

УДК 535.37:577.336/616-006

Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей

Т. А. Здобнова*, Е. Н. Лебедеенко, С. М. Деев

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: t.zdobnova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Квантовые точки – это относительно новый класс флуорофоров с уникальными физико-химическими свойствами, которые позволяют существенно расширить возможности современных методов флуоресцентной визуализации и оптической диагностики. В обзоре рассмотрены перспективы применения квантовых точек для молекулярной диагностики опухолей от определения онкомаркеров на микропланшетах до неинвазивной визуализации новообразований *in vivo*, обозначены проблемы, которые необходимо решить для внедрения квантовых точек в клиническую практику, и намечены инновационные подходы в онкологии, осуществимые с применением квантовых точек.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА квантовые точки, флуоресцентная визуализация, многоцветное мечение, наночастицы. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; ИГХ – иммуногистохимический анализ; ИФА – иммуноферментный анализ; КТ – квантовые точки; МУК – меркаптоуксусная кислота; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РЭС – ретикулоэндотелиальная система; AFP – альфафетопротеин; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; HER2/neu – человеческий эпидермальный рецептор 2/neu; IGF1R – рецептор инсулин-подобного фактора роста типа 1; PSCA – простатический антиген стволовых клеток; PSMA – простатоспецифический мембранный антиген; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела.

ВВЕДЕНИЕ

В современных биомедицинских исследованиях большое внимание уделяется поиску новых путей неинвазивного получения изображений внутренней структуры биологических объектов. Благодаря появлению приборов с высоким пространственным разрешением все большее распространение получают оптические методы изучения, одним из наиболее наглядных и информативных среди которых является флуоресцентная диагностика очагов патологии непосредственно в организме.

Значительная часть разрабатываемых методов направлена на получение изображения новообразований, тканей и органов, исследование молекулярной структуры опухолевых клеток путем регистрации аутофлуоресценции, а также с помощью специфического окрашивания наблюдаемых объектов флуоресцентными контрастирующими агентами. Такие методы могут позволить не только обнаружить место локализации опухоли в организме, но и оценить уровень экспрессии различных белков и активность отдельных клеток и процессов, которые влияют на поведение опухоли и ее ответ на действие терапевтических агентов.

К контрастирующим агентам, используемым в современных методах флуоресцентной диагностики, предъявляются особые требования. Флуорофоры должны иметь следующие свойства: небольшие размеры (1–10 нм); достаточную яркость и высокий квантовый выход; возбуждение и флуоресценцию в спектральном диапазоне, соответствующем наилучшему проникновению в биологические ткани; химическую устойчивость и фотостабильность, биосовместимость (устойчивость в биологических средах, отсутствие токсичности). Кроме того, для биологических исследований часто необходима конъюгация этих флуорофоров с различными направляющими молекулами для их доставки к определенным мишеням (белкам, компартментам, клеткам). Конъюгаты должны обладать специфичностью и стабильностью взаимодействия с мишенью, а также низким уровнем неспецифического связывания.

Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, так называемые квантовые точки (КТ, *англ.* quantum dots), – относительно новый класс флуорофоров, обладающих своеобразными оптическими и физико-химическими свойствами, не харак-

терными для других флуоресцентных красителей. Традиционно для диагностики широко используются два основных класса флуорофоров: органические красители и флуоресцентные белки [1]. За время, прошедшее с начала использования этих флуорофоров в биологии и медицине, они претерпели значительную эволюцию, и к настоящему времени создан целый ряд органических красителей с небольшой молекулярной массой, а также флуоресцентных белков с высокой яркостью, хорошим квантовым выходом, излучающих во всех областях спектра от синего до ближнего инфракрасного (ИК) [2, 3]. Однако некоторые свойства этих флуорофоров, в особенности широкий спектр флуоресценции и низкая устойчивость к фотовыцветанию, до сих пор ограничивают их эффективность в таких видах исследований, как, например, долговременная визуализация и одновременная детекция множества сигналов без использования дополнительного комплекса инструментов и способов обработки [4].

КТ обладают целым рядом физико-химических особенностей, которые дают более широкие возможности по сравнению с традиционно используемыми флуоресцентными метками и делают их особенно привлекательными для использования в самых разнообразных биологических экспериментах [5, 6].

Этот обзор посвящен рассмотрению возможностей применения КТ для изучения молекулярных механизмов процессов, происходящих в опухолевых клетках, а также для диагностики опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*.

1. ОСОБЕННОСТИ КТ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА ПРИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Квантовые точки – это почти сферические нанокристаллы размером 1–10 нм, состоящие из небольшого числа атомов (500–10 000) полупроводниковых материалов II–VI (например, CdSe, CdTe, CdS и ZnSe) или III–V (например, InP и InAs) групп Периодической таблицы Д.И. Менделеева. Термин «точка» характеризует главным образом чрезвычайно малые размеры этих объектов, а прилагательное «квантовый» отражает тот факт, что их поведение и свойства в значительной степени описываются не классической, а квантовой механикой. Уменьшение размера частиц вещества до размера, меньшего, чем боровский радиус экситона (например, для сферических частиц CdSe это диаметр менее 6 нм), приводит к тому, что свойства вещества начинают определяться не только и не столько его химическим составом, сколько размером. Благодаря этому полупроводниковые нанокристаллы обладают уникальными оптическими характеристиками и физико-химическими

свойствами, выгодно отличающими их от других флуорофоров, традиционно используемых в биологических исследованиях [7].

КТ обладают высоким коэффициентом молярной экстинкции (в 10–100 раз больше, чем у органических красителей) и высоким квантовым выходом (до 90%), что обеспечивает исключительную яркость этих флуорофоров. Для КТ характерен широкий спектр поглощения, значительный Stokes shift, узкий и симметричный (без «хвоста» в красной области) спектр флуоресценции (ширина пика ~25–40 нм). При этом длина волны флуоресценции «настраивается» экспериментатором путем изменения размера ядра, что позволяет создавать из одних и тех же материалов, по одним и тем же методикам широкий набор различных КТ, флуоресцирующих в области спектра от УФ до ИК (400–2000 нм) (рис. 1). Кроме того, широкий спектр возбуждения, характерный для этих наночастиц (КТ могут быть возбуждены светом на любой длине волны, меньшей, чем длина волны их флуоресценции), позволяет возбуждать смесь различных КТ на одной длине волны, сильно удаленной (>100 нм) от длин волн их флуоресценции [9]. Такие свойства КТ значительно повышают возможности методов многоцветного мечения и одновременной идентификации различных биологических объектов по сравнению с другими красителями [6].

Высокая устойчивость к фотовыцветанию (в 100–1000 раз выше, чем у органических флуорофоров) и исключительная устойчивость к фото- и химической деградации [7, 10], характерные для флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, позволяют использовать их в длительных экспериментах по визуализации процессов, происходящих в клетке в реальном времени, таких, как эндоцитоз [11] или перемещение отдельных рецепторных молекул на поверхности живой клетки [12], а также для окраски образцов, требующих длительного хранения [13].

Более подробное описание физико-химических свойств КТ, важных для биологического применения, а также сравнение использования КТ и других флуорофоров в биомедицинских исследованиях можно найти в обзорах [4–6].

Физико-химические и оптические свойства, а также особенности КТ напрямую зависят от метода их синтеза. Эта обширная область, которая не является предметом данного обзора, продолжает активно развиваться, расширяя ряд КТ, применимых в биомедицинских исследованиях, и улучшая их свойства (см. обзоры [4, 5]).

В настоящее время в биологии используют два типа водорастворимых монодисперсных КТ: так называемые биоинертные нанокристаллы и нанокристаллы, конъюгированные с различными биологиче-

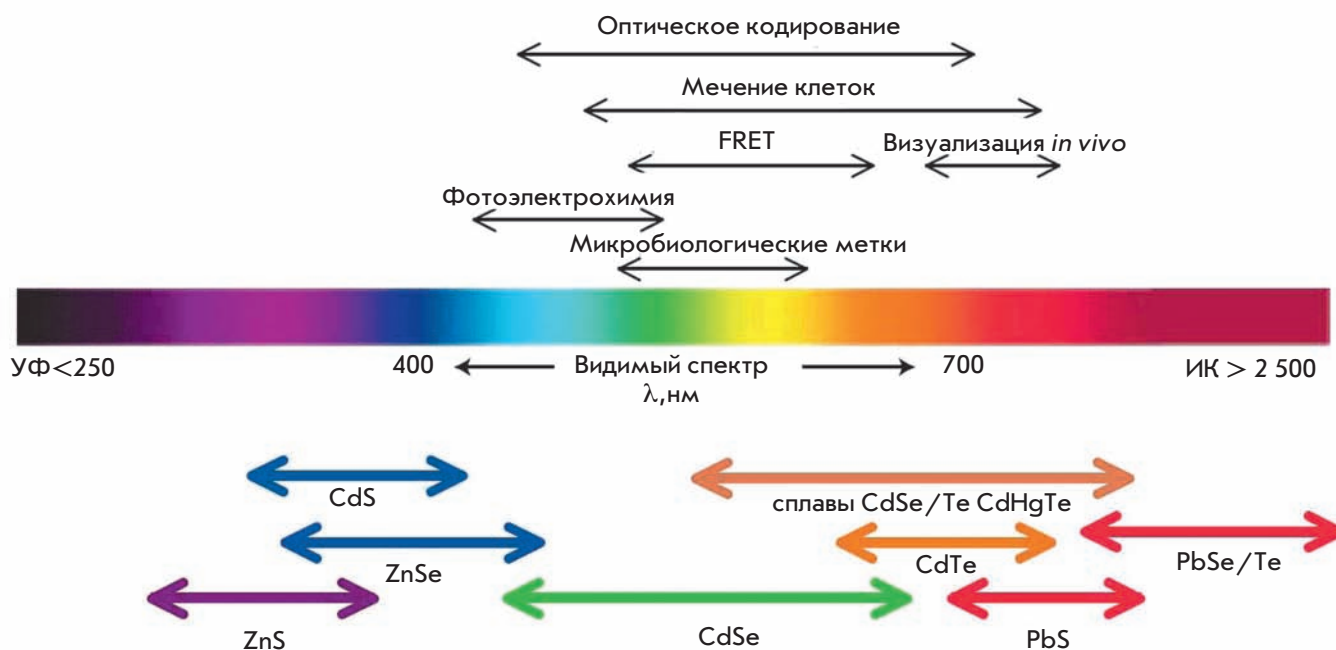


Рис. 1. Зависимость спектра флуоресценции КТ от материала ядра. Над шкалой длин волн показаны диапазоны спектра, используемые в различных биологических исследованиях. Под шкалой показаны диапазоны использования материалов ядра. Адаптировано из [8] (Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. Nat. Mater. 2005 4:435–446) с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature Materials], copyright (2005).

скими молекулами для придания им определенной специфичности.

Биоинертные КТ находят применение как неспецифические контрастирующие агенты для окрашивания клеток за счет эндоцитоза, для контрастирования кровеносных сосудов и лимфатических узлов, а также при изучении биораспределения, токсичности и пассивной доставки наночастиц в опухоли животных *in vivo*. В качестве таких частиц часто используют обычные водорастворимые КТ, модифицированные гидрофильными тиолами [14] и покрытые оболочкой из кремния [15] или из амфифильных полимеров [16]. Для уменьшения неспецифического связывания такие частицы обычно покрывают слоем инертных молекул; производители коммерческих КТ для этих целей обычно используют полиэтиленгликоль (ПЭГ).

2. НАЦЕЛИВАНИЕ КТ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

При использовании КТ в качестве флуорофоров для визуализации опухолей часто необходимо их связывание с различными направляющими молекулами, обеспечивающими селективную доставку КТ к опухолевым клеткам и их компонентам. Специфичность мечения обеспечивается выбором мишени, оптимально подходящей для каждого конкретного случая и соответствующей направляющей молекулы.

В качестве специфических мишеней для диагностики опухолей чаще всего используют рецепторную часть сигнальных белков, гиперэкспрессирующихся на мембране опухолевых клеток. Уровень экспрессии таких клеточных молекулярных онкомаркеров, определяемых непосредственно в опухолевой ткани, характеризует молекулярный профиль каждой конкретной опухоли и используется для определения иммунного статуса опухоли и индивидуализации лекарственного лечения [17].

В качестве направляющего модуля, обеспечивающего селективную доставку КТ к опухолевым клеткам и их компонентам, в зависимости от целей и объектов исследований используют антитела и их фрагменты; лиганды специфических рецепторов, локализующихся на поверхности опухолевых клеток; небольшие специфически взаимодействующие с онкомаркерами молекулы, такие, как пептиды и аптамеры.

2.1 Направляющие агенты

Молекулы иммуноглобулинов (Ig) давно известны и широко используются как эффективные направляющие модули для специфической доставки диагностических и терапевтических агентов как *in vitro* на уровне клеток и тканей, так и на уровне целого организма *in vivo*. Уже в одной из первых работ

по применению КТ для биологических исследований были показаны возможность получения комплексов КТ с молекулами IgG, способность образующихся комплексов связываться со специфичными антигенными поликлональными антителами и формировать преципитаты в растворе [14]. Позже подобные комплексы были использованы для мечения определенных молекул, находящихся в различных компартаментах клетки – на поверхности мембраны, в цитоплазме и ядре [16].

Несмотря на большое распространение полноразмерных антител в диагностических системах *in vitro*, применение их в качестве направляющих агентов *in vivo*, как правило, требует исключения их эффекторных функций и кардинальной модификации физико-химических свойств [18]. Наиболее полно этим требованиям отвечают мини-антитела формата scFv [19, 20]. Эти небольшие фрагменты антител не содержат константного домена, что не влияет на их направляющие свойства, но снижает вероятность возникновения побочных эффектов, вызванных взаимодействием константных доменов с рецепторами клеток иммунной системы и белками системы комплемента [21]. Мини-антитела к поверхностным онкомаркерам активно используют в качестве направляющих модулей для флуоресцентной визуализации опухолевых клеток и доставки к ним терапевтических агентов [22–24].

В лаборатории Nie была показана возможность использования КТ, оснащенных направляющими мини-антителами формата scFv, для визуализации опухолей, в том числе *in vivo*. После внутривенного введения конъюгатов КТ с анти-EGFR-антителом человека формата scFv в организм мыши с привитой опухолью поджелудочной железы человека наблюдалось накопление и эффективная интернализация конъюгатов клетками опухоли [25].

Основным недостатком антител формата scFv в качестве направляющих агентов является их моновалентность, так как моновалентное связывание с антигеном на поверхности клеток не обеспечивает длительного удерживания антитела и приводит к его быстрой диссоциации [26, 27]. В то же время большая площадь поверхности, характерная для КТ, обеспечивает возможность присоединения к каждой такой наночастице нескольких молекул scFv и позволяет создавать своеобразные мультивалентные конструкции с улучшенными свойствами [28].

Для специфичного узнавания некоторых белков с целью визуализации клеток и их компонентов в качестве направляющих молекул используют пептиды [29]. Применение этого подхода к созданию специализированных КТ было впервые показано для коротких генно-инженерных пептидов, специфически узнаю-

щих интегрин, в работах на нейробластоме человека [30]. Позже было доказано, что этот подход можно использовать и для специфического мечения клеток эндотелия легких, эндотелия мозга и карциномы молочной железы человека как *in vitro*, так и в живых клетках [31]. Аргинил-глицил-аспарагиновая кислота (RGD-пептид), узнающая интегрин, зарекомендовала себя хорошим альтернативным направляющим агентом для КТ, флуоресцирующих в ИК-диапазоне, при визуализации различных опухолей в организме мыши *in vivo* [32].

Еще одним перспективным направляющим агентом для доставки КТ к опухолевым клеткам являются аптамеры – специально сконструированные олигонуклеотиды, способные узнавать некоторые белки и компоненты клетки и с высокой специфичностью связываться с ними. Различные конъюгаты на основе аптамеров успешно используются для имиджинга и распознавания клеток, детекции биомаркеров и т. д. [33]. Конъюгаты КТ с аптамером, специфичным к опухолевому маркеру PSMA, избирательно окрашивали фиксированные и живые клетки опухоли простаты линии LNCaP и те же клетки в модельной среде коллагенового матрикса [34]. Было показано, что использование аптамеров в качестве направляющего агента для визуализации клеток опухоли простаты с помощью КТ так же эффективно, как использование конъюгатов КТ с анти-PSMA-антителами, но значительно дешевле [35]. Конъюгаты КТ с аптамерами можно использовать параллельно с другими направляющими агентами, такими, как пептиды, для одновременной визуализации нескольких онкомаркеров [36]. Кроме того, получение биотинилированных аптамеров, которые могут связываться с любыми КТ, конъюгированными со стрептавидином, обеспечивает создание универсальных реагентов для двухстадийной доставки КТ к опухолевым клеткам [33].

2.2 Методы присоединения направляющих агентов к КТ

На сегодняшний день применяют два основных подхода к присоединению направляющих молекул к КТ: непосредственное связывание (как правило, ковалентное) белковых молекул с активными группами на поверхности КТ и присоединение с помощью адапторов (рис. 2).

Белковые молекулы обычно присоединяют непосредственно к полупроводниковой части нанокристалла (через SH-группу либо металл-аффинной координацией гистидиновых остатков с атомами цинка оболочки нанокристаллов) или к ее гидрофильному покрытию (конъюгацией по карбоксильным, аминным и тиоловым группам с использованием специальных катализаторов; через электростатическое

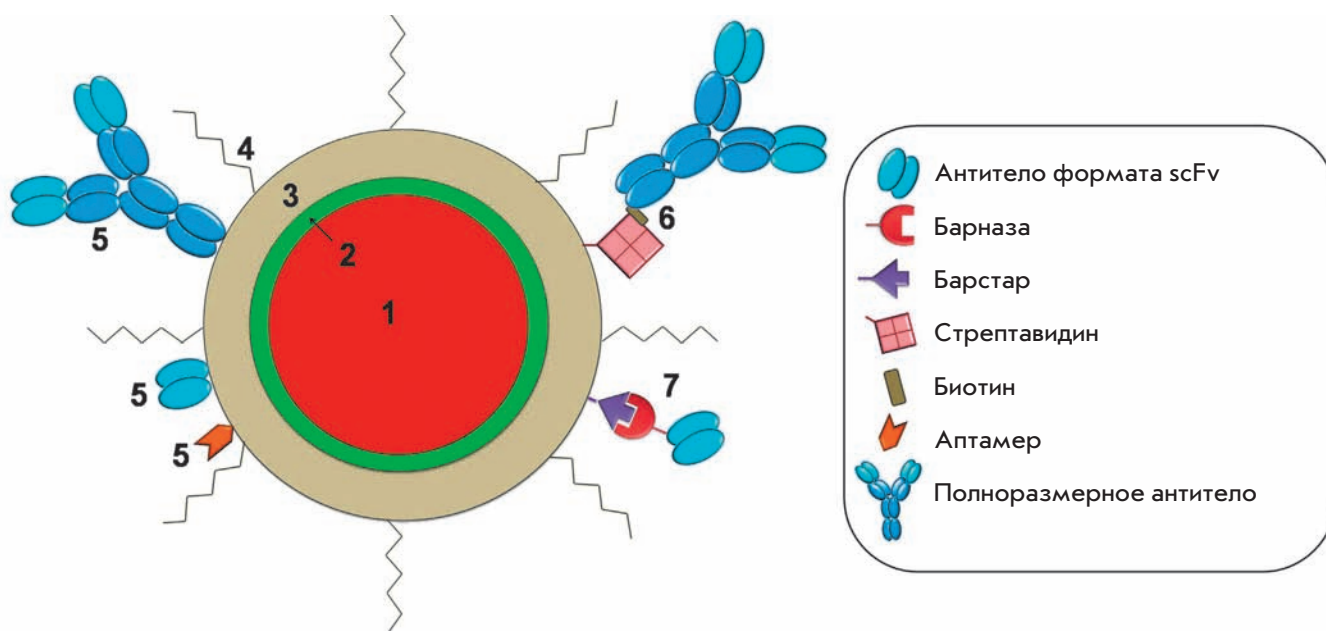


Рис. 2. Схема строения современной квантовой точки для биомедицинских исследований. 1 – флуоресцентное ядро (обычно, CdSe или CdTe); 2 – защитная оболочка (обычно, ZnS); 3 – полимерное покрытие, обеспечивающее водорастворимость КТ и возможность присоединения биологически активных молекул; 4 – молекулы ПЭГ, 5 – направляющие молекулы, присоединенные напрямую и через системы адапторов биотин-стрептавидин (6) или барназа-барстар (7).

взаимодействии). Подробно эти методы описаны в обзорах [5, 37].

Площадь поверхности нанокристаллов достаточно велика и доступна для связывания на ней нескольких биологических молекул. От 2 до 5 белковых молекул и более 50 небольших молекул (олигонуклеотидов или пептидов) могут быть связаны с одной наночастицей диаметром 4 нм [38]. Следует отметить, что реакционная способность некоторых типов биологических молекул после прямой конъюгации с нанокристаллами может существенно изменяться. В частности, антитела при конъюгации хотя и сохраняют свою специфичность, но их аффинность заметно уменьшается [39]. Кроме того, прямая конъюгация КТ с антителами требует проверки активности антитела в каждом новом конъюгате.

Более перспективным подходом к связыванию КТ с антителами представляется использование так называемых самособирающихся адапторов – небольших «липких» молекул, с высокой эффективностью и специфичностью связывающихся друг с другом, но не образующих гомодимеров. Образование комплексов с этими небольшими молекулами не влияет существенно на аффинность антител и, кроме того, дает возможность простого получения разнообразных сочетаний антител разной специфичности с КТ, флуоресцирующими в разном диапазоне, без каких-

либо дополнительных модификаций. В качестве адапторных молекул для связывания КТ с антителами используют гетеродимеризационные модули, разработанные ранее для создания генно-инженерных биспецифических и мультивалентных антител, а также для двухстадийной доставки терапевтических агентов к опухоли.

Наиболее известной и широко используемой среди таких модулей с высокой аффинностью связывания ($K_a \sim 10^{-14} - 10^{-15} \text{ M}$) является стрептавидин-биотиновая система [40]. К КТ ковалентно или через электростатические взаимодействия присоединяют стрептавидин, что позволяет им связываться с биотинилированными направляющими агентами. Впервые КТ, конъюгированные со стрептавидином, были использованы для визуализации опухолевого маркера HER2/neu на поверхности клеток опухоли молочной железы человека SKBR-3 через биотинилированные античеловеческие вторичные антитела и гуманизированные анти-HER2/neu-антитела [16]. Аналогичную трехступенчатую систему использовали для связывания КТ с фрагментами антител, специфичных к глициновым рецепторам на мембране нейронов, что позволило наблюдать за движением отдельных рецепторов в живых нейронах [41]. Трехступенчатая система на основе аффинной пары биотин-стрептавидин (первичные антитела; биоти-

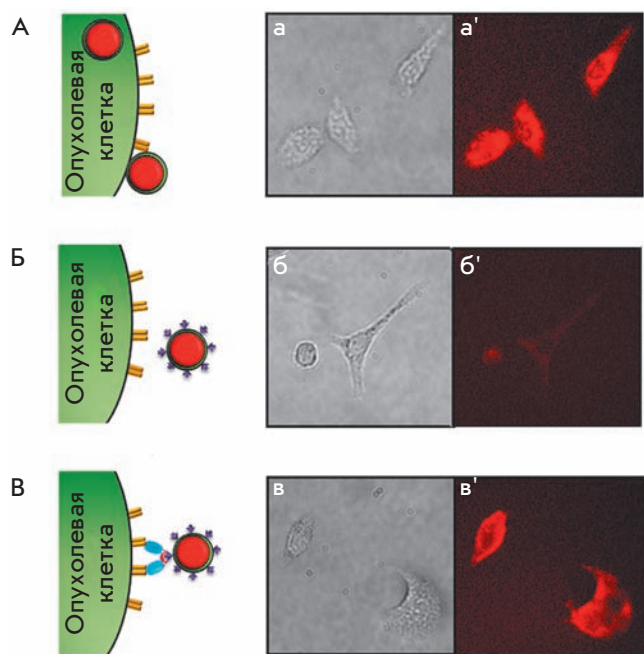


Рис. 3. Неспецифическое и специфическое взаимодействие КТ с опухолевыми клетками. Схема (слева) и результаты (справа) флуоресцентной микроскопии клеток линии SKOV-3 после их инкубации с КТ (А), конъюгатами КТ с барстаром (Б), с димером противоопухолевых антител с барназой, а затем с конъюгатами КТ с барстаром (В). Даны фотографии клеток в видимом свете (а, б, в) и их флуоресцентные изображения (а', б', в'). Обозначения см. на рис. 2.

нилизированные вторичные антитела; квантовые точки, конъюгированные со стрептавидином) позволяет использовать единожды конъюгированные со стрептавидином квантовые точки для визуализации множества различных мишеней без какой-либо дополнительной модификации, поскольку специфичность мечения определяется соответствующими первичными и биотинилированными вторичными антителами.

Число ступеней в процессе мечения можно сократить до двух, используя первичные антитела, связывающиеся с КТ через биотин-стрептавидиновый мостик [11]. Этот подход используется не только для антител, но и для других направляющих агентов. Так КТ, конъюгированные с интегрин-узнающим пептидом через биотин-стрептавидиновый модуль, были успешно использованы для мечения α ν-субъединицы интегрина в клетках нейробластомы человека SK-N-SH [27].

Благодаря своей универсальности стрептавидин-биотиновая система получила широкое распространение для некоторых типов иммунодиагностических

исследований с использованием КТ. В настоящее время КТ, конъюгированные со стрептавидином, и биотинилированные антитела коммерчески доступны (см., например, www.invitrogen.com). В то же время применение этой системы для создания направленных флуорофоров для визуализации опухолей в организме человека *in vivo* ограничено присутствием большого количества эндогенного биотина, который может конкурировать с биотинилированными компонентами, снижая эффективность мечения.

Нами предложено для получения конъюгатов КТ с антителами использовать адапторный модуль барназа-барстар, хорошо зарекомендовавший себя при получении гетеродимерных мини-антител и их флуоресцентных производных [26, 42, 43]. Этот адапторный модуль основан на свойстве рибонуклеазы барназы из *Bacillus amyloliquefaciens* образовывать очень прочный комплекс ($K_d \sim 10^{-14}$ М) со своим природным белковым ингибитором барстаром [26].

Благодаря тому, что область связывания барназы и барстара не включает их N- и C-концевые участки, каждый из этих белков можно легко объединить генно-инженерными методами в одну полипептидную цепь с scFv-фрагментами антител. При этом сохраняется эффективность связывания компонентов модуля. Небольшие размеры барназы и барстара (110 и 89 а.о. соответственно), стабильность, хорошая растворимость и устойчивость к протеазам позволяют нарабатывать сконструированные химерные белки в достаточном количестве в бактериальных продуцентах. Кроме того, барназа в составе рекомбинантных белков играет роль внутримолекулярного шаперона, обеспечивая правильное сворачивание сложных неприродных белков, что особенно важно при создании конструкций с направляющими антителами [44].

Небольшие размеры и чрезвычайная стабильность в широком диапазоне условий позволяют легко конъюгировать как барназу, так и барстар с активными группами на поверхности КТ. Было обнаружено также, что конъюгация КТ с барстаром значительно уменьшает неспецифическое связывание КТ с мембраной клетки. Так, флуоресцентные нанокристаллы, которые обычно неспецифически налипают на клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и проникают внутрь (рис. 3, А), после конъюгации с барстаром становятся практически нейтральными по отношению к этим клеткам (рис. 3, Б). В то же время барстар на поверхности КТ дает возможность с помощью адапторной системы барназа-барстар дополнительно оснастить их направляющими антителами и обеспечить эффективное и специфичное мечение раковых клеток (рис. 3, В).

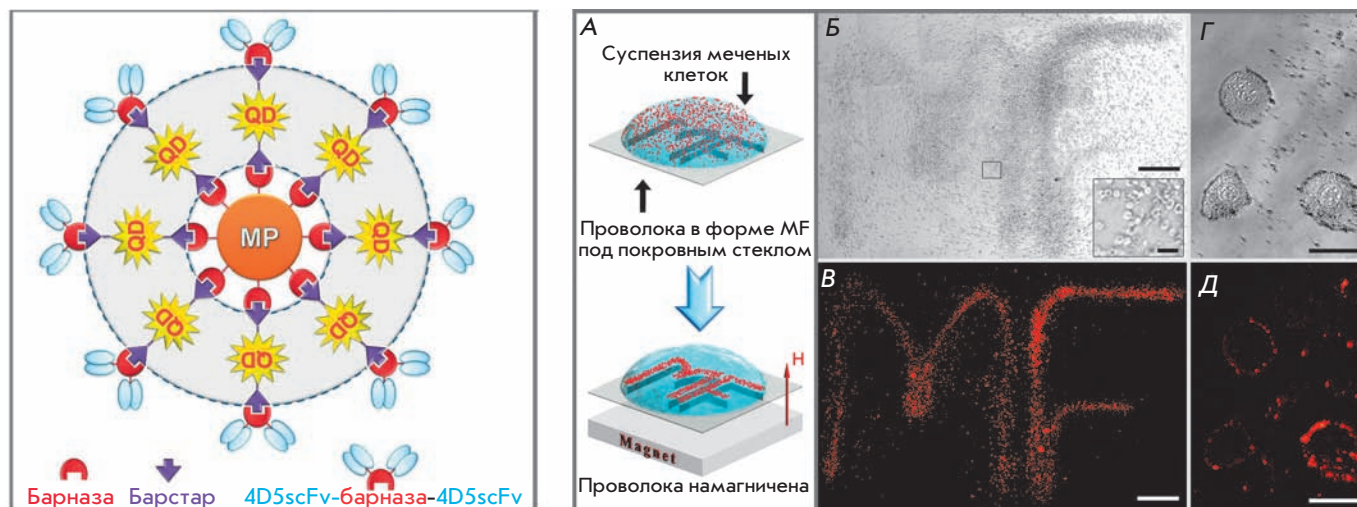


Рис. 4. Мультифункциональные наноконструкции на основе КТ, магнитных частиц и противоопухолевых мини-антител, собранные с помощью адапторной системы барназа-барстар. Схема строения наноконструкции (слева) и доказательство мультифункциональности (справа). Опухолевые клетки SKOV-3, меченные наноконструкциями, выстраиваются вдоль намагниченной проволоки в форме букв MF (А). Приведены фотографии в видимом свете (Б – увеличение 100х и Г – отдельные клетки) и флуоресцентные изображения (В – увеличение 100х и Д – отдельные клетки). QD – квантовые точки, MP – магнитные частицы. Адаптировано из [28] (Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010 107:5827–5832) с разрешения National Academy of Sciences of the United States of America: [Proc. Natl. Acad. Sci. USA], copyright (2010).

Важное преимущество модуля барназа-барстар – точное соотношение 1 : 1 компонентов в комплексе и полное отсутствие их самоагрегации, а также высокая аффинность взаимодействия, превосходящая значения всех других димеризационных систем, за исключением стрептавидин-биотиновой. В отличие от стрептавидин-биотиновой системы, использование системы барназа-барстар основано на генно-инженерных технологиях и не требует никаких ковалентных модификаций антител.

Адапторная система барназа-барстар была успешно использована нами для создания флуоресцентных комплексов для визуализации опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu, на основе антител 4D5scFv и КТ двух типов: 1) модифицированных меркаптоуксусной кислотой; 2) покрытых полимерной оболочкой [45, 46]. В обоих случаях наблюдали эффективное и избирательное окрашивание мембран после инкубации клеток аденокарциномы молочной железы и аденокарциномы яичника человека с полученным флуоресцентным комплексом.

Более того, было показано, что КТ, оснащенные с помощью адапторов направляющими антителами, могут быть присоединены к молекулам или наночастицам другой природы и, таким образом, представляют собой компоненты «молекулярного кон-

структора» [43]. Реализуя идею такого конструктора, мы создали на основе адапторного модуля барназа-барстар самособирающиеся мультимодальные конструкции с использованием КТ и магнитных частиц. Полученные флуоресцентно-магнитные наночастицы оснащены гуманизированными мини-антителами к онкомаркеру HER2/neu и способны эффективно и избирательно метить соответствующие опухолевые клетки [28]. В результате флуоресцентно-меченные опухолевые клетки приобретают свойство магнитоуправляемости (рис. 4).

2.3 Проблема неспецифического связывания КТ

Существенным препятствием для избирательного мечения биологических объектов с помощью флуоресцентных меток на основе КТ является их тенденция к «налипанию», т.е. неспецифическому связыванию с мембраной клетки, белками и составляющими внеклеточного матрикса, а также их неконтролируемое проникновение внутрь клеток. Например, показано, что частицы с сильным отрицательным или положительным зарядом, содержащие на поверхности карбоксильные или аминогруппы соответственно, имеют высокий уровень неспецифического связывания с клетками и тканями [47, 48]. Причиной такого неспецифического связывания может быть электростатическое взаимодействие между заряженными

группами на поверхности КТ и заряженными участками белков и других молекул на поверхности клеток.

Другой причиной неспецифического связывания КТ с поверхностью клеток может являться гидрофобное взаимодействие между липидами клеточной мембраны и молекулами стабилизатора (например, три-*n*-октилфосфина или олеат-аниона), остающегося на поверхности КТ после их синтеза, из-за неполного покрытия ядра наночастицы лигандом, обеспечивающим гидрофильность, или же из-за неустойчивого связывания этого лиганда. Так, показано, что КТ, в которых использованы цистеин, МУК, дигидролипоевая и другие меркаптокарбоновые кислоты, которые известны своей динамической и неустойчивой связью Zn-S, проявляют наиболее высокий уровень неспецифического связывания [47].

Установлено, что уровень неспецифического связывания сильно зависит от типа клеток [47, 49], что может объясняться различным содержанием заряженных и гидрофобных областей на мембране тех или иных клеток.

Для уменьшения неспецифического связывания КТ дополнительно покрывают слоем инертных молекул. Одним из таких веществ, широко используемым в настоящее время, является ПЭГ – нетоксичный гидрофильный полимер, который обычно применяется для увеличения биосовместимости лекарств [48]. Модифицированные ПЭГ квантовые точки имеют поверхностный заряд, близкий к нейтральному, и коллоидно стабильны в различных экспериментальных условиях. Кроме того, ПЭГ снижает способность КТ взаимодействовать с поверхностью клеток или с белками внеклеточного матрикса, т.е. приводит к пассивированию поверхности КТ [50].

Следует отметить, что, несмотря на успешное применение КТ, покрытых ПЭГ, для экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, для некоторых целей такой модификации оказывается недостаточно. Кроме того, покрытые ПЭГ частицы обладают значительно большим гидродинамическим диаметром, что затрудняет их доступ к биологическим мишеням [51].

Чтобы минимизировать неспецифическое связывание КТ, не увеличивая их размера, был предложен метод покрытия нанокристаллов нейтральной гидроксильной оболочкой [52]. Гидродинамический диаметр полученных нанокристаллов составляет 13–14 нм, что на 50% меньше размера нанокристаллов, модифицированных ПЭГ. При использовании полученных комплексов для визуализации клеток HeLa наблюдалось уменьшение уровня неспецифического связывания в 140 раз по сравнению с нанокристаллами с карбоксильными группами на поверхности и в 20 раз по сравнению с биотинилированными КТ.

Для направленной доставки таких нанокристаллов необходимо оснащать их нацеливающими молекулами, что ведет к частичной потере материала и уменьшению выхода конечного продукта. В то же время вполне реально уменьшить неспецифическое налипание КТ на мембрану клетки и одновременно обеспечить специфическое связывание наночастицы с определенными рецепторами, экспрессирующимися на поверхности опухолевой клетки. Было отмечено, что некоторые небольшие нейтральные молекулы, такие, как пептиды или маленькие белки, способны уменьшать неспецифическое связывание КТ [52]. Нами было показано, что этим свойством обладает также компонент адапторной системы – барстар (см. выше раздел 2.2, рис. 3).

3. ДИАГНОСТИКА *in vitro*

Одной из наиболее перспективных и быстро развивающихся областей применения КТ является их использование в качестве флуоресцентных меток при изучении опухолевых клеток *in vitro*: для визуализации опухолевых клеток и для определения местонахождения отдельных молекул, экспрессирующихся в них. Уникальные свойства КТ, дающие возможность многоцветного мечения и наблюдения флуоресценции объектов в течение длительного времени, позволяют существенно расширить границы традиционных методов, используемых в этой области. На сегодняшний день из всех вариантов биомедицинского использования КТ диагностика *in vitro* – это единственное применение КТ, которое может быть быстро внедрено в клиническую практику (в отличие от применения КТ *in vivo*, требующего длительных исследований токсичности КТ и отдаленных последствий их введения в организм).

Основные работы ведутся в трех направлениях: 1) визуализация опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих определенные онкомаркеры; 2) окрашивание тканей и их срезов; 3) наблюдение в реальном времени за отдельными молекулами и клетками.

3.1 Визуализация опухолевых клеток

Визуализация опухолевых клеток и определение в них отдельных онкомаркеров имеет большое практическое значение. Большинство используемых для визуализации онкомаркеров представляют собой рецепторы, гиперэкспрессирующиеся на поверхностной мембране опухолевых клеток и практически не экспрессирующиеся в нормальных тканях. Высокий уровень экспрессии таких маркеров свидетельствует о наличии опухолевого процесса в организме, а их детекция и количественная оценка важны для ранней диагностики, классификации и терапии опухолей [51].

Буквально в течение нескольких лет после выхода пионерских работ по созданию и использованию биосовместимых КТ [14, 15] сразу несколько групп заявили о возможности использования конъюгатов КТ для визуализации опухолевых клеток. К настоящему времени созданы конъюгаты КТ с различными направляющими агентами (антителами, лигандами, пептидами), предназначенные для визуализации клеток клинически значимых опухолей человека: карциномы простаты [53], аденокарциномы и карциномы протоков молочной железы [21, 54, 55], карциномы поджелудочной железы [56], глиобластомы мозга [32] и плоскоклеточной карциномы языка [57].

Основные усилия исследователей в этом направлении были сосредоточены на оптимизации свойств КТ для их применения в опытах на живых клетках и на уровне целого организма. Преимущественный упор был сделан на хорошую растворимость в водных растворах, биосовместимость и низкую токсичность КТ, а также на оснащение КТ направляющими молекулами, обеспечивающими специфичность мечения. За короткий срок были разработаны достаточно простые, дешевые и хорошо воспроизводимые методы визуализации раковых клеток с помощью КТ для диагностики клинически значимых видов опухолей и прогноза течения заболевания (таблица). Таким образом, создан большой методический задел для внедрения этих методов в клиническую практику и дальнейших исследований *in vivo* с целью визуализации опухолей и их метастазов непосредственно в живом организме.

3.2 Одновременная детекция нескольких онкомаркеров

Как правило, направляющие молекулы (антитела, пептиды, аптамеры и др.), избирательно связывающиеся с поверхностным онкомаркером, обеспечивают высокую специфичность мечения соответствующих опухолевых клеток [17]. В то же время такая особенность опухолевых клеток, как их чрезвычайная изменчивость в процессе развития заболевания и в ответ на воздействие лекарственных агентов, ставит перед исследователями задачу одновременной визуализации сразу нескольких поверхностных онкомаркеров. Для решения этой задачи в силу своих физико-химических свойств КТ подходят как нельзя лучше (см. раздел 1).

Принципиальная возможность использования КТ для одновременной множественной детекции была продемонстрирована на примере пяти опухолевых маркеров в культуре клеток опухоли молочной железы человека. Одновременное выявление рецепторов ER, PR, EGFR, mTOR и HER2/neu с помощью КТ, флуоресцирующих в разных областях спектра, точно коррелирует с результатами традиционных методов,

включая иммуногистохимию, Вестерн-блот и флуоресцентную гибридизацию *in situ*, значительно ускоряя анализ и снижая его стоимость [61].

Одновременная визуализация двух предполагаемых опухолевых маркеров, интегрин $\alpha_v\beta_3$ и нуклеолина, с использованием КТ, конъюгированных с RGD-пептидом и аптамером AS1411 соответственно, позволила сравнить локализацию этих маркеров в клетке [36]. С помощью конфокальной микроскопии были подтверждены интернализация нуклеолина и поверхностное распределение интегрин, что, возможно, позволит уточнить их участие в процессах, происходящих в опухолевых клетках.

Результаты этих работ показывают, что конъюгаты КТ с направляющими молекулами обладают мощным потенциалом в качестве компонентов новых систем для оценки типа опухолей, стадии их прогрессии и метастатического потенциала на основе одновременной визуализации различных опухолевых маркеров и определения их клеточной локализации (*англ.* multiplex imaging).

Фундаментальные исследования онкологических процессов требуют не только детекции гиперэкспрессирующихся в раковых клетках маркеров, но и выявления множества других, часто низкокопийных белков. Современным золотым стандартом для определения низкокопийных белков является иммуноферментный анализ (ИФА), чувствительность которого достигает пикомолярной. Этот метод широко используется, но он довольно трудоемок, недешев, занимает много времени и не дает возможности одновременного определения нескольких белков. Замена органических флуорофоров и цветных реагентов в иммуноферментных исследованиях на КТ сама по себе не обеспечивает значительного преимущества в чувствительности (чувствительность анализа с КТ ~ 100 пмоль) [70], но только применение КТ с разными спектральными характеристиками дает возможность одновременной специфической визуализации нескольких белков. Так, удалось одновременно визуализировать в сэндвич-ИФА четыре токсина, используя четыре разных типа КТ с флуоресценцией в диапазоне 510–610 нм с возбуждением на одной длине волны [70]. К сожалению, пока авторам не удалось осуществить количественную оценку, и для создания хорошего иммунофлуоресцентного многоцветного теста необходима дальнейшая работа. В другой работе были продемонстрированы простота и наглядность одновременной детекции двух белков с двумя различными по цвету КТ в Вестерн-блоте [71]. Нет сомнения в том, что одновременное многоцветное мечение с помощью КТ представляет собой новый мощный метод, который позволит решать не только традиционные, но и принципиально новые

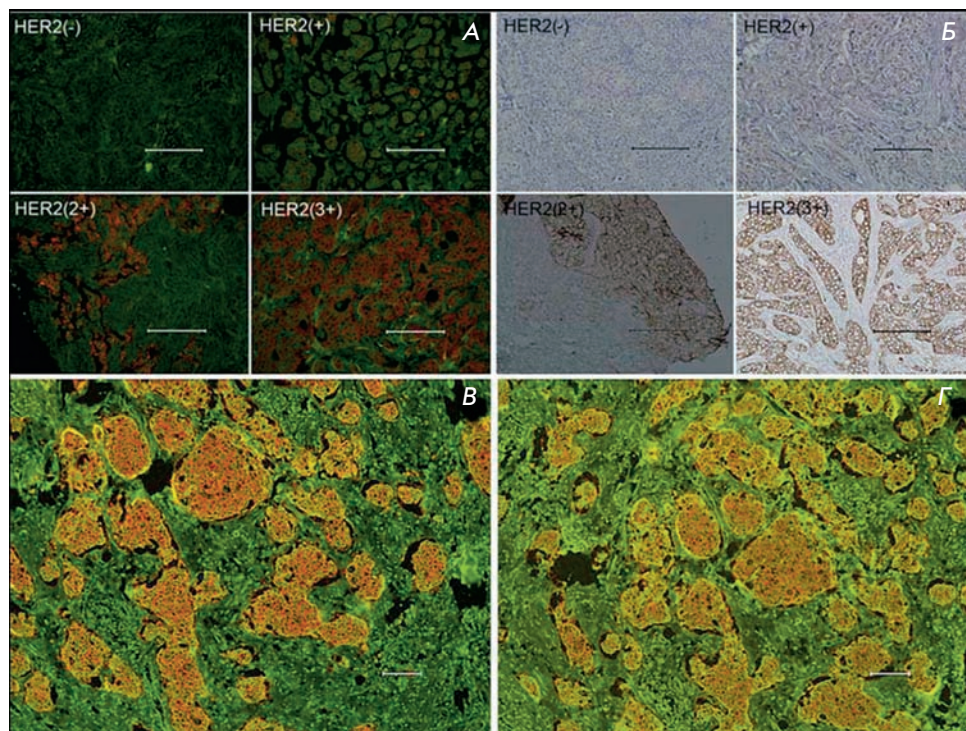


Рис. 5. Преимущества КТ в иммуногистохимическом анализе. Окрашивание тканей с различным уровнем экспрессии HER2 с использованием КТ (А) и стандартного метода с пероксидазой (Б). Фотоустойчивость образцов, окрашенных КТ через 2 (В) и 75 сут (Г). Шкала – 100 мкм. Адаптировано из [74] (Chen C., Peng J., Xia H., Yang G., Wu Q., Chen L., Zeng L., Zhang Z., Pang D., Li Y. *Biomaterials*. 2009 30:2912–2918) с разрешения Elsevier: [Biomaterials], copyright (2009).

задачи, решение которых с применением известных подходов было невозможно или чрезвычайно трудоемко.

Одновременное множественное мечение с помощью КТ с разными спектральными характеристиками дает также неоспоримые преимущества в исследованиях, требующих высокопроизводительного скрининга молекул. КТ успешно используют для анализа многочисленных компонентов клеточных систем с помощью технологии микрочипов (*англ.* microarray technology), а также для параллельного анализа геномного и протеомного содержимого здоровых и больных клеток [72]. Яркость и устойчивость КТ значительно повышают чувствительность и способность к параллельной детекции компонентов сложных смесей. Полученные результаты могут способствовать лучшему пониманию сигнальных путей в клетке и применяться для разработки новых терапевтических подходов.

3.3 Иммуногистохимический анализ

Наиболее широко используемым в клинике методом диагностики опухолей является иммуногистохимический анализ (ИГХ). Этот метод морфологического исследования, в основе которого лежит визуализация и оценка с помощью микроскопии результатов реакции антиген-антитело в срезах биопсированных тканей, позволяет не только увидеть наличие и интенсивность сигнала, но и оценить распределение сигнала в клетке (окрашивание мембраны, ци-

топлазмы, ядра и других структурных элементов). Иммунохимическое окрашивание фиксированных формалином тканей и парафиновых срезов образцов биопсии опухолей – непростая задача из-за высокой аутофлуоресценции тканей и уменьшения количества антигена в процессе фиксации и включения в парафин.

Оказалось, что для решения этой задачи как нельзя лучше подходят КТ. С использованием КТ были получены изображения фиксированных срезов тканей базально-клеточной карциномы человека [60], опухоли молочной железы мыши, гиперэкспрессирующей человеческий рецептор HER2/neu [16], базально-плоскоклеточной карциномы кожи человека [73]. На примере ткани опухоли молочной железы человека показано также, что на основе КТ можно создавать зонды для количественного и очень чувствительного обнаружения слабой экспрессии поверхностных раковых маркеров, в частности онкомаркера HER2/neu [74]. Исследователи также отмечают высокую фотостабильность препаратов, окрашенных КТ: интенсивность их флуоресценции не меняется в течение 9–75 дней [74] (*рис. 5*).

Комбинирование традиционных методик ИГХ с флуоресцентными красителями на основе КТ позволяет значительно улучшить разрешение и чувствительность метода (см. обзор [17]), а также дает возможность одновременной визуализации нескольких маркеров [75]. Кроме того, применение КТ делает метод ИГХ намного более наглядным (*рис. 5*).

Визуализация опухолевых клеток человека с использованием КТ

Опухоль	Линия клеток (тип опухоли)	Рецептор-мишень	Направляющий модуль	Тип КТ	Метод визуализации	Примечание	Ссылка
Опухоль простаты	C4-2	PSMA	Полноразмерные моноклональные антитела J591	CdSe/ZnS КТ, покрытые амфифильными полимерами	Флуоресцентная микроскопия клеток в культуре и тканей <i>post mortem</i> , неинвазивное получение изображения целого животного <i>in vivo</i>	Проведено сравнение активной и пассивной доставки	[53]*
			Аптамер A10 RNA	Коммерческие CdSe/ZnS КТ, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности (EviTag)	Конфокальная микроскопия клеток в культуре	Созданы мультифункциональные (флуоресцентные и терапевтические) конструкции КТ с доксирубицином	[55]
	S4-2B (опухоль простаты с метастазами в костной ткани)	PSMA	Полноразмерные моноклональные антитела J591	Qdot® 800 Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Неинвазивная визуализация <i>in vivo</i> с помощью системы для визуализации IVIS	Показана возможность визуализации метастазов в костной ткани	[58]*
Опухоль молочной железы	LNCaP	$\alpha_v\beta_3$ -Интегрин	Пептид GPI	CdSe/ZnS КТ, покрытые цистеином, модифицированные ПЭГ	Флуоресцентная микроскопия клеток в культуре, флуоресцентная визуализация органов <i>post mortem</i>	Созданы КТ небольшого размера, способные быстро выводиться из организма через почки	[59]*
			Пептид RGD	Коммерческие CdSe/ZnS КТ, модифицированные МУК	Конфокальная микроскопия клеток в культуре и тканей <i>post mortem</i>	Проведено сравнение уровня поглощения органами РЭС обычных КТ и КТ, модифицированных ПЭГ	[31]*
	MDA-MB-435 (карцинома протоков молочной железы)	HER2/neu	Пептиды GFE и LuP-1	Коммерческие CdSe/ZnS КТ, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности (Quantum Dot Corporation)	Флуоресцентная микроскопия фиксированных клеток в культуре	Показана возможность одновременной визуализации нескольких мишеней как на поверхности мембраны, так и внутри клетки	[16]
Опухоль молочной железы	MCF-7	p-Гликопротеин	Первичные анти-p-гликопротеин-антитела и вторичные антимышьи поликлональные антитела, конъюгированные с КТ	CdSe/ZnS КТ, модифицированные цистеином и покрытые полимером с аминогруппами на поверхности	Конфокальная микроскопия клеток в культуре, флуоресцентная иммуногистохимия	Проведено сравнение фотостабильности КТ с органическими красителями	[60]
			MDA-MB-435	$\alpha_v\beta_3$ -Интегрин	Пептид RGD (аргинил-глицил-аспарагиновая кислота)	СdTe/ZnS, модифицированные ПЭГ, с аминогруппами на поверхности (коммерческое название «Qdot® 705 ITC™ amino (PEG) quantum dots», Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия клеток в культуре
	MCF-7 (аденокарцинома), BT-474 (карцинома протоков молочной железы)	EGFR, HER2/neu	Полноразмерные моноклональные антитела	Qdot® Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия фиксированных тканей	Показана возможность использования КТ для ИТХ с одновременным мечением нескольких онкомаркеров	[61]
Опухоль молочной железы	KPL-4	HER2/neu	Гуманизированные моноклональные антитела Trastuzumab (Herceptin®)	Qdot® Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Конфокальная микроскопия <i>in vivo</i>	Наблюдение за передвижением отдельных частиц в живом организме в реальном времени после введения в хвостовую вену. Показаны движение, скорость, траектория движения КТ по сосудам опухоли и их миграция в опухолевые клетки	[54]*

				Коммерческие CdSe/ZnS, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности (Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия клеток в культуре, визуализация опухолей <i>in vivo</i> на модельном животном			Создание сложных мультифункциональных конъюнкций на основе иммунолипосом с КТ и мини-антителами	[62]
			Мини-антитела формата scFv	Qdot@800 Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Отлическая система для 3D-наблюдений на основе модифицированного эпитофлуоресцентного микроскопа			Наблюдение за передвижением отдельных частиц в живом организме в реальном времени после введения в хвостовую вену	[63]*
			Гуманизированные моноклональные антитела Trastuzumab (Herceptin®)	Qdot@ Antibody Conjugation Kit (Invitrogen)	Флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия			Измерения уровня экспрессии рецептора в клетке	[55]
			Мышьи моноклональные анти-AFP-антитела	CdSe/ZnS КТ, модифицированные тиоликолевой кислотой, растворены в PBS	Визуализация опухолей <i>in vivo</i> и отдельных органов <i>post mortem</i> ; флуоресцентная микроскопия тканей <i>post mortem</i>			Сравнение пассивной и активной доставки	[64]*
			Мышьи моноклональные анти-AFP-антитела	CdSe/ZnS с максимумом 590 нм, модифицированные тиоликолевой кислотой	Биохимический анализ крови, конфокальная микроскопия тканей, количественный анализ уровня Cd и Se с использованием масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS)			Визуализация опухоли и метастазов. Проведена оценка токсичности и биосовместимости, исследована фармакокинетика, количественное распределение по тканям	[65]*
			Анти-клаудин-4 и анти-PSCA-моноклональные антитела	InP/ZnS, модифицированные меркаптоангарной кислотой	Получение изображений <i>in vivo</i> с помощью системы «Maestro», конфокальная микроскопия срезов			Успешное использование для визуализации модельной опухоли с нетоксичными КТ, не содержащими кадмия	[56]*
			Мини-антитела формата scFv	CdSe/ZnS, покрытые амфифильным полимером и модифицированные короткими цепочками ПЭГ	Конфокальная микроскопия срезов тканей			Изучено распределение по органам при пассивной и активной доставке	[25]*
			Клаудин-4, PSCA	Qdot@ 800 ИТК™ amino (PEG) quantum dots (Invitrogen)	Получение оптических серий изображений срезов органов <i>post mortem</i>			Исследована динамика накопления направленных и ненаправленных КТ в опухолевой ткани	[66]*
			EGFR	CdSe/ZnS, DHLA модифицированные DHLA	Флуоресцентная микроскопия живых клеток в культуре			Стабильность окрашивания в течение недели, возможность одновременных исследований с КТ	[67]
			EGFR	CdTe/ZnS, модифицированные ПЭГ, с аминокетонами на поверхности (коммерческое название «Qdot@ 705 ИТК™ amino (PEG) quantum dots», Invitrogen)	Конфокальная микроскопия клеток в культуре и криосрезов опухолевой ткани. Получение 3D-изображения животного <i>in vivo</i> с помощью системы «Maestro» для визуализации «Maestro»			Сравнение активной и пассивной доставки. Ясно видно накопление КТ в органах РЭС в обоих случаях	[32]*
			р-Гликопротеин	CdTe, модифицированные тиоликолевой кислотой	Флуоресцентная микроскопия			Использованы КТ, синтезированные в водных растворах	[57]
			α _v β ₃ -Интегрин	Коммерческие CdSe/ZnS, покрытые полимером, конъюгированные со стрептавидином (Invitrogen)	Конфокальная микроскопия и проточная цитометрия клеток в культуре			Отслеживание путей передвижения отдельных молекул в клетке	[11]
			Первичные анти-р-гликопротеин-антитела, вторичные биотинилированные анти-мышьиные поликлональные антитела, стрептавидин, конъюгат биотина с КТ	EGF	Флуоресцентная микроскопия клеток, FRET, атомно-силовая микроскопия			Отслеживание путей передвижения отдельных молекул в клетке и димеризации рецепторов	[68]
			Фоллиевая кислота	InP/ZnS	Конфокальная и двухфотонная микроскопия клеток в культуре			Специфическая визуализация опухолевых клеток с использованием нетоксичных КТ, не содержащих кадмия	[69]

*Визуализация опухолей в организме модельных животных.

3.4 Наблюдение в реальном времени за молекулярными процессами и клетками

Высокая устойчивость КТ к фотовыцветанию, а также их высокая яркость позволяют использовать их для визуализации процессов, происходящих в клетках, в том числе для отслеживания динамики отдельных молекул [41]. Особый интерес представляют мембранные белки, исследование местонахождения и динамики которых важно для понимания таких процессов, как хемотаксис, межклеточная и внутриклеточная передача сигналов. Так, КТ, конъюгированные с соответствующими направляющими лигандами, были успешно использованы для визуализации динамики рецепторов глицина [12] и γ -аминомасляной кислоты [76] в клетках нейронов в культуре.

Поскольку многие значимые онкомаркеры представляют собой белки, выполняющие в нормальных клетках регуляторные функции и участвующие в передаче сигнала, изучение функционирования таких белков важно для понимания природы и механизмов процесса малигнизации. КТ, конъюгированные с эпидермальным фактором роста (EGF), были использованы для изучения механизмов интернализации EGF и путей передачи сигнала с участием белков семейства трансмембранных рецепторов тирозинкиназ erbB1/2/3 [11].

Было показано, что КТ могут быть использованы для изучения подвижности опухолевых клеток с целью определения их инвазивного потенциала [77]. Применение КТ в качестве маркеров для визуализации траектории движения клеток менее трудоемко и позволяет получать более достоверные данные, чем традиционный анализ в камере Бойдена.

Эти новые и чрезвычайно интересные направления исследований пока не нашли применения в клинической диагностике, но безусловно будут развиваться как область фундаментальной науки и способствовать получению новых знаний о патогенезе опухолей.

4. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ *in vivo* НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

За последние пять лет достигнуты значительные успехи в применении КТ в качестве флуорофоров в экспериментах на клетках и фиксированных тканях. В то же время использование этих наночастиц для визуализации в многоклеточных организмах, особенно таких высокоорганизованных, как млекопитающие, только начинает разрабатываться.

При флуоресцентном мечении на уровне целого организма возникают две основные проблемы: 1) ослабление сигнала в связи с увеличением размеров организма и толщины тканей; 2) усложнение доставки флуорофоров к целевым клеткам и тканям.

Глубина проникновения флуоресценции является основной проблемой, поскольку биологические ткани ослабляют большую часть сигналов, используемых для визуализации, и, кроме того, обладают значительной аутофлуоресценцией в зеленом диапазоне. Однако в ИК-диапазоне спектра существует так называемое «окно прозрачности» (650–1300 нм), в котором поглощение света живыми тканями минимально. Существование такого окна объясняется тем, что основные хромофоры млекопитающих (кровь, флавины, витамины и NAD(P)H) имеют минимальный уровень поглощения в этой области [78]. Поэтому для визуализации *in vivo* используют КТ, флуоресцирующие в ближнем ИК-диапазоне (700–800 нм), что позволяет повысить яркость получаемого сигнала и снизить фон.

Транспорт флуорофора к клеткам-мишеням в организме млекопитающих сложен и многоэтапен, поскольку транспортируемые вещества должны преодолеть ряд структурных и физиологических барьеров. Среди них можно отметить эндотелий стенок сосудов, иммунный барьер и метаболическую деградацию вводимых веществ. Кроме того, введенный внутрисистемно флуорофор вместе с током крови может попадать в нецелевые органы и ткани организма и накапливаться там, ухудшая контрастность, а также увеличивая вероятность ложноположительных сигналов и проявления токсического эффекта. Поэтому излишки флуорофора, не связавшиеся с целевыми клетками, должны быстро и полностью выводиться из организма.

4.1 Детекция опухолей с использованием КТ

В живом организме накопление введенных внутривенно КТ в опухолевой ткани для ее последующей визуализации возможно благодаря двум механизмам: 1) пассивному, характерному для частиц определенного размера и 2) активному, с помощью направляющего агента [53] (рис. 6).

В случае пассивного механизма частицы нанометровых размеров избирательно накапливаются в опухолевой ткани благодаря ее структурным особенностям. Такие частицы легко проникают в опухоль за счет увеличенной проницаемости стенок сосудов и задерживаются в ней из-за отсутствия нормального лимфатического дренирования. Доказано, что капиллярная проницаемость эндотелиального барьера во вновь васкуляризуемых опухолях значительно выше, чем в нормальных тканях. Нормальные ткани выстланы нефенестрированным сосудистым эндотелием, и прохождение макромолекул и наночастиц в ткань затруднено. Кровеносные сосуды, сформированные в процессе индуцированного опухолью ангиогенеза, имеют нехарактерное строение и широкие эндотелиальные поры. Эти поры настолько велики,

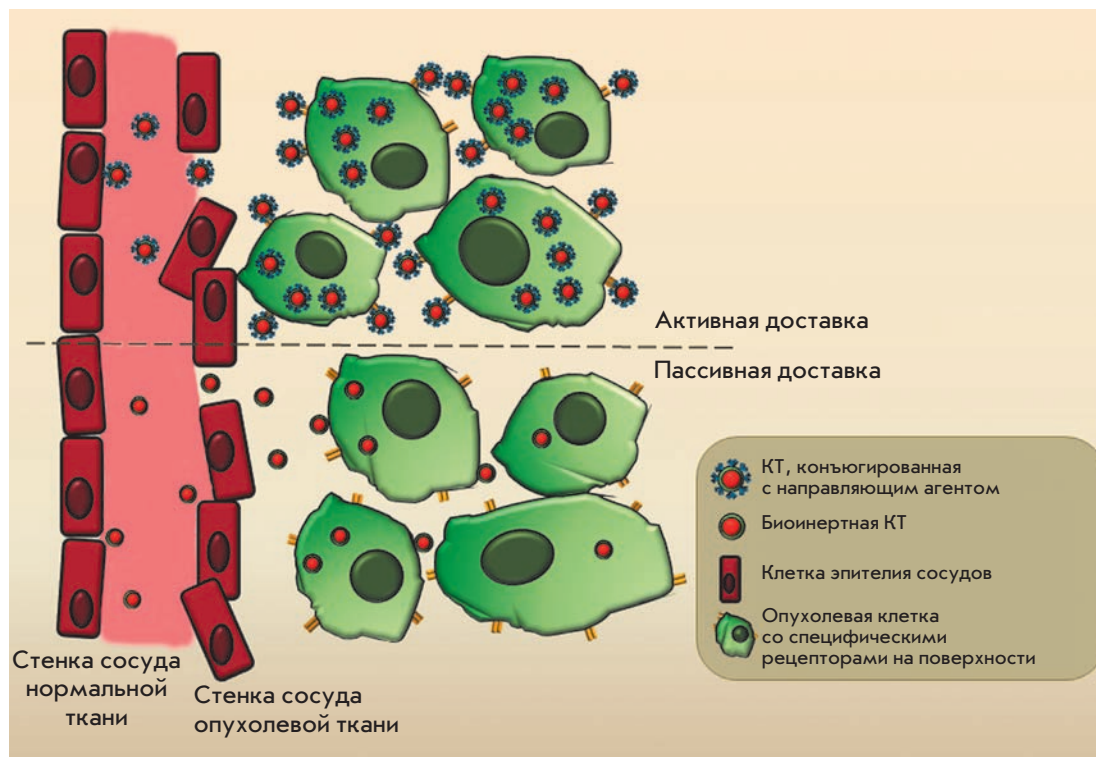


Рис. 6. Механизмы доставки КТ в опухоль после внутривенного введения.

что молекулы размером до 400 нм могут выходить из сосудов и накапливаться в опухолевой ткани [79]. Кроме того, в опухолевой ткани практически отсутствует дренирование лимфатической системой, поэтому макромолекулы остаются там длительное время. Описанный эффект увеличенной проницаемости и удерживания (*англ.* EPR-эффект – *enhanced permeability and retention*) используется для доставки в опухоли терапевтических и диагностических агентов на основе латексов, липосом и других частиц [80]. При этом для увеличения избирательности меченя в случае пассивной доставки используют «биоинертные» КТ, покрытые ПЭГ и имеющие минимальный уровень неспецифического связывания с белками и клетками крови [53].

Для активной доставки КТ к опухолям их снабжают направляющими молекулами, связывающимися со специфическими рецепторами, экспонированными на поверхности опухолевых клеток (см. раздел 2.1).

Впервые возможность прижизненного меченя опухолей квантовыми точками была продемонстрирована на мышинных моделях. Показано, что после внутривенного введения конъюгаты КТ с пептидами, специфичными к различным типам опухолей и их сосудам, избирательно накапливаются в сосудистой сети опухоли [31].

Первый успех применения КТ *in vivo* стимулировал появление большого числа работ, посвященных

прижизненной визуализации модельных опухолей человека в организме животных с применением КТ, нацеленных на различные опухолевые маркеры. В качестве направляющих агентов одинаково успешно использовали полноразмерные антитела и их фрагменты, специфические пептиды и природные лиганды (*таблица*). Результаты этих работ показывают, что использование активного механизма доставки по сравнению с пассивной доставкой значительно увеличивает накопление КТ в опухоли независимо от типа использованных КТ и от типа направляющего агента (*рис. 7*). Использование направленных КТ в качестве флуорофоров в сочетании с современными методами оптического имиджинга также позволяет визуализировать не только солидные опухоли, но и метастазы в органах [65] и в костной ткани [58], а также выявлять микрометастазы на ранних стадиях заболевания [81]. Необходимо отметить, что во всех случаях наряду с успешным маркированием опухолей *in vivo* как активным, так и пассивным методом также наблюдалось неспецифическое накопление КТ в различных органах модельных животных, прежде всего в печени, селезенке и лимфоузлах (*рис. 7*).

КТ могут также иметь большое диагностическое значение при местном введении. Так, например, было показано, что КТ различного цвета, введенные в периферические участки тела, локализовались в раз-

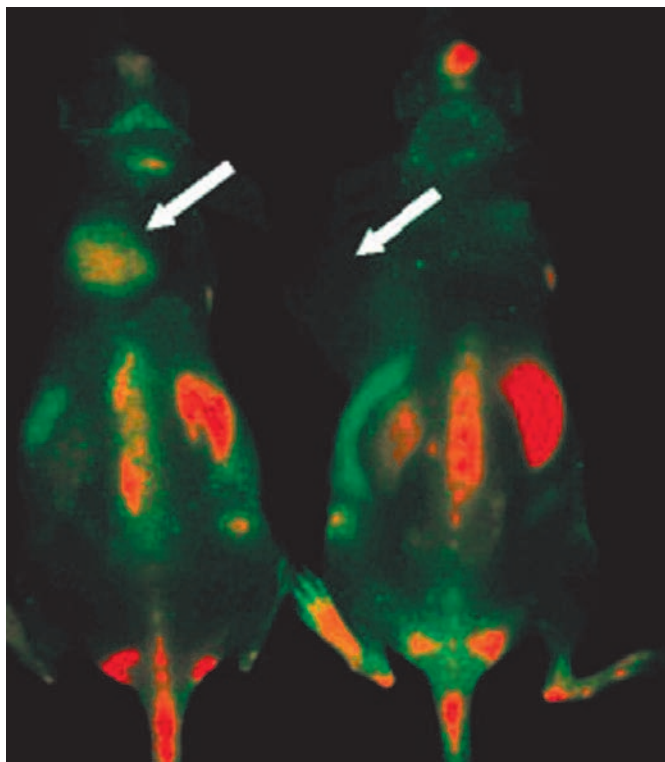


Рис. 7. Флуоресцентная ИК-визуализация мышей с опухолями глиобластомы человека U87MG (привиты под левую лопатку, указаны белыми стрелками). Животному слева были введены внутривенно конъюгаты КТ с направляющим пептидом RGD, животному справа – неконъюгированные КТ в той же концентрации. Зеленым цветом показана аутофлуоресценция тканей, красным – флуоресценция КТ. Заметно сильное накопление КТ в печени, костном мозге и лимфатических узлах. Адаптировано из [32] (Cai W., Shin D.W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. *Nano Lett.* 2006 6:669–676) с разрешения American Chemical Society: [Nano Letters], copyright (2006).

ных лимфоузлах, окрашивая их в соответствующие цвета [82]. В последнее время большой объем исследований посвящен визуализации сторожевых лимфоузлов, по которым обычно начинается распространение метастазов [83, 84]. Интраоперационная визуализация первичной опухоли вместе со сторожевыми лимфоузлами дает возможность определить размер операционного поля и необходимость лимфодиссекции [85].

Размер КТ и их способность к двухфотонному возбуждению привлекли внимание исследователей к этим частицам как к перспективному контрастирующему агенту для ангиографии, альтернативному традиционно применяемому для этих целей флуорес-

центному декстрану. Благодаря большому сечению двухфотонного поглощения (на 2–3 порядка больше, чем у традиционных органических красителей) КТ можно возбуждать в ИК-диапазоне. Это позволяет добиться более высокого разрешения и на большей глубине ткани (так как длинные волны рассеиваются меньше, чем короткие), а также уменьшить степень фототоксичности (так как возбуждающие фотоны в ИК-части спектра обладают меньшей энергией и, следовательно, менее разрушительны для исследуемой ткани) [86]. Действительно, использование двухфотонного возбуждения КТ для контрастирования кровеносных сосудов опухолевой ткани значительно улучшает контрастность изображения по сравнению с традиционными методами [87].

Таким образом, результаты работ по прижизненной визуализации опухолей, приведенные выше, показали, что из-за высокого уровня поглощения органами ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) и отсутствия полного выведения из организма (см. раздел 5.2 данного обзора) клиническое использование КТ в качестве контрастирующих агентов для визуализации *in vivo* сопряжено с определенными трудностями. В то же время исключительная яркость, высокий квантовый выход, а также большое сечение двухфотонного поглощения, определяющее яркость флуорофора в многофотонной микроскопии позволяют успешно использовать КТ как надежные визуализирующие агенты для изучения анатомии и патофизиологии опухолей на животных моделях. Применение КТ значительно усиливает существующие методы прижизненной микроскопии опухолей и их микроокружения. Комбинация исключительных спектральных свойств КТ и современных технологий, позволяющих получать изображения *in vivo* с высоким разрешением, может привести к существенному прорыву в понимании биологии опухолей.

4.2 Биораспределение и фармакокинетика КТ

Решающими факторами для успеха диагностики опухолей *in vivo* являются высокое содержание флуорофора в опухоли по сравнению с его содержанием в нормальных тканях и крови, а также отсутствие ложноположительных сигналов. Кроме того, диагностические агенты должны быстро выводиться из организма.

В исследованиях *in vitro* было показано, что поведение и судьба КТ в клетке зависят в значительной степени от размера и химических свойств поверхности этих частиц [88, 89]. Предполагалось, что эти же параметры будут играть важную роль и в распределении КТ в организме.

При изучении биораспределения КТ в организме модельных животных оказалось, что все КТ полно-

стью удаляются из кровотока и аккумулируются в органах и тканях [90], прежде всего в органах РЭС (печени, селезенке и лимфоузлах). Аналогичные результаты были получены при визуализации опухолей: наряду с накоплением метки в опухоли часть КТ задерживалась также в органах РЭС [25, 31, 32, 53, 65]. В тканях легких, сердца, мышц и мозга КТ почти во всех случаях обнаружено не было, в некоторых работах наблюдали небольшое содержание КТ в почках. Причем, что неожиданно, такое распределение не зависело от свойств поверхности и вида конъюгированного с КТ направляющего агента (или отсутствия такового), а наличие ПЭГ на поверхности частиц лишь немного увеличивало время циркуляции в крови, но не исключало полностью накопления в этих органах. Время полувыведения КТ из кровотока варьировало от нескольких минут до нескольких десятков часов и сильно зависело от их гидродинамического диаметра [91], а также от заряда и структуры поверхности [92].

В этом контексте интересна работа, в которой было проведено прямое сравнение КТ и стандартного органического красителя Alexa Fluor 680, конъюгированных с анти-IGF1R-антителами в экспериментах на модельных животных *in vivo* [55]. Было показано, что оба флуорофора позволяют специфически визуализировать опухоль молочной железы, однако КТ существенно хуже выводятся из организма, накапливаясь в органах РЭС.

Первоначальные результаты работ, посвященных исследованию влияния размера и свойств поверхности КТ на их распределение в организме после внутривенного введения, довольно противоречивы. Так, в ряде исследований было показано, что поверхностное покрытие [93, 94] и размер [94] сильно влияют на фармакокинетику и биораспределение частиц. С другой стороны, в систематическом исследовании [95], проведенном с одновременным учетом всех факторов, которые могут влиять на биораспределение, не наблюдалось каких-либо значимых различий между КТ разного размера, с разным зарядом и наличием или отсутствием на поверхности различных молекул (альбумин, ПЭГ) – все КТ накапливались в первую очередь в печени и селезенке.

КТ могут выводиться из организма двумя путями: через почки и через печень [93, 96]. Путь выведения в наибольшей степени зависит от двух параметров частиц: размера и поверхностного покрытия, определяющего склонность к адсорбции белков сыворотки крови [78]. Изучение выведения из организма специально созданных серий КТ различного размера и с различным покрытием [59] показало, что одним из обязательных критериев для полного выведения наночастиц из организма через почки является зна-

чение гидродинамического диаметра КТ менее 5.5 нм (т.е. ниже порога почечной фильтрации). На сегодняшний день все синтезированные КТ с флуоресценцией в красном и ближнем ИК-диапазоне, используемые для визуализации *in vivo*, имеют больший размер (около 10 нм) и в принципе не могут выводиться через почки. Кроме того, эти КТ покрыты полимером для лучшей стабильности и содержат на поверхности заряженные функциональные группы и ПЭГ, что еще больше увеличивает их размер. Так, например, гидродинамический диаметр широко используемых коммерческих КТ производства Invitrogen – 15–19 нм [82]. Для таких больших небиодegradуемых КТ остается только один путь выведения из организма – через печень, в составе желчи. Это очень медленный и неэффективный процесс, а длительное пребывание наночастиц в органах РЭС повышает возможность разрушения оболочки КТ и возникновения токсического эффекта. Таким образом, для КТ, идеально подходящих по своим прочим характеристикам для визуализации опухолей *in vivo*, накопление в печени, селезенке и других органах РЭС неизбежно. Интересно, что некоторые авторы отмечали в почках накопление КТ с гидродинамическим диаметром, значительно превышающим порог почечной фильтрации [95, 97]. Без проведения дополнительных исследований трудно сказать, являются ли приведенные данные артефактом или свидетельствуют о каких-то, еще не изученных механизмах взаимодействия наночастиц с живым организмом. В любом случае, затрудненное выведение из организма остается одним из основных препятствий для применения КТ в организме человека.

5. РИСК ПРИМЕНЕНИЯ КТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Уникальные физико-химические свойства КТ делают их чрезвычайно привлекательными флуорофорами для визуализации живых объектов *in vivo*. Пионерские работы в этой области появились сравнительно недавно (менее 10 лет назад), и поиск оптимального для этих целей дизайна КТ ведется до сих пор. В связи с этим КТ, используемые отдельными лабораториями, сильно различаются по таким параметрам, как размер, форма, заряд, концентрация, окислительно-восстановительные свойства, поверхностное покрытие и физическая стабильность. Широкий диапазон этих параметров, а также различные условия экспериментов (время обработки, выбор модельных клеточных линий и среды, употребление одинаковых единиц концентрации, наличие или отсутствие направляющего агента) сильно затрудняют сравнение литературных данных о био-

безопасности КТ и составление общей картины. Однако среди крайне разнообразной и противоречивой информации все же был выявлен ряд закономерностей [90, 98].

5.1 Цитотоксичность КТ

Цитотоксическое действие КТ определяется в основном четырьмя факторами: наличием в их составе ионов тяжелых металлов, способностью генерировать активные формы кислорода (АФК), коллоидной нестабильностью и неспецифическим взаимодействием с биологическими молекулами [90, 98].

КТ первого поколения, состоящие только из флуоресцентного ядра (CdTe или CdSe) и стабилизированные тиоловыми лигандами (например, цистеином или МУК), легко подвергаются окислению и деградации с высвобождением токсичных ионов кадмия [99], а также способны индуцировать образование АФК [100]. Такие частицы чрезвычайно токсичны для клеток в культуре даже в небольших концентрациях и поэтому непригодны для исследований на живых объектах.

КТ второго поколения снабжены оболочкой из инертного сульфида цинка для предотвращения безызлучательной диссипации энергии. Кроме того, как оказалось, такая оболочка препятствует окислению и деградации флуоресцентного ядра и высвобождению ионов кадмия, что значительно снижает цитотоксичность. В то же время для КТ, стабилизированных дешевым и простым методом с использованием небольших тиоловых лигандов, характерна недостаточная коллоидная стабильность [99]. Осаждение агрегатов таких КТ на поверхности клеток, даже без проникновения внутрь, может вызывать физические повреждения, нарушение функционирования и, в конечном итоге, смерть клетки [89]. КТ второго поколения в принципе применимы для кратковременных исследований на культуре клеток, но существует большой риск при их использовании в организме.

В настоящее время в большинстве биологических исследований применяют КТ третьего поколения – CdSe/ZnS-частицы, окруженные полимерной или силиконовой оболочкой. Эти КТ гораздо более стабильны коллоидно, химически и оптически по сравнению с их аналогами, покрытыми небольшими лигандами. КТ третьего поколения проявляют некоторую токсичность в культуре клеток лишь в экстремальных условиях или при использовании в концентрациях, на порядок превышающих необходимую для окрашивания и визуализации клеточных мишеней [89, 101]. Такие КТ являются наиболее перспективными для применения в организме. Однако при их конструировании необходимо учитывать, что КТ – не молекулы, а на-

ночастицы, и для них, так же как и для других наночастиц, более важным для проявления токсичности является не состав, а физико-химические свойства поверхности. Некоторые биоинертные наночастицы (золотые, углеродные) оказывают на клетки такое же токсическое воздействие, как и КТ. Например, золотые наночастицы и КТ, покрытые одной и той же оболочкой из амфифильных полимеров, одинаково вызывали физические повреждения клеток молочной железы в культуре и индуцировали их открепление от подложки [89]. Таким образом, хотя дополнительное вторичное устойчивое покрытие предотвращает окисление и деградацию КТ, оно само может вносить вклад в общую токсичность частиц [102].

Суммируя вышеизложенное, следует отметить, что с момента создания первых коллоидных КТ для биологического применения проделана большая работа по снижению их токсичности, в основном благодаря использованию различных покрытий, и создан задел для их применения *in vivo*.

5.2 Системная токсичность *in vivo*

Исследование цитотоксичности *in vitro* является важным и необходимым этапом разработки агентов для диагностики и терапии на основе КТ, поскольку позволяет ускорить и стандартизировать процесс отбора наиболее подходящих по всем параметрам частиц для применения *in vivo*. Однако для внедрения КТ в клиническую практику таких исследований, как правило, недостаточно. При использовании КТ для визуализации в организме необходимо наряду с коллоидной природой и физико-химическими свойствами поверхности этих частиц дополнительно учитывать их взаимодействие с иммунной системой, а также возможность физико-химического разрушения в условиях агрессивных сред организма с высвобождением токсичных элементов из их флуоресцентного ядра.

К настоящему моменту получены данные по взаимодействию с иммунной системой некоторых типов наночастиц (липосомных, углеродных, золотых, магнитных) [103]. Показано, что после введения в кровь наночастицы быстро подвергаются опсонизации и последующему фагоцитозу клетками иммунной системы. Кроме того, их введение в кровь может вызвать агрегацию тромбоцитов, активацию системы комплемента и стимуляцию или подавление иммунной системы [103]. В отношении КТ экспериментальные данные по этой теме пока практически отсутствуют. Можно было предположить, что взаимодействие КТ с иммунной системой аналогично взаимодействию, характерному для других наночастиц. Действительно, в работе японских авторов [104] показано, что как *in vitro*, так и *in vivo* КТ не вызывают увели-

чения цитокиновой продукции CD4⁺Т-лимфоцитами, но стимулируют пролиферацию клеток иммунной системы.

Данные первого систематического исследования токсичности и биораспределения КТ в организме были опубликованы совсем недавно [95]. На крысиных моделях были изучены кратковременные (до 7 дней) и отдаленные (более 80 дней) биологические эффекты КТ с разным полимерным покрытием. Были проведены стандартные клинические биохимические и гематологические тесты, а также гистологические исследования органов. Вопреки ожиданиям, после внутривенного введения КТ, содержащих на поверхности карбоксильные группы, ПЭГ или бычий сывороточный альбумин, в суммарной дозе 60 нмоль/животное, введенной в течение четырех недель, ни для одного из вариантов частиц выраженной токсичности отмечено не было.

Исследователи, изучающие биораспределение КТ в организме и возможность визуализации опухолей *in vivo*, также неоднократно отмечали отсутствие во время эксперимента признаков острой токсичности у животных, отсутствие некрозов и сохранение морфологии тканей [86, 93, 96]. Однако возможность накопления и дегградации КТ в организме не исключает их скрытой токсичности и отложенного действия.

Стабильность КТ внутри тканей и органов РЭС вызывает споры. Некоторые авторы показали, что КТ, покрытые полимером, сохраняют свою морфологию и флуоресцентные свойства в тканях в течение длительного времени (до 4 месяцев), не подвергаясь разрушению с высвобождением потенциально токсичных составляющих элементов [96, 97]. В то же время в некоторых случаях была отмечена дегградация таких частиц в организме, ведущая к изменению флуоресценции [53]. Этот процесс кажется вполне возможным, поскольку в экспериментах *in vitro* показано, что некоторые источники АФК, такие, как пероксид водорода и хлорноватистая кислота, которые всегда присутствуют в клетке в небольших количествах, могут проникать через полимерную оболочку и вызывать дегградацию флуоресцентного ядра [105]. Возможно также, что разрушению в организме подвергается лишь часть КТ, а часть остается интактной, и соотношение этих частей – вопрос времени (месяцев и даже лет) [95].

Таким образом, явной токсичности КТ в модельных организмах показано не было. Однако наличие многочисленных факторов риска, недостаток данных, а также отсутствие долговременных исследований не позволяют сделать окончательного заключения о безопасности применения КТ для организма. Некоторые отрывочные и противоречивые сведения

о токсичности КТ, встречающиеся в работах, посвященных биораспределению этих наночастиц, лишь подчеркивают необходимость полномасштабных исследований, затрагивающих различные системы органов, для адекватной оценки риска использования КТ *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Квантовые точки – это относительно новый класс соединений, обладающий большим потенциалом для применения в разных видах диагностики опухолей от определения онкомаркеров на микропланшете до неинвазивной визуализации опухолей *in vivo*. Уникальные физико-химические свойства КТ: легко настраиваемые спектры флуоресценции, высокий квантовый выход (особенно в ИК-области), возможность возбуждения в широком диапазоне длин волн и узкие пики флуоресценции, большое сечение двухфотонного поглощения, устойчивость к фотовыцветанию, – позволяют существенно расширить возможности современных методов флуоресцентной визуализации и оптической диагностики. Эти флуорофоры позволяют решать задачи, трудно осуществимые с помощью традиционных красителей: например, проводить одновременную детекцию нескольких маркеров, длительные наблюдения за молекулярными процессами в реальном времени и получать изображения новообразований в глубине тканей. В то же время для ряда рутинных задач проблемы, связанные с коллоидной природой КТ, значительно перевешивают преимущества их оптических свойств.

Относительно большая площадь поверхности КТ, доступная для химической модификации, и возможность присоединения других молекул и частиц также позволяют получать на основе КТ разнообразные мультимодальные конструкции, содержащие наряду с КТ частицы другой природы (золотые, магнитные, алмазные, липосомные и др.) (рис. 3) [28, 106] и обладающие одновременно направляющими, диагностическими и терапевтическими свойствами [107]. Подобные многофункциональные наноустройства предназначены для одновременной доставки действующего агента к опухоли и слежения за этим процессом [35, 62]. Дальнейшая оптимизация биосовместимых КТ будет способствовать развитию таких инновационных подходов в онкологии, как хирургическое вмешательство под контролем навигационных систем (*англ.* image-guided surgery), определение молекулярного профиля опухоли, персонализированная диагностика и терапия [108].

Успех реализации большого потенциала КТ и широкое внедрение его в диагностику *in vivo* зависят от решения следующих насущных задач. Прежде

всего, это проведение долговременных токсикологических исследований и тщательное изучение отложенного эффекта введения КТ. К настоящему моменту уже разработаны покрытия на основе полимерных материалов [109], которые значительно увеличили биоинертность КТ и существенно снизили их токсичность, однако из-за накопления КТ в органах ретикулоэндотелиальной системы и медленного выведения из организма безопасность их применения в живом организме остается предметом изучения. В связи с этим можно сформулировать и две другие задачи – необходимость разработки нового поколения КТ, быстро выводящихся из организма, а также изучение последствий возможного поступления КТ в окружающую среду и обеспечение экологической безопасности при их широком применении. Решение

этих задач, возможно, будет связано с появлением новых материалов и технологий для конструирования флуоресцентных наночастиц. ●

Работы лаборатории С.М. Деева по конструированию олигомерных надмолекулярных комплексов для диагностики и терапии рака, в том числе с использованием КТ, поддержаны грантом РФФИ 09-04-01201-а, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы», Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giepmans B.N., Adams S.R., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *Science*. 2006. V. 312. № 5771. P. 217–224.
- Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23. № 12. P. 605–613.
- Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. № 3. P. 567–754.
- Wang C., Gao X., Su X. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 397. № 4. P. 1397–1415.
- Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. // *Российские нанотехнологии*. 2007. Т. 2. № 1–2. С. 160–173.
- Resh-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 9. P. 763–775.
- Alivisatos P. // *Nature Biotechnol.* 2004. V. 22. № 1. P. 47–52.
- Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. // *Nat. Mater.* 2005. V. 4. № 6. P. 435–446.
- Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K. F., Bawendi M.G. // *J. Phys. Chem. B*. 1997. V. 101. № 46. P. 9463–9475.
- Parak W.J., Gerion D., Pellegrino T., Zanchet D., Micheel C., Williams S.C., Alivisatos A.P., Boudreau R., Le Gros M.A., Larabell C.A. // *Nanotech.* 2003. V. 14. № 7. R15–R27. doi: 10.1088/0957-4484/14/7/201.
- Lidke D.S., Nagy P., Heintzmann R., Arndt-Jovin D.J., Post J.N., Grecco H.E., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 2. P. 198–203.
- Dahan M., Levi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. // *Science*. 2003. V. 302. № 5644. P. 442–445.
- Tholouli E., Hoyland J.A., Di Vizio D., O'Connell F., Macdermott S.A., Twomey D., Levenson R., Yin J.A., Golub T.R., Loda M., Byers R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 348. № 2. P. 628–636.
- Chan W.C., Nie S. // *Science*. 1998. V. 281. № 5385. P. 2016–2018.
- Bruchez M.Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. // *Science*. 1998. V. 281. № 5385. P. 2013–2016.
- Wu M.X., Liu H., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 41–46.
- Smith A.M., Dave S., Nie S., True L., Gao X. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006. V. 6. № 2. P. 231–244.
- Деев С.М., Лебедеко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
- Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Johnson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S., Whitlow M. // *Science*. 1988. V. 242. № 4877. P. 423–426.
- Pack P., Plückthun A. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. № 6. P. 1579–1584.
- Wu A.M., Yazaki P.J. // *Q. J. Nucl. Med.* 2000. V. 44. № 3. P. 268–283.
- Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. № 6. P. e2434.
- Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Invest. New Drugs*. 2009. DOI 10.1007/s10637-009-9329-2.
- Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 23. P. 9221–9225.
- Yang L., Mao H., Wang Y.A., Cao Z., Peng X., Wang X., Duan H., Ni C., Yuan Q., Adams G., Smith M.Q., Wood W.C., Gao X., Nie S. // *Small*. 2009. V. 5. № 2. P. 235–243.
- Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 12. P. 1486–1492.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N. // *Bioessays*. 2008. V. 30. № 9. P. 904–918.
- Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.
- Zhou M., Ghosh I. // *Biopolymers*. 2007. V. 88. № 3. P. 325–339.
- Winter J.O., Liu T.Y., Korgel B.A., Schmidt C.E. // *Adv. Mater.* 2001. V. 13. № 22. P. 1673–1677.
- Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 20. P. 12617–12621.
- Cai W., Shin D.W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. № 4. P. 669–676.
- Zhang J., Jia X., Lv X.J., Deng Y.L., Xie H.Y. // *Talanta*. 2010. V. 81. № 1–2. P. 505–509.

34. Chu T.C., Shieh F., Lavery L.A., Levy M., Kortum R.R., Korgel B.A., Ellington A.D. // *Biosens. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 10. P. 1859–1866.
35. Bagalkot V., Zhang L., Levy-Nissenbaum E., Jon S., Kantoff P.W., Langer R., Farokhzad O.C. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 10. P. 3065–3070.
36. Ko M.H., Kim S., Kang W.J., Lee J.H., Kang H., Moon S.H., Hwang D.W., Ko H.Y., Lee D.S. // *Small.* 2009. V. 5. № 10. P. 1207–1212.
37. Smith A.M., Duan H., Mohs A.M., Nie S. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008. V. 60. № 11. P. 1226–1240.
38. Chan W.C., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. № 1. P. 40–46.
39. Pathak S., Davidson M.C., Silva G.A. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 7. P. 1839–1845.
40. Green N.M. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 184. P. 51–67.
41. Dahan M. // *Histochem. Cell Biol.* 2006. V. 125. № 5. P. 451–456.
42. Лебеденко Е.Н., Баландин Т.Г., Эдельвейс Э.Ф., Георгиев О., Моисеева Е.С., Петров Р.В., Деев С.М. // *ДАН.* 2007. Т. 414. № 3. С. 408–411.
43. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Биоорган. химия.* 2009. Т. 35. № 6. С. 761–778.
44. Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odintsov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I., Deyev S.M. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. № 1. P. 85–93.
45. Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., Zlomanov V.P., Deyev S.M. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. № 2. P. 021004.
46. Здобнова Т.А., Дорофеев С.Г., Тананаев П.Н., Зломанов В.П., Стрёмовский О.А., Лебеденко Е.Н., Балалаева И.В., Деев С.М., Петров Р.В. // *ДАН.* 2010. Т. 430. № 5. С. 705–708.
47. Bentzen E.L., Tomlinson I.D., Mason J., Gresch P., Warne-ment M.R., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal S.J. // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. № 6. P. 1488–1494.
48. Duan H., Nie S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 11. P. 3333–3338.
49. Беляева Т.Н., Салова А.В., Леонтьева Е.А., Моженок Т.П., Корнилова Е.С., Кроленко С.А. // *Цитология.* 2009. Т. 51. № 10. С. 830–836.
50. Kelf T.A., Sreenivasan V.K., Sun J., Kim E.J., Goldys E.M., Zvyagin A.V. // *Nanotechnology.* 2010. V. 21. № 28. e285105.
51. Xing Y., Chaudry Q., Shen C., Kong K.Y., Zhou H.E., Chung L.W., Petros J.A., O'Regan R.M., Yezhelyev M.V., Simons J.W., Wang M.D., Nie S.M. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 5. P. 1152–1165.
52. Kairdolf B.A., Mancini M.C., Smith A.M., Nie S. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. № 8. P. 3029–3034.
53. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W., Nie S. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 8. P. 969–976.
54. Tada H., Higuchi T.M., Wanatabe N., Ohuchi N. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 3. P. 1138–1144.
55. Zhang H., Sachdev D., Wang C., Hubel A., Gaillard-Kelly M., Yee D. // *Breast Cancer Res Treat.* 2009. V. 114. № 2. P. 277–285.
56. Yong K.-T., Ding H., Roy I., Law W.-C., Bergey E.J., Maitra A., Prasad P.N. // *ACS Nano.* 2009. V. 3. № 3. P. 502–510.
57. Li Z., Wang K., Tan W., Li J., Fu Z., Ma C., Li H., He X., Liu J. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 354. № 2. P. 169–174.
58. Shi C., Zhu Y., Xie Z., Qian W., Hsieh C.L., Nie S., Su Y., Zhou H.E., Chung L.W. // *Urology.* 2009. V. 74. № 2. P. 446–451.
59. Choi H.S., Liu W., Liu F., Nasr K., Misra P., Bawendi M.G., Frangioni J.V. // *Nat. Nanotechnol.* 2010. V. 5. № 1. P. 42–47.
60. Sukhanova A., Devy J., Venteo L., Kaplan H., Artemyev M., Oleinikov V., Klinov D., Pluot M., Cohen J.H., Nabiev I. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 324. № 1. P. 60–67.
61. Yezhelyev M.V., Al-Hajj A., Morris C., Marcus A.I., Liu T., Lewis M., Cohen C., Zrazhevskiy P., Simons J.W., Rogatko A., Nie S., Gao X., O'Regan R.M. // *Adv. Mater.* 2007. V. 19. № 20. P. 3146–3151.
62. Weng K.C., Noble C.O., Papahadjopoulos-Sternberg B., Chen F.F., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Wang D., Hom Y.K., Hann B., Park J.W. // *Nano Lett.* 2008. V. 8. № 9. P. 2851–2857.
63. Takeda M., Tada H., Higuchi H., Kobayashi Y., Kobayashi M., Sakurai Y., Ishida T., Ohuchi N. // *Breast Cancer.* 2008. V. 15. № 2. P. 145–152.
64. Yu X., Chen L.D., Li K.Y., Li Y., Xiao S., Luo X., Liu J., Zhou L., Deng Y.L., Pang D.W., Wang Q.Q. // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. № 1. P. 014008.
65. Chen L.D., Liu J., Yu X.F., He M., Pei X.F., Tang Z.Y., Wang Q.Q., Pang D.W., Li Y. // *Biomaterials.* 2008. V. 29. № 31. P. 4170–4176.
66. Diagaradjane P., Orenstein-Cardona J.M., Colón-Casasnovas N.E., Deorukhkar A., Shentu S., Kuno N., Schwartz D.L., Gelovani J.G., Krishnan S. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 3. P. 731–741.
67. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 47–51.
68. Kawashima N., Nakayama K., Itoh K., Itoh T., Ishikawa M., Biju V. // *Chemistry.* 2010. V. 16. № 4. P. 1186–1192.
69. Bharali D.J., Lucey D.W., Jayakumar H., Pudavar H.E., Prasad P.N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 32. P. 11364–11371.
70. Goldman E.R., Clapp A.R., Anderson G.P., Uyeda H.T., Mauro J.M., Medintz I.L., Mattoussi H. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 3. P. 684–688.
71. Makrides S.C., Gasbarro C., Bello J.M. // *Biotechniques.* 2005. V. 39. № 4. P. 501–506.
72. Rousserie G., Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Fleury F., Chames P., Baty D., Oleinikov V., Pluot M., Cohen J.H., Nabiev I. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010. V. 74. № 1. P. 1–15.
73. Estrada C.R., Salanga M., Bielenberg D.R., Harrell W.B., Zurakowski D., Zhu X., Palmer M.R., Freeman M.R., Adam R.M. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 6. P. 3078–3086.
74. Chen C., Peng J., Xia H., Yang G., Wu Q., Chen L., Zeng L., Zhang Z., Pang D., Li Y. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 15. P. 2912–2918.
75. Fountaine T.J., Wincovitch S.M., Geho D.H., Gargield S.H., Pittaluga S. // *Mod. Pathol.* 2006. V. 19. № 9. P. 1181–1191.
76. Bouzigues C., Lévi S., Triller A., Dahan M. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 374. P. 81–91.
77. Parak W.J., Boudreau R., Gros M.L., Gerion D., Zanchet D., Micheel C.M., Williams S.C., Alivisatos A.P., Larabell C.A. // *Adv. Mater.* 2002. V. 14. № 12. P. 882–885.
78. Frangioni J.V. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 5. P. 626–634.
79. Jain R.K. // *J. Control. Release.* 2001. V. 74. № 1–2. P. 7–25.
80. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. // *J. Control. Release.* 2000. V. 65. № 1–2. P. 271–284.
81. Mahmoud W., Sukhanova A., Oleinikov V., Rakovich Y.P., Donegan J.F., Pluot M., Cohen J.H., Volkov Y., Nabiev I. // *Proteomics.* 2010. V. 10. № 4. P. 700–716.
82. Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., Barrett T., Regino C.A., Urano Y., Choyke P.L. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 6. P. 1711–1716.
83. Luciani A., Itti E., Rahmouni A., Meignan M., Clement O. // *Eur. J. Radiol.* 2006. V. 58. № 3. P. 338–344.

84. Ravizzini G., Turkbey B., Barrett T., Kobayashi H., Choyke P.L. // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2009. V. 1. № 6. P. 610–623.
85. Kim S., Lim Y.T., Soltesz E.G., De Grand A.M., Lee J., Nakayama A., Parker J.A., Mihaljevic T., Laurence R.G., Dor D.M., Cohn L.H., Bawendi M.G., Frangioni J.V. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 1. P. 93–97.
86. Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., Webb W.W. // *Science.* 2003. V. 300. № 5624. P. 1434–1436.
87. Stroh M., Zimmer J.P., Duda D.G., Levchenko T.S., Cohen K.S., Brown E.B., Scadden D.T., Torchilin V.P., Bawendi M.G., Fukumura D., Jain R.K. // *Nat. Med.* 2005. V. 11. № 6. P. 678–682.
88. Lovric J., Cho S.J., Winnik F.M., Maysinger D. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. № 11. P. 1227–1234.
89. Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Javier A.M., Gaub H.E., Stolzle S., Fertig N., Parak W.J. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. № 2. P. 331–338.
90. Pelley J.L., Daar A.S., Saner M.A. // *Toxicol. Sci.* 2009. V. 112. № 2. P. 276–296.
91. Choi H.S., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J.P., Ito Ipe B., Bawendi M.G., Frangioni J.V. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. № 10. P. 1165–1170.
92. Campbell R.B., Fukumura D., Brown E.B., Mazzola L.M., Izumi Y., Jain R.K., Torchilin V.P., Munn L.L. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 23. P. 6831–6836.
93. Fischer H., Liu L., Pang K.S., Chan W. // *Adv. Funct. Mater.* 2006. № 10. V. 16. P. 1299–1305.
94. Schipper M.L., Iyer G., Koh A.L., Cheng Z., Ebenstein Y., Aharoni A., Keren S., Bentolila L.A., Li J., Rao J., Chen X., Babin U., Wu A.M., Sinclair R., Weiss S., Gambhir S.S. // *Small.* 2009. V. 5. № 1. P. 126–134.
95. Hauck T.S., Anderson R.E., Fischer H.C., Newbigging S., Chan W.C. // *Small.* 2010. № 1. V. 6. P. 138–144.
96. Ballou B., Lagerholm B.C., Ernst L.A., Bruchez M.P., Waggoner A.S. // *Bioconjug. Chem.* 2004. V. 15. № 1. P. 79–86.
97. Yang R.H., Chang L.W., Wu J.P. // *Environ. Health. Perspect.* 2007. V. 115. № 9. P. 1339–1343.
98. Hardman R. // *Environ. Health Perspect.* 2006. V. 114. № 2. P. 165–172.
99. Aldana J., Wang Y.A., Peng X. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 36. P. 8844–8850.
100. Haram S.K., Quinn B.M., Bard A.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 36. P. 8860–8861.
101. Zhang T., Stilwell J.L., Gerion D., Ding L., Elboudwarej O., Cooke P.A., Gray J.W., Alivisatos A.P., Chen F.F. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. № 4. P. 800–808.
102. Rzigalinski B.A., Strobl J.S. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. V. 238. № 3. P. 280–288.
103. Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. № 8. P. 469–478.
104. Hoshino A., Hanada S., Manabe N., Nakayama T., Yamamoto K. // *IEEE Trans. Nanobioscience.* 2009. V. 8. № 1. P. 51–57.
105. Mancini M.C., Kairdolf B.A., Smith A.M., Nie S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 33. P. 10836–10837.
106. Kim J., Piao Y., Hyeon T. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 2. P. 372–390.
107. Biju V., Mundayoor S., Omkumar R.V., Anas A., Ishikawa M. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 2. P. 199–213.
108. Zrazhevskiy P., Gao X. // *Nano Today.* 2009. V. 4. № 5. P. 414–428.
109. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // *Nanomedicine.* 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.