

TOMASZ KUBIAK

Wykorzystanie pokryć z poli(glikolu etylenowego) i chitozanu do zapewnienia biokompatybilności nanocząstkom w aplikacjach biomedycznych

The Use of Shells Made of Poly(Ethylene Glycol) and Chitosan to Ensure the Biocompatibility of Nanoparticles in Biomedical Applications

Zakład Fizyki Medycznej, Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, Polska

Streszczenie

Biomedyczne aplikacje nanocząstek wymagają, aby struktury te charakteryzowały się szeroko pojętą biokompatybilnością. Najlepszym sposobem na jej osiągnięcie jest zastosowanie pokrycia z odpowiedniego polimeru, który pozwoli zmienić właściwości powierzchniowe rdzenia nanocząstek. Otoczki tworzy się z materiałów biodegradowalnych tak, by produkty rozkładu mogły być łatwo eliminowane z organizmu. Opłaszczanie nanocząstek pozwala na zwiększenie ich stabilności (zarówno w roztworach wodnych, jak i w krwiobiegu), przeciwdziała aglomerowaniu, zapewnia hydrofilowość powierzchni oraz pozwala na dołączanie do niej różnych cząsteczek, np. leków lub ligandów kierujących, stosowanych w terapii celowanej nowotworów. Polimerowe pokrycie wpływa też w istotny sposób na zmniejszenie toksyczności nanocząstek i ich interakcje z różnymi typami komórek. Do opłaszczania nanostruktur często wykorzystuje się chitozan i poli(glikol etylenowy) (PEG) ze względu na ich dostępność i korzystne właściwości. Ogromną zaletą PEG jest jego zdolność do wydłużania czasu cyrkulacji wprowadzonych do krwiobiegu nanocząstek przez zapobieganie ich opsonizacji i ograniczenie wychwytu przez makrofagi. Chitozan ze względu na swój dodatni ładunek silnie oddziałuje z błonami komórkowymi i powierzchniami śluzowymi, co może być przydatne w systemach dostarczania leków. Należy jednak pamiętać, iż masa molowa oraz stopień deacetylacji użytego chitozanu znacząco wpływają na jego charakterystykę. Opłaszczanie nanostruktur jednocześnie poli(glikolem etylenowym) i chitozanem bądź też pokrywanie ich nowymi kopolimerami na bazie PEG ma na celu dalszą optymalizację właściwości nośników nanocząsteczkowych, aby zwiększyć ich bezpieczeństwo i niezawodność w zastosowaniach biomedycznych (**Polim. Med. 2014, 44, 2, 119–127**).

Słowa kluczowe: PEG, chitozan, nanocząstki, biokompatybilność, terapia celowana.

Abstract

Biomedical applications of nanoparticles require that these structures are characterized by broadly defined biocompatibility. The best way to achieve this goal is to use an appropriate polymer coating, which can modify the surface properties of the nanoparticles core. The shells are formed from biodegradable material, so that the products of their decomposition can be easily eliminated from the body. Coating of nanoparticles allows to increase their stability (both in aqueous solutions and in the bloodstream), prevents agglomeration, provides the hydrophilicity of the surface and allows to attach various molecules such as drugs and tumor targeting ligands in cancer therapy. The polymer coating significantly affects the reduction of toxicity of nanoparticles and their interactions with different cell types. Chitosan and poly(ethylene glycol) (PEG) are frequently used for coating of nanostructures due to the availability and favourable properties. A major advantage of PEG is its ability to prolong the circulation time of nanoparticles injected into the bloodstream by preventing their opsonization and reducing the uptake by macrophages. Chitosan, because of its positive charge, strongly interacts with cell membranes and mucosal surfaces, which can be useful in drug delivery systems. However, it should be remembered that the molar mass and the degree of deacetylation of the used chitosan significantly affect its characteristics. The use of combined shells made of poly(ethylene glycol) and chitosan or coatings formed from new PEG based copolymers aims at further optimization of the properties of nanoparticle carriers to increase their safety and reliability in biomedical applications (**Polim. Med. 2014, 44, 2, 119–127**).

Key words: PEG, chitosan, nanoparticles, biocompatibility, targeted therapy.

Zastosowanie nanocząstek w diagnostyce i terapii otwiera nowe perspektywy przed współczesną medycyną. Rewolucja, jaką niosą za sobą cząstki o wymiarach od kilku do kilkuset nanometrów dotyczy m.in. obrazowania biomedycznego, terapii fototermicznej, dostarczania do organizmu substancji aktywnych w postaci leków lub kwasów nukleinowych [1]. Jako przykład można przywołać nanocząstki Fe_3O_4 , które ze względu na unikatowe właściwości fizyczne mogą być użyte jako środki wzmacniające kontrast w obrazowaniu metodą jądrowego rezonansu magnetycznego czy sterowane polem magnetycznym nośniki w terapii celowanej [2]. Należy jednak pamiętać, iż wszelkie biomedyczne aplikacje nanocząstek wymagają ich biokompatybilności rozumianej nie tylko jako brak toksyczności i niewywołanie reakcji alergicznych lub odrzucających po wprowadzeniu do organizmu, ale przede wszystkim jako zdolność do zachowania funkcjonalności w środowisku biologicznym [1, 3]. Otoczenie nanocząstek powłoką polimerową jest doskonałym sposobem na zwiększenie ich stabilności i biokompatybilności, pozwala także na dołączenie do ich powierzchni różnych ligandów [4]. Polipeptydy, aptamery i inne ligandy kierujące pozwalają bowiem na skuteczne dostarczenie nanomateriału do wybranego celu jedynie wówczas, gdy powierzchnia nośnika została zmodyfikowana obojętnym polimerem. W przeciwnym razie niespecyficzne oddziaływania nanocząstek z komórkami i organellami mogą być porównywane ze specyficznymi interakcjami dołączonego ligandu z receptorem w miejscu docelowym [5]. W przypadku terapii celowanej nowotworów dostarczany lek musi być uwalniany miejscowo, a zatem nanocząstki stanowiące jego nośnik powinny być stabilne w krwiobiegu i efektywnie gromadzić się w obrębie guza [6]. Realizacja przewidzianych zadań terapeutycznych przez wygenerowanie korzystnej odpowiedzi komórkowej lub tkankowej bez wywołania niepożądanych miejscowych bądź ogólnoustrojowych skutków to wymagania, jakie stawia się projektowanym systemom dostarczania leków opartym na nanocząstkach. Warto podkreślić, iż zarówno inherentne właściwości fizyczne oraz chemiczne nanocząstek, np. ich wielkość, kształt, właściwości powierzchni, jak i środowisko, z którym wchodzi w kontakt, mogą narzucać stopień ich biokompatybilności [1]. Przykładowo nanocząstki magnetyczne mające duży stosunek powierzchni do objętości, wykazują skłonność do aglomerowania w celu ograniczenia energii powierzchniowej. Powleczenie ich surfaktantem pozwala ograniczyć siły przyciągające i przeciwdziałać aglomerowaniu [7]. Poza tym, mając na uwadze, iż procesy biologiczne zachodzą w środowisku wodnym, ważne jest, aby otoczka zapewniała nanocząstkom hydrofilowość powierzchni [4]. Pokrycie polimerowe, poprzez modyfikację właściwości powierzchniowych rdzenia, wpływa zatem na interakcje nanocząstek z otoczeniem. Chitozan i poli(glikol ety-

lenowy) [PEG] to materiały, które ze względu na swoje pożądane własności są najczęściej stosowane do pokrywania powierzchni nanocząstek.

Chitozan jako materiał pokrywający rdzenie nanocząstek

Chitozan jako liniowy amino-polisacharyd i naturalny polimer często służy do powlekania rdzeni nanocząstek. Ma strukturę opartą na powtarzających się jednostkach N-acetyloglukozoaminy i D-glukozaaminy, połączonych wiązaniem β -(1-4) glikozydowym [3, 8]. Wytwarza się go z chityny, jednego z najpowszechniej występujących w przyrodzie polisacharydów [9], który jest pozyskiwany do celów przemysłowych m.in. ze skorupki krabów oraz krewetek [10, 11] bądź grzybni [10]. Chitozan otrzymuje się w wyniku niecałkowitej N-deacetylacji chityny z udziałem zasady, np. wykorzystanie 40% wodorotlenku sodu przez 1–3 h w temperaturze 120°C pozwala uzyskać chitozan deacetylowany w 70% [10]. Chitozan jest dostępny w wielu formach różniących się przede wszystkim masą molową i stopniem deacetylacji [3]. Właściwości te wpływają bowiem m.in. na jego rozpuszczalność, mukoadhezyjność [3] oraz biokompatybilność [8,11]. Chitozan jest rozpuszczalny w rozcieńczonych roztworach kwasów, np. octowego lub mrówkowego [10].

Należy pamiętać o kationowym charakterze chitozanu [3, 9], który ze względu na swój dodatni ładunek silnie oddziałuje z ujemnie naładowaną błoną komórkową. Właściwości mukoadhezyjne są właśnie związane z jonowymi oddziaływaniami pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami aminowymi w chitozanie a ujemnie naładowanymi resztami kwasu siałowego w śluzie lub na powierzchni komórek [12]. Zdolność przylegania polimeru pokrywającego nanocząsteczkowy nośnik do powierzchni śluzowych wzmacnia interakcje dołączonego do niego ligandu z warstwą śluzową pokrywającą powierzchnie nabłonkowe [3]. W warunkach biologicznych potencjalne interakcje nośnika z błoną mogą jednak zostać zmniejszone na skutek maskowania dodatniego ładunku chitozanu przez zaadsorbowane do powierzchni nanocząstek białka [13].

Wpływ otoczki chitozanowej na interakcje nanocząstek z komórkami

Biokompatybilność otoczonych chitozaniem nanocząstek złota w stosunku do mysich fibroblastów i ludzkich komórek raka jelita grubego jest znacznie większa niż ich nieopłaszczonych odpowiedników [4].

Pokryte chitozanem nanocząstki tlenku żelaza wykazują kompatybilność z osteoblastami, zwiększają proliferację tych komórek i sprzyjają ich różnicowaniu [14]. Chitozanowa otoczka nanocząstek ogranicza ponadto uszkodzenia błony komórkowej oraz zwiększa zdolność przeżycia osteoblastów, co może wiązać się z tym, iż nanocząstki niepokryte polimerem wnikają do wnętrza komórki, a te pokryte pozostają w większości na zewnątrz, przywierając do błony komórkowej [14]. W przypadku ludzkich komórek raka płuc wychwyt nanocząstek uformowanych z chitozanu jest zjawiskiem wysycającym się, jego wydajność maleje natomiast wraz ze zmniejszającą się masą molową polimeru i stopniem deacetylacji [8]. Wychwyt nanocząstek chitozanu można regulować przez zmianę ich potencjału ζ (zeta) (wyższy potencjał ζ oznacza silniejsze powinowactwo), gdyż oddziaływania między nanocząstkami a ujemnie naładowaną błoną komórkową mają charakter elektrostatyczny [8]. Silne powinowactwo grup aminowych chitozanu do powierzchni nanocząstek srebra sprawia, iż polimer ten jest często wykorzystywany do ich powlekania. Osłonięte chitozanem nanocząstki srebra mają potencjał zeta rzędu +39 mV i ładunek powierzchniowy wystarczający do ich stabilizacji poprzez zapobieganie procesowi agregacji [15]. Dodatkowo wykazano eksperymentalnie, iż nanocząstki srebra pokryte warstwą chitozanu wykazują biokompatybilność w stosunku do zdrowych komórek, natomiast zależną od dawki cytotoxyczność w stosunku do komórek raka płuc [15]. W aplikacjach biomedycznych często stosuje się chitozanowe nanocząstki, których zadaniem jest transport makromolekuł przez nabłonek i ich ochrona przed degradacją. W związku z tym badano m.in. zdolność nanocząstek chitozanowych do pośredniczenia w transporcie insuliny przez monowarstwy komórek Caco-2 [16] oraz wpływ składu chemicznego i masy molowej chitozanu na przepuszczalność jelitowych komórek nabłonkowych [12]. Wykazano, iż: wychwyt nanocząstek przez komórki jest poprzedzony ich niespecyficznym oddziaływaniem z błoną komórkową (chitozan oddziałuje z błoną siłami przyciągania elektrostatycznego), zależy od czasu, temperatury (jest bardzo ograniczony po jej zmniejszeniu z 37 do 4°C) oraz od stężenia nanocząstek (wzrasta wraz ze stężeniem, ale proces się wysycza) [16]. Postuluje się także, iż internalizacja nanocząstek do komórek zachodzi na bazie endocytozy adsorpcyjnej z udziałem klatryny, zaznaczając jednak, iż mogą również zaistnieć inne niezależne od niej procesy [16]. W przypadku internalizacji na drodze klasycznej endocytozy nanocząstki są łapane w wewnątrzkomórkowe pęcherzyki, które mają tendencję do zlewania się z kwasowymi lizosomami. Enzymy tam występujące degradują przenoszony środek terapeutyczny, dlatego warto rozwijać strategie dostarczania nanocząstek alternatywnymi szlakami, np. poprzez makropinocytozę [17]. W przypadku monowarstw komórek Caco-2 chitozany o małym stopniu acetyla-

cji (1 i 15%) aktywnie poprawiają absorpcję hydrofilowego leku zarówno przy małej, jak i dużej masie cząsteczkowej (4,7–190 kg/mol), natomiast przy stopniu acetylacji 35–49% wzmożony transport leku występuje tylko w przypadku dużych mas molowych [12]. Niestety stopień acetylacji chitozanu może również wpływać na jego toksyczność w stosunku do komórek. Uważa się, iż chitozany o wyższym stopniu acetylacji są mniej toksyczne, zatem reacetylacja (zmniejszenie stopnia deacetylacji) chitozanu znacząco poprawia profil cytotoxyczności [8]. Ustalono, iż chitozan ze stopniem acetylacji 35% i o masie molowej 170 kg/mol ma szczególnie korzystne właściwości, np. bardzo małą toksyczność i szybki początek działania wzmacniającego absorpcję leku [12]. Z drugiej strony zaobserwowano, iż po podskórnym wstrzyknięciu szczurom roztworu chitozanu zawierającego fosforan-2-glicerolu (roztwór ten przy temp. zbliżonej do 37°C przechodzi w żel) reakcja zapalna (mierzona wielkością obrzęku) była słabsza dla chitozanów o większym stopniu deacetylacji [11]. Konieczne są zatem dodatkowe badania pozwalające na ocenę toksyczności chitozanów *in vivo*. Dodatkowo należy nadmienić, iż kompleksowanie polimeru z lekiem również wpływa na interakcje z środowiskiem i błoną komórkową, gdyż zmniejsza liczbę dostępnych dodatkowych grup aminowych [3].

Chitozan może być stosowany w biomedycynie podczas tworzenia nanocząsteczkowych systemów dostarczania leków, białek, szczepionek lub genów [8,15]. Kwasy nukleinowe, ze względu na polianionowy charakter wynikający z ujemnego ładunku grup fosforanowych, tworzą polielektrolitowe kompleksy z chitozanem, protonowanym w kwasowym pH. Postuluje się zatem wykorzystanie nanocząsteczkowych nośników chitozanowych do skutecznego i bezpiecznego dostarczania do komórek siRNA, przydatnego w terapii wielu chorób ze względu na zdolność do zmniejszania ekspresji genów [13].

Nanocząstki chitozanowe testowano jako przenośniki kurkuminy, której przypisuje się potencjalne działanie przeciwnowotworowe [18]. Zawierające taki ładunek nanocząstki wykazywały przedłużony kontakt z jelitem grubym oraz były wylapywane i internalizowane przez komórki gruczołakoraka jelita w większym stopniu niż wolna kurkumina. Wprawdzie za adhezję nanocząstek do tkanki okrężnicy odpowiadały głównie oddziaływania elektrostatyczne między dodatnio naładowanym chitozanem a ujemnie naładowanymi glikoproteinami w błonie śluzowej jelita, porównanie zachowania załadowanych i pozbawionych ładunku nanocząstek polimeru pokazało, iż sama kurkumina również odgrywa rolę w procesie mukoadhezji [18]. W diagnostyce i leczeniu raka piersi potencjalne zastosowanie mogą również znaleźć opłaszczane chitozanem bionanokompozyty z ferrytu manganowo-cynkowego. Pokrycie polimerowe nie wpływa bowiem na mikrostrukturę oraz właściwości magnetyczne ferrytu,

zapewnia jednak biokompatybilność i pozwala na łatwe dołączenie do powierzchni małych kryształów apatytu. Dzięki takiej modyfikacji duże powinowactwo komórek raka piersi do hydroksyapatytu, które zwykle wpływa jedynie na częste przerzuty nowotworu do kości, zostałyby wykorzystane w terapii celowanej [19].

W przypadku terapii celowanej ważne jest, aby lek bezpiecznie dotarł do miejsca przeznaczenia, w którym zostanie odłączony od nośnika. Uwalnianie z nanocząstek chitozanowych tamoksyfenu wykorzystywanego w terapii raka piersi okazało się zależne od pH ośrodka. Przy pH = 7,4 było długotrwałe, lecz przy pH = 4 i 6 zdecydowanie szybsze, przy czym tempo oddawania leku zwiększało się wraz ze zmniejszeniem pH [20]. Pozwala to postawić hipotezę, iż w normalnych warunkach fizjologicznych podczas transportu we krwi (pH 7,4) większość leku pozostanie w nośniku, a podczas internalizacji przez komórki nowotworowe na drodze endocytozy nastąpi szybsze uwalnianie z powodu miejscowego zmniejszenia pH, np. w endosomie bądź lizosomie komórki raka [20]. Warto dodać, iż podobne zachowanie podczas uwalniania (szybkie oddawanie leku w pH = 4,5 i wolne w pH = 7,4) przejawiały nanocząstki chitozanowe przenoszące inny lek przeciwnowotworowy – oksaliplatynę [21].

Uwalnianie leków kowalencyjnie przyłączonych do polimerów bądź rozproszonych w ich matrycy wiąże się z degradacją związków wielkocząsteczkowych [10]. Warto przyrzeć się zatem biodegradowalności chitozanu, mając na uwadze to, iż materiały, które nie są rozkładane w organizmie w odpowiednim czasie, mogą nagromadzać się w komórkach, tkankach i narządach.

Biodegradowalność chitozanu

Badania biodegradacji chitozanu u szczurów pokazały, że gdy stopień deacetylacji nie przekracza 70%, polimer jest łatwo degradowany, a przy większych wartościach słabo, co wynika z faktu, iż tylko sekwencyjne rozmieszczanie jednostek N-acetyloglukozaminy jest identyfikowane przez enzymy degradujące chitozan [8]. Chociaż mniej deacetylowane chitozany przejawiają tendencję do szybszej degradacji, nie jest możliwe precyzyjne szacowanie tempa ich enzymatycznego rozkładu wyłącznie na podstawie wiedzy o stopniu deacetylacji, gdyż ze względu na różnice w dystrybucji grup acetoamidowych nawet chitozany o zbliżonych właściwościach mogą być rozkładane w różnym tempie [22]. Warto dodać, iż typowy stopień acetylacji jest zwykle mniejszy niż 35% [10]. W warunkach fizjologicznych łańcuch cząsteczkowy chitozanu może być strawiony przez lizozymy (występujące m.in. w błonach śluzowych) bądź chitynazę (wytworzaną przez florę jelitową). Fakt, iż chitozan, którego masa molowa i stopień deacetylacji zostały odpowiednio zoptymalizowane, jest rozkładany przez enzymy bakterii jelitowych, wskazu-

je na jego potencjalną przydatność w terapii celowanej okrężnicy [23]. Enzymy rozkładają chitozan najpierw na oligomery, a później na endogenną dla organizmu N-glukozaaminę [8]. Oligosacharydy, będące produktami metabolizmu, nie przejawiają tendencji do akumulacji bądź retencji, gdyż są łatwo wydalone z moczem albo włączane w glikozoaminoglikanowe i glikoproteinowe szlaki metaboliczne. Zbyt szybka degradacja może jednak skutkować nagromadzeniem aminocukrów, wywołując odpowiedź zapalną [3].

W celu optymalizacji nanocząsteczkowych systemów dostarczania leków testuje się też polimery będące pochodną chitozanu, np. glikol chitozanu i jego hydrofobowo zmodyfikowaną odmianę – HGC (*hydrophobically modified glycol chitosan*). Amfifilowy charakter HGC i jego zdolność do samoorganizowania w roztworach wodnych sprzyja tworzeniu stabilnych nanocząstek, które wykazują słabą toksyczność, biokompatybilność oraz duże powinowactwo do wiązania z błoną komórkową. Wychwyt nanocząstek HGC przez komórki może zachodzić różnymi szlakami, jest szybki, choć zależny od czasu i dawki [17]. Innym sposobem poprawy właściwości chitozanu formującego nanocząstki lub tworzącego ich otoczki jest zmieszanie go z drugim polimerem, np. poli(glikolem etylenowym) – PEG [9]. Warto zatem zastanowić się, dlaczego PEG jest tak chętnie wykorzystywany przy wytwarzaniu nanostruktur do zastosowań biomedycznych.

PEG jako uniwersalne pokrycie nanocząstek pozwalające na wydłużenie czasu ich krążenia w krwiobiegu

Poli(glikol etylenowy) jest polimerem występującym w wielu odmianach różniących się masą molową. Na potrzeby europejskiego przemysłu farmaceutycznego wytwarza się go poprzez polimeryzację tlenku etylenu (*ethylene oxide* – EO) z udziałem wody, monoetylenoglikolu albo glikolu dietylenowego, a reakcja jest katalizowana zasadowo [24]. Powstaje produkt o wzorze $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, gdzie n jest liczbą jednostek EO [25]. Końcowe grupy hydroksylowe mają znaczący wpływ na fizyczne i chemiczne właściwości polimeru [24], który uczestniczy w tworzeniu wiązań wodorowych z tlenem pochodzącym z eterów i wodorami z H_2O [25]. PEG rozpuszcza się w wodzie, toluenie, chloroformie [25] oraz w innych zarówno polarnych, jak i niepolarnych rozpuszczalnikach [26]. Dodatkowo polimer ten poprawia rozpuszczalność pokrywanych nim struktur, dzięki zapewnieniu im hydrofilowości powierzchni [25], charakteryzuje się też dużą rozpuszczalnością w błonach komórkowych, co jest ważne w kontekście interakcji ze środowiskiem biolo-

gicznym [26]. Stan skupienia, w jakim PEG występuje w temperaturze pokojowej ma związek z jego masą molową (mała masa – ciecz, duża – ciało stałe). Warto również dodać, iż twardość polimeru w stanie stałym wzrasta wraz z masą molową [24].

PEG jest powszechnie stosowany do pokrywania nanocząstek. Na ich powierzchni może być unieruchomiony kowalencyjnie [26] lub dołączony na skutek fizycznej adsorpcji [6]. W tym drugim przypadku istnieje jednak prawdopodobieństwo wymywania go przez płyny biologiczne, dlatego preferuje się trwałe wiązanie chemiczne [25]. Stopień pokrycia nanocząstki polimerem jest zależny od jego masy molowej i gęstości szczenia [1]. Łańcuchy polimeru przyjmują różne aranżacje na powierzchni nanocząstek. Z konformacją „grzyba” (*mushroom*) mamy do czynienia przy małej gęstości szczenia, z konformacją przejściową przy średniej modyfikacji powierzchni, natomiast z konformacją „szczotki” (*brush*) przy dużej PEG-ylacji [1, 6]. Konfiguracja „szczotki” w stosunku do „grzyba” może zapewnić konformacyjną mobilność molekuł PEG, a tym samym większą i jednolitą osłonę dla nanocząstek [27]. Znaczna ruchliwość powierzchni prowadzi do dużego wykluczenia sterycznego [25, 26], a to właśnie efekty steryczne przeciwdziałają agregacji nanocząstek, zwiększając ich stabilność koloidalną [1]. Zmodyfikowane poliglikolem nanocząstki tlenku żelaza wykazują dużą stabilność koloidalną w roztworach wodnych przynajmniej przez miesiąc [28]. Zanotowano nawet przypadek, gdzie pokrycie takich struktur surfaktantem na bazie PEG zapobiegło ich aglomeracji w wodzie zdejonizowanej przez cztery miesiące [29]. Synteza wielowarstwowych nanocząstek w fazie aerozolowej ma wiele zalet, ale w zastosowaniach biomedycznych są potrzebne nanocząstki stabilne w wodzie. Konieczne jest zatem przeniesienie ich z fazy aerozolu do dyspersji wodnej, unikając przy tym agregacji. Jedną z metod, by to uczynić jest właśnie pokrywanie nanocząstek poliglikolem, które, jak udowodniono, można przeprowadzić już w procesie aerozolowym [30].

W kontekście zastosowań biologicznych niezwykle ważne jest zachowanie się nanostruktur pokrytych PEG w układzie krwionośnym. Otóż polimer ten nie tylko tłumi ich agregację, ale przede wszystkim zwiększa czas krążenia w krwiobiegu [1, 30–33]. Zdolność do wydłużania czasu cyrkulacji wynika m.in. z tego, iż polimerowe pokrycie zapobiega opsonizacji [25, 26, 31]. Odpowiedź immunologiczna organizmu na wprowadzone nanocząstki jest indukowana właśnie przez adsorpcję do ich powierzchni opsonin (immunoglobulin bądź białek dopełniacza), które prezentują nanocząstki jako ciała obce [1]. W konsekwencji niezabezpieczone, hydrofobowe nanocząstki są szybko wychwytywane przez fagocyty (z układu fagocytów jednojądrzastych) występujące w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym [26, 34]. PEG osłania nanocząstki przed działaniem układu siateczkowo-śródbłonkowego, tworząc hydrofilowe po-

krycie wokół ich powierzchni. Gdy białko zbliża się do powierzchni pokrytej PEG, objętość dostępna do każdego segmentu polimeru zmniejsza się, a utrata swobody konformacyjnej łańcuchów PEG skutkuje pojawieniem się siły odpychającej [25]. Dodatkowo występują też oddziaływania osmotyczne między białkami a pokrytą PEG powierzchnią, gdyż łańcuchy białkowe albo w nią wnikają (przy słabszym pokryciu powierzchni polimerem) bądź ulegają kompresji (w przypadku gęstszego szczenia), powodując zmniejszenie dostępnych konformacji segmentów PEG [25]. PEG nie tylko ogranicza adsorpcję białek do powierzchni nanocząstek, ale dodatkowo zmniejsza też przyleganie płytek krwi, formowanie się skrzepów, redukuje aktywność hemolityczną i aktywację neutrofilów, co również skutkuje słabszą odpowiedzią immunologiczną [1, 33]. Warto zaznaczyć, iż aranżacja PEG na powierzchni nanocząstek również jest w tym względzie istotna. Wykazano bowiem, że pokrycie nanostruktur poliglikolem o konformacji „szczotki” skutkuje ich zmniejszonym rozpoznawaniem przez makrofagi w wątrobie i tym samym ogranicza wychwyt [27]. Dla pokrytych PEG nanocząstek PLGA – poly(L-lactide-co-glycolide) ustalono, iż inhibicja fagocytozy jest maksymalna przy stężeniu poli(glikolu etylenowego) 10% w/w, natomiast gęstsze pokrycie nieznacznie ją zmniejsza [27]. Warto również dodać, iż nadmierne pokrycie nanocząstek poliglikolem może skutkować silną inhibicją wychwytu w komórkach docelowych, zmniejszając tym samym potencjał systemu dostarczania leku [35]. Należy zatem tak dobrać właściwości pokrycia, aby znaleźć najlepszy kompromis między właściwościami antyopsonizacyjnymi a zdolnością nanocząstek do wydajnego wiązania się z celem.

W przypadku biomedycznych aplikacji nanocząstek pokrywanie ich powierzchni PEG jest standardową procedurą mającą na celu zapewnienie biokompatybilności. Zaobserwowano jednak, iż nawet tak bezpieczny polimer dołączony do nanomateriału w pewnych przypadkach może wywołać reakcję nadwrażliwości poprzez aktywację układu dopełniacza [5, 31]. Białka dopełniacza, np. C3b, mogą wiązać się z wolnymi grupami nukleofilowymi, wytwarzanymi na skutek utleniania łańcuchów PEG, a należy zaznaczyć, iż polimer ten jest podatny na autooksydację potęgowaną przez światło, temperaturę czy jony metali przejściowych [31]. Aktywacja układu dopełniacza może mieć związek z użyciem materiału, który wcześniej był długotrwale przechowywany lub poddany nawet krótkotrwale ekspozycji na promieniowanie UV [31]. Dodatkowo ze względu na częstsze występowanie związków pokrytych PEG w lekach, kosmetykach i przetworzonych produktach żywnościowych zaobserwowano w ostatnich latach znaczny wzrost występowania przeciwciał PEG u zdrowych ludzi [36]. Powtarzalne wstrzykiwanie nanostruktur pokrytych poli(glikolem etylenowym) może ponadto powodować, iż układ odpornościowy zacznie wydzielać specyficzne przeciwciała PEG IgM, znacznie obniżają-

ce ich okres półtrwania [6]. W przypadku liposomów opłaszczonych tym polimerem efekt wydłużonej cyrkulacji w krwiobiegu zanika przy kolejnych podaniach, właśnie ze względu na wytwarzanie przeciwciał. Zjawisko ABC (*accelerated blood clearance*) nie jest jednak uniwersalne, a rodzaj przenoszonego ładunku oraz zawartość lipidów w pokrytych PEG liposomach ma również związek z indukowaniem przez nie produkcji anty-PEG IgM [32]. Badanie interakcji między ludzkim osoczem a pokrytymi poliglikolem nanocząstkami lipidowymi pokazało, iż zwiększanie długości łańcuchów PEG ogranicza całkowitą adsorpcję białek i powinowactwo powierzchni nanocząstek do apolipoprotein, ale niestety zwiększa też monotonicznie jej względne powinowactwo do białek dopełniacza i opsonin Ig [35].

Nanocząstki modyfikowane PEG w zastosowaniach biomedycznych

Pokrycie nanocząstek poli(glikolem etylenowym) zapewnia im wiele właściwości, które są niezbędne w przypadku wykorzystania tych struktur w aplikacjach biomedycznych. Powierzchnie pokryte PEG są biokompatybilne, charakteryzują się nieimmunogennością i odpornością na przywieranie białek [25, 26]. Polimer tworzy hydrofilowe ochronne pokrycie wokół nanocząstek, ograniczając ich interakcje z komórkami [15]. Dodatkowo poprawia też stabilność cząstek, wydłuża czas ich cyrkulacji w krwiobiegu [37], a w przypadku dołączonych do nanocząstek leków zwiększa okres ich półtrwania i przedłuża działanie [1].

Pożądanne właściwości pokrycia uzyskuje się, używając zmodyfikowanych struktur polimeru, np. rozgałęzionych zamiast liniowych albo zastosowanie zawierających PEG kopolimerów blokowych [32]. Dla przykładu superparamagnetyczne nanocząstki magnetytu można pokrywać kopolimerem PEG-PPSu, w którym poli(bursztynian propylenu) jest miękkim poliestrem o dużym stopniu biodegradowalności, idealnym do tworzenia przenośników leków [2]. Można także mieszać poli(glikol etylenowy) z chitozanem, by otrzymać pokrycie o optymalnych właściwościach. Należy jednak pamiętać, iż niebagatelną rolę odgrywają tu proporcje, w jakich łączy się oba polimery, gdyż np. duża ilość PEG redukuje dodatni ładunek chitozanu [9]. Dla nanocząstek, których pokrycie stanowi kombinacja chitozanu i poliglikolu obserwuje się znacznie wydłużony czas krążenia, ograniczony wychwyt przez makrofagi i tylko niewielką sekwestrację w wątrobie w porównaniu do nanocząstek niepokrytych bądź opłaszczonych samym chitozanem [27].

Generalnie powłoki z poli(glikolu etylenowego) są stosowane w różnych systemach dostarczania aktywnych składników farmaceutycznych, np. peptydów, białek czy genów [32].

Poliglikol okazał się przydatny do modyfikacji powierzchni znakowanych fluorescencyjnie nanocząsteczkowych sond do wykrywania miRNA [38]. Tworzące sondę nici DNA były unieruchamiane na wierzchu powłoki pasywnej z PEG, która otaczała nanocząstki złota. Warto dodać, iż niekodujące mikroRNA pełni funkcję czynnika regulacyjnego w wielu procesach biologicznych przez represję translacji mRNA [38].

Umieszczenie leku w otoczonego PEG nośniku pozwala na ochronę jego aktywnej postaci, wydłuża czas cyrkulacji, zapewnia stabilność koloidalną i umożliwia przedłużone, kontrolowane uwalnianie terapeutycznego, co udowodniono na przykładzie ibuprofenu sodowego – niesteroidowego leku przeciwzapalnego [33].

Poliglikolem pokrywa się nawet niezwykle małe (o średnicy 1,7 nm) superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, które mogą migrować przez ściany naczyń włosowatych [28]. Ciekawy wydaje się eksperyment, w którym nanocząstki opłaszczone PEG o wielkości 10 nm domieszkowano radioaktywnymi jonami $^{153}\text{Sm}^{3+}$, by ocenić ich dynamiczną biodystrybucję u szczurów metodą SPECT-CT [39]. Dowiedziono, iż pokryte polimerem nanocząstki wykazują długi czas retencji we krwi, co umożliwia ich potencjalne zastosowania w terapii celowanej, a następnie są albo wychwytywane i gromadzone przez wątrobę czy śledzionę albo wydalone przez drogi moczowe lub usuwane wolniej wraz z kałem [39]. Aby eliminowanie z organizmu polimerów było sprawne, ich podstawowe jednostki powinny być biodegradowalne bądź też mniejsze niż wielkość progu wydalania nerkowego (< 40 kg/mol) [40].

Z medycznego punktu widzenia ciekawe wydaje się, iż modyfikacja nanocząstek PEG w odmienny sposób wpływa na ich interakcje z różnymi typami komórek. Dowiedziono, iż opłaszczenie nanocząstek tlenku żelaza tym polimerem znacznie ogranicza ich wylapywanie przez makrofagi, znacznie zwiększa natomiast wychwyt przez ludzkie komórki raka piersi BT-20 [26]. Odkrycie to jest obiecujące w kontekście terapii celowanej nowotworów, jednak najpewniejszym sposobem na precyzyjne dostarczenie leku do określonego miejsca docelowego pozostaje dołączenie do nanocząsteczkowych nośników ligandów kierujących. Zwykle przyłącza się je właśnie do dystalnego końca PEG [6]. Wciąż są rozwijane nowe, wydajne techniki pokrywania nanocząstek poli(glikolem etylenowym). Pozwalają one na kontrolowanie gęstości funkcjonalnych łańcuchów tego polimeru i tym samym ilości przyłączanego ligandu celującego [34]. Pokryte amfifilowym poliglikolem nanocząstki mogą być skutecznym i bezpiecznym nośnikiem chemioterapeutyków, co daje nadzieję na ograniczenie efektów ubocznych przez ograniczenie dawki całkowitej i skoncentrowanie działania leku przeciwnowotworowego [37]. Z myślą o terapii raka trzustki stworzono stabilne i biologicznie aktywne systemy dostarczania gemcytabiny oparte na nanocząstkach PLGA-PEG z dołączonym kowalencyjnie przeciwciałem monoklo-

nalnym celującym w receptor nabłonkowego czynnika wzrostu [41]. Odpowiednio opłaszczzone nanocząstki testowano też jako przenośniki hydrofobowego paklitakselu [2, 27, 42, 43]. Przy takim zastosowaniu oprócz skutecznego i bezpiecznego transportu leku do miejsca docelowego niezwykle ważne jest jego uwalnianie. Na proces ten wpływa wiele czynników, np. masa molowa, temperatura topnienia i tempo degradacji polimeru, jego powinowactwo wiązania leku, rozmiar nanocząstek użytych jako nośnik itp. [2].

Uwalnianie paklitakselu z nanocząstek TiO_2 , które zostały pokryte poliglikolem i dodatkowo zmodyfikowane kwasem foliowym (by celować w występujące w dużych ilościach na komórkach nowotworowych receptory folianowe), jest wyraźnie dwuetapowe: po początkowej fazie szybkiego uwalniania następuje dalsze stopniowe i kontrolowane oddawanie leku przez kilkadziesiąt godzin [42]. Zmodyfikowanie powierzchni nanocząsteczkowego nośnika równocześnie poliglikolem i chitozanem powoduje przedłużenie uwalniania z niego paklitakselu i w konsekwencji przekłada się na większą skuteczność w zwalczaniu nowotworu przez wzmożoną cytotoksyczność w stosunku do komórek rakowych [27]. W przypadku nośnika pokrytego kopolimerem PEG-PPSu tempo oddawania leku jest również wydłużone, jednak początkowe uwalnianie zmniejsza się dodatkowo wraz ze wzrostem masy molowej bloków poliestru PPSu w kopolimerze [2].

Podsumowanie

Znakomite właściwości chitozanu: biokompatybilność, bioaktywność czy biodegradowalność sprawiają, iż jest on powszechnie stosowany do pokrywania nanostruktur. Polimer ten jest dobry do stabilizacji nano-

cząstek, stanowi też rusztowanie pozwalające dołączyć do nich leki i ligandy kierujące, które w przypadku terapii celowanej wiążą się specyficznym z receptorami na określonych komórkach. Chitozanowa otoczka wpływa w istotny sposób na interakcje nanocząsteczkowych nośników z środowiskiem, np. zwiększając zdolność ich przylegania do powierzchni śluzowych. Ze względu na swój kationowy charakter chitozan oddziałuje elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi. Nie wolno jednak zapominać, iż stopień jego deacetylacji wpływa na poziom biodegradowalności, profil cytotoksyczności i zdolność do wzmacniania działania dołączonych leków.

Niezwykle pożądane właściwości ma również poli(glikol etylenowy). Charakteryzuje go duża rozpuszczalność w błonach komórkowych, a pokryte nim nanocząstki wykazują wysoką stabilność koloidalną w roztworach wodnych i w krwiobiegu. PEG nie tylko tłumi agregację nanocząstek, ale przede wszystkim zapobiega ich opsonizacji, osłaniając przed działaniem układu siateczkowo-śródbłonkowego. PEG zapewnia nanocząstkom hydrofilowe ochronne pokrycie, a jego łańcuchy mogą przyjmować różne konformacje w zależności od gęstości szczepienia polimeru na powierzchni. Dzięki ograniczonemu wychwytowi przez makrofagi opłaszczzone polimerem nanocząstki dłużej krążą w krwiobiegu, co jest niezwykle ważne w kontekście dostarczania przenoszonego leku do miejsca docelowego. Chociaż PEG jest uznawany za polimer bezpieczny i biokompatybilny, w pewnych warunkach może wywołać reakcję nadwrażliwości, aktywując układ dopełniacza.

Intensyfikacja badań naukowych nad zastosowaniem pokryć z poliglikolu, chitozanu czy też innych polimerów na nich bazujących daje nadzieję na coraz skuteczniejsze wykorzystywanie nanocząstek w aplikacjach biomedycznych.

Piśmiennictwo

- [1] Naahidi S., Jafari M., Edalat F., Raymond K., Khademhosseini A., Chen P.: Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* 2013, 166, 182–194.
- [2] Filippousi M., Papadimitriou S.A., Bikiaris D.N., Pavlidou E., Angelakeris M., Zamboulis D., Tian H., Van Tendeloo G.: Novel core-shell magnetic nanoparticles for Taxol encapsulation in biodegradable and biocompatible block copolymers: Preparation, characterization and release properties. *Int. J. Pharm.* 2013, 448, 221–230.
- [3] Rodrigues S., Dionisio M., López C.R., Grenha A.: Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* 2012, 3, 615–641.
- [4] Tan W.B., Zhang Y.: Surface modification of gold and quantum dot nanoparticles with chitosan for bioapplications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2005, 75, 56–62.
- [5] Sahay G., Alakhova D.Y., Kabanov A.V.: Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* 2010, 145, 182–195.
- [6] Li S.D., Huang L.: Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. *J. Control. Release* 2010, 145, 178–181.
- [7] Köseoglu Y., Yildiz F., Kim D.K., Muhammed M., Aktas B.: EPR studies on Na-oleate coated Fe_3O_4 nanoparticles. *Phys. Stat. Sol. (C)*. 2004, 1, 3511–3515.
- [8] Huang M., Khor E., Lim L.Y.: Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharm. Res.* 2004, 21, 344–353.
- [9] Zhang M., Li X.H., Gong Y.D., Zhao N.M., Zhang X.F.: Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials* 2002, 23, 2641–2648.
- [10] Majeti N.V., Kumar R.: A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 2000, 46, 1–27.

- [11] Molinaro G., Leroux J.C., Damas J., Adam A.: Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials* 2002, 23, 2717–2722.
- [12] Schipper N.G.M., Varum K.M., Artursson P.: Chitosans as Absorption Enhancers for Poorly Absorbable Drugs. 1: Influence of Molecular Weight and Degree of Acetylation on Drug Transport Across Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. *Pharm. Res.* 1996, 13, 1686–1692.
- [13] Vauthier C., Zandanel C., Ramon A.L.: Chitosan-based nanoparticles for in vivo delivery of interfering agents including siRNA. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2013, 18, 406–418.
- [14] Shi S.F., Jia J.F., Guo X.K., Zhao Y.P., Chen D.S., Guo Y.Y., Cheng T., Zhang X.L.: Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells. *Int. J. Nanomedicine* 2012, 7, 5593–5602.
- [15] Boca S.C., Potara M., Gabudean A.M., Juhem A., Baldeck P.L., Astilean S.: Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. *Cancer Lett.* 2011, 311, 131–140.
- [16] Ma Z., Lim L.Y.: Uptake of Chitosan and Associated Insulin in Caco-2 Cell monolayers: A Comparison Between Chitosan Molecules and Chitosan Nanoparticles. *Pharm. Res.* 2003, 20, 1812–1819.
- [17] Nam H.Y., Kwon S.M., Chung H., Lee S., Kwon S.H., Jeon H., Kim Y., Park J.H., Kim J., Her S., Oh Y.K., Kwon I.C., Kim K., Jeong S.Y.: Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J. Control. Release* 2009, 135, 259–267.
- [18] Chuah L.H., Roberts C.J., Billa N., Abdullah S., Rosli R.: Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids Surf. B.* 2014, 116, 228–236.
- [19] Martins M.L., Saeki M.J., Telling M.T.F., Parra J.P.R., Landsgesell S., Smith R.I., Bordallo H.N.: Development and characterization of a new bio-nanocomposite (bio-NCP) for diagnosis and treatment of breast cancer. *J. Alloy Comp.* 2014, 584, 514–519.
- [20] Vivek R., Nipun Babu V., Thangam R., Subramanian K.S., Kannana S.: pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells. *Colloids Surf. B.* 2013, 111, 117–123.
- [21] Vivek R., Thangam R., Nipun Babu V., Ponraj T., Kannan S.: Oxaliplatin-chitosan nanoparticles induced intrinsic apoptotic signaling pathway: A “smart” drug delivery system to breast cancer cell therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014, 65, 289–297.
- [22] Kofuji K., Qian C., Nishimura M., Sugiyama I., Murata Y., Kawashima S.: Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *Eur. Polym. J.* 2005, 41, 2784–2791.
- [23] Zhang H., Neau S.H.: *In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials* 2002, 23, 2761–2766.
- [24] Henning T.: Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry. *Pharma Chem.* 2002, 1, 57–59.
- [25] Alcantar N.A., Aydil E.S., Israelachvili J.N.: Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Inc. J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 51, 343–351.
- [26] Zhang Y., Kohler N., Zhang M.: Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* 2002, 23, 1553–1561.
- [27] Parveen S., Sahoo S.K.: Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 670, 372–383.
- [28] Park J.Y., Daksha P., Lee G.H., Woo S., Chang Y.: Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications. *Nanotechnology* 2008, 19, 365–603.
- [29] Mondini S., Drago C., Ferretti A.M., Puglisi A., Ponti A.: Colloidal stability of iron oxide nanocrystals coated with a PEG-based tetra-catechol surfactant. *Nanotechnology* 2013, 24, 105702.
- [30] Lei P., Girshick S.L.: PEGylation of gold-decorated silica nanoparticles in the aerosol phase. *Nanotechnology* 2013, 24, 335602.
- [31] Arima Y., Toda M., Iwata H.: Complement activation on surfaces modified with ethylene glycol units. *Biomaterials* 2008, 29, 551–560.
- [32] Park K.: To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question. *J. Control. Release* 2010, 142, 147–148.
- [33] Narayanan D., Geena M.G., Lakshmi H., Koyakutty M., Nair S., Menon D.: Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An *in vitro* and *in vivo* analysis. *Nanomedicine* 2013, 9, 818–828.
- [34] Chen H., Paholak H., Ito M., Sansanaphongpricha K., Qian W., Che Y., Sun D.: Living PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities. *Nanotechnology* 2013, 24, 355101.
- [35] Pozzi D., Colapicchioni V., Caracciolo G., Piovesana S., Capriotti A.L., Palchetti S., De Grossi S., Riccioli A., Ameni-tschf H., Lagana A.: Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells. *Nanoscale* 2014, 6, 2782–2792.
- [36] Lehner R., Wang X., Marsch S., Hunziker P.: Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine* 2013, 9, 742–757.
- [37] Chao X., Guo L., Zhao Y., Hua K., Peng M., Chen C., Cui Y.: PEG-modified GoldMag nanoparticles (PGMNs) combined with the magnetic field for local drug delivery. *J. Drug Target.* 2011, 19, 161–170.
- [38] Degliangeli F., Kshirsagar P., Brunetti V., Pompa P.P., Fiammengo R.: Absolute and Direct MicroRNA Quantification Using DNA-Gold Nanoparticle Probes. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 2264–2267.
- [39] Cao T., Yang Y., Sun Y., Wu Y., Gao Y., Feng W., Li F.: Biodistribution of sub-10 nm PEG-modified radioactive/upconversion nanoparticles. *Biomaterials* 2013, 34, 7127–7134.

- [40] **Iyer A.K., Khaled G., Fang J., Maeda H.:** Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* 2006, 11, 812–818.
- [41] **Aggarwal S., Gupta S., Pabla D., Murthy R.S.R.:** Gemcitabine-loaded PLGA-PEG immunonanoparticles for targeted chemotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Nano.* 2013, 4, 145–157.
- [42] **Devanand Venkatasubbu G., Ramasamy S., Ramakrishnan V., Kumar J.:** Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Adv. Powder Technol.* 2013, 24, 947–954.
- [43] **Ding Y., Zhou Y.Y., Chen H., Geng D.D., Wu D.Y., Hong J., Shen W.B., Hang T.J., Zhang C.:** The performance of thiol-terminated PEG-paclitaxel-conjugated gold nanoparticles. *Biomaterials* 2013, 34, 10217–10227.

Adres do korespondencji:

Tomasz Kubiak
Zakład Fizyki Medycznej
Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Umultowska 85
61-614 Poznań
Polska
e-mail: tomebiofizyk@wp.pl

Konflikt interesów: nie występuje

Praca wpłynęła do Redakcji: 4.01.2014 r.

Po recenzji: 9.04.2014 r.

Zaakceptowano do druku: 9.04.2014 r.

Received: 4.01.2014

Revised: 9.04.2014

Accepted: 9.04.2014