

Nanobiomateriały w medycynie i weterynarii

Zdzisław Gliński, Barbara Majer-Dziedzic

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Otrzymanie nanocząsteczek jest jednym z rewolucyjnych i najnowszych osiągnięć nauki, które znajdują coraz powszechniejsze zastosowanie w innowacyjnych technologiach, szczególnie w optyce, elektronice i włókiennictwie. Nanobiomateriały są stosowane w nowoczesnych terapiach i szczepionkach, inżynierii tkankowej i mikrochirurgii oraz jako narzędzia w genomice i proteomice (1). Pojedyncza nanocząsteczka ma rozmiar od 1×10^{-9} do 1×10^{-7} m i składa się z atomów, które łączą się w sposób inny aniżeli w środowisku naturalnym (2). Do struktur nanometrycznych i nanomateriałów zalicza się też materiały, które przynajmniej w jednym wymiarze mają rozmiar 1–100 nm lub w rozkładzie wielkości cząstek przynajmniej 50% cząstek jest w skali nanometrycznej. O pojemności nanocząsteczki świadczy fakt, że na odcinku 1 nm mieści się 10 atomów wodoru lub 5 atomów krzemu. Do bardziej znanych i często wykorzystywanych w praktyce struktur nanometrycznych należą: nanorurki węglowe jedno- i wielościenne, studzienki kwantowe (ultracienkie powłoki półprzewodnikowe), nanopowłoki polimerowe, klastry atomów metali szlachetnych, nanonitki i nanodrut srebrowe lub miedzi, grafen i jego pochodne, różnorodne kompozyty wzmacniane nanocząsteczkami, a także różnego rodzaju nanoosiłki leków (3, 4, 5, 6).

Struktura i właściwości nanocząsteczek

Dzięki mikroskopii elektronowej poznano wielkość, kształt i sieć atomową nanocząsteczek, zaś krystalografia rentgenowska, mapując położenie każdego atomu na powierzchni nanocząsteczki, pokazuje sposób jego wiązania z rdzeniem cząsteczki. Metoda otrzymywania nanocząsteczek ma bezpośredni wpływ na ich kształt, wielkość, stabilność, obecność i orientację czynników stabilizujących na powierzchni. Struktura w zasadzie determinuje właściwości nanocząsteczki, a dzięki znajomości struktury jest możliwe zrozumienie właściwości, co pozwala na ich wykorzystanie w konkretnych zastosowaniach.

Wyróżnia się trzy źródła powstawania nanocząsteczek: naturalne (7), efekty niezamierzonej oraz efekty zamierzonej działalności człowieka (8, 9). Źródłem naturalnych nanocząsteczek są drobne cząstki

powstające, np. podczas pożarów lasów, wybuchu wulkanów i reakcji fotochemicznych w górnych warstwach atmosfery. Powstają one też podczas niezamierzonej działalności człowieka, np. podczas gotowania, grillowania, spawania, cięcia strumieniem plazmy. Osobne źródło stanowią nanocząsteczki projektowane, będące efektem zaprojektowania i wytworzenia przez człowieka w celu różnorodnych aplikacji. Tak otrzymane nanocząsteczki cechuje ściśle określony kształt i skład chemiczny, mogą one też zawierać warstwy o różnym składzie (liposomy, dendrymery; 10).

Dotychczas większość projektowanych nanocząsteczek posiada strukturę jednorodną, strukturę typu rdzeń-powłoka lub polimerosomów, to jest kapsułek o powłokach posiadających zarówno część hydrofilową, jak i hydrofobową. Zmiany właściwości fizycznych i chemicznych zależą od wielu czynników, głównie temperatury i ciśnienia. I tak zmiana rozmiarów materiału w dwóch (nanodrut) i w trzech kierunkach (nanokropki) przez bezpośredni wpływ na strukturę atomową i elektronową prowadzi do zmian właściwości fizycznych materiałów. Z chwilą gdy nanocząstka osiąga określoną wielkość, następuje przegrupowanie atomów do bardziej regularnego (krystalicznego) upakowania. Duży stosunek pola powierzchni nanocząstek do ich objętości, oraz nietypowe ułożenie atomów powoduje, że wykazują one nietypową reaktywność chemiczną. Na przykład makroskopowe drobinę niektórych leków nierozpuszczalne w wodzie w formie nanocząsteczek stają się rozpuszczalne, a wiele nanostrukturalnych ceramiek jest superplastyczna.

Połączenie nanostruktury z substancją aktywną biologicznie (lek, antygen) umożliwiło kreację nanoosiłków. Jako nanoosiłki wykorzystuje się emulsje, polimeryczne nanocząsteczki, tlenek grafenu, złoto, ditlenek tytanu. Mają one kształt nanokuleczek, nanopaleczek, mikro-nanowypustek bądź płatek (11). Stałe nanocząsteczki lipidowe są stałymi koloidalnymi lipidowymi nośnikami w temperaturze pokojowej i temperaturze ciała człowieka i składają się z rdzenia stałych lipidów z materiałem bioaktywnym będącym częścią lipidowego podłoża i z powłoki surfaktantu. Są stabilne fizycznie, nietoksyczne, umożliwiają kontrolowane uwalnianie substancji

Application of nanobiomaterials in medicine and veterinary sciences

Gliński Z., Majer-Dziedzic B., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

This review summarizes the most recent development in the field of applied nanomaterials and discusses their commercialization prospects. Nanoparticles have found numerous applications in many fields, from biomedical and veterinary sciences, through optics, textile, construction, motorization, electricity and electronics. New possibilities of nanoparticles application emerge almost every day. However, nanoparticles usage carries both benefits and risks. Tissue toxicity of nanoparticles is manifested by inflammation resulting probably from oxidative stress. Nanobiotechnology should be combined with other molecular diagnostic and therapeutic procedures to boost the efficiency of diagnosis and treatment of animal diseases for food security.

Keywords: nanoparticles, nanotechnology, medicine, veterinary medicine.

czynnej, są przy tym biokompatybilne i selektywnie ukierunkowane, np. na komórki nowotworowe (12, 13).

Zastosowanie nanocząsteczek

Ciekawe kształty, struktury i właściwości nanocząsteczek przyczyniają się do coraz powszechniejszego ich wykorzystania. Dzięki swoim unikatowym właściwościom nanocząsteczki znajdują zastosowanie lub zostaną w najbliższej przyszłości wykorzystane w rozlicznych działach medycyny i weterynarii. Obecnie są pomocne w doskonaleniu obrazowania, diagnostyce i terapii raka, wakcynologii, terapii chorób, oczyszczania wielocząsteczkowych związków chemicznych.

Wakcynologia

Nanotechnologia, a zwłaszcza nanoosiłki, zwiększyły możliwości produkcji nowych typów szczepionek. Nanoskala umożliwia efektywniejsze rozpoznanie i prezentację antygenów szczepionkowych. Cząsteczki o średnicy poniżej 10 nm są bowiem z łatwością fagocytowane przez makrofagi i komórki dendrytyczne. Jako nośnik często jest wykorzystywany kwas polilakto-koglikolowy oraz nanorurki grafenowe, które nie ulegają biodegradacji, są pozbawione właściwości immunogennych, cechują się małą toksycznością i z łatwością wchodzi w kontakt z komórkami prezentującymi antygen (5). Związane z nośnikiem substancje aktywne biologicznie łatwiej docierają do specyficznych receptorów w GALT,

MALT i w SALT oraz swoiście i selektywnie stymulują odpowiedź immunologiczną (14). Nośniki stałe chronią antygeny białkowe szczepionek przed degradacją, co umożliwia podawanie szczepionek drogą doustną, do przewodu pokarmowego oraz bezpośrednio na skórę w postaci nanoplatek (patches of microprojections), co pozwala na około 100-krotne zmniejszenie efektywnej dawki szczepionki podanej w sposób konwencjonalny przy równoczesnym utrzymaniu jej efektywności (15, 16). Konstruowane nanoszczepionki, zwłaszcza wykorzystujące jako nośniki nanoliposomy, emulsje, polimery, nanocząsteczki węgla, są ukierunkowane na wybrane komórki układu immunologicznego, umożliwiają ciągłe uwalnianie się antygenów, przez co nie wymagają reakcytacji, a jednocześnie stymulują wysoce selektywną odporność (6). Efektem immunizacji przy użyciu peptydów wirusa zligowanego z węglowymi nanorurkami jest zwiększenie swoistości przeciwciał neutralizujących wirusy (17).

Terapia chorób

Jedną z ważnych cech nanocząsteczek jest pokonywanie barier ustrojowych i sprawne przemieszczanie się w obrębie organizmu dzięki ich małym rozmiarom. Małe rozmiary ligandów nanocząsteczek z lekami ułatwiają nie tylko uwalnianie leku. Micelarne nanocząsteczki dzięki możliwości pułapkowania leków, białek i DNA zwiększają biodostępność pułpowanej substancji czynnej w związkach okluzyjnych przez zmianę tempa ich rozpuszczania (18). Wykorzystuje się je w terapiach pozajelitowych, doustnych, okulistyce, a także w terapiach zewnętrznych w dermatologii i kosmetyce. Zamykane leki w nanocząsteczkach lipidowych, takie jak kortyzon, diazepam, deksorubicyna, idarubicyna, witamina A i E, są coraz powszechniej wykorzystywane nie tylko w leczeniu, ale i kosmetyce oraz przemyśle spożywczym (luteina, β -karoten, likopen; 10, 19). Nanocząsteczki umożliwiają bezpośrednie dostarczanie leków do mózgu, a nawet na ich ukierunkowanie na wybrane struktury mózgu, co wykorzystuje się np. w leczeniu chorób zwyrodnieniowych (20).

Silne właściwości przeciwbakteryjne nanokrystalicznego srebra są coraz powszechniej wykorzystywane do produkcji bandaży. Godny uwagi jest fakt rzadkiego pojawiania się szczepów opornych na leczenie. Produkty nanotechnologii są też wykorzystywane w terapii genowej w chorobach gałki ocznej i układu oddechowego. Ważną i bardzo szybko rozwijającą się dziedziną nanotechnologii jest wykorzystanie nanomateriałów w inżynierii

tkankowej i neuromikrochirurgii oraz do konstrukcji materiałów do endoprotez lub rusztowań wykorzystywanych do odbudowy kości konstruowanych np. z nanorurek węglowych lub tytanowych (21, 22). Pokrycie implantów biokompatybilnymi nanorurkami ditlenku tytanu powoduje szybszy wzrost tkanki kostnej, a w konsekwencji zapewnia lepszą integrację implantów z kością pacjenta. Nanocząsteczki tlenków metali tworzą bezbarwne filtry ochronne przeciw promieniowaniu UV i IR. Nanomateriały mają też coraz częstsze zastosowanie w izolowaniu i oczyszczaniu struktur biologicznych oraz pojedynczych komórek i znakowaniu preparatów biologicznych (23). Nanocząsteczki złota są bardzo dobrymi markerami biologicznymi (24).

Nanotechnologie wykorzystano w terapii zakażeń wywołanych przez oporne na leki drobnoustroje, zwłaszcza bakterii opornych na antybiotyki jak *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA). Dobre efekty uzyskano z penicyliną połączoną ze strukturami nanocząsteczek poliakrylu (~100 nm; 25). Nanokompleksy penicyliny lub doksycyliny pozwalają na destrukcję komórek *Brucella melitensis* sfagocytowanych przez makrofagi (26). Emulsje nanocząsteczek poliakrylu kowalentnie skoniugowane z penicylinami o średnicy ~40 nm cechuje *in vitro* silna aktywność w stosunku do MRSA (27). Efektem przeciwbakteryjnym cechuje się propolis. MIC dla *Staphylococcus aureus* nanocząsteczek propolisu o średnicy 380 nm wynosi 512 $\mu\text{g/ml}$, zaś o średnicy 250 nm 356 $\mu\text{g/ml}$ (28).

Diagnostyka i leczenie chorób nowotworowych

Zarówno diagnostyka nowotworów, jak i terapia, starając się osiągnąć coraz lepsze efekty, wykorzystują najnowsze osiągnięcia nauki. Ogromny postęp w nieinwazyjnych metodach diagnostyki choroby nowotworowej, zwłaszcza w najwcześniejszym jej okresie, przyniosły nanotechnologie. Dzięki nim możliwe stało się bardzo precyzyjne obrazowanie naczyń limfatycznych i krwionośnych guzów nowotworowych, a nawet pojedynczych komórek nowotworu (29). Jako sondy wykorzystuje się nanocząsteczki tlenku żelaza o paramagnetycznych właściwościach (30), liposomy, dendrimery, nanokropki (quantum dots), nanocząsteczki złota, nanosfery i nanorurki. Czujniki złożone z nanocząsteczek połączonych z przeciwciałami pozwalają na wykrycie *in vivo* specyficznych białek (31). Nanokropki zligowane z peptydami, a także nanocząsteczki złota są coraz powszechniej wykorzystywane w diagnostyce nowotworów.

Nanocząsteczki przyczyniły się też do dużego postępu w leczeniu choroby

nowotworowej. Są one wykorzystywane m.in. w termicznym niszczeniu nowotworów. Naświetlanie UV lub działanie lasera indukuje wzrost temperatury zaadsorbowanych na komórkach nowotworu nanocząsteczek złota z ligandem rozpoznającym markery limfocytów CD8+. Komórki nowotworu ulegają destrukcji w 42°C zaś zdrowe w 46°C.

Nanocząsteczek używa się też jako nośników leków przeciwnowotworowych, do ułatwienia penetracji leków do wnętrza komórek, uzyskania efektu przedłużonego działania, a także do otrzymania rozpuszczalnej postaci tych leków. W tym celu stosuje się najczęściej nanocząsteczki w formie polimerów lub liposomów polietyloglikolowych (32, 33).

Niepożądany wpływ nanocząsteczek na organizm

Wykorzystanie nanocząsteczek w medycynie i weterynarii przynosi nie tylko ogromne korzyści. Nanotechnologie są też stosowane w przechowywaniu żywności, wykrywaniu zmian biochemicznych w żywności oraz jako wskaźniki zanieczyszczeń środowiska i obecności patogenów. Aktualna wiedza o ostrym działaniu nanocząsteczek i nanomateriałów na organizm zwierząt i człowieka jest nadal znikoma. W świetle wyników uzyskanych w doświadczalnych modelach, trudno o wyrobienie jednoznacznego poglądu odnośnie do toksyczności wielu nanomateriałów i przedstawienie listy ich toksycznego działania na różnorodne układy biologiczne. Nie można przy tym niejednokrotnie przewidzieć odległych skutków ekspozycji na nanocząsteczki (34). Nanocząsteczki stanowią zagrożenie związane głównie z ich specyficznymi właściwościami, szczególnie z małymi wymiarami, dzięki czemu z łatwością pokonują bariery wewnątrzustrojowe. Następuje ono wszystkimi drogami, ale największe zagrożenie stanowi inhalacja nanocząsteczek i indukowane przez nie stany zapalne będące najprawdopodobniej skutkiem stresu oksydacyjnego. Rozwija się apoptoza i martwica komórek na skutek tworzenia się wolnych rodników i gromadzenia nadtlenków, powodujących stres oksydacyjny, jak również zmniejszenie ilości glutationu (GSH), utlenienie grup SH białek oraz obniżenie poziomu witaminy E (4, 35). Przypisuje się też nanocząsteczkom pewien stopień działania alergizującego.

Ten niepożądany efekt nanocząsteczek zależy ponadto od stanu zdrowia i predyspozycji genetycznych organizmu, charakteru i czasu ekspozycji na nanocząsteczki, ich wielkości, kształtu, właściwości elektromagnetycznych, sposobu oddziaływania na błonę komórkową, mitochondria lub DNA i mutagenę (7, 36). Wpływ

nanocząsteczek oceniano najczęściej na podstawie zachowania się takich biomarkerów zapalenia, jak IL-8, IL-6 i TNF, a w ocenie integralności błon komórkowych na podstawie aktywności dehydrogenazy mleczowej (LDH). Jako modele w badaniach nad toksycznością wykorzystywano także hodowle komórek (36).

Wiele danych, choć często kontrowersyjnych, odnosi się do toksyczności nanocząsteczek metali i nanoproduktów. Toksyczne działanie nanocząsteczek aluminium na organizm zależy od ich stężenia. W stężeniu 10, 50, 100, 200, 400 µg/ml są nietoksyczne dla organizmu ssaków (37). Natomiast w wyższych stężeniach zaburzają one czynność mitochondriów, zwiększają stres oksydacyjny i przepuszczalność bariery krew – mózg (38). Cytotoksyczność nanocząsteczek złota zależy też od ich stężenia oraz stabilizatorów i stopnia zdysocjowania (39). Działania toksycznego są pozbawione nanokuleczki złota o średnicy 2–18 nm, na co wskazują badania nad ich wpływem na komórki układu immunologicznego. Natomiast nanocząsteczki złota o średnicy poniżej 2 nm działają toksycznie, podobnie jak nanocząsteczki kadmu (40). Zarówno działaniem genotoksycznym, jak i cytotoksycznym przez niszczenie integralności błon komórek i indukcję stresu oksydacyjnego cechuje się tlenek miedzi (50 nm; 41). Badania na linii komórkowej białaczki i komórek raka płuc człowieka wykazały wpływ nanocząsteczek srebra na tworzenie adduktów komórkowego DNA, przy czym silniej działają cytotoksycznie cytryniany pokryte nanocząsteczkami srebra (20 nm) aniżeli peptydy o tych samych rozmiarach (42, 43). Nanocząsteczki żelaza niszczą organelle komórkowe, powodują lizę komórek, indukują zapalenie, zaburzają układ krzepnięcia krwi, a po inhalacji gromadzą się w wątrobie, śledzionie, płucach oraz przenikają przez barierę krew – mózg i gromadzą się w neuronach (44, 45).

Toksyczność nanocząsteczek węgla zależy ściśle od ich wielkości, kształtu i stężenia (46). Zmiany genotoksyczne występują w hodowli komórkowej jajnika chomika, komórkach raka człowieka, hodowli komórek nerki zarodka chomika po 80-dniowej ekspozycji na stężenia fullerenów wynoszące 1 ng/ml (47). Jednak działania genotoksycznego fullerenów nie potwierdziły badania Niwa i wsp. (48) z rozpuszczalnymi w wodzie fullerenami oraz Jacobsena i wsp. (49) z nanorurkami węgla i fullerenami w hodowli komórek płuc myszek. Biodegradowalne lub polimeryczne nanocząsteczki, np. poly-(D,L-lactide-co-glycolide), są nietoksyczne i nie uszkadzają układu immunologicznego, a także nie aktywują neutrofilów. Dlatego są powszechnie

wykorzystywane w terapii raka, inkapsulowaniu leków, peptydów, kwasów nukleinowych i białek (50). Udoskonalenie nanobiotechnologii stwarza szerokie perspektywy dla wykorzystania nanostruktur w przemyśle spożywczym (51), a w medycynie zwłaszcza w proteomice w konstrukcji chipów białkowych łączących się swoiście z określonymi motywami strukturalnymi lub biochemicznymi organizmu (52), terapii genowej i inżynierii molekularnej (53).

Piśmiennictwo

- Świdwińska-Gajewska A.M.: Nanocząsteczki. Cz. 2. Korzyści i ryzyko dla zdrowia. *Med. Pracy* 2007, **58**, 253–263.
- Vert M., Doi, Y., Hellwich K.H., Hess M., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schué F.O.: Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 2012, **84**, 377–410.
- Chow D.C., Johannes M.S., Lee W.K., Clark R.L., Zauscher S., Chilkoti A.: Nanofabrication with biomolecules. *Nano Today* 2005, **8**, 30–39.
- Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J.: Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005, **113**, 823–839.
- Scheinberg D.A., McDevitt M.R., Dao T., Mulvey J.J., Feinberg E., Alidori S.: Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013, **65**, 2016–2022.
- Kim M.G., Park J.Y., Shon Y., Kim G., Shim G., Oh Y.K.: Nanotechnology and vaccine development. *Asian J. Pharm. Sci.* 2014, **9**, 227–235.
- Vesselina D.: Current major cancer targets for nanoparticle systems. *Curr. Cancer Drug Targ.* 2011, **11**, 164–183.
- Donaldson K., Stone V., Couter A., Renwick L., MacNee W.: Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.* 2001, **58**, 211–216.
- Taylor R., Sylvain C., Todd O., Phelan P., Gunawan A., Lv W., Gary R., Ravi P., Himanshu T.: Small particles, big impacts: a review of the diverse applications of nanofluids. *J. Appl. Phys.* 2013, **113**, 78–84.
- Wissing S.A., Müller R.H.: Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 2003, **254**, 65–68.
- Chadwick S., Kriegel C., Amiji M.: Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, **62**, 394–407.
- Almeida A.J., Souto E.: Solid lipid nanoparticles as drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, **59**, 478–490.
- Lasoń E., Ogonowski J.: Stałe nanocząsteczki lipidowe – charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie. *Chemik* 2011, **65**, 960–967.
- Peek L.J., Middaugh C.R., Berkland C.: Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008, **60**, 915–928.
- Renukaradhya G.J., Narasimhan B., Mallapragada S.K.: Respiratory nonparticle-based vaccines and challenges associated with animal models and translation. *J. Control. Rel.* 2015, **219**, 622–631.
- Gregory A.E., Titball R., Williamson D.: Vaccine delivery using nanoparticles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013, **3**, 1–13.
- Panaretto D., Prtidos C.D., Hoebeke J., Brown F., Kramer E., Briand J.P., Muller S., Prato M., Bianco A.: Immunization with peptide-fractionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem. Biol.* 2003, **10**, 961–966.
- Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: Drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, **45**, 149–155.
- Cavalli R., Caputo U., Gasco M.R.: Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *Int. J. Pharm.* 1993, **89**, 9–12.
- Kreuter J.: Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain. *Int. Congr. Ser.* 2005, **1277**, 85–94.
- Kubota S., Johkura K., Asanama K., Okouchi Y., Ogiwara N., Sasaki K.: Titanium oxide nanotubes for bone regeneration. *J. Materials Sci.* 2004, **15**, 1031–1035.
- Ma J., Wong H., Kong L.B., Peng K.W.: Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology* 2003, **14**, 619–623.
- Murphy S.K.: Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future. *Int. J. Nanomed.* 2007, **2**, 129–141.

Automat biochemiczny MINDRAY BS-120



Automat hematologiczny 3-diff MINDRAY BC-2800vet



Najnowszy automat hematologiczny 5-diff MINDRAY BC-5000vet



(cytometria przepływowa + laser)

STAMAR®

Autoryzowany
i wyłączny dystrybutor sprzętów
firmy **mindray**
do laboratorium weterynaryjnego

Tel.: 601 845 055 (Marek)
726 300 777 (Dominika)

24. Cao Y.C., Jin R., Nam J.M., Thaxton C.S., Mirkin C.A.: Raman dye-labeled nanoparticle probes for proteins. *J.A.C.S.* 2003, **125**, 14676–14677.
25. Turos E., Reedy G.S.K., Greenhalgh K., Ramaraju P., Abeylath S.C., Jang S., Dickey S., Limc D.V.: Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of β -lactam antibiotics against MRSA. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2007, **17**, 3468–3472.
26. Selem M.N., Jain N., Pothayee N., Ranjan A., Riffle J.S., Sriranganathan N.: Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol. Lett* 2009, **294**, 24–31.
27. Turos E., Shim J.Y., Wang Y., Greenhalgh K., Reddy G.S., Dickey S., Lim D.V.: Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, **17**, 53–56.
28. Chakravarthy V., Sri P., Balaj N.: Applications of nanotechnology in veterinary medicine. *Vet World*. 2010, **3**, 477–480.
29. Yonus M., Hoheisel J.D., Efferth T.: Therapeutic and diagnostic applications of nanoparticles. *Curr. Drug Targ* 2011, **12**, 357–365.
30. Laurent S., Mahmoudi M.: Superparamagnetic Ion oxide nanoparticles promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2011, **2**, 367–390.
31. Patel S.P., Patel B.P., Parekh B.B.: Application of nanotechnology in cancer prevention, early detection and treatment. *J. Cancer Res. Ther.* 2014, **10**, 479–486.
32. Aslan B., Ozpolat B., Sood A.K., Lopez-Berestein G.: Nanotechnology in cancer therapy. *J. Drug Target.* 2013, **21**, 904–913.
33. Ahmad J., Akhter S., Khan M.A., Wahajuddin M., Greig N.H., Kamal N.A., Midoux P., Pichon C.: Engineered nanoparticles against MDR in cancer: the state of art and its perspective. *Curr.Pharm. Dis.* 2016, **22**, 4360–4373.
34. Hydzik P.: Zagrożenie związane z nanotechnologią w świetle prawodawstwa Unii Europejskiej. *Przegl. Lek.* 2012, **69**, 490–491.
35. Donaldson S., Stone V., Clouter A., Renwick L., MacNee W.: Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.* 2001, **58**, 211–216.
36. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M.: Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran Biomed. J.* 2016, **20**, 1–11.
37. Radziun E., Dudkiewicz-Wilczyńska J., Książek L., Nowak K., Anuszewska E.L., Kunicki A., Olszyna A., Zabkowski T.: Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. *Toxicology in Vitro*. 2011, **25**, 1694–1700.
38. Chen L., Yokel R.A., Hennig B., Toborek M.: Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. *J. Neuroimmunopharm.* 2008, **3**, 286–295.
39. Boisselier E., Astruc D.: Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity *Chemical Soc. Rev.* 2009, **38**, 1759–1782.
40. Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D.: Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 2005, **1**, 325–327.
41. Ahamed M., Siddiqui M.A., Akhtar M.J., Ahmad I., Pant A.B., Alhadlag H.A.: Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res.* 2010, **396**, 578–583.
42. Foldbjerg R., Dang D.A., Autrup H.: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.* 2011, **85**, 743–750.
43. Haase A., Tentschert J., Jungnickel H., Graf P., Mantion A., Draude F., Plendl J., Goetz M.E., Galla S., Masic A.: Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular responses. *J. Physics* 2011, **304**, 12–30.
44. Liu G., Gao J., Ai H., Chen X.: Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 2013, **9**, 1533–1545.
45. Zhu M.T., Feng W.Y., Wang B., Wang T.C., Gu Y.Q., Wang M., Wang Y., Ouyang H., Zhao Y.L., Chai Z.F.: Comparative study of pulmonary responses to nano- and sub-micron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 2008, **247**, 102–111.
46. Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J.W., Celio M., Catsicas S., Schwaller B., Forro L.: Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Letters* 2006, **6**, 1121–1125.
47. Dhawan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K., Shan W., Miller S.M., Hashsham S.A., Tarabara V.V.: Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity. *Envir. Sci. Techn.* 2006, **40**, 7394–7401.
48. Niwa Y., Iwai N.: Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test. *Environ. Hlth Prev. Med.* 2006, **11**, 292–297.
49. Jacobsen N.R., Pojana G., White P., Moller P., Cohn C.A., Korsholm K.S., Vogel U., Marcomini A., Loft S., Wallin H.: Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C(60) fullerenes in the FE1-Mutatrade mark/Mouse lung epithelial cells. *Environ. Molec. Mutagen.* 2008, **49**, 476–487.
50. Grabowski N., Hillaireau H., Vergnaud J., Tsapis N., Pallardy M., Kerdine-Röme S., Fattal E.: Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int. J. Pharm.* 2015, **482**, 75–83.
51. Duran N., Marcato P.D.: Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Techn.* 2013, **48**, 1127–1134.
52. Lee K.B., Park S.J., Mirkin C., Smith J., MrKisich M.A.: Protein Nanoarrays generated by Dip-Pen Nanolithography. *Science*. 2002, **295**, 1702–1705.
53. Young L.S., Searle P.F., Onion D., Mautner V.: Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J. Pathol.* 2006, **208**, 299–318.