez przeszkód do cytozolu i niszczyły struktury

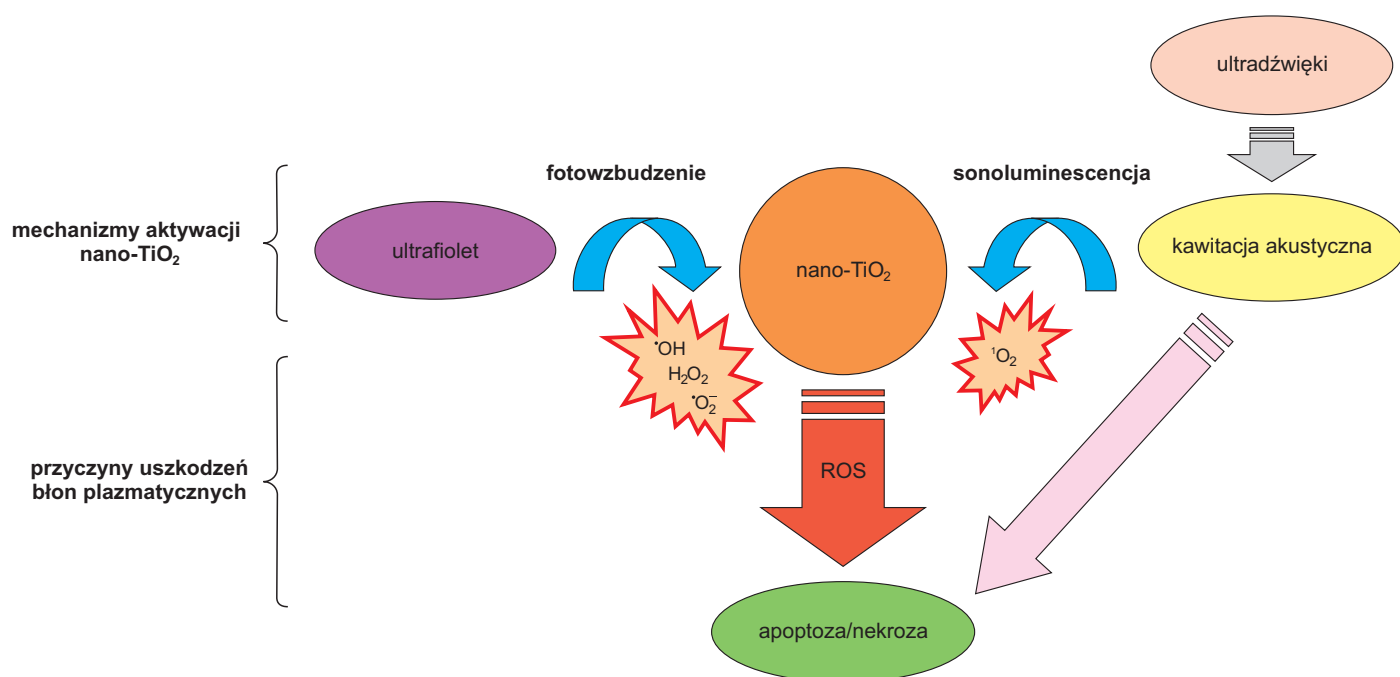
wewnątrzkomórkowe. Zdaniem Fujishima i wsp. (10) oraz Kim i wsp. (20), spośród wszystkich struktur komórki eukariotycznej najbardziej wrażliwe na działanie reaktywnych form tlenu (ROS) są błony fosfolipidowe. ROS, szczególnie rodniki hydroksylowe, depolaryzują błony cytoplazmatyczne, zaburzają asymetrię lipidów, obniżają hydrofobowość lipidowego wnętrza błony, a także hamują aktywność transbłonowych białek przenośnikowych. W przypadku wewnętrznych błon mitochondrialnych zmiany te prowadzą do rozprężenia generującego syntezę ATP łańcucha reakcji transportu elektronów. Wśród skutków stresu oksydacyjnego często obserwuje się również zmniejszoną efektywność enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego i zwiększoną liczbę pęknięć podwójnej nici DNA (42). Uszkodzenia te prowadzą do apoptozy i/lub nekrozy (rzadziej autofagii) – podstawowych rodzajów śmierci komórki (35).

Do materiałów stosowanych coraz częściej w terapii antynowotworowej należą nanokompozyty, np. Ag/TiO₂ (1), Au/TiO₂ (55) czy Pt/TiO₂ (28). Przyłączenie metalu szlachetnego do nanocząstek ditlenku tytanu zwiększa aktywność katalityczną TiO₂, co potwierdziły prace Abdulla-al-Mamun i wsp. (1), w których nano-Ag/TiO₂ wykazywał w porównaniu z nano-TiO₂ wyższą o 80% skuteczność niszczenia złośliwych komórek raka szyjki macicy (linia HeLa). W innych badaniach nanocząstki TiO₂ sprzęgano z cząsteczkami kwasu foliowego (folic acid, FA) (23). Pozwoliło to, dzięki pośrednictwu receptorów FA znajdujących się w błonie cytoplazmatycznej, zwiększyć wychwyt nano-TiO₂ przez komórki linii HeLa, a tym samym poprawić skuteczność ich niszczenia. Rozhkova i wsp. (39) skonstruowali koniugaty nano-TiO₂, które wyszukują i niszczą komórki rakowe mózgu *in vitro*, nie uszkodzając przy tym pobliskich zdrowych komórek. Do cząstek nanometrycznego TiO₂ przyłączono za pośrednictwem DOPAC (kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego) przeciwciała IL13α2R, które rozpoznają komórki nowotworowe i wiążą się z nimi. W wyniku ekspozycji komórek rakowych na promieniowanie UV-A związane z ich powierzchnią koniugaty nano-TiO₂ generowały powstawanie reaktywnych form tlenu, które uszkodzały komórki nowotworowe i prowadziły do ich apoptozy. Xu i wsp. (54) opowiadają się za łącznym wykorzystaniem sprzęgania nanocząstek TiO₂ z przeciwciałami monoklonalnymi oraz odwracalnego uszkodzenia błony komórkowej przy użyciu pola elektrycznego, tzw. elektroporacji (electroporation). Według autorów, kombinacja ta może poprawić precyzję rozpoznawania komórek nowotworowych przez ditlenek tytanu i ułatwić wnikanie jego nanocząstek do cytozolu. Przy pomocy opisanej techniki w ciągu 90 min zniszczono *in vitro* wszystkie objęte eksperymentem ludzkie komórki gruczolaka okrężnicy (linia LoVo). Dysponując różnymi przeciwciałami, można tworzyć koniugaty precyzyjnie rozpoznające

i skutecznie niszczące wiele rodzajów komórek nowotworowych (41, 43).

Podstawowe ograniczenie wykorzystania procesu TiO₂/UV w niszczeniu komórek nowotworowych *in vivo* stanowi trudność wprowadzenia źródeł promieniowania UV. Stąd też Thevenot i wsp. (47) zastąpili fotowzbudzenie nanocząstek TiO₂ chemiczną funkcjonalizacją ich powierzchni, polegającą na przyłączeniu grup -OH, -NH₂ i -COOH, po czym zbadali powierzchniowo zmodyfikowane cząstki półprzewodnika pod kątem ich wpływu na czas przeżycia szeregu nowotworowych linii komórkowych (np. linii B16F10 komórek czerniaka, linii 3T3 ludzkich fibroblastów czy linii PC-3M komórek raka prostaty) w warunkach *in vitro*. Zdaniem autorów, na żywotność komórek nowotworowych badanych linii wpływ miała nie tylko koncentracja nano-TiO₂ w komórkach, ale także rodzaj grupy funkcyjnej modyfikującej powierzchnię jego cząstek. Największą cyto- i genotoksyczność wykazywał nano-TiO₂ sfunkcjonalizowany przy pomocy grup -OH. Projektowanie powierzchni nanocząstek półprzewodników (np. nano-TiO₂) stanowi cenne narzędzie w ukierunkowanej terapii antynowotworowej.

Przykładem innej, alternatywnej w stosunku do PDT, metody niszczenia nowotworów jest terapia sonodynamiczna. Oparta jest ona na synergistycznym efekcie wywołanym łącznym oddziaływaniem na komórkę rakową sonosensybilizatora (sonosensitiser) i ultradźwięków. Harada i wsp. (16) wykazali zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* zahamowanie rozwoju komórek czerniaka myszy (linia C32) przy pomocy nano-TiO₂ aktywowanego ultradźwiękami (1 MHz, 30 sek.). Yamaguchi i wsp. (57) twierdzą, że wykorzystujące nano-TiO₂ terapie foto- i sonodynamiczne staną się wkrótce cennym narzędziem skutecznie leczącym glejaki złośliwe. Autorzy ci porównali PDT i SDT pod kątem efektywności niszczenia ludzkich komórek glejaka (linia U251). W przypadku PDT efekt toksyczności nano-TiO₂ (20 µg/ml) obserwowany był dopiero po 2 godzinach naświetlania pojedynczej warstwy komórek nowotworowych promieniowaniem UV-A (5,0 mW/cm²) i był znacznie hamowany przez zmiatacze wolnych rodników (free radical scavengers). Cytotoksyczność nano-TiO₂ (20 µg/ml) w przypadku SDT była proporcjonalna do czasu sonikacji (sonication) i nie zależała od koncentracji antyoksydantów, co wskazuje na inny mechanizm uszkodzenia struktur wewnątrzkomórkowych. Ultradźwięki, rozchodząc się w komórce, powodują powstawanie pęcherzyków kawitacyjnych (cavitation bubbles), które implodując, uwalniają energię. Uważa się, że impuls sonoluminescencyjny może prowadzić nie tylko do aktywacji sonosensybilizatora, skutkiem której jest powstanie reaktywnego tlenu singletowego, lecz także do – następującego bez udziału reaktywnych form tlenu – rozerwania wiązań wodorowych i osłabienia oddziaływań van der Waalsa w białkach błonowych, czego



Ryc. 2. Mechanizmy aktywacji nano-TiO₂ i przyczyny uszkodzeń błon plazmatycznych prowadzących do śmierci komórki na drodze apoptozy i/lub nekrozy

wynikiem są zmiany w strukturze i funkcjonowaniu błon komórkowych (ryc. 2).

Używając barwników fluorescencyjnych, stwierdzono znacznie większe uszkodzenia błony cytoplazmatycznej w wyniku procesu TiO₂/US w porównaniu z procesem TiO₂/UV (57). Podobnie jak w przypadku PDT, również w SDT nano-TiO₂ sprzęga się z metalami czy przeciwciałami. Przedmiotem badań Ninomiya i wsp. (33) była ocena toksyczności nano-TiO₂ względem komórek nowotworu wątroby (linia HepG2). W celu zwiększenia wychwytu nanometrycznego ditlenku tytanu przez komórki rakowe do powierzchni nano-TiO₂ przyłączono pre-S1/S2 – modelowe białko rozpoznające hepatocyty. Apoptozę pierwszych komórek linii HepG2 *in vitro* zaobserwowano po 6 godz. od zakończenia procesu TiO₂/US (1 MHz, 30 sek.), a po 96 godz. liczba komórek dzielących się zmniejszyła się o 54%.

Podsumowanie

Wzbudzone promieniowaniem UV nanocząstki ditlenku tytanu stanowią źródło powstających na ich powierzchni reaktywnych form tlenu (ROS). ROS to czynniki o dużym potencjale oksydacyjnym, który w pierwszej kolejności wykorzystywany jest do niszczenia błon komórkowych, m.in. komórek rakowych. Uszkodzenia błony cytoplazmatycznej prowadzą na ogół do nekrozy komórek, podczas gdy defekty błon mitochondrialnych indukują śmierć komórki na drodze apoptozy. Główną przyczyną ograniczającą wykorzystanie fotosensybilizatorów w terapii antynowotworowej jest trudność w przygotowaniu formuły farmaceutycznej, która umożliwi ich precyzyjne dostarczenie do komórek rakowych. Dzięki postępowi nanotechnologii powstały różne systemy transportu

leków w organizmie. Jeden z nich stanowi tworzenie koniugatów nano-TiO₂ z przeciwciałami monoklonalnymi, dzięki czemu możliwe jest ukierunkowanie fotouczulaczy na receptor docelowy. Opracowywanie nowoczesnych i bardziej skutecznych metod walki z nowotworami wciąż pozostaje ważnym zadaniem współczesnej medycyny. Przed naukowcami jeszcze wiele lat badań nad optymalizacją terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem nanotechnologii, przy czym dotychczasowe efekty wydają się dość obiecujące.

Piśmiennictwo

1. Abdulla-al-Mamun M., Kasumoto Y., Zannat T., Islam M. S.: Synergistic cell-killing by photocatalytic and plasmonic photothermal effects of Ag/TiO₂ core-shell composite nanoclusters against human epithelial carcinoma (HeLa) cells. Appl. Catal. A 2011, 398, 134-142.
2. Allen N. S., Edge M., Verran J., Stratton J., Maltby J., Bygott C.: Photocatalytic titania based surfaces: environmental benefits. Polym. Degrad. Stab. 2008, 93, 1632-1646.
3. Bystrzejewska B., Golimowski J., Urban P. L.: Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. Waste Manage. 2009, 29, 2587-2595.
4. Chihara Y., Fujimoto K., Kondo H., Moriwaka Y., Sasahira T., Hirao Y., Kuniyasu H.: Anti-tumor effects of liposome-encapsulated titanium dioxide in nude mice. Pathobiology 2007, 74, 353-358.
5. Dowling A. P.: Development of nanotechnologies. Mater. Today 2004, 7, 30-35.
6. Drexler K. E.: Nanosystems: molecular machinery, manufacturing and computation. New York: John Wiley and Sons 1992, s. 990-998.
7. Ferin J., Oberdörster G.: Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutile. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1985, 46, 69-72.
8. Feynman R. P.: There's plenty of room at the bottom. Eng. Sci. 1960, 23, 22-36.
9. Foldvari M., Bagonluri M.: Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 2008, 4, 173-182.
10. Fujishima A., Cai R. X., Otsuki J., Hashimoto K., Itoh K., Yamashita T., Kubota Y.: Biochemical application of photoelectrochemistry: photokilling of malignant cells with TiO₂ powder. Electrochim. Acta 1993, 38, 153-157.
11. Fujishima A., Honda K.: Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. Nature 1972, 238, 37-38.

12. Fujishima A., Rao T. N., Tryk D. A.: Titanium dioxide photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C* 2000, 1, 1-21.
13. Fujita K., Horie M., Kato H., Endoh S., Suzuki M., Nakamura A., Miyauchi A., Yamamoto K., Kinugasa S., Nishio K., Yoshida Y., Iwahashi H., Nakanishi J.: Effects of ultrafine TiO₂ particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: involvement of extracellular matrix and cell adhesion. *Toxicol. Lett.* 2009, 191, 109-117.
14. Gogniat G., Dukan S.: TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 7740-7743.
15. Gómez-Couso H., Fontán-Sainz M., Sichel C., Fernández-Ibáñez P., Ares-Mazás E.: Efficacy of the solar water disinfection method in turbid waters experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts under real field conditions. *Trop. Med. Int. Health* 2009, 14, 620-627.
16. Harada Y., Ogawa K., Irie Y., Endo H., Feril L. B., Jr, Uemura T., Tachibana K.: Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors. *J. Control. Release.* 2011, 149, 190-195.
17. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (vol. 93): carbon black, titanium dioxide and talc. France, Lyon 2010.
18. ISO/TS 27687:2008 Nanotechnologies – terminology and definitions for nano-objects – nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
19. Jin C., Tang Y., Fan X. Y., Ye X. T., Li X. L., Tang K., Zhang Y. F., Li A. G., Yang Y. J.: In vivo evaluation of the interaction between titanium dioxide nanoparticle and rat liver DNA. *Toxicol. Ind. Health* 2013, 29, 235-244.
20. Kim S., Ghafoor K., Lee J., Feng M., Hong J., Lee D. U., Park J.: Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water Res.* 2013, 47, 4403-4411.
21. Kim S. Y., Nishioka M., Taya M.: Promoted proliferation of an SOD-deficient mutant of *Escherichia coli* under oxidative stress induced by photoexcited TiO₂. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, 236, 109-114.
22. Lagopati N., Kitsiou P. V., Kontos A. I., Venieratos P., Kotsopoulou E., Kontos A. G., Dionysiou D. D., Pispas S., Tsilibary E. C., Falaras P.: Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *J. Photochem. Photobiol. A* 2010, 214, 215-223.
23. Lai T. Y., Lee W. C.: Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B* 2009, 204, 148-153.
24. Landsiedel R., Kapp M. D., Schulz M., Wiench K., Oesch F.: Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutat. Res.* 2009, 681, 241-258.
25. Lee J. H., Kang M., Choung S. J., Ogino K., Miyata S., Kim M. S., Park J. Y., Kim J. B.: The preparation of TiO₂ nanometer photocatalyst film by a hydrothermal method and its sterilization performance for *Giardia lamblia*. *Water Res.* 2004, 38, 713-719.
26. Li X., He J.: Synthesis of raspberry-like SiO₂-TiO₂ nanoparticles toward antireflective and self-cleaning coatings. *ACS Appl. Mater. Interf.* 2013, 5, 5282-5290.
27. Li Z., Pan X., Wang T., Wang P. N., Chen J. Y., Mi L.: Comparison of the killing effects between nitrogen-doped and pure TiO₂ on HeLa cells with visible light irradiation. *Nanoscale Res. Lett.* 2013, 8, 96.
28. Liu L., Miao P., Xu Y., Tian Z., Zou Z., Li G.: Study of Pt/TiO₂ nanocomposite for cancer-cell treatment. *J. Photochem. Photobiol. B* 2010, 98, 207-210.
29. Liu R., Zhang X., Pu Y., Yin L., Li Y., Zhang X., Liang G., Li X., Zhang J.: Small-sized titanium dioxide nanoparticles mediate immune toxicity in rat pulmonary alveolar macrophages in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010, 10, 5161-5169.
30. Long T. C., Saleh N., Tilton R. D., Lowry G. V., Veronesi B.: Non-photoactivated titanium dioxide nanoparticles produce reactive oxygen species in immortalized mouse microglia (BV2). *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 4346-4352.
31. Long T. C., Tajuba J., Sama P., Saleh N., Swartz C., Parker J., Hester S., Lowry G. V.: Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115, 1631-1637.
32. Menard A., Drobne D., Jemec A.: Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. *Environ. Pollut.* 2011, 159, 677-684.
33. Ninomiya K., Ogino C., Oshima S., Sonoke S., Kuroda S., Shimizu N.: Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* 2012, 19, 607-614.
34. Parveen S., Misra R., Sahoo S. K.: Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2012, 8, 147-166.
35. Ramkumar K. M., Manjula C., Gnanakumar G., Kanjwal M. A., Sekar T. V., Paulmurugan R., Rajaguru P.: Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012, 81, 324-333.
36. Reeves J. F., Davies S. J., Dodd N. J. F., Jha A. N.: Hydroxyl radicals (*OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.* 2008, 640, 113-122.
37. Rehn B., Seiler F., Rehn S., Bruch J., Maier M.: Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003, 189, 84-95.
38. Robertson J. M. C., Robertson P. K. J., Lawton L. A.: A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic microorganisms. *J. Photochem. Photobiol. A* 2005, 175, 51-56.
39. Rozhkova E. A., Ulasov I., Lai B., Dimitrijevic N. M., Lesniak M. S., Rajh T.: A high-performance nanobiophotocatalyst for targeted brain cancer therapy. *Nano Lett.* 2009, 9, 3337-3342.
40. Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J.: The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2007, 3, 20-31.
41. Saquib Q., Al-Khedhairi A. A., Siddiqui M. A., Abou-Tarboush F. M., Azam A., Musarrat J.: Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. in Vitro* 2012, 26, 351-361.
42. Shen B., Scaiano J. C., English A. M.: Zeolite encapsulation decreases TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 2006, 82, 5-12.
43. Shukla R. K., Sharma V., Pandey A. K., Singh S., Sultana S., Dhawan A.: ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. in Vitro* 2011, 25, 231-241.
44. Sökmen M., Değerli S., Aslan A.: Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water. *Exp. Parasitol.* 2008, 119, 44-48.
45. Srivastava R. K., Rahman Q., Kashyap M. P., Singh A. K., Jain G., Jahan S., Lohani M., Lantow M., Pant A. B.: Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549. *Hum. Exp. Toxicol.* 2013, 32, 153-166.
46. Taniguchi N.: On the basic concept of "nano-Technology". *Proc. Intl. Conf. Prod. London, Part II, British Society of Precision Engineering* 1974.
47. Thevenot P., Cho J., Wavhal D., Timmons R. B., Tang L.: Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2008, 4, 226-236.
48. Toyooka T., Amano T., Ibuki Y.: Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 2012, 742, 84-91.
49. Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R.: Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 2009, 69, 8784-8789.
50. Vamanu C. L., Cimpan M. R., Hol P. J., Sornes S., Lie S. A., Gjerdet N. R.: Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol. in Vitro* 2008, 22, 1689-1696.
51. Wamer W. G., Yin J. J.: Photocytotoxicity in human dermal fibroblasts elicited by permanent makeup inks containing titanium dioxide. *J. Cosmet. Sci.* 2011, 62, 535-547.
52. Wang L., Mao J., Zhang G. H., Tu M. J.: Nano-cerium-element-doped titanium dioxide induces apoptosis of Bel 7402 human hepatoma cells in the presence of visible light. *World J. Gastroenterol.* 2007, 13, 4011-4014.
53. Whitesides G. M.: The "right" size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1161-1165.
54. Xu J., Sun Y., Huang J., Chen C., Liu G., Jiang Y., Zhao Y., Jiang Z.: Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody-TiO₂ bioconjugates and electroporation. *Bioelectrochemistry* 2007, 71, 217-222.
55. Xu J., Sun Y., Zhao Y., Huang J., Chen C., Jiang Z.: Photocatalytic inactivation effect of gold-doped TiO₂ (Au/TiO₂) nanocomposites on human colon carcinoma LoVo cells. *Int. J. Photoenergy* 2007, 2007, article ID 97308.
56. Yamaguchi S., Kobayashi H., Narita T., Kanehira K., Sonezaki S., Kubota Y., Terasaka S., Iwasaki Y.: Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound: evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids in vitro. *Photochem. Photobiol.* 2010, 86, 964-971.
57. Yamaguchi S., Kobayashi H., Narita T., Kanehira K., Sonezaki S., Kudo N., Kubota Y., Terasaka S., Houkin K.: Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethyleneglycol compound on glioma cells: comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.* 2011, 18, 1197-1204.
58. Yu J. C., Ho W., Lin J., Yip H., Wong P. K.: Photocatalytic activity, antibacterial effect, and photoinduced hydrophilicity of TiO₂ films coated on a stainless steel substrate. *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 2296-2301.
59. Ze Y., Zheng L., Zhao X., Gui S., Sang X., Su J., Guan N., Zhu L., Sheng L., Hu R., Cheng J., Cheng Z., Sun Q., Wang L., Hong F.: Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere* 2013, 92, 1183-1189.
60. Zhang A. P., Sun Y. P.: Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* 2004, 10, 3191-3193.