

УДК 57.083:546.59

Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы

Л. А. Дыкман¹, Н. Г. Хлебцов^{1,2*}¹ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13² Саратовский государственный университет, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

*E-mail: khlebtsov@ibppm.sgu.ru

Поступила в редакцию 21.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Функционализированные золотые наночастицы с контролируемыми геометрическими и оптическими свойствами являются объектом интенсивного изучения и применения в биомедицинских целях, включая геномику, биосенсорику, иммуноанализ, клиническую химию, лазерную фототерапию раковых клеток и опухолей, адресную доставку лекарственных средств, ДНК и антигенов, оптический биоимиджинг и мониторинг клеток и тканей с применением современных систем регистрации. В обзоре рассмотрены актуальные проблемы и результаты применения золотых наночастиц различного размера, формы и структуры в биомедицине. Основное внимание уделено применению конъюгатов золотых наночастиц с различными молекулами-зондами в биомедицинской диагностике, фототермической и фотодинамической терапии, в качестве носителей целевых молекул, а также их иммунологическим и токсикологическим свойствам. Из-за огромного объема информации и высокой скорости обновления данных 2/3 списка цитированных работ (заведомо ограниченного 250 ссылками) – это публикации последних пяти лет.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА золотые наночастицы, плазмонный резонанс, биосенсоры, медицинская диагностика, фототермическая терапия, адресная доставка лекарств, нанотоксикология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЗНЧ – золотые наночастицы; ПФТТ – плазмонная фототермическая терапия; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭМ, РЭМ – просвечивающая и растровая электронная микроскопия; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФНО – фактор некроза опухоли; ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид; SPIA (sol particle immunoassay) – иммуноанализ на частицах золя.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. Золотые наночастицы в диагностике
 - 1.1. Методы визуализации и биоимиджинга
 - 1.2. Аналитические методы диагностики
 - 1.2.1. Гомофазные методы
 - 1.2.2. Дот-иммуноанализ
 - 1.2.3. Иммунохроматография
 - 1.2.4. Плазмонно-резонансные биосенсоры
2. Золотые наночастицы в терапии
 - 2.1. Фототермическая терапия с использованием золотых наночастиц
 - 2.2. Фотодинамическая терапия с использованием золотых наночастиц
 - 2.3. Использование золотых наночастиц как терапевтического средства
3. Золотые наночастицы – носители лекарственных средств
4. Иммунологические свойства золотых наночастиц

5. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Золото – один из первых открытых человеком металлов, история изучения и применения которого насчитывает, как минимум, несколько тысяч лет. Первые сведения о коллоидном золоте можно найти в трактатах китайских, арабских и индийских ученых, которые уже в V–IV веках до нашей эры получали коллоидное золото и использовали его, в частности, в лечебных целях (китайский «золотой раствор» – цзинь е, чин-тау, индийское «жидкое золото» – Kushta Tila Kalan, Makaradhwaaja). В средние века в Европе коллоидное золото изучали и применяли в лабораториях алхимиков. Так Парацельс писал о терапевтических свойствах квинтэссенции золота –

«*quinta essentia auri*», полученной им восстановлением хлорида золота спиртовыми или масляными растительными экстрактами. Он использовал «питьевое золото» при ряде психических заболеваний и сифилисе. Его современник Джованни Андреа применял «*aurum potabile*» при проказе, язве, эпилепсии, диарее. Врач французского короля Людовика XIII алхимик Давид де Плани-Кампи в 1583 г. рекомендовал свой «эликсир долголетия» – коллоидный раствор золота в воде. Первая из дошедших до нас книг, посвященных коллоидному золоту, была опубликована в 1618 г. философом и доктором медицины Франциском Антониом [1]. В ней содержались сведения о получении коллоидного золота и его применении в медицине, включая практические советы.

Несмотря на многовековую историю, «революция в иммунохимии», связанная с использованием золотых наночастиц (ЗНЧ) в биологических исследованиях, произошла в 1971 г., когда британские исследователи Фолк и Тейлор [2] описали способ конъюгации антител с коллоидным золотом для прямой электронно-микроскопической визуализации поверхностных антигенов сальмонелл. С этой работы начинается история применения биоспецифических маркеров – конъюгатов коллоидного золота с иммуноглобулинами и другими молекулами в различных областях биологии и медицины. За прошедшие 40 лет опубликовано огромное количество работ, посвященных применению функционализированных наночастиц – конъюгатов с узнающими биомолекулами (антителами, лектинами, ферментами, аптамерами и др.) в биохимии, микробиологии, иммунологии, цитологии, физиологии растений, морфологии и т.д.

Спектр использования ЗНЧ в современных медико-биологических исследованиях необычайно широк. Он включает, в частности, геномику, биосенсорику, иммуноанализ, клиническую химию, детекцию и фототермолиз микроорганизмов и раковых клеток, адресную доставку лекарственных средств, ДНК и антигенов, оптический биоимиджинг и мониторинг клеток и тканей с применением современных систем регистрации. Золотые наночастицы предложено применять практически во всех медицинских приложениях – диагностике, терапии, профилактике, гигиене. Обширную информацию о получении, функционализации и использовании коллоидного золота в биологии и медицине можно найти в книгах и обзорах [3–8]. Широкий спектр приложений ЗНЧ основан на их уникальных физических и химических свойствах. В частности, оптические свойства ЗНЧ определяются их плазмонным резонансом, связанным с коллективным возбуждением электронов проводимости и локализованным в широкой обла-

сти – от видимой до инфракрасной (ИК), в зависимости от размера, формы и структуры частиц [9].

Учитывая большой объем опубликованных данных и высокую скорость их обновления, цель нашего обзора состояла в обобщении результатов, полученных за последние годы в наиболее перспективных направлениях использования ЗНЧ в современных медико-биологических исследованиях.

1. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В ДИАГНОСТИКЕ

1.1. Методы визуализации и биоимиджинга

Золотые наночастицы активно используются для идентификации химических и биологических агентов. Исторически основным методом обнаружения биоспецифических взаимодействий посредством частиц коллоидного золота (благодаря их высокой электронной плотности) долгое время оставалась электронная микроскопия, преимущественно в просвечивающем варианте (ПЭМ). Не случайно первое трехтомное издание о применении коллоидного золота [10] в основном было посвящено именно ПЭМ с использованием ЗНЧ. Особенностью современного использования электронно-микроскопической техники является применение приборов высокого разрешения (high-resolution transmission electron microscope – HRTEM) и систем цифровой записи и обработки изображений. Основное приложение иммуноэлектронной микроскопии в современных медико-биологических исследованиях – идентификация возбудителей инфекционных заболеваний и их поверхностных антигенов [11] (рис. 1А). В этих же целях зачастую применяют сканирующую зондовую [12] (рис. 1Б),

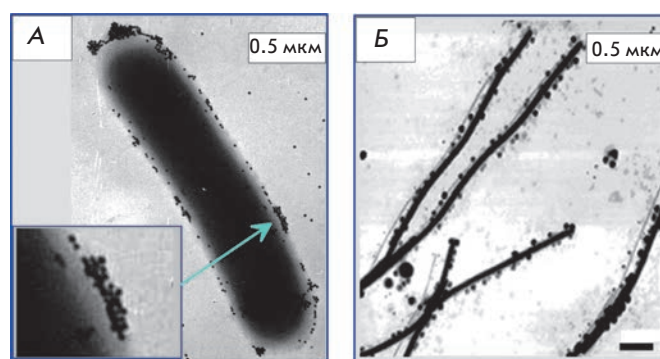


Рис. 1. ПЭМ-изображение клетки *Listeria monocytogenes*, меченной конъюгатом антител с коллоидным золотом (А), и изображение вируса табачной мозаики, меченного конъюгатом антител с коллоидным золотом, полученное методом сканирующей зондовой микроскопии (Б). Адаптировано по данным работ [11] (А) и [12] (Б).

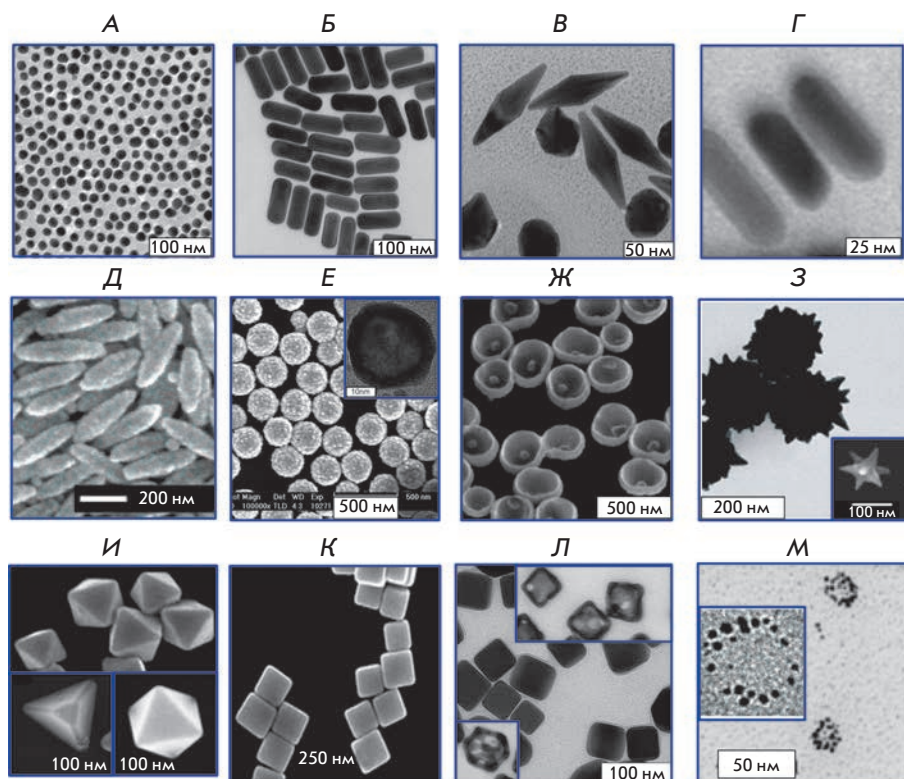


Рис. 2. Золотые плазмонно-резонансные наночастицы: 16 нм наносферы (А) [8], наностержни (Б) [15], бипирамиды (В) [16], золотые наностержни с серебряной нанооболочкой (Г) [17], «нанорис» – наностержни Fe_2O_3 , покрытые золотом (Д) [18], нанооболочки SiO_2/Au на ядрах двуоксида кремния (Е) [19] (на вставке показан вариант нанооболочки с полым ядром [20]), наночаши с ядром на дне (Ж) [21], нанооболочки SiO_2/Au с золотыми шипами («spiky nanoshells» [22], на вставке показана золотая «нанозвезда» [23]) (З), тетраэдры, октаэдры и кубооктаэдры (И) [24], нанокубики (К) [24], серебряные нанокубики и полученные из них золото-серебряные наноклетки (на вставках) (Л) [25], наноожерелья [26] (М). Рисунки воспроизведены или адаптированы по данным цитированных публикаций с разрешения The Royal Society of Chemistry (<http://dx.doi.org/10.1039/b711490g>, <http://dx.doi.org/10.1039/b925102b>, <http://dx.doi.org/10.1039/c0cs00018c>) и The American Chemical Society.

сканирующую электронную [13] и флуоресцентную [14] микроскопию.

Кроме «классического» коллоидного золота с квазисферическими частицами – наносферами – в качестве меток для микроскопических исследований в последние годы стали использовать частицы несферической цилиндрической формы – наностержни, а также нанооболочки, наноклетки, нанозвезды и др. типы частиц, объединенные термином плазмонно-резонансные частицы благородных металлов [8] (рис. 2).

Большую популярность в медицинских и биологических исследованиях в последние годы приобрели также методы визуализации объектов с использованием ЗНЧ и оптической микроскопии [27] и, в частности, конфокальной лазерной микроскопии. Конфокальная микроскопия представляет собой метод обнаружения микрообъектов с помощью оптической системы, которая обеспечивает регистрацию светового излучения только от объектов, расположенных в ее фокальной плоскости, что позволяет сканировать образцы по высоте и в итоге создавать их объемные изображения путем наложения сканограмм. Использование в этом методе ЗНЧ и их конъюгатов

с антителами позволяет в реальном времени отслеживать проникновение золота на уровне одной частицы в живые клетки (например, раковые) и даже оценить их количество [28].

Конфокальные изображения могут быть получены, например, с детектированием излучения флуоресценции (конфокальная флуоресцентная микроскопия) или резонансного упругого или двухфотонного (мультифотонного) рассеяния света плазмонными наночастицами (конфокальная микроскопия резонансного рассеяния или двухфотонной люминесценции). Эти методики основаны на обнаружении микрообъектов с помощью оптического микроскопа, в котором люминесценция объекта возбуждается благодаря одновременному поглощению двух (или более) фотонов, энергия каждого из которых меньше энергии, необходимой для возбуждения флуоресценции. Основное преимущество данного метода состоит в повышении контраста за счет сильного уменьшения фонового сигнала. Использование двухфотонной люминесценции золотых наночастиц позволяет визуализовать, в частности, онкомаркеры на поверхности или внутри клетки [29, 30]. На рис. 3А приведен пример комбинированного биоимиджинга раковой клетки с использо-

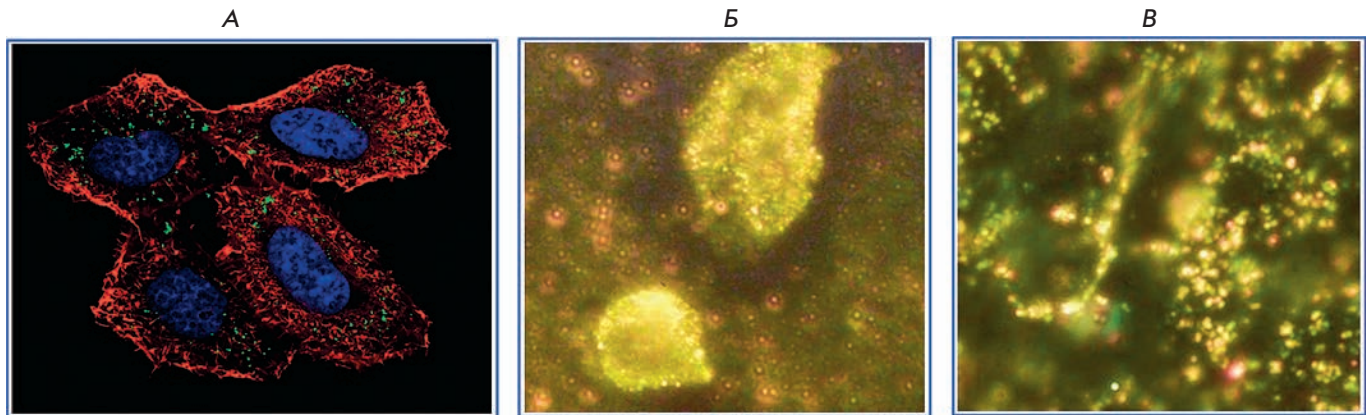


Рис. 3. А – Конфокальное изображение клеток HeLa в присутствии золотых наночастиц. Ядра окрашены реактивом Hoechst 33258 (синий цвет), актиновый цитоскелет – фаллоидином, меченным Alexa Fluor 488 (красный), золотые наночастицы (зеленый) выявлены методом двухфотонной люминесценции [30]. Темнопольное микроскопическое изображение опухолевых (Б) и здоровых (В) клеток с использованием конъюгатов золотых наночастиц с антителами к рецептору эпидермального фактора роста [31]. Адаптировано из цитируемых работ с разрешения The American Chemical Society.

ванием адсорбционных, флуоресцентных и люминесцентных плазмонно-резонансных меток.

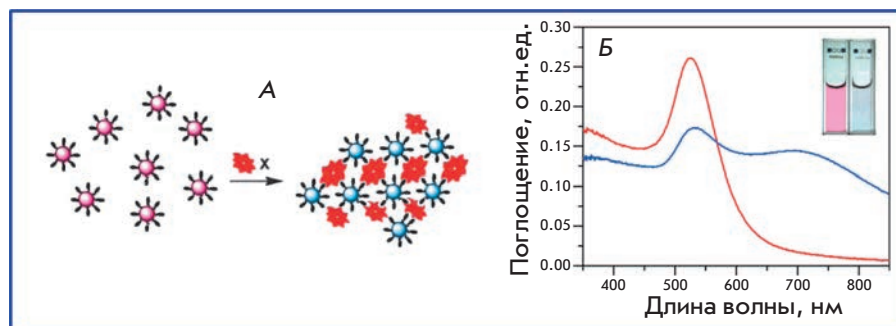
Одним из наиболее популярных методов биоимиджинга с использованием ЗНЧ остается микроскопия темного поля, основанная на рассеянии света микроскопическими объектами (темнопольная микроскопия резонансного рассеяния), в том числе и теми, размеры которых меньше предела разрешения светового микроскопа (рис. 3Б,В). При темнопольной микроскопии в объектив попадает только свет, рассеянный объектом при боковом освещении (аналогично эффекту Тиндаля), поэтому рассеивающий объект ярко светится на темном фоне. Золотые наночастицы имеют большие возможности для выявления биоспецифических взаимодействий с использованием световой микроскопии темного поля по сравнению с флуоресцентными метками [8], так как сечение рассеяния частицы на 3–5 порядков превышает сечение флуоресценции одной молекулы. Этот принцип был впервые использован американскими исследователями из лаборатории М. Эль-Сайеда [31] в новом методе простой и надежной диагностики онкологических заболеваний с помощью ЗНЧ. Метод основан на связывании конъюгатов, специфичных к опухолевым антигенам антител и ЗНЧ, преимущественно с поверхностью раковых клеток, а не здоровых клеток. Таким образом, с помощью метода темнопольной микроскопии резонансного рассеяния можно «картографировать» опухоль с точностью до нескольких клеток (рис. 3Б,В). В дальнейшем с этой целью использовали золотые наностержни [32], нанооболочки [33], нанозвезды [34] и наноклетки [35].

Наноклетки представляют собой сравнительно новый класс наночастиц, получаемых методом гальванического замещения на шаблонах из серебряных нанокубиков. В этой реакции три атома серебра заменяются на один атом золота, так что постепенно формируются различные пористые сплавные золото-серебряные структуры, называемые «нанокоробками» и «наноклетками» (nanoboxes и nanocages) [35]. В процессе формирования таких частиц плазмонный резонанс смещается от 430–440 нм у кубиков до 700–900 нм у наноклеток.

Использование несферических и/или неоднородных частиц, а также самосборных монослоев наночастиц или островковых пленок открывает новые возможности для повышенной чувствительности обнаружения бимолекулярного связывания на или около поверхности наноструктур. Принцип усиления сигнала биомолекулярного связывания основан на сильных локальных электромагнитных полях, возникающих около наночастиц с острыми участками поверхности или в узких (порядка или менее нанометра) зазорах между двумя наночастицами. Это обуславливает повышенную чувствительность плазмонного резонанса к локальному диэлектрическому окружению и высокую интенсивность рассеяния по сравнению с эквивалентными сферами. Поэтому такие наноструктуры имеют многообещающие перспективы использования в биомедицинских диагностических целях с применением световой микроскопии темного поля [36].

Золотые наночастицы в темнопольной микроскопии резонансного рассеяния используют для де-

Рис. 4. Иммуноанализ на частицах золя: схема агрегации конъюгатов в результате связывания с молекулами-мишенями (А) и соответствующие изменения спектров и цвета золя (Б). Адаптировано по данным [52] с разрешения The American Chemical Society.



текции микробных клеток и их метаболитов [37], биоимиджинга опухолевых клеток [38] и выявления рецепторов на их поверхности [39], для изучения процессов эндоцитоза [40]. В большинстве биомедицинских приложений эффективность мечения клеток конъюгатами оценивается на качественном уровне. Одно из немногих исключений представляет метод количественной оценки эффективности мечения клеток золотыми наночастицами [41], примененный для мечения клеток почек эмбриона свиньи конъюгатами золотых наноболочек.

Кроме перечисленных способов регистрации биоспецифических взаимодействий с помощью различных вариантов оптической микроскопии и ЗНЧ, в настоящее время активно развиваются и другие современные методы детекции и биоимиджинга, которые можно объединить под общим названием – «методы биофотоники» [9]. Биофотоника объединяет все исследования, связанные с взаимодействием света с биологическими клетками и тканями. К методам биофотоники можно отнести оптическую когерентную томографию [42], рентгеновскую и магниторезонансную томографию [43, 44], фотоакустическую микроскопию [45] и томографию [46], флуоресцентную корреляционную микроскопию [47] и т.п. В этих методах также с успехом используются золотые наночастицы различных размеров и форм. Особо перспективными, на наш взгляд, методы биофотоники с применением золотых несферических наночастиц могут оказаться для биоимиджинга *in vivo* [48]. Кроме того, следует отметить важность нового класса конъюгатов ЗНЧ с узнающими конструкциями на основе модуля «барназа–барстар» [49].

1.2. Аналитические методы диагностики

1.2.1. Гомофазные методы. С 80-х годов прошлого века конъюгаты коллоидного золота с узнающими биомакромолекулами начали применять в различных аналитических методах клинической диагностики. В 1980 г. Дж. Лойверинг и соавт. [50] предложили новый метод, названный ими иммуноанализ на ча-

стицах золя (sol particle immunoassay, SPIA). Этот метод основан на двух принципах: 1) цвет и спектр поглощения золя мало изменяются при адсорбции биополимеров на индивидуальных частицах [51]; 2) при сближении частиц на расстояние менее 0.1 их диаметра красный цвет золя изменяется на пурпурный, а спектр поглощения уширяется и сдвигается в красную область [51]. Эти изменения спектра поглощения легко детектируются спектрофотометрически или визуально (рис. 4, [52]).

Оптимизированный вариант метода (с использованием частиц золота более крупных размеров и моноклональных антител к различным сайтам антигена) применили для выявления хорионического гонадотропина в моче беременных [53]. На основе этих разработок фирмой «Chefaro» (Нидерланды) был выпущен набор Discretest™ для внебольничной ранней диагностики беременности. Наборы для иммуноколориметрического определения ревматоидного фактора и стрептолизина выпускает фирма «ПЛИВА-Лахема» (Чехия).

В дальнейшем этот метод применяли для иммуноанализа антигенов шистозом, рубелл и количественного определения иммуноглобулинов (см. ссылки в [5]), для определения тромбина (с использованием аптамеров) [54] и глюкозы [55], прямого выявления раковых клеток [56] и клеток лептоспир в моче [57], определения маркеров болезни Альцгеймера [58] и протеазной активности [59]. Одновременное использование конъюгатов золотых наностержней и наносфер с антителами для детекции опухолевых антигенов описано в работе [60]. Опубликованы данные [61] об определении вируса гепатита В в крови с помощью золотых наностержней, конъюгированных со специфичными антителами.

Все варианты метода SPIA оказались весьма простыми в исполнении и при этом высокочувствительными и специфичными. Однако в ряде случаев, несмотря на заведомую комплементарность пары, агрегация не происходила, цвет раствора и соответственно спектры поглощения не изменялись или изменялись незначительно. Опубликована модель обра-

зования второго белкового слоя на золотых частицах без потери агрегативной устойчивости золя [62]. Изменения спектров, обусловленные адсорбцией биополимеров на поверхности золотых наночастиц, сравнительно малы. Однако даже такие незначительные изменения спектров поглощения, вызванные изменением структуры биополимерного слоя (и, в частности, его среднего показателя преломления) около поверхности ЗНЧ, можно зарегистрировать и использовать для количественного анализа в биологических приложениях [63].

Для повышения чувствительности аналитической гомофазной реакции используют разнообразные оптические методы, включая различные варианты ИК-Фурье [64] и UV-vis-спектроскопии поглощения или отклонения луча (см. ссылки в [5]), гиперрелеевское [65], дифференциальное статическое [51] и динамическое [60] рассеяние света, а также поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние [66].

Новый вариант описываемого метода предложен Миркиным и соавт. [67] для колориметрической детекции ДНК. В настоящее время колориметрическое определение ДНК включает две стратегии: (1) использование конъюгатов ЗНЧ с тиол-модифицированными одноцепочечными ДНК [67–71]; (2) использование немодифицированных ЗНЧ [72, 73]. Первая стратегия основана на агрегации конъюгатов 10–30 нм ЗНЧ с тиол-модифицированными одноцепочечными ДНК-зондами при внесении в систему полинуклеотидов-мишеней. При этом применяют зонды двух типов, комплементарные двум концевым участкам мишеней. Гибридизация мишеней и зондов приводит к формированию агрегатов ЗНЧ, что сопровождается изменением спектра поглощения раствора и легко выявляется визуально, фотометрически [74] или методом динамического рассеяния света [71]. В рамках первой стратегии Маеда и соавт. [75] использовали диагностическую систему, основанную на агрегации ЗНЧ, модифицированных зондами одного типа, при внесении в раствор ДНК-мишеней в условиях высокой ионной силы. В отличие от них [75], Бапטיста и соавт. [70] разработали метод, основанный на повышенной стабильности конъюгатов при добавлении комплементарных мишеней даже в условиях высокой ионной силы (2 М NaCl) и наблюдали агрегацию некомплементарных мишеней. Кажущиеся противоречия между двумя подходами были объяснены [76] различием в поверхностной плотности функционализации.

Вторая стратегия [72] основана на том, что при высокой ионной силе одноцепочечная ДНК защищает немодифицированные ЗНЧ от агрегации, в то время как формирование дуплексов при гибридизации не может стабилизировать систему. Этот подход ис-

пользован для определения вируса гепатита С [77]. Недавно Ся и соавт. [78] описали новый вариант второй стратегии, в котором используются одноцепочечные ДНК, немодифицированные ЗНЧ и катионный полиэлектролит. Этот же подход оказался пригодным для определения широкого спектра мишеней, включая пептиды, аминокислоты, пестициды, антибиотики и тяжелые металлы. В отличие от методик с обычными ЗНЧ, Хэ и соавт. [73] предложили метод определения ДНК вируса HIV-1 U5 с использованием стабилизированных цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ) наностержней и метода светорассеяния с пределом детекции (100 пМ). В оптимизированном варианте с использованием спектроскопии поглощения [79] предел детекции был снижен до 0.1 пМ. Недавно показали, что для обнаружения ДНК-мишеней можно также использовать покрытые ЦТАБ положительно заряженные ЗНЧ в комбинации с методами спектроскопии и динамического рассеяния [15].

Перечисленные варианты метода агрегации частиц золя за счет реакции гибридизации использовали для определения ДНК микобактерий [70], стафилококков [80], стрептококков [81] и хламидий [82] в клинических образцах.

Способность золотых частиц при их взаимодействии с белками агрегировать с изменением цвета раствора послужила основой для количественного метода колориметрического определения белков [83]. Предложен новый вариант метода SPIA с использованием микротитровальных планшетов и микропланшетного спектрофотометра, а также с применением в качестве специфического агента, выявляющего белки, конъюгата трипсина с коллоидным золотом [84].

1.2.2. Дот-иммуноанализ. На ранних этапах развития иммуноанализа предпочтение отдавалось жидкофазным методикам, в которых осаждали связавшиеся антитела или удаляли несвязавшийся антиген адсорбцией с помощью активированного угля, покрытого декстраном. В настоящее время наиболее распространены твердофазные методики (впервые использованные в радиоиммуноанализе белков), поскольку они позволяют существенно упростить проведение анализа и уменьшить фоновый сигнал. Наибольшее распространение среди твердофазных носителей получили микротитровальные полистирольные планшеты и нитроцеллюлозные фильтры.

В качестве метки в мембранных тестах (дот- и блот-анализы) широко применяют радиоактивные изотопы (^{125}I , ^{14}C , ^3H) и ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу и др.). В 1984 г. независимо опубликовали четыре работы [85–88], в которых меткой для твердофазного иммуноанализа служило кол-

Таблица 1. Пределы чувствительности иммунодот-блот-методов на нитроцеллюлозных фильтрах с использованием различных меток (согласно [89])

Метка	Предел чувствительности, пг белка / фракция
^{125}I	5
Пероксидаза хрена	10
Щелочная фосфатаза	1
Коллоидное золото	1
Коллоидное золото + серебро	0.1
Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ)	1000

лоидное золото. Использование конъюгатов ЗНЧ в твердофазном анализе основано на том, что интенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяет визуально определять результаты реакции, проведенной на твердом носителе. «Иммунозолотые» методы в дот-блот-анализе превосходят прочие (например, иммуноферментный) по чувствительности (табл. 1, [89]), простоте, скорости и стоимости. Размеры ЗНЧ после соответствующей иммунохимической реакции можно увеличить с помощью реакции усиления солями серебра [90] или золота (автометаллография) [91], что существенно увеличивает границы приложения метода. Оптимизированный вариант твердофазного анализа с использованием системы денситометрирования Quantity One («Bio-Rad») обеспечивал линейный диапазон детекции от 1 пМ до 1 мкМ [92] с пределом 100 аМ и его снижением до 100 зМ усилением серебром. Следует иметь в виду, что это рекордное снижение предела детекции за счет усиления серебром достигнуто при помощи чувствительной системы денситометрирования Quantity One. Современные инструментальные методы, такие, как фототермическое отклонение зондирующего лазерного луча, вызванное нагревом локального окружения около поглощающих частиц импульсами нагревающего лазера (LISNA [93]), также обеспечивает очень широкий диапазон детекции – от трех порядков до нескольких отдельных частиц в пятне.

При специфическом окрашивании мембрану с нанесенным материалом инкубируют в растворе антител (или других биоспецифических зондов), меченных коллоидным золотом [94]. В качестве зондов при проведении «золотого» дот- или блот-анализа используют иммуноглобулины, Fab- и scFv-фрагменты

антител, белок А, лектины, ферменты, авидин или антибиотинные антитела при исследовании биотинилированных образцов, аптамеры и другие узнающие молекулы. Используют также одновременно несколько меток (например, коллоидное золото и пероксидазу или щелочную фосфатазу) для выявления различных антигенов на мембране.

Коллоидное золото в мембранных тестах применяли для диагностики паразитарных, вирусных, грибковых заболеваний, туберкулеза, мелиоидоза, сифилиса, бруцеллеза, шигеллеза, коли-инфекций, для определения групп крови, беременности на ранних сроках, дот-блот-гибридизации, выявления дифтерийного токсина, диагностики инфаркта миокарда, гепатита В (см. ссылки в [5]).

Иммунодот является одним из наиболее простых методов определения антигенов, иммобилизованных на мембранах, в некоторых случаях этот метод позволяет оценить и их количественное содержание. Чаще всего с помощью иммунодота изучают растворимые антигены [95]. Однако имеются немногочисленные работы, в которых методом дот-анализа с ферментной меткой изучали корпускулярные антигены (целые бактериальные клетки) [96]. Впервые методика дот-анализа целых бактериальных клеток с визуализацией продуктов реакции биоспецифическими маркерами – конъюгатами коллоидного золота («cell-gold immunoblotting»), использована для серотипирования почвенных азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azospirillum* [97]. В дальнейшем этот метод применили для экспресс-диагностики кишечных инфекций [98].

Результаты применения золотых наноболочек в качестве биоспецифических меток для дот-анализа впервые были представлены в работе [99], в которой исследованы три типа золотых наноболочек с диаметром силикатного ядра 100, 140 и 180 нм и толщиной золотой оболочки примерно 15 нм. В качестве биоспецифической пары использовали нормальную кроличью сыворотку (молекулы-мишени) и антикроличьи иммуноглобулины овцы (узнающие молекулы). При использовании стандартного протокола дот-анализа на нитроцеллюлозной мембране с наночастицами коллоидного золота диаметром 15 нм в качестве меток минимально выявляемое количество кроличьих IgG составляло 15 нг. Замена конъюгатов коллоидного золота на наноболочки увеличила чувствительность анализа до 0.2 нг в случае золотых наноболочек типа 180/15 нм и до 0.4 нг в случае золотых наноболочек типа 100/15 и 140/15 нм (рис. 5). Столь заметное увеличение чувствительности дот-анализа с наноболочками по сравнению с коллоидным золотом объяснено различными оптическими свойствами частиц [100].

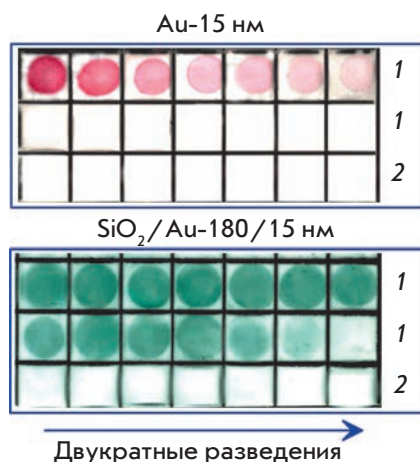


Рис. 5. Результаты дот-анализа нормальной кроличьей сыворотки (1) с использованием суспензий конъюгатов 15 нм ЗНЧ и наноболочек SiO_2/Au с диаметром ядра 180 нм с овечьими антикроличьими антителами. Количество IgG в первом квадрате верхнего ряда равно 1 мкг и уменьшается в соответствии с двукратными разведениями слева направо. Нижние ряды (2) соответствуют нанесению 10 мкг бычьего сывороточного альбумина в каждый квадрат в качестве негативного контроля. Выявляемое количество пробы равно 15 нг для 15 нм ЗНЧ и 0.2 нг для наноболочек. Адаптировано по данным [100].

Весьма перспективным кажется применение ЗНЧ при анализе больших массивов антигенов в микроматрицах (иммуночипах) [101], которые позволяют определять анализируемое вещество в 384 пробах одновременно в концентрации 60–70 нг/л или, с учетом микролитровых количеств пробы и иммунозолотого маркера, с пределом детекции менее 1 пг.

1.2.3. Иммунохроматография. Около 10 лет назад несколько зарубежных фирм организовали выпуск иммунохроматографических тест-систем для бесприборной диагностики. Благодаря высокой специфичности и чувствительности иммуноанализа эти тесты нашли широкое применение в определении наркотических соединений, токсинов, ранней диагностике беременности, скрининге особо опасных и урогенитальных инфекций. Разработаны новые методы диагностики туберкулеза, геликобактериоза, стафилококковой инфекции, гепатита В, простатита, определения беременности на ранних сроках, пестицидов, афлатоксина, диэтилстильбэстрола и цефалексина в объектах окружающей среды, а также ДНК-гибридизации (см. ссылки в [5]).

Иммунохроматографический анализ [102] основан на движении элюента вдоль мембраны (латеральная

диффузия), в результате чего на разных участках мембраны образуются специфические иммунные комплексы, выявляемые как окрашенные полосы. В качестве меток в этих системах используются ферменты, окрашенные латексы, квантовые точки [102], но в подавляющем большинстве случаев – золотые наночастицы [103].

Исследуемый образец за счет капиллярных сил мигрирует вдоль тест-полоски. Если проба содержит искомое вещество или иммунохимически близкие соединения в момент прохождения образца через абсорбирующее устройство, то происходит реакция со специфическими антителами, мечеными коллоидным золотом, которая сопровождается образованием комплекса антиген–антитело. Коллоидный препарат вступает в реакцию конкурентного связывания с антигеном, иммобилизованным в тест-зоне (как правило, при детекции низкомолекулярных соединений для иммобилизации используется конъюгат гаптена с белковым носителем). Если концентрация антигена в пробе превышает пороговый уровень, то конъюгат не обладает свободными валентностями для взаимодействия в тест-зоне, и окрашенная полоса, соответствующая образованию комплекса, не выявляется. При отсутствии в пробе определяемого вещества или его концентрация не достигает порогового уровня, антиген, иммобилизованный в тест-зоне полоски, вступает в реакцию с антителами на поверхности коллоидного золота, что приводит к появлению окрашенной полосы.

Золотые частицы с иммобилизованными антителами, непрореагировавшие с антигеном в тест-зоне полоски, при дальнейшем движении фронта жидкости связываются в контрольной зоне тест-полоски с антивидовыми антителами. Появление окрашенной полосы в контрольной зоне подтверждает правильность проведения тестирования и диагностическую активность компонентов системы. Отрицательный

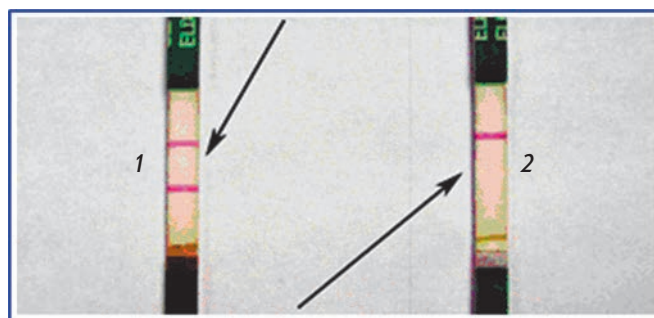


Рис. 6. Результаты иммунохроматографического анализа: 1 – отрицательный, 2 – положительный.

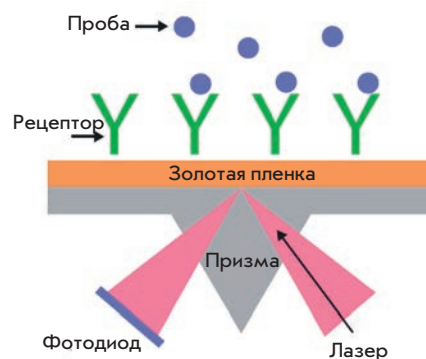
результат тестирования – появление двух окрашенных полос (в тест-зоне и контрольной зоне) – указывает на отсутствие антигена в образце или на его более низкую концентрацию по сравнению с пороговым уровнем. Положительный результат тестирования – появление одной окрашенной полосы в контрольной зоне – свидетельствует о превышении антигеном пороговой концентрации (рис. 6).

Изучение таких тест-систем показало их высокую стабильность, воспроизводимость результатов и корреляцию с альтернативными методами. Денситометрическая характеристика степени неоднородности полос дает величину 5–8%, что позволяет вполне достоверно визуально оценить результаты анализа. Эти тесты крайне просты и удобны в применении.

1.2.4. Плазмонно-резонансные биосенсоры. В последние годы наночастицы золота, серебра и их композиты широко используются как эффективные оптические детекторы биоспецифических взаимодействий [104]. В частности, резонансные оптические свойства нанометровых металлических частиц успешно применяются для разработки так называемых биочипов и биосенсоров. Различают колориметрические, рефрактометрические, электрохимические, пьезоэлектрические и др. сенсоры [102, 105, 106]. Подобные устройства представляют большой интерес для биологии (определение содержания нуклеиновых кислот, белков и метаболитов), медицины (скрининг лекарственных средств, анализ антител и антигенов, диагностика инфекционных заболеваний) и химии (экспресс-мониторинг окружающей среды, количественный анализ растворов и дисперсных систем).

Более 10 лет развивается изучение биоспецифических взаимодействий в таких системах, где ЗНЧ представлены упорядоченными структурами: самосборными (тонкие пленки) [107] или в составе полимерных матриц [108]. В этом случае используется усиление оптического сигнала от конъюгата за счет усиления возбуждающего локального поля в сформировавшемся агрегате из золотых нанокластеров. При создании биосенсорных устройств в настоящее время используются новые уникальные технологии, в частности монослойная самосборка металлических частиц (см. [109] и ссылки в этой работе), нанолитография [110], вакуумное испарение [111] и др. Принципиально важно отметить, что на оптический отклик от наночастиц или их агрегатов (особенно упорядоченных) существенно влияют размер и форма частиц [112], межчастичное расстояние [113], а также оптические свойства их локального окружения [114], что дает возможность управлять «настройкой» сенсоров. Эти свойства металлических кластеров послужили основой для создания новых многообещающих

Рис. 7. Схема детектирования молекул пробы в приборе типа VIAcore™ с использованием полного внутреннего отражения на грани призмы, покрытой тонкой золотой пленкой. Адаптировано по данным [106].



плазмонно-резонансных биосенсорных систем (SPR-биосенсоры), основанных на преобразовании биоспецифических взаимодействий в оптический сигнал. Теория создания и варианты практического использования подобных систем рассмотрены в обзорах [115–119].

Чувствительность, стабильность и селективность сенсора напрямую зависят от характеристик оптической системы регистрации. Наиболее популярной сенсорной системой такого рода является VIAcore™ [120]. Принцип измерения в планарных, призмных или зеркальных биосенсорах аналогичен принципу метода нарушенного полного внутреннего отражения, который традиционно используется для измерений толщины и показателя преломления ультратонких органических пленок на металлических (отражающих) поверхностях [105]. Возбуждение плазмонного резонанса в плоском слое золота происходит, когда поляризованный свет падает на поверхность под определенным углом. На поверхности раздела металл/диэлектрик возбуждаются электромагнитные поля, бегущие вдоль границы раздела и локализованные около нее за счет экспоненциального убывания амплитуды перпендикулярно диэлектрику с типичной длиной затухания до 200 нм (эффект полного внутреннего отражения, рис. 7). Коэффициент отражения под определенным углом на определенной длине волны света зависит от диэлектрических свойств тонкого слоя на поверхности раздела, которые определяются, в конечном счете, концентрацией молекул-мишеней в слое.

Различные типы биосенсоров с использованием ЗНЧ были разработаны для иммунодиагностики клещевого энцефалита [121], вирусов папилломы [122] и иммунодефицита [123] человека, болезни Альцгеймера [124], определения фосфорорганических веществ и пестицидов [125], антибиотиков [126], аллергенов [127], цитокинов [128], углеводов [129], иммуноглобулинов [130], выявления опухолевых [131] и бактериальных [132] клеток, определения активности клеток головного мозга [133].

Биосенсоры на основе ЗНЧ применяются не только в иммуноанализе [134], но и для детекции нуклеотидных последовательностей [67, 119]. В пионерских работах [135, 136] получены рекордные показатели чувствительности подобных сенсоров в зептомолярном диапазоне на основе детектирования спектров резонансного рассеяния от отдельных частиц. Это открыло путь к регистрации межмолекулярных взаимодействий на уровне отдельных молекул [137].

2. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В ТЕРАПИИ

2.1. Фототермическая терапия с использованием золотых наночастиц

Фототермическое повреждение клеток представляет собой интенсивно развиваемое перспективное направление в терапии как опухолей [138], так и инфекционных заболеваний. Суть явления такова: золотые наночастицы имеют максимум поглощения в видимой или ближней инфракрасной области и при облучении соответствующим светом сильно разогреваются. Если при этом они находятся внутри или вокруг клеток-мишеней (чего можно добиться путем конъюгации частиц золота с антителами или другими молекулами), то эти клетки погибают.

Тепловое воздействие используется в терапии опухолей с XVIII века. С этой целью применялся как локальный нагрев (с использованием микроволнового, ультразвукового и радиоизлучений), так и гипертермия всего организма [139] (нагревание до 41–47°C в течение 1 ч). При локальном разогреве до 70°C продолжительность процедуры может быть снижена до 3–4 мин. Локальная и общая гипертермия вызывают необратимое повреждение клеток, обусловленное нарушением проницаемости клеточных мембран и денатурацией белков. При этом, естественно, повреждаются и здоровые ткани, что накладывает существенные ограничения на применение этого метода.

Революция в термотерапии рака связана с использованием лазерного излучения, что позволило обеспечить управляемое и направленное повреждение опухолевых тканей [140]. Соединение лазерного излучения и оптоволоконных световодов дало отличные результаты и получило название внутритканевой лазерной гипертермии [141]. К недостаткам лазерной терапии относятся низкая селективность, связанная с необходимостью использовать мощные лазеры для эффективной стимуляции гибели опухолевых клеток.

В 2003 г. ЗНЧ впервые применили в качестве агентов для фототермической терапии [142, 143], которую позднее было предложено называть плазмонной фототермической терапией (ПФТТ) [139]. В работе [144] описан новый метод селективного повреждения

клеток-мишеней, основанный на использовании 20 и 30 нм золотых наносфер, облучаемых 20 нс лазерными импульсами (532 нм), для создания локального нагрева. Для импульсной фототермии в модельном эксперименте использовали сэндвич-технология мечения Т-лимфоцитов конъюгатами ЗНЧ. Особо перспективным представляется использование ЗНЧ для фототермической терапии устойчивых к химиотерапии форм рака. В отличие от фотосенсибилизаторов (см. ниже), уникальность ЗНЧ определяется длительным сохранением оптических свойств в клетках при определенных условиях. Последовательное облучение несколькими лазерными импульсами позволяет контролировать инактивацию клеток нетравматическим способом, а использование одновременно рассеивающих и поглощающих свойств наночастиц – ПФТТ с помощью оптической томографии [33].

На рис. 8 приведен пример успешной терапии привитой опухоли у мышей [145]. Дальнейшее развитие метода ПФТТ и его продвижение в клиническую практику зависит от успешного решения многих задач, главные среди которых: 1) выбор оптимальных по оптическим свойствам наночастиц; 2) повышение контраста накопления наночастиц в опухоли и снижение общей потенциальной токсичности; 3) разработка способов доставки оптического излучения к мишеням и поиск альтернативных источников излучения, сочетающих высокую проникающую способность с возможностью нагрева ЗНЧ.

Первое требование определяется согласованием спектрального положения максимума плазмонного резонанса поглощения с окном прозрачности биотканей в ближней ИК-области 700–900 нм. Опубликован [113] обобщающий теоретический анализ фототермической эффективности ЗНЧ в зависимости от их размера, формы, структуры и степени агрегации. Показано, что хотя сами золотые наносферы неэффективны в ближнем ИК-диапазоне, агрегаты таких частиц могут быть очень эффективными при достаточно малых межчастичных расстояниях (менее 0.1 диаметра). Подобные кластеры формируются как на поверхности клеток, так и внутри них [146]. Получены данные об усилении ПФТТ за счет кластеризации [147, 148]. В частности, установлено [147], что малые агрегаты из 30 нм частиц позволяют разрушать раковые клетки при мощности в 20 раз меньшей, чем в контроле без частиц.

Определены также оптимальные для ПФТТ параметры золотых наноболочек и наностержней [113, 149]. К настоящему моменту опубликовано много работ, в которых описано применение золотых наностержней [32, 150], наноболочек [142, 151] и сравнительно нового класса частиц – золото-серебряных наноклеток для ПФТТ [152, 153]. Результаты сравне-

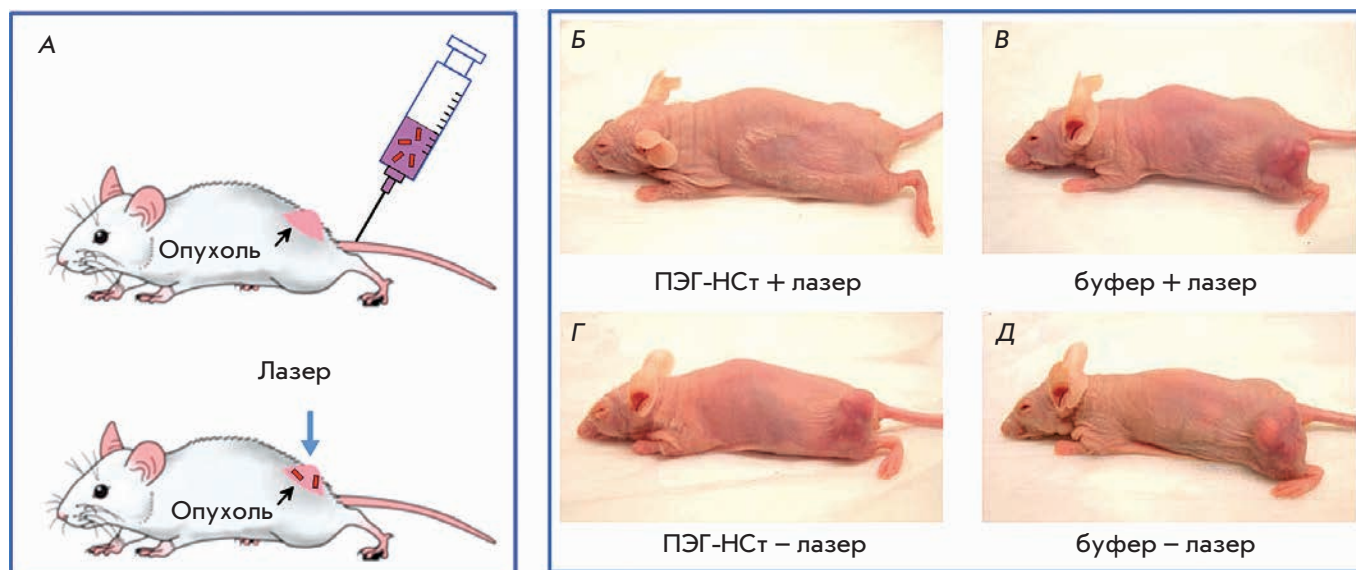


Рис. 8. Схема эксперимента, показывающего накопление золотых наностержней (НСт) после введения в хвостовую вену мыши (А). Результаты опыта по фототермической деструкции привитой опухоли у мыши (2–3 нед. после инъекции мышам опухолевых клеток MDA-MB-435 человека). Облучение лазером (810 нм, 2 Вт/см², 5 мин) проведено через 72 ч после инъекции золотых наностержней, функционализированных полиэтиленгликолем (ПЭГ-НСт, 20 мг Au/кг) (Б) или буфера (В). Видно, что при облучении без частиц (контроль В), равно как и при введении частиц или буфера без облучения (контроли Г и Д), опухоль продолжала развиваться, и только в опыте (Б) получена полная деструкция. Адаптировано по данным [145] с разрешения Informa Healthcare Communications.

ния эффективности нагрева наностержней, наноболочек и наноклеток приведены в работах [25, 154].

В связи с оптимизацией параметров частиц следует иметь в виду три принципиальных момента. Во-первых, собственное поглощение не является единственным параметром, определяющим эффективность ПФТТ [155]. Быстрый нагрев наночастиц или кластеров приводит к формированию паровых пузырьков [156], которые могут вызывать кавитационное повреждение клеток при облучении видимым [148] или ближним ИК-светом [157]. Эффективность образования паровых пузырьков существенно увеличивается при образовании кластеров наночастиц [143, 146]. Возможно именно этот эффект, а не усиленное поглощение определяет более сильное повреждение клеток при прочих равных условиях [155]. Наконец, облучение наночастиц мощными резонансными наносекундными ИК-импульсами может приводить к деструкции частиц уже после первого импульса (см., например, [158, 159] и ссылки в них). В серии работ Лапотко и соавт. (см. [160] и ссылки в этой статье) обратили внимание на то, что разогрев ЗНЧ и их деструкция могут приводить к резкому снижению фототермической эффективности «холодных» частиц, настроенных на длину волны лазера. Использование фемтосекундных импульсов не решает проблему из-

за низкой доставляемой энергии, поэтому необходим тщательный контроль сохранения свойств наночастиц для выбранного режима облучения.

Рассмотрим теперь второй вопрос, связанный с проблемой целевой доставки наночастиц в опухоль. Этот вопрос имеет два важных аспекта: повышение контраста в целевой биомассе и снижение побочных эффектов, обусловленных накоплением ЗНЧ в других органах, прежде всего в печени и селезенке (см. ниже). Обычно используются две стратегии доставки. Первая основана на конъюгации ЗНЧ с ПЭГ, вторая – на конъюгации с антителами к определенным маркерным белкам опухолевых клеток. ПЭГ используется для увеличения биодоступности и стабильности наночастиц, приводящих к увеличению времени их циркуляции в кровотоке. Покрытые цитратом золотые наносферы, ЦТАБ-покрытые наностержни, а также наноболочки имеют низкую устойчивость в солевых буферных растворах. При конъюгации наночастиц с ПЭГ их стабильность существенно улучшается, предотвращая солевую агрегацию.

In vivo пэгилированные наночастицы предпочтительно накапливаются в опухолевой ткани благодаря увеличенной проницаемости сосудов опухоли [161] и удерживаются в ней за счет уменьшенного лим-

фооттока. Кроме того, пэгелированные наночастицы менее доступны для иммунной системы (stealth technologies). Этот метод доставки называют пассивным, в отличие от активного – с использованием антител [162] (рис. 9). Активный метод доставки более надежен и эффективен. В нем используются антитела к определенным опухолевым маркерам. Наиболее часто такими маркерами служит рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его разновидности (например, Her2) [151, 163], фактор некроза опухоли (ФНО) [164]. Особенно перспективным представляется использование конъюгатов ЗНЧ с антителами одновременно как для диагностики, так и для фототермической терапии (методы так называемой тераностики) [165]. В дополнение к антителам для активной доставки может использоваться фолиевая кислота, лиганд многочисленных фолатных рецепторов опухолевых клеток [150], а также гормоны [166].

В последнее время вопрос об эффективности адресной доставки наночастиц в опухоль вновь стал предметом изучения и дискуссии [167]. В опытах с липосомами, мечеными анти-Her2-антителами [168], и ЗНЧ, мечеными трансферрином [169], показано, что функционализация улучшает проникновение наночастиц в клетки, но не увеличивает существенно контраст накопления частиц в опухоли. Изучены [167] биораспределение и локализация золотых наностержней, меченных тремя типами зондовых молекул, включая (1) scFv-фрагмент антител EGFR; (2) N-концевой фрагмент пептида, узнающего рецептор урокиназного активатора плазминогена (uPAR); (3) циклический RGD-пептид, распознающий $\alpha_v\beta_3$ -рецептор интегрин. Оказалось, что все три типа лигандов незначительно улучшают контраст накопления наночастиц в клеточных моделях и в опухоли при внутривенном введении, но сильно влияют на внеклеточное распределение и внутриклеточную локализацию. Поэтому сделан вывод, что в случае ПФТТ введение частиц непосредственно в опухоль может быть более эффективным, чем внутривенное.

Последний важный вопрос современной ПФТТ связан с эффективной доставкой излучения к биомишени. Поскольку поглощение хромофоров биотканей в видимой области на два порядка меньше, чем в ближнем ИК-свете [138], то использование ИК-излучения радикально снижает нецелевую тепловую нагрузку и увеличивает проникновение излучения в глубь тканей. Тем не менее, глубина проникновения обычно не превышает 5–10 мм [142, 170], поэтому необходим поиск альтернативных решений. Первый подход состоит в использовании импульсных (наносекунды) режимов облучения вместо непрерывных, что позволяет поднять мощность излучения без увеличения побочных эффектов. Второй подход состоит

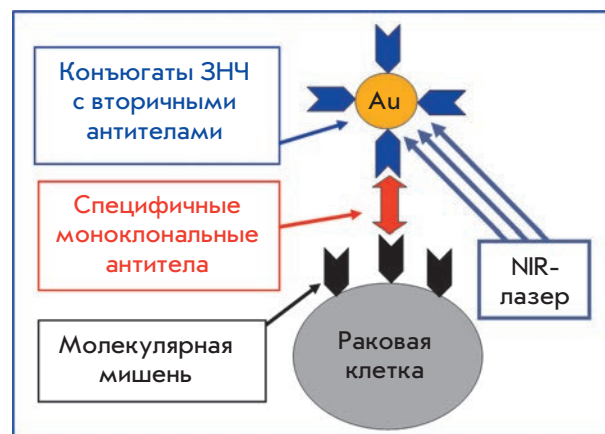


Рис. 9. Схема плазмонной фототермической терапии с активным методом доставки ЗНЧ к опухолевым клеткам. Воспроизведено из работы [8] с разрешения Elsevier.

в использовании оптоволоконных устройств для эндоскопической или внутритканевой доставки излучения. Плюсы и минусы такого подхода очевидны. Наконец, для гипертермии можно использовать излучение с большей глубиной проникновения, например радиоизлучение [171].

Конъюгаты ЗНЧ с антибиотиками и антителами использовали также в качестве фототермических агентов для селективного повреждения простейших и бактерий [172, 173]. Информацию по некоторым вопросам использования ПФТТ можно найти в книгах и обзорах [139, 170, 174, 175]. Особо следует отметить обстоятельный обзор [138].

2.2. Фотодинамическая терапия с использованием золотых наночастиц

Фотодинамический метод [176], применяемый при онкологических заболеваниях, некоторых кожных или инфекционных заболеваниях основан на использовании светочувствительных веществ – фотосенсибилизаторов (в том числе красителей), и, как правило, видимого света определенной длины волны. Сенсибилизатор вводится в организм чаще всего внутривенно, но может применяться аппликационно или перорально. Вещества для фотодинамической терапии (ФДТ) обладают способностью избирательно накапливаться в опухоли или иных целевых тканях (клетках). Пораженные ткани облучают лазерным светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения красителя. Кроме обычного выделения тепла за счет поглощения [6], существенным является второй механизм, связанный с фотохимической генерацией синглетного кислорода и образованием высокоактивных

радикалов, которые вызывают некроз и апоптоз опухолевых клеток. ФДТ также приводит к нарушению питания и гибели опухоли за счет повреждения ее микрососудов. Главный недостаток ФДТ состоит в том, что фотосенсибилизатор остается в организме в течение длительного времени, оставляя ткани больного высокочувствительными к свету. С другой стороны, использование красителей для селективного нагрева тканей [6] имеет низкую эффективность из-за малого сечения поглощения хромофоров.

Хорошо известно [177], что металлические наночастицы – эффективные тушители флуоресценции. Однако недавно было показано [178], что интенсивность флуоресценции можно усилить плазмонной частицей, если молекулы разместить на оптимальном расстоянии от металла. В принципе, эта идея может использоваться для повышения эффективности ФДТ.

В ряде работ предложен метод доставки лекарственных средств в составе полиэлектролитных капсул на ЗНЧ, разрушающихся под воздействием лазерного излучения и доставляющих лекарство к мишеням [179, 180], или с помощью наночастиц, окруженных слоем полимерного наногеля [181, 182]. Кроме того, в составе наноконъюгатов используют фотоактивные вещества [183] и пептиды, облегчающие внутриклеточное проникновение [184]. Недавно предложено [185] использовать композитные наночастицы, в состав которых, помимо золотых наночастиц, входят магнитные частицы, фотодинамический краситель, ПЭГ и антитела. Наконец, по данным [186], конъюгаты наночастиц с фотодинамическими красителями способны оказывать синергичный антимикробный эффект.

Таким образом, золотые наноструктуры с плазмонным резонансом весьма перспективны для селективной ПФТТ онкологических и других заболеваний. Не вызывает сомнений, что ряд вопросов нуждается в дальнейшем изучении, например, стабильность, биосовместимость, химическое взаимодействие биоконъюгатов наночастиц в физиологических окружающих средах, время циркуляции в крови, проникновение в опухоль, взаимодействие с иммунной системой, вывод наночастиц и т.д. Мы ожидаем, что успех начальных этапов использования наночастиц для селективной ПФТТ может быть расширен в клинической стадии [138] при условии дальнейшего изучения оптимальных методических параметров.

2.3. Использование золотых наночастиц как терапевтического средства

Золотые наночастицы все активнее используют не только в диагностике и опытах по фототермолизу клеток, но и в терапевтических целях. В 1997 г. появилось первое сообщение об успешном примене-

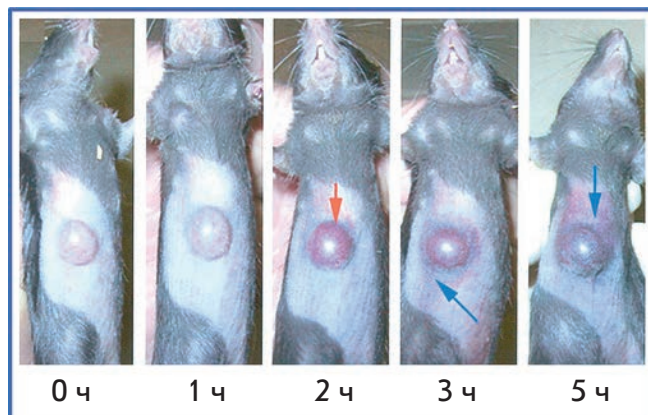


Рис. 10. Накопление конъюгата золотых наночастиц с ФНО в опухоли через 1–5 ч. Больным мышам внутривенно вводили 15 мкг вектора ЗНЧ-ФНО. Брюшная поверхность животного была сфотографирована в обозначенные времена, показывая изменения цвета опухоли за 5 ч. Красная стрелка показывает накопление вектора в опухоли; синие стрелки – в тканях, окружающих опухоль. Адаптировано из работы [191] с разрешения The American Association for Cancer Research.

нии коллоидного золота при ревматоидном артрите у человека [187]. В 2008 г. опубликован обширный материал по десятилетним клиническим испытаниям препарата Aurasol® для перорального применения при тяжелых формах ревматоидного артрита [188]. Описаны положительные результаты, достигнутые при внутрисуставном введении коллоидного золота крысам с коллаген-индуцированным артритом [189]. Авторы объясняют положительный эффект усилением антиангиогенной активности за счет связывания ЗНЧ с фактором роста сосудистого эндотелия и, вследствие этого, уменьшением инфильтрации макрофагов и воспаления. Сходные результаты получены и при подкожном введении золотых наночастиц крысам с коллаген- и пристан-индуцированным артритом [190].

Ученые из Мэрилендского университета использовали коллоидно-золотой вектор для доставки ФНО к солидным опухолям у мышей [191, 192]. При внутривенной инъекции конъюгат ЗНЧ с ФНО быстро накапливается в опухолевых клетках и не обнаруживается в клетках печени, селезенки и других здоровых органов. Накопление ЗНЧ в опухоли доказывается изменением цвета опухоли, которая становится ярко-красно-фиолетовой (цвет, характерный для коллоидного золота и его агрегатов), что совпадает с максимумом опухолиспецифичной активности ФНО (рис. 10). Вектор «коллоидное золото-ФНО» обладал меньшей токсичностью и большей эффек-

тивностью в уменьшении размеров опухоли, чем нативный ФНО, так как максимальная противоопухолевая реакция достигалась при использовании более низких доз лекарства. Препарат для внутривенного введения на основе конъюгата ЗНЧ с ФНО под названием AurImmune™ уже прошел вторую стадию клинических испытаний.

Антиангиогенные свойства ЗНЧ [193] наблюдали *in vitro* и *in vivo*. Оказалось, что ЗНЧ взаимодействуют с гепаринсвязывающими гликопротеинами – факторами сосудистой проницаемости, факторами роста сосудистого эндотелия и фибробластов. Эти вещества являются медиаторами ангиогенеза, в том числе в опухолевых тканях, и ЗНЧ ингибируют их активность. Поскольку интенсивный ангиогенез (процесс образования новых кровеносных сосудов в органах или тканях) рассматривается как один из основных факторов опухолевого роста, наличие у ЗНЧ антиангиогенных свойств делает их потенциально перспективными для терапии опухолей. Эта же группа исследователей показала, что золотые наночастицы усиливают апоптоз устойчивых к запрограммированной смерти клеток хронического лимфолейкоза [194], а также подавляют пролиферацию клеток множественной миеломы [195].

3. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ – НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Одно из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений использования ЗНЧ в медицине – адресная доставка лекарственных средств [196, 197]. Самыми популярными объектами для адресной доставки являются противоопухолевые средства и антибиотики.

Предложены варианты использования конъюгатов ЗНЧ с такими противоопухолевыми средствами, как паклитаксель [192], метотрексат [198], даунорубин [199], гемцитабин [200], меркаптопурин [201], додецилцистеин [202], сульфонамид [203], фторурацил [204], комплексы платины [205], кахалалид [206], тамоксифен [207], герцептин [208], доксорубин [209], проспидин [210] и др. Конъюгацию осуществляли как путем простой физической адсорбции препаратов на ЗНЧ, так и с помощью алкантиольных линкеров. Действие конъюгатов оценивали как (в основном) на моделях *in vitro* – с использованием культур опухолевых клеток, так и *in vivo* – на мышцах с привитыми опухолями различной природы и локализации (карцинома легких Льюиса, аденокарцинома поджелудочной железы и др.). Кроме действующего вещества для создания системы доставки использовали таргетные молекулы (например, цетуксимаб), обеспечивающие лучшее закрепление и проникновение комплекса в клетки-мишени. Также предложено

применять мультимодальные системы доставки, когда золотая наночастица нагружена несколькими лекарственными средствами (как гидрофильными, так и гидрофобными), а также вспомогательными веществами – таргетными молекулами, красителями для фотодинамической терапии и т.п. [211]. Большинство исследователей отмечают высокую эффективность противоопухолевых средств, конъюгированных с золотыми наночастицами.

В качестве объектов, доставляемых золотыми наночастицами, рассматриваются также антибиотики и другие антибактериальные средства. Показана возможность получения стабильного комплекса ванкомицина с коллоидным золотом и эффективность такого комплекса в отношении различных, в том числе ванкомицин-устойчивых, энтеропатогенных штаммов *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* [212]. Сходные результаты получены и в работе [213]: комплекс ципрофлоксацина с золотыми наночастицами проявлял высокую антибактериальную активность по отношению к *E. coli*. Заметной антибактериальной и антигрибковой активностью против *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Aspergillus fumigatus* и *A. niger* обладает конъюгат антилейкозного препарата фторурацила с коллоидным золотом [214]. Необходимо отметить, что во всех перечисленных случаях комплексы лекарственных средств с золотыми наночастицами были устойчивыми, о чем можно было судить по оптическим спектрам конъюгатов.

Отличие от этого не удалось получить стабильные комплексы с золотыми наночастицами таких антибиотиков, как ампициллин, стрептомицин, канамицин, гентамицин, неомицин, стрептомицин, ципрофлоксацин, гатифлоксацин, норфлоксацин, активных в отношении *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus* и *P. aeruginosa* [215–217]. Тем не менее, в зависимости от антибиотика активность его смеси с коллоидным золотом на 12–40% превышала активность одного антибиотика. На основании этих данных сделаны выводы об усилении антибактериальной активности антибиотиков за счет ЗНЧ. Однако вопрос о механизмах возможного усиления антибактериального действия лекарственных средств остался невыясненным. Экспериментально доказано [218], что свободный гентамицин и его смесь с золотыми наночастицами достоверно не различаются по антимикробной активности в тестах как на плотной, так и на жидкой питательной среде. Предполагается, что для усиления антибактериальной активности необходимы стабильные конъюгаты наночастиц, покрытых молекулами антибиотика. Так, антибиотик цефаклор предложено [219] использовать непосредственно при синтезе ЗНЧ. В результате получили устойчивый конъюгат,

который обладал высокой антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* и *S. aureus*.

Сведения о других лекарственных веществах, конъюгированных с золотыми наночастицами, встречаются гораздо реже. Однако необходимо отметить высокую антиоксидантную активность комплекса токоферола с золотыми наночастицами [220] и предложенные варианты его потенциального использования. Опубликованы данные о том [221], что конъюгат ЗНЧ с препаратом ТАК-779 за счет высокой локальной концентрации проявлял более выраженную активность против вируса иммунодефицита человека, чем сам препарат. На крысиных моделях сахарного диабета разработана методика перорального и интраназального введения инсулина, конъюгированного с коллоидным золотом, и достоверно показано снижение уровня сахара в крови, сравнимое с эффектом подкожного введения инсулина [222]. Наконец, описано терапевтическое действие противоревматического препарата этанерцепта, конъюгированного с золотыми наностержнями [223].

И в заключение этого раздела необходимо упомянуть о генотерапии, которая представляется идеальной стратегией при генетических, а также приобретенных заболеваниях [224]. Под генной терапией подразумевают подход, основанный на введении с лечебной целью в клетки и организм генных конструкций [225]. Желаемый эффект достигается либо в результате экспрессии введенного гена, либо за счет частичного или полного подавления функции поврежденного или сверхэкспрессируемого гена. В последнее время предпринимаются также попытки коррекции структуры и функции неправильно функционирующего («больного») гена. Золотые наночастицы и в этом случае могут служить эффективным средством доставки генетического материала в цитоплазму и ядро клетки [226].

4. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

С двадцатых годов прошлого века большой интерес исследователей вызывали иммунологические свойства коллоидных металлов и, в частности, золота. Это было связано, главным образом, с физико-химической (неспецифической) теорией иммунитета Ж. Бордэ, которая постулировала, что иммуногенность, равно как и антигенная специфичность, зависят преимущественно от физико-химических свойств веществ и, в первую очередь, от их коллоидного состояния. Л.А. Зильбером предпринимались успешные попытки получить агглютинирующие сыворотки к коллоидному золоту [227]. Вместе с тем в ряде работ показано, что введение полноценного антигена вместе с коллоидными металлами стимулирует выработку

антител. Более того, обнаружено, что некоторые гаптены, адсорбированные на коллоидных частицах, могут вызывать образование антител. В одном из лучших ранних обзоров [228] приведены многочисленные данные о влиянии коллоидного золота на неспецифические иммунные реакции. В частности, отмечалось, что через 2 ч после внутривенного введения кроликам 5 мл коллоидного золота значительно повышается количество лейкоцитов в 1 мл крови (с 9900 до 19800) на фоне незначительного снижения мононуклеарных форм (с 5200 до 4900) и значительного увеличения полинуклеарных (с 4700 до 14900). Причем при введении других коллоидных металлов подобных явлений не наблюдалось. К сожалению, с развитием иммунологии и отрицанием многих положений теории Бордэ, интерес к иммунологическим свойствам коллоидов снизился. Хотя данные об усилении иммунного ответа на антигены, адсорбированные на коллоидных частицах, использовали при создании различных адъювантов.

Известно, что биосинтез антител индуцируется веществами, обладающими достаточно развитой структурой (иммуногенностью). К их числу принадлежат белки, полисахариды, некоторые синтетические полимеры. Значительная же часть биологически активных соединений (таких, как витамины, гормоны, антибиотики, наркотики и т.д.) имеют относительно низкую молекулярную массу и, как правило, вызывают низкий иммунный ответ. Для преодоления этого ограничения в стандартных методах получения антител *in vivo* такие вещества (гаптены) присоединяются химически к высокомолекулярным носителям (чаще всего белкам), что делает возможным получение специфичных антисывороток. Однако такие антисыворотки обычно содержат сопутствующие антитела к антигенным структурам носителя [229].

В 1986 г. в пионерской работе японских исследователей [230] появились сведения об успешной попытке получения антител к глутаминовой кислоте с использованием частиц коллоидного золота в качестве носителя. После этого вышел ряд работ, в которых применяли и развивали этот метод для получения антител к следующим гаптенам и полноценным антигенам: аминокислотам, фактору активации тромбоцитов, хинолиновой кислоте, биотину, рекомбинантным пептидам, лизофосфатидной кислоте, эндостатину, пептидам капсида вирусов гепатитов В и С, гриппа, ящура, α -амидированным пептидам, актину, антибиотикам, азобензолу, А β -пептиду, кленбутиролу, поверхностным антигенам иерсиний, вирусу трансмиссивного гастроэнтерита, туберкулину (см. обзор [231] и ссылки в нем). Во всех перечисленных работах гаптен непосредственно конъюгировали с частицами коллоидного золота, смешивали с полным

адъювантом Фрейнда и иммунизировали животных. В результате получали антисыворотки с высоким титром, которые не требовали дальнейшей очистки от балластных антител.

В 1993 г. предложили [232] перед конъюгированием с коллоидным золотом присоединять к белку-носителю гаптен (гамма-аминомасляную кислоту). Это предложение нашло поддержку в работах по получению антител к ряду пептидов, аминокислотам, фенил-β-D-тиоглюкорониду, диминазону (см. [231] и ссылки в нем). Антитела, полученные таким способом, обладали высокой специфичностью к антигенам и имели более высокий титр («чрезвычайно высокий», согласно [232]) – от 1 : 250000 до 1 : 1000000, чем антитела, полученные рутинным способом. В настоящее время фирма «ImmunoSolution» предлагает антитела к ряду нейротрансмиттеров и аминокислот, полученные согласно [232].

В 1996 г. впервые показали [233] возможность использования частиц коллоидного золота в составе противовирусной вакцины в качестве носителей белкового антигена капсида вируса клещевого энцефалита. Несмотря на то что в состав вакцины не входили адъюванты, экспериментальная вакцина обладала более высокими протективными свойствами по сравнению с коммерческими аналогами.

Появилось также значительное количество работ, посвященных использованию ЗНЧ для создания ДНК-вакцин с генными конструкциями, кодирующими белки, к которым необходимо получить антитела. В случае эффективной экспрессии генов эти белки служат антигенами для развития иммунного ответа. Особой популярностью среди наночастиц-носителей ДНК пользуются частицы коллоидного золота [234].

Описана технология получения антител против различных антигенов с применением коллоидного золота в качестве носителя и адъюванта [233, 235]. При этом антигены адсорбируются непосредственно на поверхности наночастиц золота без использования связующих реагентов. Установлено, что иммунизация животных конъюгатами коллоидного золота с антигеном (как с использованием полного адъюванта Фрейнда, так и без него) приводит к получению специфических антител с высоким титром к широкому кругу антигенов без балластных антител. Наночастицы золота могут стимулировать синтез антител у кроликов, крыс и мышей с более низкой дозой используемого антигена по сравнению с его количеством, требуемым при применении ряда обычных адъювантов (табл. 2).

Показано, что золотые наночастицы, используемые как носители антигенов, стимулируют фагоцитирующую активность макрофагов и влияют на функционирование лимфоцитов, что, вероятно,

Таблица 2. Показатели титров антител в процессе иммунизации кроликов иерсиниозным антигеном (согласно [235])

Препарат	1-я иммунизация	2-я иммунизация	Реиммунизация
Коллоидное золото + антиген (1 мг)	1:32	1:256	1:10240
Полный адъювант Фрейнда + антиген (100 мг)	1:32	1:256	1:10240
Физиологический раствор + антиген (100 мг)	1:2	1:16	1:512

может обуславливать их иммуномодулирующий эффект. Кроме того, золотые наночастицы и их конъюгаты с низко- и высокомолекулярными антигенами стимулируют дыхательную активность клеток ретикулоэндотелиальной системы и активность митохондриальных ферментов макрофагов [236], что, возможно, является одной из причин адъювантных свойств коллоидного золота. То, что золотые наночастицы действуют и как носитель, и как адъювант (т.е. представляют гаптены Т-клеткам), следует признать наиболее интересной стороной проявления иммуногенных свойств коллоидного золота. В частности, золотые наночастицы, конъюгированные с антигенами, влияют на активацию Т-клеток: обнаружено увеличение пролиферации в 10 раз по сравнению с добавлением нативного антигена. Этот факт указывает на принципиальную возможность направленного воздействия на Т-клетки с последующей активацией ими макрофагов и уничтожением патогена.

Однако ни в одной из работ мы не нашли сведений о механизмах подобных свойств золотых частиц. На наш взгляд, безусловно справедливы рассуждения [232] о предпочтительном макрофагальном ответе на корпускулярные антигены, в отличие от растворимых. Подтверждают этот факт и исследователи, изучающие механизмы действия ДНК-вакцин, использующие для транспортировки генетического материала в клетку золотые частицы [234]. В этих работах показана роль клеток Купфера и Лангерганса в формировании иммунного ответа. Обсуждается влияние дендритных клеток на формирование иммунного ответа при введении антигена, конъюгированного с золотыми наночастицами [237]. Кроме того, отмечается, что при использовании наночастиц в медицинской практике необходимо следить за отсутствием на их поверхности липополисахаридов. Взаимодействию клеток иммунной системы с золотыми наночастицами посвящены недавние работы [238, 239].

На электронно-микроскопическом уровне показано [240] проникновение ЗНЧ, конъюгированных с пептидами, в цитоплазму макрофагов, что вызывает их активацию. Установлено, что после взаимодействия конъюгатов с рецепторами TLR-4 макрофагов, наночастицы проникают в клетку, что сопровождается выделением воспалительных цитокинов – ФНО, интерлейкинов 1 β и 6 и торможением пролиферации макрофагов. При введении ЗНЧ количество макрофагов уменьшается, а их размер увеличивается [241]. При этом возрастает уровень интерлейкинов 1 и 6 и ФНО. Не исключен и другой (не воспалительный) путь проникновения наночастиц золота в макрофаги [242] – посредством взаимодействия с рецепторами мусорщиками. Изучено влияние неконъюгированного коллоидного золота на иммунокомпетентные клетки *in vivo* [243] и показано, что введение мышам ЗНЧ вызывает усиление пролиферации лимфоцитов и нормальных киллеров, увеличение выработки интерлейкина 2.

По нашему мнению, обнаружение адъювантных свойств у ЗНЧ создает благоприятные условия для разработки нового поколения вакцин.

5. БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ТОКСИЧНОСТЬ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

Сказанное выше показывает, что в последние годы ЗНЧ активно используется в различных областях наномедицины в диагностических и терапевтических целях. Причем все чаще их вводят в организм животных и человека парентерально. Практически синхронно с началом применения ЗНЧ в медицине возникли острые вопросы по поводу их биораспределения, циркуляции в кровяном русле, фармакокинетики и выведения из организма, а также о возможной токсичности на уровне целого организма или на уровне цито- и генотоксичности. Следует отметить, что данные о биораспределении и токсичности ЗНЧ пока скудны и противоречивы.

Анализ опубликованных данных показал, что взрыв активности исследований в области биораспределения и токсичности ЗНЧ приходится на последние 3–4 года [7, 244–248]. Поскольку многие группы начали свои проекты независимо, наблюдается большой разброс в дизайне эксперимента, включая размер и форму частиц, способы функционализации, типы животных, дозы и способ введения частиц и т.д. Соответственно наблюдается большой разброс данных и выводов об уровне и кинетике биораспределения и по оценкам токсичности. Однако уже сейчас можно сделать некоторые предварительные выводы.

Во-первых, органы ретикулоэндотелиальной системы служат основной мишенью для накопления

ЗНЧ размером 10–100 нм, причем с уменьшением размера равномерность биораспределения увеличивается. Быстрое снижение концентрации частиц в крови и их длительное удерживание в организме связано с функционированием гепатобилиарной системы. Поскольку накопленные частицы могут выводиться из печени и селезенки в течение 3–4 месяцев, вопрос о дозах и возможных воспалительных процессах исключительно важен.

Во-вторых, имеющиеся данные позволяют предположить, что эффект проникновения наночастиц через гематоэнцефалический барьер критически зависит от размера, с верхней границей для частиц размером 15–20 нм. В-третьих, золотые наночастицы диаметром 1–2 нм имеют потенциально более высокую токсичность за счет возможности необратимого связывания с биополимерами клеток. Вместе с тем многочисленные опыты на клеточных культурах не выявили заметной токсичности у коллоидных частиц размером 3–100 нм при условии, что предельная доза не превышает величины порядка 10^{12} частиц/мл.

Данные экспериментов *in vivo* немногочисленны и несколько противоречивы. Можно лишь предположить, что заметная токсичность отсутствует при кратковременном (около недели) введении ЗНЧ в суточной дозе, не превышающей 0.5 мг/кг.

Данные последнего времени указывают на резко возросший интерес и интенсивность исследований в области нанотоксикологии. На *рис. 11* приведена общая схема изучения биораспределения и токсичности наночастиц, которая может быть использована при планировании экспериментов [248]. Для более полного ознакомления с проблемами биораспределения и токсичности ЗНЧ мы рекомендуем обзоры [244–248].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря бурному развитию технологий химического синтеза ЗНЧ за последнее десятилетие сегодня в распоряжении исследователей имеется огромное разнообразие частиц по размеру, форме, структуре и оптическим свойствам. Более того, на повестку дня поставлен вопрос о моделировании наночастиц, обладающих необходимыми физическими (оптическими, тепловыми и т.д.) свойствами с последующей разработкой методик синтеза смоделированных наноструктур.

С точки зрения применения в медицине, важное значение имела разработка эффективных технологий функционализации ЗНЧ различными классами молекул, которые обеспечивают стабилизацию наночастиц в условиях *in vivo* и адресное взаимодействие с биологическими мишенями. На сегодняшний день лучшими стабилизаторами считаются тиолирован-



Рис. 11. Схема экспериментов по биораспределению. Первый этап включает синтез наночастиц и их характеристику (определение размера, формы, заряда и т.д.) методами электронной микроскопии (ПЭМ, РЭМ), динамического светорассеяния (ДСР) и UV-vis-спектроскопии поглощения и рассеяния на уровне суспензий или отдельных частиц, электрофореза (ЭФ) и другими методами. На втором этапе проводится функционализация поверхности частиц требуемыми лигандами, например тиолированными молекулами ПЭГ (ПЭГ-SH), полиэтиленоксида (ПЭО-SH), белками сыворотки крови (БСК), фактором некроза опухоли (ФНО-α) и т.п. Полученные конъюгаты вводятся в модель (мышь, крыса и т.д.) в соответствии с дизайном опыта (дозы, кратность, способ введения – внутривенный (ВВ), внутрибрюшинный (ИП), респираторный (РЕ), желудочно-кишечный (ГЭ)). Распределение по органам и кинетика накопления / выведения наночастиц осуществляется по выбранной схеме отбора проб, которые анализируются методами радиоактивного анализа (РА), инструментальной нейтронной активации (ИНА), масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) или атомно-адсорбционной спектроскопии (ААС). Проводится также идентификация частиц на тканевом (гистология, ГИСТ) и клеточном уровне и локализация ЗНЧ с использованием методов ПЭМ, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) и рентгеновской адсорбционной спектроскопии (РАС). На последнем этапе проводится биологическая характеристика, включая оценку проникновения в клетки, цито- и генотоксичности, апоптоза (с использованием стандартных тестов МТТ и WST-1) и т.д., с финальной оценкой возможных рисков. Воспроизведено из работы [248] (<http://dx.doi.org/10.1039/c0cs00018c>) с разрешения The Royal Society of Chemistry.

ные производные ПЭГ и иных молекул. В частности, ПЭГ-покрытые частицы способны дольше циркулировать в кровотоке и менее подвержены атаке клеточных компонентов иммунной системы.

Сегодня уже общепризнано, что конъюгаты ЗНЧ являются отличными метками для задач биоимиджинга, который может быть реализован при помощи различных оптических технологий, включая темнопольную микроскопию резонансного рассеяния, конфокальную лазерную микроскопию, различные варианты двухфотонной люминесценции ЗНЧ, оптическую когерентную и акустическую томографию и т.д.

Конъюгаты ЗНЧ нашли применение в аналитических исследованиях, которые могут быть основаны как на современных инструментальных методах (поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия, LISNA, ИК-Фурье и т.д.), так и на простых твердофазных или гомофазных методиках (дот-анализ, иммунохроматография). В качестве показательных можно привести два примера: (1) с помощью конъюгатов ЗНЧ с антителами можно определить про-

статспецифический антиген с чувствительностью, в миллион раз большей, чем в обычном иммуноферментном анализе [249]; (2) резкая зависимость цвета от межчастичных расстояний позволяет *визуально* детектировать мутантные ДНК в так называемом «Northwestern spot test» [68]. Наряду с описанными примерами клинической диагностики рака, болезни Альцгеймера, HIV, гепатита туберкулеза, сахарного диабета и других заболеваний, следует ожидать новых диагностических применений ЗНЧ.

Плазменная фототермическая лазерная терапия рака с помощью ЗНЧ, впервые описанная в 2003 г., в настоящее время перешла в стадию клинической апробации. Реальные клинические успехи этой технологии будут зависеть от того, как быстро удастся решить несколько актуальных проблем: (1) разработать эффективные методы доставки излучения к опухолям внутри организма с помощью оптоволоконных технологий или неоптических методов нагре-

ва; (2) усовершенствовать методы доставки конъюгатов к опухолям, повысить контраст и равномерность накопления; (3) разработать методы контроля процесса фототермолиза *in situ*.

Адресная доставка ДНК, антигенов и лекарственных средств с помощью ЗНЧ представляется одним из наиболее перспективных направлений в биомедицине. В частности, работы группы Уоррена Чаня из Торонтского университета [250] показали зависимость от размера возможность доставки конъюгатов ЗНЧ с герцептином в опухолевые клетки с гораздо большей эффективностью, чем препарата в чистом виде. Недавний критический пересмотр концепции ПФТТ, основанной на внутривенной адресной доставке ЗНЧ, конъюгированных с молекулярными зондами к опухолевым рецепторам [167], указывает на необходимость продолжения исследований в этом направлении. В свете данных [167] представляется вполне рациональным, например, использование «ненацеленных» ПЭГ-покрытых золотых наноболочек типа SiO₂/Au с диаметром ядра 120 нм и толщиной слоя золота 15–20 нм в качестве универсального маркера для ПФТТ и биоимиджинга [25, 41]. Подчеркнем, что группа Н. Халас и Дж. Вест из университета Райса в США в 2010 г. начала клинические испытания подобных частиц для ПФТТ.

Наконец, имеется необходимость в продолжении и расширении работ в области биораспределения и токсичности ЗНЧ. Прежде всего, необходима скоординированная программа, которая выявила бы корреляции между параметрами частиц (размер, форма, функционализация различными молекулярными зондами), параметрами эксперимента (модель, дозы, способ и временная схема введения, длительность наблюдений, исследуемые органы, клетки, субклеточные структуры и т.п.) и наблюдаемыми биологическими эффектами. Необходимы также скоординированные усилия по введению стандартов на частицы и методы, используемые для тестирования токсичности наноматериалов. ●

Работа была частично поддержана грантами Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (направление «Биофотоника»), РФФИ, Министерства образования и науки РФ (контракты 2.1.1/2950, 14.740.11.260 и 02.740.11.0484), а также грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antonii F. Panacea Aurea-Auro Potabile. Hamburg: Ex Bibliopolio Frobeniano, 1618. 250 p.
2. Faulk W.P., Taylor G.M. // *Immunochemistry*. 1971. V. 8. P. 1081–1083.
3. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 319 с.
4. Gold Nanoparticles: Properties, Characterization and Fabrication / Ed. P.E. Chow. N. Y.: Nova Science Publisher, 2010. 343 p.
5. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // *Успехи химии*. 2007. Т. 76. С. 199–213.
6. Wilson R. // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. P. 2028–2045.
7. Boisselier E., Astruc D. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. P. 1759–1782.
8. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2010. V. 111. P. 1–35.
9. Хлебцов Н.Г. // *Квант. электроника*. 2008. Т. 38. С. 504–529.
10. Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications / Ed. M.A. Hayat. San Diego: Acad. Press, 1989. V. 1. 538 p.; V. 2. 484 p.; 1990. V. 3. 421 p.
11. Бунин В.Д., Игнатов О.В., Гулий О.И., Волошин А.Г., Дыкман Л.А., О'Нейл Д., Ивницкий Д. // *Биофизика*. 2005. Т. 50. С. 316–321.
12. Дрыгин Ю.Ф., Блинцов А.Н., Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Усков А.И., Варицев Ю.А., Анисимов Б.В., Новиков В.К., Атабеков И.Г. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 1212–1220.
13. Naja G., Hrapovic S., Male K., Bouvrette P., Luong J.H.T. // *Microsc. Res. Tech.* 2008. V. 71. P. 742–748.
14. Phillips R.L., Miranda O.R., You C.C., Rotello V.M., Bunz U.H. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 2590–2594.
15. Пылаев Т.Е., Ханадеев В.А., Хлебцов Б.Н., Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Хлебцов Н.Г. // *Коллоидный журн.* 2011. Т. 73. № 2. С. 1–12.
16. Liu M., Guyot-Sionnest P. // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. P. 22192–22200.
17. Khlebtsov B., Khanadeev V., Khlebtsov N. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V. 12. P. 3210–3218.
18. Wang H., Brandl D.W., Le F., Nordlander P., Halas N.J. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 827–832.
19. Khlebtsov B.N., Khanadeyev V.A., Ye J., Mackowski D.W., Borghs G., Khlebtsov N.G. // *Phys. Rev. B*. 2008. V. 77. P. 035440–1–035440–14.
20. Schwartzberg A.M., Olson T.Y., Talley C.E., Zhang J.Z. // *J. Phys. Chem. B*. 2006. V. 110. P. 19935–19944.
21. Ye J., van Dorpe P., van Roy W., Borghs G., Maes G. // *Langmuir*. 2009. V. 25. P. 1822–1827.
22. Sanchez-Gaytan B.L., Park S.-J. // *Langmuir*. 2010. V. 26. P. 19170–19174.
23. Nehl C.L., Liao H., Hafner J.H. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 683–688.
24. Grzelczak M., Pérez-Juste J., Mulvaney P., Liz-Marzán L.-M. // *Chem Soc. Rev.* 2008. V. 37. P. 1783–1791.
25. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Максимова И.Л., Терентюк Г.С., Хлебцов Н.Г. // *Российские нанотехнологии*. 2010. Т. 5. С. 454–468.
26. Ramakrishna G., Dai Q., Zou J., Huo Q., Goodson Th. //

- J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. P. 1848–1849.
27. Wang G., Stender A.S., Sun W., Fang N. // *Analyst*. 2010. V. 135. P. 215–221.
28. Klein S., Petersen S., Taylor U., Rath D., Barcikowski S. // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. P. 036015.
29. Durr N.J., Larson T., Smith D.K., Korgel B.A., Sokolov K., Ben-Yakar A. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 941–945.
30. Maiorano G., Sabella S., Sorce B., Brunetti V., Malvindi M.A., Cingolani R., Pompa P.P. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 7481–7491.
31. El-Sayed I.H., Huang X.H., El-Sayed M.A. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 829–834.
32. Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 2115–2120.
33. Loo C., Hirsch L., Lee M., Chang E., West J., Halas N., Drezek R. // *Opt. Lett.* 2005. V. 30. P. 1012–1014.
34. Aaron J., de la Rosa E., Travis K., Harrison N., Burt J., José-Yakamán M., Sokolov K. // *Opt. Express*. 2008. V. 16. P. 2153–2167.
35. Au L., Zhang Q., Cobley C.M., Gidding M., Schwartz A.G., Chen J., Xia Y. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 35–42.
36. Schultz D.A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 14. P. 13–22.
37. York J., Spetzler D., Hornung T., Ishmukhametov R., Martin J., Frasch W.D. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007. V. 39. P. 435–439.
38. Hu R., Yong K.T., Roy I., Ding H., He S., Prasad P.N. // *J. Phys. Chem. C*. 2009. V. 113. P. 2676–2684.
39. Bickford L., Chang J., Fu K., Sun J., Hu Y., Gobin A., Yu T.K., Drezek R. // *Nanobiotechnology*. 2008. V. 4. P. 1–8.
40. Wang S.-H., Lee C.-W., Chiou A., Wei P.-K. // *J. Nanobiotechnology*. 2010. V. 8. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/33>.
41. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Staroverov S.A., Vidyasheva I.V., Skaptsov A.A., Ilineva E.S., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // *J. Biophotonics*. 2011. V. 4. P. 74–83.
42. Zagaynova E.V., Shirmanova M.V., Kirillin M.Yu., Khlebtsov B.N., Orlova A.G., Balalaeva I.V., Sirotkina M.A., Bugrova M.L., Agrba P.D., Kamensky V.A. // *Phys. Med. Biol.* 2008. V. 53. P. 4995–5009.
43. Kim D., Park S., Lee J.H., Jeong Y.Y., Jon S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 7661–7665.
44. Patra C.R., Jing Y., Xu Y.-H., Bhattacharya R., Mukhopadhyay D., Glockner J.F., Wang J.-P., Mukherjee P. // *Cancer Nano*. 2010. V. 1. P. 13–18.
45. Zharov V., Galanzha E., Shashkov E., Khlebtsov N., Tuchin V. // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 3623–3625.
46. Li C., Wang L.V. // *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54. P. R59–R97.
47. Chen J., Irudayaraj J. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. P. 4071–4079.
48. Hutter E., Boridy S., Labrecque S., Lalancette-Hébert M., Kriz J., Winnik F.M., Maysinger D. // *ACS Nano*. 2010. V. 4. P. 2595–2606.
49. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
50. Leuversing J.H.W., Thal P.J.H.M., van der Waart M., Schuurs A.H.W.M. // *J. Immunoassay*. 1980. V. 1. P. 77–91.
51. Khlebtsov N.G., Melnikov A.G., Dykman L.A., Bogatyrev V.A. // *Photopolarimetry in Remote Sensing* / Eds G. Videen, Ya.S. Yatskiv, M.I. Mishchenko. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2004. P. 265–308.
52. Wu S.H., Wu Y.S., Chen C.H. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 6560–6566.
53. Leuversing J.H.W., Coverde B.C., Thal P.J.H.M., Schuurs A.H.W.M. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 60. P. 9–23.
54. Pavlov V., Xiao Y., Shlyahovsky B., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 11768–11769.
55. Aslan K., Lakowicz J.R., Geddes C.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 330. P. 145–155.
56. Medley C.D., Smith J.E., Tang Z., Wu Y., Bamrungsap S., Tan W. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 1067–1072.
57. Chirathaworn C., Chantaramalai T., Sereemasun A., Kongthong N., Suwancharoen D. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. V. 34. P. 31–34.
58. Neely A., Perry C., Varisli B., Singh A.K., Arbneshti T., Senapati D., Kalluri J.R., Ray P.C. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. P. 2834–2840.
59. Guarise C., Pasquato L., De Filippis V., Scrimin P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 3978–3982.
60. Liu X., Dai Q., Austin L., Coutts J., Knowles G., Zou J., Chen H., Huo Q. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 2780–2782.
61. Wang X., Li Y., Wang H., Fu Q., Peng J., Wang Y., Du J., Zhou Y., Zhan L. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 404–410.
62. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н., Дыкман Л.А., Englebienne P. // *Коллоидный журн.* 2003. Т. 65. С. 679–693.
63. Englebienne P. // *Analyst*. 1998. V. 123. P. 1599–1603.
64. Kamnev A.A., Dykman L.A., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. // *Biosci. Reports*. 2002. V. 22. P. 541–547.
65. Russier-Antoine I., Huang J., Benichou E., Bachelier G., Jonin C., Brevet P.F. // *Chem. Phys. Lett.* 2008. V. 450. P. 345–349.
66. Lin C.-C., Yang Y.-M., Chen Y.-F., Yang T.-S., Chang H.-C. // *Biosens. Bioelectron.* 2008. V. 24. P. 178–183.
67. Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J. // *Nature*. 1996. V. 382. P. 607–609.
68. Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1078–1081.
69. Sato K., Onoguchi M., Sato Y., Hosokawa K., Maeda M. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 350. P. 162–164.
70. Baptista P., Koziol-Montewka M., Paluch-Oles J., Doria G., Franco R. // *Clin. Chem.* 2006. V. 52. P. 1433–1434.
71. Dai Q., Liu X., Coutts J., Austin L., Huo Q. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 8138–8139.
72. Li H.X., Rothberg L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 14036–14039.
73. He W., Huang C.Z., Li Y.F., Xie J.P., Yang R.G., Zhou P.F., Wang J. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 8424–8430.
74. Storhoff J.J., Elghanian R., Mucic R.C., Mirkin C.A., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 1959–1964.
75. Sato K., Hosokawa K., Maeda M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 8102–8103.
76. Song J., Li Z., Cheng Y., Liu Ch. // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2010. № 46. P. 5548–5550.
77. Shawky S.M., Bald D., Azzazy H.M.E. // *Clin. Biochem.* 2010. V. 43. P. 1163–1168.
78. Xia F., Zuo X., Yang R., Xiao Y., Kang D., Vallée-Bélisle A., Gong X., Yuen J.D., Hsu B.B., Heeger A.J., Plaxco K.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 10837–10841.
79. Ma Z., Tian L., Wang T., Wang C. // *Anal. Chim. Acta*. 2010. V. 673. P. 179–184.
80. Storhoff J.J., Marla S.S., Bao P., Hagenow S., Mehta H., Lucas A., Garimella V., Patno T., Buckingham W., Cork W., Müller U.R. // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 19. P. 875–883.
81. Storhoff J.J., Lucas A.D., Garimella V., Bao Y.P., Müller U.R. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 883–887.
82. Parab H.J., Jung C., Lee J.H., Park H.G. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 667–673.
83. Stoschek C.M. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 160. P. 301–305.

84. Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 341. P. 16–21.
85. Brada D., Roth J. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 142. P. 79–83.
86. Moeremans M., Daneles G., van Dijck A., Langanger G., De Mey J. // *J. Immunol. Meth.* 1984. V. 74. P. 353–360.
87. Surek B., Latzko E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. V. 121. P. 284–289.
88. Hsu Y.-H. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 142. P. 221–225.
89. Danscher G. // *Histochemistry.* 1981. V. 71. P. 81–88.
90. Ma Z., Sui S.-F. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. V. 41. P. 2176–2179.
91. Hou S.-Y., Chen H.-K., Cheng H.-C., Huang C.-Y. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 980–985.
92. Blab G.A., Cognet L., Berciaud S., Alexandre I., Husar D., Remacle J., Lounis B. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. L13–L15.
93. Bio-Rad Labs Bulletin 1310. Western blotting detection systems: how do you choose? 1987. P. 3.
94. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 411–418.
95. Стародуб Н.Ф., Артюх В.П., Назаренко В.И., Коломиец Л.И. // *Украинский биохимический журн.* 1987. Т. 59. С. 108–120.
96. Fenoll A., Jado I., Vicioso D., Casal J. // *J. Clin. Microbiol.* 1997. V. 35. P. 764–766.
97. Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartsburd B.I. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 96. P. 115–118.
98. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000. V. 27. P. 135–137.
99. Khlebtsov B.N., Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Zharov V., Khlebtsov N.G. // *Nanoscale Res. Lett.* 2007. V. 2. P. 6–11.
100. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. // *Российские нанотехнологии.* 2008. Т. 3. № 7–8. С. 50–63.
101. Han A., Dufva M., Belleville E., Christensen C.B.V. // *Lab. Chip.* 2003. V. 3. P. 329–332.
102. Биохимические методы анализа / Ред. Б.Б. Дзантиев. М.: Наука, 2010. 391 с.
103. Cho J.-H., Paek S.-H. // *Biotechnol. Bioengineer.* 2001. V. 75. P. 725–732.
104. Schalkhammer Th. // *Chem. Monthly.* 1998. V. 129. P. 1067–1092.
105. Biosensors and Biodetection / Eds A. Rasooly, K.E. Herold. N.-Y.: Humana Press, 2009. V. 1. 454 p.; V. 2. 470 p.
106. Li Y., Schluesener H.J., Xu S. // *Gold Bull.* 2010. V. 43. P. 29–41.
107. Musick M.D., Keating C.D., Lyon L.A., Botsko S.L., Peña D.J., Holliday W.D., McEvoy T.M., Richardson J.N., Natan M.J. // *Chem. Mater.* 2000. V. 12. P. 2869–2881.
108. Shipway A.N., Katz E., Willner I. // *ChemPhysChem.* 2000. V. 1. P. 18–52.
109. Nath N., Chilkoti A. // *J. Fluorescence.* 2004. V. 14. P. 377–389.
110. Haynes C.L., van Duyne R.P. // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105. P. 5599–5611.
111. Lyon L.A., Musick M.D., Natan M.J. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 5177–5183.
112. Miller M.M., Lazarides A.A. // *J. Phys. Chem. B.* 2005. V. 109. P. 21556–21565.
113. Khlebtsov B.N., Melnikov A.G., Zharov V.P., Khlebtsov N.G. // *Nanotechnology.* 2006. V. 17. P. 1437–1445.
114. Templeton A.C., Pietron J.J., Murray R.W., Mulvaney P. // *J. Phys. Chem. B.* 2000. V. 104. P. 564–570.
115. Stewart M.E., Anderton C.R., Thompson L.B., Maria J., Gray S.K., Rogers J.A., Nuzzo R.G. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. P. 494–521.
116. Sepúlveda B., Angelomé P.C., Lechuga L.M., Liz-Marzán L.M. // *Nano Today.* 2009. V. 4. P. 244–251.
117. Daghestani H.N., Day B.W. // *Sensors.* 2010. V. 10. P. 9630–9646.
118. Abbas A., Linman M.J., Cheng Q. // *Biosens. Bioelectron.* 2011. V. 26. P. 1815–1824.
119. Peng H.-I., Miller B.L. // *Analyst.* 2011. V. 136. P. 436–447.
120. Jason-Moller L., Murphy M., Bruno J. // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2006. Ch. 19. Unit 19.13.
121. Brainina K., Kozitsina A., Beikin J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 376. P. 481–485.
122. Baek T.J., Park P.Y., Han K.N., Kwon H.T., Seong G.H. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1373–1378.
123. Mahmoud K.A., Luong J.H. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 7056–7062.
124. Haes A.J., Chang L., Klein W.L., van Duyne R.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 2264–2271.
125. Simonian A.L., Good T.A., Wang S.-S., Wild J.R. // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 534. P. 69–77.
126. Boghaert E.R., Khandke K.M., Sridharan L., Dougher M., DiJoseph J.F., Kunz A., Hamann P.R., Moran J., Chaudhary I., Damle N.K. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. V. 61. P. 1027–1035.
127. Maier I., Morgan M.R., Lindner W., Pittner F. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 2694–2703.
128. Huang T., Nallathambay P.D., Xu X.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 17095–17105.
129. Aslan K., Zhang J., Lakowicz J.R., Geddes C.D. // *J. Fluoresc.* 2004. V. 14. P. 391–400.
130. Wang L., Jia X., Zhou Y., Xie Q., Yao S. // *Microchim. Acta.* 2010. V. 168. P. 245–251.
131. de la Escosura-Muñiz A., Sánchez-Espinel C., Díaz-Freitas B., González-Fernández A., Maltez-da Costa M., Merkoçi A. // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 10268–10274.
132. Eum N.-S., Yeom S.-H., Kwon D.-H., Kim H.-R., Kang S.-W. // *Sens. Actuator B Chem.* 2010. V. 143. P. 784–788.
133. Zhang J., Atay T., Nurmikko A.V. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 519–524.
134. Adamczyk M., Moore J.A., Yu Z. // *Methods.* 2000. V. 20. P. 319–328.
135. Raschke G., Kowarik S., Franzl T., Sönnichsen C., Klar T.A., Feldmann J., Nichtl A., Kürzinger K. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 935–942.
136. McFarland A.D., van Duyne R.P. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 1057–1062.
137. Mayer K.M., Hao F., Lee S., Nordlander P., Hafner J.H. // *Nanotechnology.* 2010. V. 21. P. 255503.
138. Kennedy L.C., Bickford L.R., Lewinski N.A., Coughlin A.J., Hu Y., Day E.S., West J.L., Drezek R.A. // *Small.* 2011. V. 7. P. 169–183.
139. Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. // *Lasers Med. Sci.* 2008. V. 23. P. 217–228.
140. Minton J.P., Carlton D.M., Dearman J.R., McKnight W.B., Ketcham A.S. // *Surg. Gynaecol. Obstet.* 1965. V. 121. P. 538–544.
141. Masters A., Bown S.G. // *Br. J. Cancer.* 1992. V. 8. P. 242–249.
142. Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Price R.E., Hazle J.D., Halas N.J., West J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 13549–13554.
143. Zharov V.P., Galitovsky V., Viegas M. // *Appl. Phys. Lett.* 2003. V. 83. P. 4897–4899.
144. Pitsillides C.M., Joe E.K., Wei X., Anderson R.R., Lin C.P. // *Biophys. J.* 2003. V. 84. P. 4023–4032.
145. von Maltzahn G., Park J.-H., Agrawal A., Bandaru N.K.,

- Das S.K., Sailor M.J., Bhatia S.N. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 3892–3900.
146. Lapotko D., Lukianova-Hleb E., Oraevsky A. // *Nanomedicine.* 2007. V. 2. P. 241–253.
147. Huang X., Qian W., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. // *Lasers Surg. Med.* 2007. V. 39. P. 747–753.
148. Lapotko D., Lukianova E., Potapnev M., Aleinikova O., Oraevsky A. // *Cancer Lett.* 2005. V. 239. P. 36–45.
149. Harris N., Ford M.J., Cortie M.B. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 10701–10707.
150. Huff T.B., Tong L., Zhao Y., Hansen M.N., Cheng J.X., Wei A. // *Nanomedicine.* 2007. V. 2. P. 125–132.
151. Loo C., Lowery A., Halas N.J., West J.L., Drezek R. // *Nano Lett.* 2005. V. 5. P. 709–711.
152. Hu M., Petrova H., Chen J., McLellan J.M., Siekkinen A.R., Marquez M., Li X., Xia Y., Hartland G.V. // *J. Phys. Chem. B.* 2006. V. 110. P. 1520–1524.
153. Chen J., Wang D., Xi J., Au L., Siekkinen A., Warsen A., Li Z.-Y., Zhang H., Xia Y., Li X. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 1318–1322.
154. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Akchurin G.G., Maksimova I.L., Tuchin V.V. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 021016.
155. Lapotko D. // *Nanomedicine.* 2009. V. 4. P. 253–256.
156. Hleb E., Hu Y., Drezek R., Hafner J., Lapotko D. // *Nanomedicine.* 2008. V. 3. P. 797–812.
157. Zharov V.P., Galitovskaya E.N., Johnson C., Kelly T. // *Lasers Surg. Med.* 2005. V. 37. P. 219–226.
158. Akchurin G., Khlebtsov B., Akchurin G., Tuchin V., Zharov V., Khlebtsov N. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 015701.
159. Hleb E.Y., Lapotko D.O. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 355702.
160. Lukianova-Hleb E.Y., Anderson L.J.E., Lee S., Hafner J.H., Lapotko D.O. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010. V. 12. P. 12237–12244.
161. Jain R.K., Booth M.F. // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 112. P. 1134–1136.
162. Nie S.M. // *Nanomedicine.* 2010. V. 5. P. 523–528.
163. El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A. // *Cancer Lett.* 2006. V. 239. P. 129–135.
164. Visaria R.K., Griffin R.J., Williams B.W., Ebbini E.S., Paciotti G.F., Song C.W., Bischof J.C. // *Mol. Cancer Ther.* 2006. V. 5. P. 1014–1020.
165. Larson T.A., Bankson J., Aaron J., Sokolov K. // *Nanotechnology.* 2007. V. 18. P. 325101.
166. Lu W., Xiong C., Zhang G., Huang Q., Zhang R., Zhang J.Z., Li C. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 876–886.
167. Huang X., Peng X., Wang Y., Wang Y., Shin D.M., El-Sayed M.A., Nie S. // *ACS Nano.* 2011. V. 4. P. 5887–5896.
168. Kirpotin D.B., Drummond D.C., Shao Y., Shalaby M.R., Hong K., Nielsen U.B., Marks J.D., Benz C.C., Park J.W. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 6732–6740.
169. Choi C.H.J., Alabi C.A., Webster P., Davis M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 1235–1240.
170. *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. V.V. Tuchin.* Boca Raton: CRC Press, 2009. 868 p.
171. Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Smilowitz H.M. // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. N309–N315.
172. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Miller C.M., Cortie M.B. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 3808–3812.
173. Zharov V.P., Mercer K.E., Galitovskaya E.N., Smeltzery M.S. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 619–627.
174. Pissuwan D., Valenzuela S.M., Cortie M.B. // *Trends Biotech.* 2006. V. 24. P. 62–67.
175. *Cancer Nanotechnology. Methods and Protocols / Eds S.R. Grobmyer, B.M. Moudgil. N.-Y.: Humana Press, 2010. 396 p.*
176. Wilson B.C. // *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. V.V. Tuchin.* Boca Raton: CRC Press, 2010. P. 649–686.
177. Lakowicz J.R., Ray K., Chowdhury M., Szmecinski H., Fu Y., Zhang J., Nowaczyk K. // *Analyst.* 2008. V. 133. P. 1308–1346.
178. Bardhan R., Grady N.K., Cole J.R., Joshi A., Halas N.J. // *ACS Nano.* 2009. V. 3. P. 744–752.
179. Sershen S.R., Westcott S.L., Halas N.J., West J.L. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. V. 51. P. 293–298.
180. Radt B., Smith T.A., Caruso F. // *Adv. Mater.* 2004. V. 16. P. 2184–2189.
181. Shiotani A., Mori T., Niidome T., Niidome Y., Katayama Y. // *Langmuir.* 2007. V. 23. P. 4012–4018.
182. Nakamura T., Tamura A., Murotani H., Oishi M., Jinji Y., Matsuishi K., Nagasaki Y. // *Nanoscale.* 2010. V. 2. P. 739–746.
183. Thomas K.G., Kamat P.V. // *Acc. Chem. Res.* 2003. V. 36. P. 888–898.
184. Liu S.Y., Liang Z.S., Gao F., Luo S.F., Lu G.Q. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. V. 21. P. 665–674.
185. Bardhan R., Chen W., Bartels M., Perez-Torres C., Botero M.F., McAninch R.W., Contreras A., Schiff R., Pautler R.G., Halas N.J., Joshi A. // *Nano Lett.* 2010. V. 10. P. 4920–4928.
186. Kuo W.-S., Chang C.-N., Chang Y.-T., Yang M.-H., Chien Y.-H., Chen S.-J., Yeh C.-S. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. V. 49. P. 2711–2715.
187. Abraham G.E., Himmel P.B. // *J. Nutr. Med.* 1997. V. 7. P. 295–305.
188. Abraham G.E. // *Orig. Intern.* 2008. V. 15. P. 132–158.
189. Tsai C.Y., Shiau A.L., Chen S.Y., Chen Y.H., Cheng P.C., Chang M.Y., Chen D.H., Chou C.H., Wang C.R., Wu C.L. // *Arthritis Rheum.* 2007. V. 56. P. 544–554.
190. Brown C.L., Whitehouse M.W., Tiekink E.R.T., Bushell G.R. // *Inflammopharmacology.* 2008. V. 16. P. 133–137.
191. Paciotti G.F., Myer L., Weinreich D., Goia D., Pavel N., McLaughlin R.E., Tamarkin L. // *Drug Deliv.* 2004. V. 11. P. 169–183.
192. Paciotti G.F., Kingston D.G.I., Tamarkin L. // *Drug Dev. Res.* 2006. V. 67. P. 47–54.
193. Mukherjee P., Bhattacharya R., Wang P., Wang L., Basu S., Nagy J.A., Atala A., Mukhopadhyay D., Soker S. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 3530–3534.
194. Mukherjee P., Bhattacharya R., Bone N., Lee Y.K., Patra C.R., Wang S., Lu L., Secreto C., Banerjee P.C., Yaszemski M.J., Kay N.E., Mukhopadhyay D. // *J. Nanobiotechnology.* 2007. V. 5. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/5/1/4>
195. Bhattacharya R., Patra C.R., Verma R., Kumar S., Greipp P.R., Mukherjee P. // *Adv. Mater.* 2007. V. 19. P. 711–716.
196. Duncan B., Kim C., Rotello V.M. // *J. Control. Release.* 2010. V. 148. P. 122–127.
197. Pissuwan D., Niidome T., Cortie M.B. // *J. Control. Release.* 2011. V. 149. P. 65–71.
198. Chen Y.H., Tsai C.Y., Huang P.Y., Chang M.Y., Cheng P.C., Chou C.H., Chen D.H., Wang C.R., Shiau A.L., Wu C.L. // *Mol. Pharm.* 2007. V. 4. P. 713–722.
199. Li J., Wang X., Wang C., Chen B., Dai Y., Zhang R., Song M., Lv G., Fu D. // *ChemMedChem.* 2007. V. 2. P. 374–378.
200. Patra C.R., Bhattacharya R., Wang E., Katarya A., Lau J.S., Dutta S., Muders M., Wang S., Buhrow S.A., Safgren S.L., Yaszemski M.J., Reid J.M., Ames M.M., Mukherjee P,

- Mukhopadhyay D. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 1970–1978.
201. Podsiadlo P., Sinani V.A., Bahng J.H., Kam N.W., Lee J., Kotov N.A. // *Langmuir.* 2008. V. 24. P. 568–574.
202. Azzam E.M.S., Morsy S.M.I. // *J. Surf. Deterg.* 2008. V. 11. P. 195–199.
203. Stiti M., Cecchi A., Rami M., Abdaoui M., Barragan-Montero V., Scozzafava A., Guari Y., Winum J.Y., Supuran C.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 16130–16131.
204. Agasti S.S., Chompoosor A., You C.C., Ghosh P., Kim C.K., Rotello V.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 5728–5729.
205. Dhar S., Daniel W.L., Giljohann D.A., Mirkin C.A., Lippard S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 14652–14653.
206. Hosta L., Pla-Roca M., Arbiol J., López-Iglesias C., Samitier J., Cruz L.J., Kogan M.J., Albericio F. // *Bioconjug. Chem.* 2009. V. 20. P. 138–146.
207. Dreaden E.C., Mwakwari S.C., Sodji Q.H., Oyelere A.K., El-Sayed M.A. // *Bioconjug. Chem.* 2009. V. 20. P. 2247–2253.
208. Eghtedari M., Liopo A.V., Copland J.A., Oraevsky A.A., Motamedi M. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 287–291.
209. Asadishad B., Vossoughi M., Alemzadeh I. // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2010. V. 49. P. 1958–1963.
210. Староверов С.А., Гасина О.А., Кладиев А.А., Богатырев В.А. // *Российский биотерапевтический журн.* 2010. Т. 9. С. 22–23.
211. Kim C.-K., Ghosh P., Rotello V.M. // *Nanoscale.* 2009. V. 1. P. 61–67.
212. Gu H., Ho P.L., Tong E., Wang L., Xu B. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. P. 1261–1263.
213. Rosemary M.J., MacLaren I., Pradeep T. // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 10125–10129.
214. Selvaraj V., Alagar M. // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 337. P. 275–281.
215. Saha B., Bhattacharya J., Mukherjee A., Ghosh A.K., Santra C.R., Dasgupta A.K., Karmakar P. // *Nanoscale Res. Lett.* 2007. V. 2. P. 614–622.
216. Grace A.N., Pandian K. // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2007. V. 297. P. 63–70.
217. Grace A.N., Pandian K. // *J. Bionanosci.* 2007. V. 1. P. 96–105.
218. Burygin G.L., Khlebtsov B.N., Shantrokha A.N., Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Khlebtsov N.G. // *Nanoscale Res. Lett.* 2009. V. 4. P. 794–801.
219. Rai A., Prabhune A., Perry C.C. // *J. Mater. Chem.* 2010. V. 20. P. 6789–6798.
220. Nie Z., Liu K.J., Zhong C.J., Wang L.F., Yang Y., Tian Q., Liu Y. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. P. 1243–1254.
221. Bowman M.C., Ballard T.E., Ackerson C.J., Feldheim D.L., Margolis D.M., Melander C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 6896–6897.
222. Joshi H.M., Bhumkar D.R., Joshi K., Pokharkar V., Sastry M. // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 300–305.
223. Chamberland D.L., Agarwal A., Kotov N., Fowlkes J.B., Carson P.L., Wang X. // *Nanotechnology.* 2008. V. 19. P. 095101.
224. Miller A.D. // *Nature.* 1992. V. 357. P. 455–460.
225. Зеленин А.В. // *Вестник РАН.* 2001. Т. 71. С. 387–395.
226. Patel P.C., Giljohann D.A., Daniel W.L., Zheng D., Prigodich A.E., Mirkin C.A. // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21. P. 2250–2256.
227. Зильбер Л.А., Фризе В.В. // *Журн. эксп. биологии.* 1929. Т. 11. С. 128–135.
228. Pacheco G. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1925. V. 18. P. 119–149.
229. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. *Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям.* М.: Наука, 1985. 304 с.
230. Shiosaka S., Kiyama H., Wanaka A., Tohyama M. // *Brain Res.* 1986. V. 382. P. 399–403.
231. Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Щёголев С.Ю. // *Российские нанотехнологии.* 2010. Т. 5. С. 58–68.
232. Pow D.V., Crook D.K. // *J. Neurosci. Meth.* 1993. V. 48. P. 51–63.
233. Демениев В.А., Щинова М.А., Иванов Л.И., Воробьева Р.Н., Здановская Н.И., Небайкина Н.В. // *Вопр. вирусол.* 1996. Т. 41. С. 107–110.
234. Zhao Z., Wakita T., Yasui K. // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 4248–4260.
235. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. *Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant.* New York: Nova Science Publishers, 2010. 54 p.
236. Staroverov S.A., Aksinenko N.M., Gabalov K.P., Vasilenko O.A., Vidyasheva I.V., Shchyogolev S.Yu., Dykman L.A. // *Gold Bull.* 2009. V. 42. P. 153–156.
237. Vallhov H., Qin J., Johansson S.M., Ahlborg N., Muhammed M.A., Scheynius A., Gabriellson S. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 1682–1686.
238. Villiers C.L., Freitas H., Couderc R., Villiers M.-B., Marche P.N. // *J. Nanopart. Res.* 2010. V. 12. P. 55–60.
239. Zolnik B.S., González-Fernández A., Sadrieh N., Dobrovolskaia M.A. // *Endocrinology.* 2010. V. 151. P. 458–465.
240. Bastús N.G., Sánchez-Tilló E., Pujals S., Farrera C., Kogan M.J., Giralt E., Celada A., Lloberas J., Puntès V. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 46. P. 743–748.
241. Yen H.J., Hsu S.H., Tsai C.L. // *Small.* 2009. V. 5. P. 1553–1561.
242. Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. P. 469–478.
243. Lou H., Tian Y., Gao J.-Q., Deng S.-Y., Li J.-L. // *J. Foshan Univ.* 2007. V. 25. P. 24–27.
244. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. // *Small.* 2008. V. 4. P. 26–49.
245. Alkilany A.M., Murphy C.J. // *J. Nanopart. Res.* 2010. V. 12. P. 2313–2333.
246. Fadeel B., Garcia-Bennett A.E. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. V. 62. P. 362–374.
247. Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V. // *Crit. Rev. Toxicol.* 2010. V. 40. P. 328–346.
248. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. P. 1647–1671.
249. Nam J.M., Thaxton C.S., Mirkin C.A. // *Science.* 2003. V. 301. P. 1884–1886.
250. Jiang W., Kim B.Y.S., Rutka J.T., Chan W.C.W. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. P. 145–150.