

НАНОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ**НАНОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ**

д.м.н., проф. Ш.А. БЕЙСЕМБАЕВА

Современный этап развития науки характеризуется продолжающейся миниатюризацией технологических процессов, что привело к формированию принципиально нового направления – нанотехнологии. Первоначально возникшие в электронике и материаловедении, нанотехнологии в последние годы завоевывают лидирующие позиции в химии, биологии и медицине. Бурный рост количества работ в области наномедицины привел к созданию специализированных научных журналов, выходу монографий, регулярному проведению международных форумов, посвященных вопросам применения наночастиц в экспериментальной и клинической медицине.

Нанотехнологии успешно применяются для молекулярной диагностики различных заболеваний, направленной доставки лекарственных препаратов и генетических конструкций в поврежденные ткани, а также высокоселективного уничтожения патологических тканевых образований и даже отдельных измененных клеток. Применение наноматериалов в медицине не ограничивается решением изолированных узких задач. Проводимые исследования отражают общую тенденцию к созданию многофункциональных устройств, сочетающих в себе диагностические и терапевтические возможности. В то же время наномедицина идет по пути профилизации и специализации, проникая в такие отрасли медицинской науки, как офтальмология, стоматология, травматология и ортопедия.

Внедрение новых технологий и материалов в клиническую медицину требует тщательного изучения их безопасности. На сегодняшний день мы располагаем недостаточными данными о безопасности многих наноматериалов. В ближайшие годы ожидается значительное увеличение объема исследований, посвященных этой важной проблеме.

Применение нанотехнологий в медицинской практике позволяет приблизиться к формированию персонализированной (предиктивной) медицины. Концепция персонализированной медицины предполагает создание тактики лечения и профилактики на основе индивидуальных особенностей

генотипа и фенотипа конкретного пациента. Существенно расширяющиеся возможности молекулярной диагностики и идентификации биомаркеров, уникальных для каждого пациента, создают предпосылку для персонализации терапевтических мероприятий.

Таким образом, применение нанотехнологий в биологии и медицине представляет собой пример исключительно плодотворного синтеза физических, химических и биомедицинских научных знаний, в конечном итоге способствующего повышению качества оказания медицинской помощи и улучшению состояния здоровья населения. Нанотехнологии революционизировали современную диагностику. Так, использование определенных типов наночастиц позволяет осуществлять прижизненную визуализацию отдельных патологически измененных клеток и даже молекул, являющихся маркерами распространенных заболеваний. Нанодиагностика существенно повышает чувствительность и специфичность методов распознавания биохимических и молекулярных маркеров заболеваний. С использованием нанотехнологий становится возможной одновременная диагностика и терапия многих заболеваний.

Наноматериалы медицинского назначения.

Использование нанотехнологии в биологии и медицине базируется на знании уникальных физических и химических свойств наноматериалов. В настоящее время достаточно хорошо охарактеризованы такие наноматериалы, как нанопористые мембранны, нанотрубки и разнообразные типы наночастиц.

Простейший вариант наноматериала – это поверхность с отверстиями (порами), имеющими наноразмерный диаметр. Одним из первых наномедицинских материалов является изобретенный в 1995 г. Desai и Ferrari кристаллический силикон с микроячейками, в которые могут помещаться клетки. Взаимодействие клеток с окружающей средой происходит через силиконовую мембрану, содержащую поры диаметром около 20 нм. Эти поры дают возможность поступления к клеткам таких небольших молекул, как глюко-

за, кислород и инсулин, но в то же время препятствуют контакту загруженных в ячейки основной матрицы клеток с антителами.

Микрокапсулы, содержащие иммуноизолированные островковые клетки, могут имплантироваться под кожу пациентов с сахарным диабетом (Leoni, Desai, 2001). Трансплантация инкапсулированных клеток в организм может быть важной альтернативой заместительной терапии многих заболеваний, сопровождающихся врожденным и приобретенным дефицитом гормонов и ферментов.

Процесс высвобождения материалов из нанопор может контролироваться извне. Первая нанорешетка с потенциал-зависимым высвобождением содержимого была разработана Nishizawa et al. в 1995 г. Разработанный ими материал состоял из массива золотых нанотрубок с внутренним диаметром, не превышающим 1,6 нм. При этом положительный заряд нанотрубок приводил к высвобождению только отрицательных ионов. Напротив, отрицательный заряд стимулировал выделение катионов. Другими авторами предпринимались попытки исследовать синтетические нанопористые ионные насосы (Siwy, Fulinski, 2002), потенциал-зависимые нанопоры, помещенные в искусственные мембранны (Schmidt, 2003) и биологические сенсоры для регуляции ионных каналов, реагирующие на изменения концентрации вещества в пределах $10^{-18}M$ (Cornell et al., 1997).

Большой интерес представляют эксперименты, направленные на изучение подвижности молекул ДНК и РНК под действием внешнего электрического поля в центральном канале молекулы альфа-гемолизина, встроенной в билипидный слой, идентичный плазмалемме живой клетки (Meller et al., 2000). В 1998 г. той же группой авторов было показано, что в процессе прохождения молекулы РНК по нанопоре возможно дифференцировать пуриновые и пиримидиновые основания. Позднее было установлено, что пропускание молекул ДНК одинаковой длины через нанопоры определенной структуры позволяет различать цепи ДНК, имеющие неодинаковую нуклеотидную последовательность. Эти данные дали импульс для активных исследований возможnosti секвенирования ДНК с помощью прохождения ее цепей через нанопоры (Li et al., 2003; Rhee, Burns, 2007). Устройства для секвенирования ДНК с помощью нанопор могут, по прогнозам,

обеспечить фантастическую скорость чтения - до 1000 оснований в секунду на одну пору (Deamer, Akeson, 2000).

Таким образом, использование нанопористых материалов является одним из перспективных направлений применения нанотехнологии в биологии и медицине. Область применения этих материалов простирается от трансплантации иммуноизолированных клеток до сверхскоростного секвенирования ДНК.

Углеродные нанотрубки принадлежат к семейству фуллереновых аллотропных модификаций углерода (Foldvari, Bagonluri, 2008a). Нанотрубки представляют собой цельные цилиндрические структуры, образованные листками графита. Существуют две разновидности нанотрубок - однослойные и многослойные. Многослойные нанотрубки обычно имеют больший наружный диаметр (2,5-100 нм), чем однослойные (0,6-2,4 нм). Нанотрубки сочетают в себе высокую жесткость и упругость со способностью к обратимому сгибу и коллаборированию. Актуальным вопросом является возможность использования нанотрубок в качестве носителей лекарственных веществ. Известно, что нанотрубки взаимодействуют с макромолекулами (ДНК, белки).

Принципиально существуют три способа использования нанотрубок для доставки и высвобождения лекарственных веществ (Foldvari, Bagonluri, 2008b). Первый способ заключается в сорбировании активных молекул препарата на сети нанотрубок или внутри их пучка (рис. 1). Второй способ предполагает химическое присоединение лекарства к функционализированной внешней стенке нанотрубок. Наконец, третий способ требует помещения молекул активного вещества внутрь просвета нанотрубок.

Важным этапом превращения нанотрубок в эффективный носитель лекарственного вещества является функционализация поверхности нанотрубок, т.е. присоединение к ней химических группировок, играющих роль связующего звена между поверхностью и молекулой лекарственного препарата. Существует несколько методов функционализации. Во-первых, функционализации могут подвергаться дефектные участки стенки нанотрубки. Во-вторых, функционализация может обеспечиваться ковалентным или нековалентным связыванием химических групп с поверхностью интактной стенки. Одним из наиболее широко

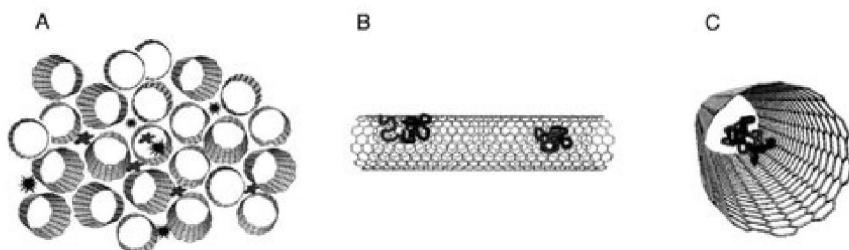


Рис. 1. Варианты использования нанотрубок для транспорта и доставки лекарственных веществ.

А - сорбирование вещества в массиве нанотрубок, Б - химическое присоединение вещества к функционализированной поверхности нанотрубки, С - помещение вещества в просвет нанотрубки.

используемых способов нековалентной функционализации нанотрубок является присоединение к ним молекул полиэтиленгликоля (Kam et al., 2005).

Функционализированные нанотрубки могут служить переносчиками как небольших молекул лекарственных веществ, так и макромолекулярных комплексов. Примером переноса низкомолекулярных препаратов является синтез коньюгата нанотрубок с антимикотическим препаратом амфотерицином В (Wu et al., 2005). Использование такого рода коньюгатов позволило добиться снижения токсичности амфотерицина В и усилить его фунгицидный эффект, направленный против грибов рода *Candida*.

Большой интерес представляют собой результаты исследований, посвященных переносу с помощью нанотрубок молекул белков и ДНК. В работе Kam et al. (2004) изучалась способность нанотрубок доставлять в клетки белок стрептавидин. Коньюгаты нанотрубок со стрептавидином обеспечивали более выраженную трансфекцию белка внутрь клеток, чем прямая инкубация с данным белком. Согласно данным другой группы исследователей, присоединение к нанотрубкам молекул интерферирующей РНК, направленной против обратной транскриптазы теломеразы, с последующим введением данной конструкции в клетки вызывало эффективное подавление экспрессии гена-мишени (Zhang et al., 2006). Pantarotto et al. (2004) провели успешную трансфекцию плазмиды гена в-галактозидазы в клетки линий HeLa и CHO с помощью функционализованных аммонием нанотрубок. Для трансфекции плазмид, коньюгированных с нанотрубками, в большинстве выполненных к настоящему времени исследований применялась стандартная методика инкубации клеточных культур с соответствующим коньюгатом. Cai et al. (2005)

применили принципиально иной вариант доставки, названный ими магнитофекцией. Для этого использовались вертикально уложенные нанотрубки, конъюгированные с плазмидой зеленого флуоресцирующего белка, верхушки которых дополнительно связывались с ферромагнитными наночастицами никеля. Поступление этих конструкций в клетки лимфомы Bal-17 и В-лимфоциты обеспечивалось за счет воздействия внешнего магнитного поля. В результате нанотрубки фактически пронизывали мембрану клеток, проходя в цитоплазму под действием магнитного поля. Интересно, что жизнеспособность клеток при этом не страдала, а эффективность трансфекции была исключительно высокой, поскольку экспрессия гена зеленого флуоресцирующего белка наблюдалась в 100% клеток.

Несмотря на успешное экспериментальное обоснование использования нанотрубок для доставки внутрь клеток различных молекул, многие принципиально важные вопросы относительно механизмов взаимодействия нанотрубок с клетками остаются неясными. Так, например, отсутствует четкое представление о пути проникновения нанотрубок в клетки. При этом одни авторы считают, что нанотрубки поступают в клетку путем эндоцитоза (Kam et al., 2004), а другие рассматривают в качестве возможного механизма диффузию каркаса нанотрубок в билипидном слое (Pantarotto et al., 2004). В последние годы были получены важные данные о возможности использования нанотрубок для доставки в организм антигенов вакцин. В силу хорошей биосовместимости и низкой иммуногенности нанотрубки представляют собой перспективный носитель для вакцин.

Еще один вариант использования нанотрубок в качестве носителей биологически активных веществ основан на помещении активной молекулы в просвет нанотрубки, что превращает по-

леднюю в своеобразный «наноконтейнер». С помощью математического моделирования Shaitan et al. (2006) построили наноструктуру, содержащую в просвете активное вещество (декапептид) и микродозу взрывчатого вещества. После интернализации таких нанотрубок внешний сигнал вызывает активацию взрывчатого вещества, в результате чего происходит деструкция углеродного каркаса нанотрубки и высвобождение содержащегося в ней пептида. В реальности задача помещения активных молекул внутрь нанотрубок осложняется их высокой гидрофобностью и крайне малым внутренним диаметром. Cui et al. (2004) удалось обеспечить инкапсуляцию ДНК, связанной с атомами платины, в нанотрубки с внутренним диаметром 10-12 нм. Однако для

достижения этой цели использовалась температура 127°C и давление 3 Бар. Очевидно, что такие условия синтеза могут оказаться неприемлемыми для сохранения функциональной активности большинства биомолекул. Более приемлемым может оказаться использование электрофореза заряженных частиц, содержащих активное вещество. Этот подход обеспечивал эффективное протекание через нанотрубки с внутренним диаметром 1,5 нм взвеси наночастиц, нагруженных одноцепочечной РНК (Yeh, Hummer, 2004).

Разновидности наночастиц и их применение в биологии и медицине.

Формальными признаками наночастиц являются сферическая форма и размер от 1 до 250-300 нм. В связи с этим, в группу наночастиц отно-

Таблица 1. Классификация наночастиц

Вид наночастиц	Разновидности (примеры)
Углеродные наночастицы	Фуллерены Цельноуглеродные наночастицы
Кремнеземные наночастицы	Аэросил
Дендримеры	Полиамидоамин Полилизин
Липосомы	Малые однослойные липосомы Большие однослойные липосомы Многослойные липосомы
Полимерные мицеллы	Полиаспартат- <i>b</i> -полиэтиленгликоль Поликапролактон— <i>b</i> —метокси—полиэтиленгликоль
Полимерные биодеградируемые наночастицы	<i>Синтетические</i> Полиметилметакрилат Полиметилицианакрилат и др. Гамма-полиглутаминовая кислота Полилактид Поли(лактид-ко-гликолид) <i>Натуральные</i> Хитозан Альбумин Желатин Агароза
Квантовые точки	Селенид кадмия Теллурид кадмия Фосфид индия Арсенид индия
Металлические наночастицы	Золото Серебро
Суперпарамагнитные частицы	Оксид железа
Перфторуглеродные наночастицы	Наночастицы, состоящие из жидкого перфторуглеродного ядра, покрытые липидным монослоем

сят весьма разнородные по химическому строению и физическим свойствам частицы (табл. 1).

Принципиально возможно деление наночастиц на органические (например, фуллерены, дендримеры) и неорганические (металлические и квартцевые наночастицы). Физико-химические свойства наночастиц предопределяют их назначение в наномедицине. Например, четко зависящая от размера квантовой точки флуоресцентная эмиссия делает эти наночастицы незаменимыми для молекулярной визуализации, а разветвленная структура дендримеров дает широкие возможности для их функционализации и, следовательно, превращает их в перспективные средства для доставки лекарственных препаратов. Ниже дается краткая характеристика основных классов наночастиц и приводятся примеры их использования в биологии и медицине:

Липосомы представляют собой наночастицы шаровидной формы, ограниченные билипидной мембраной, в полости которой находится водная среда. Активное вещество может располагаться в ядре липосомы (водорастворимые вещества) либо в ее липидной оболочке (жирорастворимые вещества). Несмотря на то, что размеры липосом могут быть очень вариабельными, большинство липосом имеют диаметр менее 400 нм.

Обычно липосомы классифицируют на три группы: однослойные малые, однослойные большие и многослойные. Кроме того, в зависимости от состава и пути попадания в клетку липосомы могут быть разделены на пять классов: 1) стандартные липосомы, 2) липосомы, чувствительные к pH, 3) катионные липосомы, 4) липосомы с иммунными свойствами, 5) длительно циркулирующие липосомы.

Хотя липосомы были описаны более 40 лет назад, способы транспортировки и доставки лекарственных препаратов на основе липосом не получили широкого распространения на фармацевтическом рынке. Основными проблемами, сдерживающими более широкое применение липосом, являются их относительная нестабильность, невозможность обеспечить стандартное действие в различных партиях препаратов, трудности стерилизации и недостаточная загрузка препаратом (Fenske et al., 2008). Тем не менее, существуют примеры успешного применения основанных на липосомах препаратов в клиничес-

кой практике. К ним относится препарат доксил, содержащий доксорубицин в липосомах, модифицированных полиэтиленгликолем. Данный препарат особенно эффективен для лечения саркомы Капоши у пациентов, инфицированных ВИЧ.

Полимерные мицеллы представляют интерес в первую очередь как переносчики гидрофобных лекарственных препаратов. В частности, мицеллы могут использоваться для парентерального введения таких препаратов, как амфотерицин В, пропофол и паклитаксел (Kwon, 2003). Подобно липосомам, мицеллы могут применяться для направленной доставки лекарственных препаратов к клеткам-мишеням. Это достигается при соединением к поверхности мицелл чувствительных к pH элементов. Описаны бифункциональные полимерные мицеллы для одновременной доставки лекарственных препаратов и визуализации поврежденных тканей (Fahmy et al., 2007).

Среди металлических наночастиц наиболее известны наночастицы таких благородных металлов, как золото и серебро. **Наночастицы золота**, обладающие целым рядом уникальных характеристик (оптические свойства, прочность, высокая площадь поверхности), в основном используются в диагностических целях. Наночастицы золота могут служить для усиления сигнала при проведении иммуноферментного анализа за счет их связывания с антителами. Tanaka et al. (2006) применяли наночастицы золота для повышения чувствительности иммунохроматографических диагностических полосок. При этом с наночастицами золота связывались как первичные, так и вторичные антитела. Разработанный иммуноаналитический набор позволял определять хорионический гонадотропин в концентрации, приближающейся к 1 пг/мл. Чувствительность хемилюминесцентной детекции антител также может быть во много раз повышенена при использовании наночастиц золота нерегулярной формы, каталитическая активность которых в 100 раз выше, чем у наночастиц сферической формы. Электрохимический подход, основанный на частичном замещении электродов наночастицами золота, недавно был использован для безметочной детекции раково-эмбрионального антигена (Ou et al., 2007). Полученные иммуноаналитические наборы показали прекрасную воспроизводимость данных. Примечательно, что наночастицы серебра в последние годы с успехом

использовались для усиления флуоресценции в иммунодиагностике (Asian et al., 2006).

Описанные наносенсоры на основе наночастиц золота также применяются для диагностики однонуклеотидных генных полиморфизмов и точечных мутаций (Doria et al., 2007), детекции микробактерий туберкулеза в биологических средах (Baptista et al., 2006) и определения кДНК онкогена p53 в фемтомолярных концентрациях (Yao et al., 2006).

В ближайшем будущем ожидается дальнейшее усовершенствование диагностических подходов, основанных на использовании наночастиц золота. В частности, большой потенциал имеют разработки методов функционализации поверхности этих наночастиц с помощью углеводов и повышения чувствительности наносенсоров на основе золотых наночастиц с «профилизацией» их диагностических возможностей (Baptista et al., 2008).

Цельные наночастицы представлены сферическими наноразмерными объектами из биодеградируемого материала, например, белка (альбумин, коллаген), жиров или синтетических полимеров (Mo et al., 2007). Размер цельных наночастиц колеблется от 10 до 1000 нм. Это дает возможность использовать их для одновременной визуализации поврежденных тканей и направленной доставки лекарственных препаратов. Цельные наночастицы в настоящее время лидируют средиnanoобъектов, используемых в терапевтических целях.

Особое внимание исследователей привлекают цельные **липидные наночастицы**. Их преимущества включают высокую стабильность, защиту инкорпорированных препаратов от деградации, контролируемое высвобождение препаратов и превосходную переносимость. Эти наночастицы в качестве транспортеров препаратов могут вводиться в организм самыми разными путями, включая энтеральный, трансдермальный, парентеральный, ректальный и внутриглазной. Предполагается, что липидные наночастицы могут лучше преодолевать гематоэнцефалический барьер, в связи с чем предпринимались попытки их изучения в качестве переносчиков в мозг таких препаратов, как доксорубицин, паклитаксел и камптотецин (Yang et al., 1999). Положительные результаты были получены при исследовании терапевтической эффективности перорального приема липидных наночастиц, нагружен-

ных тобрамицином, клозапином, камптотецином, рифампицином и изониазидом (Bawarski et al., 2008).

Флуоресцентные метки широко используются в биологии и медицине. Их недостатком является необходимость использования различных красителей для получения каждого цвета и подбора лазера соответствующей длины волны для индукции флуоресценции этих красителей. Кроме того, цвета флуоресцентных меток часто сливаются и быстро бледнеют. **Полупроводниковые нанокристаллы**, называемые **квантовыми точками**, лишены этих недостатков. Они представлены мельчайшими частицами, сопоставимыми по размеру с молекулами белков и нуклеиновых кислот. При возбуждении они дают практически непрерывную палитру четких цветов. Флуоресценция квантовых точек возбуждается белым светом, причем частицы нанокристаллов могут быть присоединены к биомолекулам и обеспечивать длительно существующий сигнал, многократно превосходящий по яркости используемые в настоящее время красители (Azzazy et al., 2007). Применение квантовых точек может существенно расширить возможности диагностики многих заболеваний. В настоящее время квантовые точки активно используются для детекции опухолевых клеток (Wu et al., 2003), маркирования внутриклеточных органелл (Hanaki et al., 2003), визуализации микрососудов (Lim et al., 2003) и многих других биомедицинских исследований.

Перфторуглеродные наночастицы представлены ядром, состоящим из жидкого перфторуглерода, и фосфолипидной оболочкой. Размер этих частиц обычно лежит в пределах 200-250 нм. Жидкостные перфторуглеродные наночастицы нелетучи, биологически инертны, химически стабильны и не подвергаются распаду в организме (Mattrey, 1994). Наличие фосфолипидов позволяет присоединять к наружной поверхности перфторуглеродных наночастиц лекарственные препараты и антитела. Примечательно, что перфторуглеродные наночастицы обладают исключительно высокой способностью связывать атомы гадолиния (до 50-100 тыс. атомов на одну частицу). Это ставит перфторуглеродные наночастицы в ряд наиболее перспективных контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии. Направленная доставка перфторуглерод-

ных наночастиц в клетки-мишени обычно достигается путем ковалентного связывания липидов поверхностной мембранны с антителами или пептидомиметиками. Большинство наноразмерных носителей лекарственных препаратов обеспечивают высвобождение последних только после интернализации в клетку или разрушения наночастиц. По сравнению с ними перфторуглеродные наночастицы обладают серьезным преимуществом, поскольку липофильные препараты, внедренные в наружную оболочку перфторуглеродных наночастиц, могут высвобождаться при простом контакте поверхности перфторуглеродных наночастиц с плазмалеммой клетки-мишени. Этот процесс получил название «контактного облегченного липидного обмена» (Winter et al., 2007). Усиление взаимодействия между наружной оболочкой перфторуглеродных наночастиц и клеточной мембраной с помощью облучения ультразвуком усиливает перенос вещества в клетку по меньшей мере в 10 раз (Crowder et al., 2005).

Перфторуглеродные наночастицы используются для молекулярной визуализации вновь сформированных опухолевых сосудов за счет взаимодействия с интегрином $\alpha_v\beta_3$. Такого рода специфическое взаимодействие перфторуглеродных наночастиц обеспечивается за счет их соединения с пептидомиметиком, распознавающим интегрин $\alpha_v\beta_3$. Поскольку интегрин $\alpha_v\beta_3$ усиленно экспрессируется не только в опухолевых сосудах, но и в прогрессирующей атеросклеротической бляшке, перфторуглеродные наночастицы успешно применялись для визуализации атеросклеротического повреждения аорты у кроликов (Winter et al., 2003). Кроме того, связывание перфторуглеродных наночастиц с антителами против тканевого фактора и фибрина позволяло визуализировать поврежденный эндотелий и тромбы в просвете сосудов, соответственно (Flacke et al., 2001). Перфторуглеродные наночастицы также представляют собой неоценимый инструмент для наблюдения судьбы клеток, вводимых в организм с терапевтической целью. Partlow et al. (2007) с помощью магнитно-резонансной томографии наблюдали продвижение и аккумуляцию в подкожных лимфоузлах прогениторных клеток, меченых перфторуглеродными наночастицами и введенных в пятую область.

Парамагнитными материалами называют ионы металлов или органические радикалы, име-

ющие неспаренные электроны. В присутствии магнитного поля спины неспаренных электронов ориентируются в магнитном поле в невозбужденном состоянии, формируя материал с насыщенным магнитным моментом. Прекращение действия магнитного поля устраняет этот феномен. Группы соседних электронов, ориентированные в одинаковом направлении, получили название магнитных доменов. Уменьшение магнитных материалов до наноразмерных величин приводит к формированию высокого магнитного момента, известного под названием **суперпарамагнетизма**. Наиболее хорошо изучены суперпарамагнитные свойства частиц оксида железа. Для биомедицинских целей чаще всего используется магнетит (Fe_3O_4), который представляет собой смесь различных оксидов железа (Tartaj et al., 2003).

Подобно квантовым точкам, **суперпарамагнитные наночастицы** обладают довольно высокой токсичностью. Поэтому в процессе их синтеза необходимо повышение их биосовместимости. Это может достигаться различными путями, например, помещением суперпарамагнитных наночастиц в биологически инертные футляры из декстрана, полисахаридов и полиэтиленгликоля. Покрытые золотом суперпарамагнитные наночастицы могут использоваться в качестве контрастных агентов при проведении магнитно-резонансной томографии, что позволяет существенно увеличить разрешающую способность данного метода (Ji et al., 2007). С другой стороны, известно, что помещение суперпарамагнитных наночастиц в циклическое магнитное поле приводит к их выраженному разогреву за счет электрического сопротивления металлического компонента (Laurent et al., 2008). Этот факт обосновывает применение суперпарамагнитных наночастиц для таргетной термической деструкции патологических тканевых образований (в первую очередь, опухолей).

Микророботы, нанороботы.

На протяжении последних десяти лет непрерывно производились попытки сконструировать **микророботы** для лечения определенных заболеваний. Так, в 2002 г. Ishiyama et al. разработали микроразмерные врачающиеся винтовые структуры, движение которых в кровотоке обеспечивалось магнитным полем. Эти микророботы предназначались для доставки лекарственных веществ в инфицированную ткань и даже для

проникновения в опухоли с целью их термической деструкции. В 2003 г. была предпринята попытка использовать магнитные поля различной интенсивности для обеспечения направленного движения в организме человека микроробота, содержащего ферромагнитные частицы (Mathieu et al., 2003). В 2005 г. эти попытки увенчались успешным созданием микророботов, имевших размер около 200 мкм, которые могли быть введены в просвет сосуда через иглу (Nelson, Rajamani, 2005). Эти микророботы эффективно перемещались по водному лабиринту за счет помещения по внешнее магнитное поле, причем различные частоты поля приводили к селективной активации определенных частей робота, обеспечивая контроль его функций.

Однако принципиально иной уровень функционирования устройств этого типа может быть достигнут при переходе на наномасштаб. Это станет возможным после разработки молекулярных аналогов современных подшипников и шестерней. Для создания таких **нанороботов** будет применяться методика позиционной сборки. В макромире аналогом этого процесса является автоматизированная сборочная линия автозавода, где каждый робот выполняет строго заданную манипуляцию. Позиционная сборка алмазо-подобных структур из молекулярного сырья хорошо изучена теоретически с помощью математических моделей механосинтеза алмаза (Drexler, 1992; Merkle, Freitas, 2003). **Механосинтез алмаза** - это процесс контролируемого добавления атомов углерода к участку роста кристаллической решетки алмаза в вакуумированной среде. Использование этого подхода может обеспечить быстрое производство огромного количества нанороботов.

На сегодняшний день мы располагаем ограниченными данными о возможном применении подобных нанороботов в практической медицине. Один из немногих завершенных проектов посвящен созданию т. н. респироцита – искусственного эритроцита, состоящего из 18 миллионов четко структурированных атомов (Freitas, 1998). **Респироцит** представляет собой сферический сосуд из алмазоподобного материала, имеющий 1 мкм в диаметре и выдерживающий давление в 1000 атмосфер. Способность этого наноробота к переносу кислорода в 256 раз превышает аналогичную способность эритроцита.

Другой пример наноробота, выполняющего функцию естественной клетки человеческого организма – **искусственный фагоцит** (Freitas, 2005). Такого рода наноробот также предназначен для циркуляции в кровотоке и фагоцитоза патогенных вирусов, бактерий и грибов. По прогнозам создателей, введение в кровоток искусственных фагоцитов может приводить к полному уничтожению патогенных микроорганизмов в течение нескольких часов у пациентов с тяжелой септикопиемией. Большие надежды возлагаются на применение нанороботов в хирургии. При этом нанороботы также вводятся в кровоток и затем осуществляют поиск пораженной ткани и коррекцию дефектов за счет манипулирования наnanoуровне. Первые данные о применении нанороботов для хирургических нужд свидетельствуют о перспективности данного метода. Так, например, **фемтосекундный лазер** представляет собой «нано-ножницы», с помощью которых осуществляются тончайшие манипуляции на уровне внутриклеточных структур. Такой эффект достигается за счет испарения нанообъемов ткани без какого-либо повреждения соседних участков ткани. Уже имеется опыт использования фемтосекундного лазера для препарирования микротрубочек в клетках дрожжей (Sacconi et al., 2005) и нанохирургии отдельных хромосом в живой яйцеклетке путем избирательного удаления определенных участков генома (Konig et al., 1999). Существенным моментом является то, что эти процедуры не влияют на жизнеспособность клеток, в которых они выполняются.

В будущем прогнозируется создание нанороботов, способных осуществлять мельчайшие манипуляции на ультраструктурном уровне, невыполнимые рукой самого искусного микрохирурга.

Нанооболочки.

Одним из примеров использования наноструктур для направленной доставки лекарственных препаратов являются **нанооболочки**. В отличие от углеродных наночастиц, нанооболочки представляют собой несколько более крупные частицы, состоящие из кремнеземной сердцевины и тонкого золотого покрытия. Нанооболочки покрываются слоем полимера, содержащего лекарственный препарат, и вводятся в организм. После накопления частиц в пораженной ткани (например, в опухоли) производится облучение данной области инфракрасным лазером. Это приво-

дит к селективному поглощению нанооболочками инфракрасных частот и их нагреванию. Нагрев поверхности частицы приводит к высвобождению лекарства из слоя полимера и обеспечивает его локальное действие.

Нанооболочки могут использовать для иммуноанализа цельной крови, которая, как известно, хорошо проникаема для инфракрасных лучей. При присоединении антител к поверхности нанооболочек путем варьирования толщины металлического покрытия можно добиться точного определения длины волны, на которую будут «отвечать» частицы. В настоящее время уже имеется положительный опыт использования этой методики для детекции иммуноглобулинов, присутствующих в растворе, сыворотке и цельной крови в концентрации ниже 1 нг/мл (Hirsch et al., 2005).

Еще одна область применения нанооболочек – прямая деструкция опухолевых клеток. Для этой цели использовались содержащие железо нанооболочки с иммобилизованными на их поверхности моноклональными антителами против опухолевых поверхностных антигенов. После инъекции нанооболочек в кровоток они селективно связываются с опухолевыми клетками как в зоне первичной опухоли, так и в области микрометастазов. Облучение животных магнитным полем, генерируемым портативным аппаратом **магнитно-резонансной томографии**, приводило к нагреванию железосодержащих нанооболочек до 170°C и гибели опухолевых клеток в течение нескольких секунд (DeNardo et al., 2005).

Нанобиотехнологии в лабораторной диагностике.

Нанотехнологии открывают новые возможности в клинической лабораторной диагностике. Молекулярная диагностика способствует формированию персонализированной медицины - современного направления, в основе которого лежит составление индивидуального генотипического и фенотипического портрета пациента. Кроме того, преимуществами использования нанотехнологии в лабораторной диагностике являются возможность использования очень небольших количеств биологического материала, высокая скорость и чувствительность лабораторных тестов, и, наконец, возможность одновременного проведения диагностики и лечения.

Нанотехнологии могут применяться для решения самых разных диагностических задач, в

частности, генотипирования, иммуногистохимического анализа, детекции биохимических маркеров различных заболеваний и обнаружения патогенных микроорганизмов.

Нанобиочипы.

В настоящее время микрочипы широко используются для выявления полиморфизмов и мутаций. Усилия исследователей в течение последних лет были направлены на миниатюризацию биочипов с целью обеспечения максимальной плотности нанесения биологического материала. Недавно разработанная технология поиска и идентификации аллельных полиморфизмов и мутаций в геноме человека, основанная на применении наночастиц золота, не требует предварительной амплификации (Bao et al., 2005).

Атомно-силовая микроскопия.

В основе метода **атомно-силовой микроскопии** лежит принцип профилометра (рис. 2). При этом заостренный пирамidalный наконечник, присоединенный к кронштейну, движется по поверхности изучаемого объекта, обеспечивая формирование трехмерного изображения объекта на экране регистрирующего устройства (Pereira, 2001). Кронштейн, на котором располагается наконечник, состоит из двух слоев – золотого зеркала и слоя силикона. Двухмерное изображение (ширина и длина объекта) достигается за счет отсчета расстояния, пройденного кронштейном, а третье измерение (глубина или высота) формируется путем отражения лазерного пучка и фиксации полученных значений двойным фотодиодом.

Атомно-силовая микроскопия имеет некоторые преимущества перед методом сканирующей электронной микроскопии, традиционно используемой для получения поверхностных изображений биологических объектов высокого разрешения. При сканирующей электронной микроскопии изображение объекта формируется за счет детекции электронов, отраженных объектом. При этом поверхность объекта должна быть электропроводной, что в большинстве случаев достигается путем напыления тонкого слоя металла на образец. Процедура напыления приводит к маскированию некоторых структур клеточной оболочки и, кроме того, клетки образца теряют жизнеспособность в ходе его приготовления. Изобретение атомно-силовой микроскопии позволило избежать этих проблем, поскольку в дан-

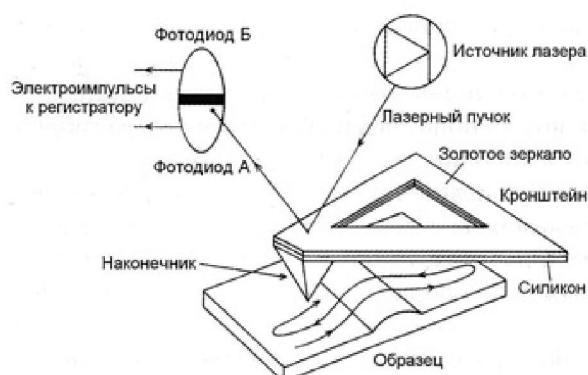


Рис. 2. Принцип работы атомного силового микроскопа.

ном случае не требуется покрытие образца слоем металла и вполне возможно наблюдение живых клеток. При этом разрешающая способность атомно-силовой микроскопии не уступает традиционной сканирующей электронной микроскопии.

Атомно-силовая микроскопия может использоваться не только для визуализации клеток и субклеточных структур, но и для детекции молекулярных структур. Pereira (2001) использовал нанодатчик с иммобилизированной на поверхности кронштейна атомного силового микроскопа супероксиддисмутазой для обнаружения продукции супероксид-аниона клетками пекарских дрожжей. Иммобилизация каталазы в аналогичных условиях позволила определить продукцию перекиси водорода. Размещение на верхушке наконечника атомного силового микроскопа молекул блокаторов кальциевых каналов позволяет локализовать индивидуальные кальциевые каналы на поверхности клетки по выраженному отклонению сигнала, регистрируемому в этих точках. Метод атомно-силовой микроскопии является перспективным и в плане направленной доставки лекарственных препаратов, поскольку в этом случае препарат может быть доставлен не только в отдельную клетку, но и в определенный внутриклеточный компартмент.

Нанотехнологии в цитогенетике.

Методы цитогенетики используются для характеристики структуры хромосом и их аномалий. Использование флуоресцентной гибридизации *in situ* позволило добиться хороших результатов. В настоящее время молекулярная цитогенетика получила новый импульс к развитию, что связано главным образом с использованием

атомно-силовой микроскопии и флуоресцентной гибридизации *in situ* на основе квантовых точек. Атомно-силовая микроскопия позволяет получить информацию об ультраструктуре хромосом и одновременно осуществлять препаровку мельчайших участков хромосом.

Kanger et al. (2008) разработали оригинальную методику изучения механических свойств ядерного хроматина *in vivo* с помощью магнитных наночастиц, управляемых «магнитным пинцетом». Количественные характеристики вязкости и эластичности хроматина, полученные в этих экспериментах, хорошо согласуются с результатами других исследований и позволяют рассчитывать силу, необходимую, например, для репозиции фрагментов хроматина в ядре. Авторы работы предполагают, что методика «магнитного пинцета» в будущем может использоваться для таргетной регуляции экспрессии генов путем перемещения определенных локусов из зон конденсированного хроматина в зоны его разрыхления и наоборот. Кроме того, использование этой методики может обеспечить возможность эпигеномной регуляции экспрессии некоторых генов за счет присоединения к поверхности магнитных наночастиц ферментов, осуществляющих метилирование и деметилирование азотистых оснований.

Нанобиодатчики.

Нанобиодатчики представляют собой наноразмерные датчики для качественного и количественного определения химических веществ и определенных типов клеток в биологическом материале. Нанобиодатчики обладают исключительно высокой чувствительностью по сравнению с другими типами датчиков (Jain, 2003).

Таблица 2. Основные типы нанодатчиков (по Jain, 2007)

Типы нанодатчиков
Электронные нанодатчики
Электрохимические нанодатчики
Нанодатчики, основанные на переключении ионных каналов
Нанопроволочные датчики
Наноконсоли
Нанодатчики на основе нанотрубок
Кремнеземные наночастицы
Датчики, инкапсулированные в биологически локализованный материал
Нанодатчики на основе вирусных частиц

Выделяют несколько типов нанобиодатчиков (табл. 2). Одним из вариантов являются **нанопроволоки**. Поскольку поверхность нанопроволоки легко поддается химической модификации, в настоящее время освоены методы нанесения на нее распознающих элементов для различных молекул. Присоединение молекулы-мишени к поверхности нанопроволоки вызывает немедленное изменение ее электропроводности, которое может учитываться количественными методами. Легированная бором силиконовая нанопроволока использовалась для создания высокочувствительных количественных датчиков биологического назначения (Cui et al., 2001). Модифицированная биотином силиконовая нанопроволока применялась для детекции стрептавидина в пирамидальных концентрациях. Малый размер, высокая чувствительность и возможность детекции в режиме реального времени делают нанопроволоки перспективным материалом для чиповой диагностики и прижизненной диагностики.

Другой тип нанодатчиков основан на технологии переключения ионных каналов. Датчик представляет собой синтетическую самосборную мембрану, функционирующую по принципу биологического прерывателя. Электрический импульс от датчика генерируется при контакте с искомой биологической молекулой (Cornell, 2002).

Диагностическая система «Biodetect» (Integrated NanoTechnologies, США) функциони-

рует за счет электронного распознавания связывания искомой молекулы ДНК с чувствительным элементом микрочипа. Молекула ДНК при этом формирует мостик между двумя струнами нанопроволоки. Образование ДНК-мостиков, наличие которых контролируется с помощью методов флуоресцентной визуализации, легко распознается путем измерения сопротивления или других электрических свойств нанодатчика.

Некоторые нанодатчики основаны на использовании вирусных частиц. Так, в частности, вирус герпеса и аденоовирус использовались для запуска самосборки магнитных нанозерен, обеспечивающих детекцию других вирусов в биологических средах (Perez et al., 2003). Нанозерна состояли из магнитного ядра, представленного оксидом железа и декстрановой оболочки. Далее к поверхности нанозерен присоединялись антитела против вируса герпеса. Облучение диагностической системы магнитным полем обеспечивало чрезвычайно чувствительную детекцию вирусных частиц, например, 5 вирусных частиц в объеме сыворотки 10 мл. Описанная диагностическая система имеет гораздо более высокую чувствительность, чем традиционный иммуноферментный анализ. С другой стороны, она характеризуется большей скоростью выполнения, меньшей стоимостью и встречаемостью артефактов, чем полимеразная цепная реакция.

Датчики, инкапсулированные в биологически локализованный материал (ДИБЛМ), состоят из сенсорных молекул, погруженных в химически инертный матрикс путем микроэмulsionной полимеризации, что обеспечивает образование сферических нанодатчиков диаметром от 20 до 200 нм (Sumner et al., 2002). Эти датчики обеспечивают внутри- и межклеточную детекцию различных ионов и молекул в режиме реального времени, причем формирующийся при этом сигнал не подвергается интерференции со стороны белковых молекул. ДИБЛМ также демонстрируют хорошую устойчивость к выщелачиванию и фотовыцветанию. В плазме крови человека ДИБЛМ обеспечивают высокочувствительную детекцию напряжения кислорода, на которую не влияют эффекты светорассеяния и аутофлуоресценции (Cao et al., 2004).

Нанокронштейны предназначены для трансформации молекулярного взаимодействия в механическое смещение наноплатформы (около 10 нм), которое может быть измерено напря-

мую за счет степени отклонения светового пучка от поверхности кронштейна. Использование нанокронштейнов в будущем может стать альтернативой полимеразной цепной реакции и дополнить существующие методы ДНК- и белковых микрочипов, поскольку в данном случае отпадает необходимость метить или копировать молекулы-мишени. Преимущества нанокронштейнов состоят в том, что они дают возможность быстрого распознавания немеченых специфических последовательностей ДНК для идентификации генных полиморфизмов, онкогенов и мутаций. Нанокронштейны могут быть полезны для разработки новых типов нанодатчиков для детекции вирусов, бактерий и других патогенных микроорганизмов (Gupta et al., 2006).

Нанотехнологии и молекулярная визуализация

Как и традиционная диагностика, нанодиагностика преследует цель возможно более раннего выявления заболевания в идеале на молекулярном уровне. В связи с этим в наномедицине появился термин «молекулярная визуализация». Молекулярная визуализация возможна при использовании следующих видов диагностических исследований:

1. Оптическая биолюминесценция и флуоресценция.
2. Компьютерная томография.
3. Магнитно-резонансная томография.
4. Однофотонная эмиссионная компьютерная томография.
5. Позитронно-эмиссионная томография.

Методы оптической визуализации.

Для оптической молекулярной визуализации чаще всего используются квантовые точки. Они представляют собой неорганические флуоресцентные наночастицы, имеющие целый ряд преимуществ по сравнению с органическими флуоресцентными метками. Квантовые точки могут быть идеальным инструментом для молекулярной визуализации у животных *in vivo*. Диагностическая ценность квантовых точек существенно возрастает при обеспечении их селективной доставки в определенный орган или ткань без нарушения их функции. Направленная доставка квантовых точек становится возможной при их конъюгации с пептидами или антителами. Первое исследование, посвященное возможности

использования квантовых точек для молекулярной визуализации, показало, что конъюгация пептидов с квантовыми точками приводит к их селективному накоплению в сосудах опухолей и других тканей *ex vivo* (Akerman et al., 2002). Позднее были выполнены исследования, показавшие возможность использования конъюгатов «квантовые точки-пептид» для визуализации специфических тканей *in vivo*. Так, в работе Cai et al. (2006) применялись квантовые точки, конъюгированные с трипептидом АРГ-ГЛИ-АСП. Последний является антагонистом интегрина $\alpha_v\beta_3$, который, в свою очередь, селективно экспрессируется на поверхности опухолевых клеток и сосудов. В результате внутривенного введения конъюгатов квантовых точек с указанным трипептидом авторам удалось добиться идеальной флуоресцентной визуализации подкожной глиобластомы у мышей *in vivo*. Квантовые точки также конъюгировались с моноклональными антителами против мембранных простатоспецифического антигена для детекции рака предстательной железы у мышей *in vivo* (Gao et al., 2004). В другом исследовании применялись конъюгаты квантовых точек и антител против альфафетопротеина для визуализации гепатомы *in vivo* (Yu et al., 2007).

Tada et al. (2007), используя метод высокоскоростной конфокальной биомикроскопии кожной складки, изучили движение единичной (!) квантовой точки, конъюгированной с антителом против герцептина-2, у мышей с раком молочной железы. При этом авторы наблюдали циркуляцию квантовой точки в просвете кровеносных сосудов, экстравазацию квантовой точки, ее связывание с мембранным антигеном и движение от мембраны опухолевой клетки к перинуклеарной зоне.

К сожалению, прижизненная флуоресцентная визуализация тканей с помощью квантовых точек, успешно продемонстрированная в нескольких исследованиях на мелких лабораторных животных, в силу ограниченной глубины проникновения оптического сигнала не может быть напрямую экстраполирована на клиническую практику. В клинической медицине эта методика может применяться для визуализации поверхностных тканевых образований (опухоли кожи и подкожной клетчатки), интраоперационной диагностики и визуализации зон, доступных при эндоскопии

Компьютерная томография.

В силу отсутствия тканеспецифических контрастных агентов, компьютерная томография до настоящего времени не рассматривалась как метод молекулярной визуализации. Тем не менее, в последние годы появились исследования, в которых в качестве контрастных агентов для компьютерной томографии использовались наночастицы. Так, йодсодержащие наночастицы в исследовании Hyafil et al. (2007) обеспечивали хорошую визуализацию макрофагов в атеросклеротических бляшках аорты кролика. Есть основания ожидать, что использование этих наночастиц может стать важным элементом компьютерной томографии коронарных артерий у человека. Использование в качестве контрастирующего агента покрытых полимером неорганических наночастиц (Bi_2S_3) показало, что эти частицы в 5 раз более эффективно поглощают рентгеновские лучи, чем стандартные йодсодержащие контрастные агенты (Rabin et al., 2006). Кроме того, наночастицы гораздо дольше циркулировали в крови и не уступали традиционным агентам по безопасности и эффективности. Учитывая, что компьютерная томография относится к наиболее часто используемым в настоящее время диагностическим методам, эти данные позволяют надеяться на все более активное внедрение наноразмерных контрастных и визуализирующих агентов в практику использования данного метода.

Магнитно-резонансная томография.

Определенные перспективы связаны с использованием наночастиц в качестве альтернативы традиционным контрастным агентам для магнитно-резонансной томографии. Для этой цели использовались суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, которые подвергаются неспецифическому захвату клетками ретикуло-эндотелиальной системы. В связи с этим, наночастицы оксида железа применялись для визуализации печени (Reimer et al., 2000), селезенки (Weissleder et al., 1988) и лимфоузлов (Mack et al., 2002). Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа хорошо обнаруживаются даже при их очень низкой концентрации. Имеются данные о визуализации отдельных клеток, содержащих эти наночастицы, и даже индивидуальных наночастиц (Shapiro et al., 2006). Поэтому данный тип наночастиц в последнее время активно используется для мечения отдельных клеток и прослеживания

путей их миграции *in vivo* (Stuckey et al., 2006).

Наиболее часто используемой мишенью для молекулярной визуализации с помощью магнитно-резонансной томографии является интегрин $\alpha_v\beta_3$. Для визуализации этого маркера опухолевого роста впервые были использованы парамагнитные липосомы, покрытые антителами и содержащие ионы гадолиния (Sipkins et al., 1998). Для направленной доставки парамагнитных наночастиц к клеткам опухолей использовался уже упоминавшийся ранее трипептид АРГ-ГЛИ-АСП (Winter et al., 2003). У кроликов с чешуйчато-клеточной карциномой инъекция таких наночастиц сопровождалась выраженным усилением сигнала на периферии опухоли через 2 часа после инъекции. В одном из последних исследований парамагнитные наночастицы против интегрина $\alpha_v\beta_3$ использовались для визуализации ранних стадий атеросклероза (Winter et al., 2006). Примечательно, что эти наночастицы содержали фумагиллин - мощный антиангидиальный препарат, блокирующий рост сосудов атеросклеротической бляшки. Через неделю после первой инъекции наночастицы они вводились снова, причем интенсивность сигнала при повторном введении была менее выраженной у животных, которым в первый раз вводились наночастицы с фумагиллином. Эти данные рассматриваются авторами как свидетельство антиатерогенного эффекта наночастиц, содержащих препарат. Таким образом, парамагнитные наночастицы могут выполнять роль бионаномашин, сочетая в себе функциональные элементы, обеспечивающие направленную доставку, визуализацию и терапевтический эффект.

К настоящему времени были выполнены единичные исследования, в которых изучалась возможность визуализации других молекулярных мишеней с помощью магнитно-резонансной томографии и наночастиц. Так, Flacke et al. (2001) изучали диагностическую эффективность содержащих гадолиний наночастиц для выявления нестабильных атеросклеротических бляшек. Данные парамагнитные наночастицы были направлены против молекул фибрина, причем их введение собакам *in vivo* позволяло выявить нестабильные бляшки. Другими авторами изучалась возможность использования парамагнитных наночастиц для доставки антирестенотических препаратов к гладким миоцитам сосудистой стенки (Lanza et al., 2002). Так или иначе, метод моле-

кулярной визуализации с помощью магнитно-резонансной томографии пока находится на ранней стадии своего развития. Большинство выполненных исследований было направлено на визуализацию сосудов, что связано с достаточно большими размерами парамагнитных наночастиц. Совершенствование методов создания парамагнитных наночастиц, имеющих сродство к определенным внутриклеточным структурам, может в перспективе сделать возможной визуализацию определенных типов клеток.

Радионуклидные методы визуализации.

В большинстве выполненных к настоящему времени исследований наноплатформ для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии и позитронно-эмиссионной томографии изучалась возможность направленной доставки наночастиц, меченых радиоизотопами, к опухолевой ткани с целью ее визуализации. Например, наночастицы оксида железа, меченные изотопом ^{111}In и содержащие моноклональные антитела, исследовались на модели рака молочной железы у мышей (DeNardo et al., 2005). Эти наночастицы обеспечивали оптимальную детекцию опухоли и после их нагревания за счет облучения переменным магнитным полем вызывали термолиз опухолевой ткани (рис.3). Перфторуглеродные наночастицы, также меченные ^{111}In , использовались для детекции опухолевого ангиогенеза у кроликов (Hu et al., 2007). Селективность связывания этих наночастиц с опухолевыми сосудами обеспечивалась их направленностью против интегрина $\alpha_v\beta_3$. Было показано, что наночастицы, содержащие около 10 атомов ^{111}In , обладают гораздо большей диагностической специфичностью, чем те, что содержат 1 атом изотопа. Важнейшее преимущество однофотонной эмиссион-

ной компьютерной томографии перед позитронно-эмиссионной томографией состоит в возможности одновременной визуализации нескольких радиоизотопов, поскольку гамма-лучи от различных изотопов могут быть дифференцированы по их энергии. На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные о попытках использования двойной радиоизотопной визуализации с помощью наночастиц.

Несколько исследований были посвящены изучению наноплатформ для позитронно-эмиссионной томографии. Liu et al. (2007) изучили распределение ^{64}Cu -меченых однослоистых нанотрубок в организме мыши *in vivo* с помощью позитронно-эмиссионной томографии, а также распределение этих нанотрубок *ex vivo*. Было показано, что нанотрубки обладают высокой стабильностью *in vivo*, причем длина функционализирующих их молекул полиэтиленгликоля оказывает влияние на распределение и время полужизни в кровотоке. В том же исследовании была показана хорошая диагностическая информативность нанотрубок для выявления опухолей, содержащих интегрин $\alpha_v\beta_3$.

Использование наночастиц в качестве контрастных агентов для радионуклидных исследований сопряжено с некоторыми трудностями в интерпретации получаемых результатов. Дело в том, что радионуклидные методы диагностики визуализируют в первую очередь изотоп, а не наночастицы. Суждения о накоплении наночастиц в том или ином органе в данном случае являются косвенными, поскольку в ходе исследования не исключается диссоциация радионуклида и поверхностного слоя наночастиц. Обеспечение более прочного связывания наночастиц с радиоизотопами будет способствовать созданию

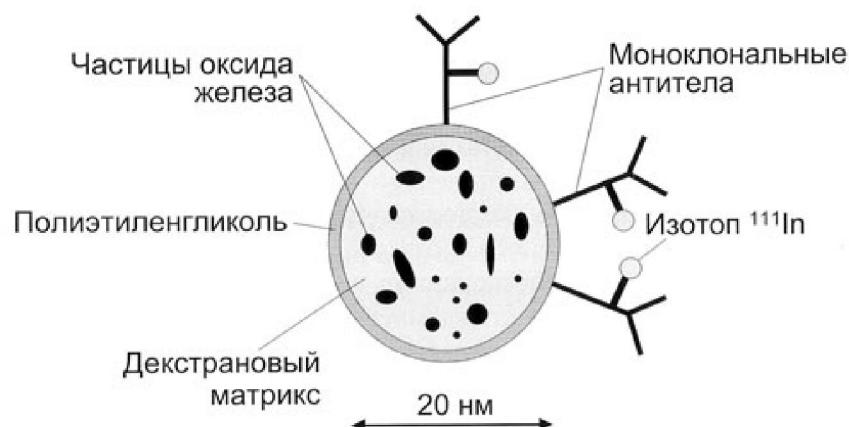


Рис. 3. Схема строения гибридной наночастицы, предназначенной для диагностики и терапии опухолей.

интегральных структур, дающих возможность одновременного количественного анализа молекулярных изображений и направленной доставки лекарственных препаратов.

Бимодальная визуализация с помощью наночастиц.

Ни один из существующих методов визуализации не может быть признан идеальным и дающим полную информацию об объекте исследования. Например, количественная оценка флуоресцентных сигналов затруднена *in vivo* и, кроме того, не дает возможности визуализировать глубоко лежащие ткани. С другой стороны, магнитно-резонансная томография обеспечивает высокое разрешение сигнала, но страдает от недостаточной чувствительности. Таким образом, комбинация различных методов визуализации могла бы дать более качественную информацию об исследуемом объекте.

В настоящее время предпринимаются попытки разработки бимодальных агентов для магнитно-резонансной томографии и оптической визуализации. Парамагнитные флуоресцирующие липосомы, несущие сайты связывания с интегрином $\alpha_v\beta_3$, использовались для изучения опухолей у мышей *in vivo* (Mulder et al., 2005). Использование такихnanoструктур позволило авторам лучше изучить паттерны адгезии липосом к эндотелию опухолевых микрососудов. Cai et al. (2007) недавно сообщили о разработке бимодального агента на основе квантовых точек для одновременной молекулярной визуализации интегрина $\alpha_v\beta_3$ с помощью позитронно-эмиссионной томографии и инфракрасной флуоресценции. В качестве радионуклида для позитронно-эмиссионной томографии использовался ^{64}Cu . С использованием этого метода производилась количественная оценка эффективности направленной доставки частиц к опухолевым сосудам. Было показано, что для достижения достаточной интенсивности позитронно-эмиссионного томографического сигнала при этом требуется гораздо меньшая концентрация наночастиц, чем та, что необходима для флуоресценции *in vivo*. Это позволяет значительно понизить ожидаемую токсичность кадмийовых квантовых точек, что делает гораздо более реальным использование этого метода для дальнейших биомедицинских исследований.

Обратимое подавление экспрессии генов с помощью интерферирующей и антисмысловой

РНК широко применяется в современной биологии и медицине. Для доставки иРНК в опухолевые клетки и визуализации ее внутриклеточного накопления была разработана методика, включающая одновременное получение магнитно-резонансного, томографического и флуоресцентного сигналов (Medarova et al., 2007). Использованное для этой цели наноустройство состояло из магнитных наночастиц, связанных с флуоресцентной меткой и иРНК. Кроме того, к поверхности наночастиц дополнительно присоединялся мембранный пептид для внутриклеточной транслокации. Накопление наночастиц было подтверждено в опухолевой ткани с помощью магнитно-резонансной томографии и инфракрасной флуоресценции.

Таким образом, нанотехнологии находят применение практически во всех современных способах диагностики, связанных с визуализацией тканей. Использование наночастиц позволяет перейти на уровень молекулярной визуализации, дающей возможность наблюдать тонкие патологические изменения внутри и вне клеток.

Использование нанотехнологий для транспортировки и направленной доставки лекарственных препаратов.

По некоторым оценкам, до 95% вновь созданных лекарственных препаратов демонстрируют серьезные недостатки фармакокинетических параметров и/или обладают выраженным побочными эффектами (Brayden, 2003). В связи с этим, актуальную задачу представляет разработка методов направленной (таргетной) доставки лекарственных препаратов к поврежденным тканям. Способы **направленной доставки лекарств** обеспечивают достижение действующей концентрации препарата в поврежденной ткани без выраженного системного эффекта. Нанотехнологии способствуют решению этой задачи, что, в свою очередь, позволяет снизить дозировки препаратов, увеличить их терапевтический эффект и повысить безопасность их применения. Под «**нанолекарствами**» понимают наноразмерный (1-100 нм) переносчик, содержащий инкапсулированное, диспергированное, адсорбированное или конъюгированное лекарственное вещество (Koo et al., 2005).

Koo et al. (2005) приводят следующие преимущества использования наночастиц в качестве

переносчиков лекарственных препаратов. Во-первых, при использовании наноразмерных переносчиков объем распределения препарата обычно снижается. Во-вторых, происходит снижение токсичности препарата за счет его избирательного накопления в поврежденной ткани и меньшего поступления в здоровые ткани. В-третьих, многие нанопереносчики увеличивают растворимость гидрофобных веществ в водной среде и, таким образом, делают возможным их парентеральное введение. В-четвертых, системы доставки способствуют повышению стабильности препаратов на основе пептидов, олигонуклеотидов и небольших гидрофобных молекул. И, наконец, в-пятых, нанопереносчики представляют собой биосовместимые материалы.

По механизму обеспечения адресной доставки препаратов выделяют две основные стратегии – пассивный и активный перенос. Пассивный перенос происходит за счет преимущественного выхода лекарственных наночастиц в воспаленную или опухолевую ткань вследствие локального повышения проницаемости микрососудов при этих патологических процессах. Для дополнительного повышения проницаемости микрососудов в ткани-мишени могут применяться такие физические факторы, как ультразвук (Nelson et al., 2002) и гипертермия (Meyer et al., 2001). Для обеспечения эффективного пассивного переноса требуется продолжительная циркуляция лекарственных наночастиц в кровотоке. В то же время, немодифицированные наночастицы достаточно быстро подвергаются опсонизации и захвату клетками ретикуло-эндотелиальной системы. «Маскирование» наночастиц наиболее часто достигается за счет их покрытия слоем полиэтиленгликоля, который обладает химической инертностью и низкой иммуногенностью. Показано, что время полужизни в кровотоке покрытых полиэтиленгликолем липосом составляет от 15 до 24 часов у грызунов и до 45 часов у человека (Woolde, 1993), в то время как непокрытые липосомы имеют время полужизни, не превышающее 2 часов (Allen, Everest, 1983). Пассивный перенос препаратов в центральную нервную систему может иметь место при ее заболеваниях, сопровождающихся повышением проницаемости гемато-энцефалического барьера. Показано, что повышение проницаемости последнего происходит при ишемическом инсульте, болезни Альцгеймера, некоторых

энцефалопатиях и рассеянном склерозе.

Активная доставка лекарственных препаратов в поврежденные ткани предполагает маркирование поверхности наночастиц антителами или иными распознающими элементами, которые обеспечивают высокоизбирательное связывание наночастиц с антигенами, экспрессирующимиися на поверхности поврежденных клеток.

Применение нанотехнологии и наноматериалов в отдельных областях медицины.

Наномедицинские подходы все более интенсивно внедряются в конкретные медицинские специальности, обеспечивая решение проблем лечения сердечно-сосудистых, эндокринных, онкологических заболеваний, а также заболеваний нервной, пищеварительной, дыхательной систем и опорно-двигательного аппарата. В последние годы формируются отдельные направления наномедицины, названные соответственно отраслям медицинских знаний, например, наноневрология,nanoонкология, наноэндокринология и т. д. Ниже описываются достижения последних лет в некоторых конкретных областях наномедицины.

Нанотехнологии в кардиологии.

Использование нанотехнологии и наноматериалов в кардиологии приводит к существенному прогрессу в диагностике и терапии сердечнососудистых заболеваний.

Борьба с последствиями артериального и венозного тромбоза остается важнейшей задачей современной кардиологии. В последнее время получены данные о тромболитическом эффекте малоинтенсивного ультразвука. Добавление микро- или нанопузырьков не только увеличивает разрешающую способность при осуществлении ультразвуковой визуализации, но и усиливает тромболитический эффект ультразвука, даже в отсутствие традиционных тромболитиков (Birnbaum et al., 1998). Механизм терапевтического эффекта нанопузырьков включает их прикрепление к тромбу, фрагментацию (после облучения ультразвуком) и механическое разрушение тромба. Эта методика получила название **сонотромболизиса** (Daffertshofer, Hennerici, 2006). В настоящее время проводятся клинические исследования, посвященные эффективности сонотромболизиса с использованием нанопузырьков, наполненных перфторпропаном, у пациентов с ишемическим инсультом (Unger, 2006).

Сконструированные с помощью нанотехнологии молекулы, называемые **нанолипоблокаторами**, могут подавлять захват окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛНП), активированными макрофагами (Chnari et al., 2006). Нанолипоблокаторы взаимодействуют с ЛНП двумя путями. Анионные нанолипоблокаторы взаимодействуют с нейтральными и слабоокисленными ЛНП, предотвращая их дальнейшее окисление. В то же время, нанолипоблокаторы не взаимодействуют напрямую с высокоокисленными ЛНП, но, связываясь со скэвенджер-рецепторами на поверхности макрофагов, подавляют неконтролируемый захват окисленных ЛНП последними (Chnari et al., 2006). В том же исследовании было показано, что анионные нанолипоблокаторы в значительной степени подавляли опосредованный скэвенджер-рецепторами захват ЛНП макрофагами. В результате понижалось количество вновь образованных пенистых клеток и содержание холестерина в макрофагах.

Наноматериалы завоевывают важные позиции и в технологии изготовления внутрисердечных и внутрисосудистых имплантантов. Так, предполагается, что импрегнация манжеты искусственных клапанов сердца наночастицами серебра может привести к значительному уменьшению риска развития септического эндокардита в послеоперационном периоде, а создание супергидрофобных поверхностей на подвижных элементах клапанов позволит избежать тромбоза клапана.

Включение в состав покрытия коронарных стентов наночастицы, содержащих антирестенотические и антитромботические препараты, может способствовать уменьшению вероятности развития таких поздних осложнений процедуры стентирования, как рестеноз и тромбоз.

Нанотехнологии в эндокринологии.

В последние годы появились единичные сообщения о разработке **нанороботов**, призванных осуществлять контроль уровня гликемии у пациентов с сахарным диабетом (Cavalcanti et al., 2008). Использование такого подхода позволяет избежать многократного, иногда на протяжении многих лет, взятия крови для определения уровня глюкозы. Кроме того, применение нанороботов, мониторирующих уровень глюкозы в крови, позволяет повысить степень информированность пациентов о заболевании и обеспечить более четкий контроль гликемии. Наличие циркулирующих в крови нанороботов может дать возможность од-

новременного анализа уровня гликемии в сосудах различных органов. При этом создается уникальная возможность оценивать степень поглощения глюкозы различными тканями и идентифицировать ткани с наиболее выраженными нарушениями захвата глюкозы. Дополнительную диагностическую информацию может дать мониторинг концентрации глюкозы в крови у пациента, находящегося в различных состояниях (покой, физическая нагрузка, до и после приема пищи и т. д.).

Оболочка разрабатываемого для этих целей наноробота представлена нанокомпозитами углерода и металлов, что придает поверхности наноробота идеальную гладкость, делает ее химически инертной, а по прочности приближает ее к алмазу. На поверхности наноробота формируется искусственный гликокаликс, предотвращающий адгезию фибриногена и маскирующий устройство от распознавания иммунной системой. Определение текущего местонахождения наноробота обеспечивается за счет радиочастотного идентифицирующего устройства. Движение наноробота осуществляется с потоком крови без дополнительного активного перемещения. Основными функциональными элементами наноробота для мониторинга уровня гликемии являются: 1) химический датчик, 2) источник питания, 3) передатчик. В качестве датчиков для определения концентрации глюкозы предполагается использовать наносенсоры на основе металлоксидных полупроводников. Предполагается, что плотность нанороботов в крови будет составлять около 10^{12} в среднем объеме циркулирующей крови взрослого человека (5 л). При этом общая масса нанороботов составляет менее 0,2 г. Существуют предпосылки для обеспечения передачи информации о критических изменениях уровня глюкозы в крови непосредственно на мобильный телефон пациента.

Элиминация нанороботов из организма может быть достигнута следующим образом: в поверхностный слой наноробота загружается гиалуронидаза, которая расщепляет гликокаликс поверхности робота. После истекания срока службы нанороботов (ожидаемое время полужизни около 3 месяцев) или при принятии решения о прекращении мониторинга уровня гликемии к нанороботам направляется радиосигнал, который инициирует высвобождение гиалуронидазы (Gough et al., 2000). В результате происходит утрата поверхностного защитного слоя гликопротеинов, и

нанороботы распознаются и элиминируются иммунной системой организма.

Таким образом, использование нанороботов для контроля уровня глюкозы в крови может способствовать повышению качества жизни пациентов с сахарным диабетом и улучшению результатов их лечения.

Нанотехнологии в онкологии, гематологии и трансфузиологии.

Проблеме применения наночастиц для диагностики и терапии онкологических заболеваний в последнее десятилетие были посвящены многочисленные исследования. В настоящем разделе приводятся лишь последние данные, касающиеся этого важного вопроса.

В диагностике опухолей используются различные типы наночастиц, включая квантовые точки, нанооболочки, коллоидные наночастицы металлов, суперпарамагнитные наночастицы и углеродныеnanoструктуры. Основной проблемой на пути использования квантовых точек для диагностики опухолей является достаточно высокая токсичность металлов, входящих в состав первых. Для уменьшения токсичности применяются пассивирующие покрытия, например, сульфидами цинка и кадмия. Фотостабильность покрытых этими материалами квантовых точек не страдает. Дополнительное улучшение биосовместимости квантовых точек достигается их покрытием полиэтиленгликолем, белками и углеводами (Hartman et al., 2008). Нанооболочки, покрытые тонким слоем золота, могут использоваться для одновременной диагностики и терапии опухолей. В исследовании Gobin et al. (2007) облучение аккумулированных в опухолевой ткани нанооболочек околоинфракрасным светом приводило к термической деструкции карцином у мышей. Суперпарамагнитные наночастицы могут служить эффективным контрастным агентом при проведении магнитно-резонансной томографии. В настоящее время имеется опыт четкой визуализации злокачественных опухолей прямой кишки (Tota et al., 2005) и рака молочной железы (Funovics et al., 2004) с помощью суперпарамагнитных частиц с присоединенными к их поверхности моноклональными антителами. Одним из перспективных способов направленной доставки суперпарамагнитных наночастиц в опухолевую ткань является их коньюгация с фолиевой кислотой. Активный захват последней опухолевыми

клетками обеспечивает избирательное накопление наночастиц в опухоли (Sun et al., 2006). Подобно нанооболочкам, суперпарамагнитные наночастицы могут использоваться для термической абляции опухолей. Нагревание наночастиц в данном случае обеспечивается облучением импульсным магнитным полем. Недавно завершенная I фаза клинического исследования, проведенного на пациентах с раком предстательной железы, показала достоверное снижение простатоспецифического антигена у 8 из 10 пациентов, прошедших процедуру термической абляции опухоли с помощью суперпарамагнитных наночастиц (Johannsen et al., 2007).

Углеродные нанотрубки также рассматриваются в качестве перспективных противоопухолевых nanoструктур. В работе Kam et al. (2005) было показано, что функционализированные фолатом однослойные нанотрубки интернализировались опухолевыми клетками, причем облучение опухоли ближним инфракрасным светом приводило к интенсивному разогреву нанотрубок, вызывавшему лизис клеток опухоли без повреждения соседних клеток.

Кроме углеродных нанотрубок, для визуализации и терапии опухолей в будущем могут применяться производные фуллерена. Эндодральные комплексы фуллерена с ионами гадолиния Gd³⁺, называемые гадофуллеренами, в настоящее время используются в качестве неселективных контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии. Большой интерес вызывает перспектива использования гадофуллеренов для прицельной визуализации опухолей, однако к настоящему времени таких исследований не проводилось. Теоретическая возможность создания конъюгатов противоопухолевых антител с «пустыми» молекулами фуллеренов была изучена в работах Ashcroft et al. (2006) и Rancan et al. (2007).

Различные типы наночастиц могут выступать в роли транспортеров противоопухолевых препаратов. Основной проблемой при этом является обеспечение селективного накопления содержащих препарат наночастиц в опухолевой ткани. Для решения этой проблемы используются два подхода - пассивное и активное «прицеливание» (targeting) (Lamfers et al., 2008). Пассивная доставка химиотерапевтических средств, иммобилизованных на наночастицах, основана на та-

ких особенностях опухолевых сосудов, как повышенная проницаемость и отсутствие полноценных лимфатических капилляров. В результате длительно циркулирующие в кровотоке наночастицы накапливаются в интерстиции опухоли и задерживаются в нем (Duncan, 2006). Активная доставка предполагает соединение поверхности наночастиц, содержащих химиопрепарат, с моноклональными антителами или специфическими пептидами, которые распознаются поверхностными рецепторами опухолевых клеток.

Примером пассивной доставки химиопрепаратов к опухолевым клеткам может служить использование в клинической практике липосом, нагруженных доксорубицином. Известны также липосомальные противоопухолевые препараты, содержащие винкристин и цисплатин. Для пассивной доставки противоопухолевых препаратов широко используются биополимеры. Так, например, в 2005 году был одобрен для клинического применения при раке молочной железы препарат абраксан, представляющий собой конъюгат альбумина и паклитаксела. Примером активной доставки является использование конъюгатов радионуклидов, иммунотоксинов и противоопухолевых антибиотиков с антителами против CD20, CD25 и CD33 при диагностике и терапии неоджинской лимфомы, Т-клеточной лимфомы и острого миелобластного лейкоза, соответственно (Larimers et al., 2008).

Нанобиотехнологии открывают широкие возможности для создания новых классов кровезаменителей, лишенных недостатков донорской крови. Одним из примеров второго поколения кровезаменителей является **полигемоглобин**, связанный с каталазой и супероксиддисмутазой (Rowanda, Chang, 2002). Кровезаменители на основе такого полигемоглобина особенно эффективны при геморрагическом шоке, сопровождающемся массивной ишемией с последующей реинфузией. Третье поколение кровезаменителей, разрабатываемое в настоящее время, основано на создании искусственных эритроцитов, содержащих гемоглобин и ферментативные системы. Определенный интерес представляет модель искусственного эритроцита, предложенная Chang et al. (2003). Оболочкой такой искусственной клетки служит тонкая мембрана, состоящая из кополимера полилактида и полиэтиленгликоля и проницаемая для глюкозы и других небольших

гидрофильных молекул. Внутри искусственного эритроцита содержится гемоглобин, супероксиддисмутаза, каталаза и метгемоглобинредуктаза. Результаты экстраполяции данных о продолжительности циркуляции искусственных эритроцитов в крови, полученных на крысах, на клиническую ситуацию у человека показывают, что среднее время циркуляции может составлять до 41 часа.

Нанотехнологии в терапии заболеваний дыхательной системы.

Поскольку наноструктуры с диагностическими и терапевтическими функциями могут быть сравнительно просто доставлены в просвет дыхательных путей, наномедицинские технологии оказались применимы к целому ряду заболеваний легких, а именно: обструктивным заболеваниям легких, генетическим нарушениям в дыхательной системе, инфекционным заболеваниям и опухолям (Pison et al., 2006).

В патогенезе атопической бронхиальной астмы важная роль принадлежит активности перибронхиального воспаления. В свою очередь, выраженность воспаления зависит от уровня экспрессии Р-селектина, обеспечивающего адгезию лейкоцитов к поверхности эндотелиальных клеток легочных микрососудов. John et al. (2003) создали полимерные наночастицы с функциональными группами, способными имитировать естественные сайты связывания Р-селектина. В результате введения этих наночастиц наблюдалось выраженное ослабление реактивности бронхов в ответ на аллерген и уменьшение инфильтрации перибронхиальной ткани зезинофилами у мышей *in vivo*. В другом исследовании наночастицы, содержащие хитозан и ДНК интерферона г, при интраназальном введении мышам, сенсибилизованным овалбумином, способствовали достоверному уменьшению гиперреактивности дыхательных путей и ослаблению гистологических признаков воспаления в ткани легких (Kumar et al., 2003).

Доставка генетических конструкций к эпителиальным клеткам, в геноме которых имеются мутации генов эпителиального хлорного канала, может оказаться перспективной для лечения муковисцидоза. Так, в работе Truong-Le et al. (1999) были получены данные о том, что трансфекция гена эпителиального хлорного канала в человеческие эпителиальные клетки трахеи и бронхов с помощью желатиновых наночастиц приводит к экспрессии данного гена в 50% клеток.

Бактериальные и вирусные инфекции дыхательной системы играют ключевую роль в прогрессировании хронической обструктивной болезни легких и муковисцидоза, приводя к утрате функционирующей легочной паренхимы и дыхательной недостаточности. Установлено, что повторное пероральное введение мышам наночастиц на основе органических полимеров, содержащих три основных противотуберкулезных препарата (рифампицин, изониазид и пиразинамид), позволяло полностью элиминировать микобактерии из организма животных, добившись при этом более редкого введения препаратов, чем при стандартной терапии (Pandey et al., 2003). Биодоступность противотуберкулезных препаратов еще более возрастает при введении нагруженных ими наночастиц ингаляционным путем (Pison et al., 2006).

Наноносители могут также успешно использоваться для индукции длительного иммунного ответа против респираторных вирусов. Например, введение мышам хитозановых наносфер, содержащих «коктейль» из ДНК плазмид, кодирующих антигены респираторного синцитиального вируса, приводило к существенному повышению титров иммуноглобулинов А и G, числа цитотоксических Т-лимфоцитов и концентрации интерферона у (Kumar et al., 2002). В последние годы наночастицы также успешно использовались в эксперименте для вакцинации против вируса падириппа.

Нанотехнологии в неврологии и нейрохирургии.

Хорошая биосовместимость нанотрубок и их электропроводность делают возможным использование этого класса наноматериалов в качестве матриц для индукции роста нейрональных сетей. Функционализированные нанотрубки создают хорошую основу для прикрепления конусов роста удлиняющихся аксонов (Hu et al., 2004). Структура поверхности нанотрубок оказывает влияние на интенсивность роста аксонов и степень их ветвления. Показано, что скорость роста аксонов и длина их отростков были максимальными при использовании в качестве подложки положительно заряженной поверхности покрытых полиэтиленимином нанотрубок (Hu et al., 2005). При этом использование в качестве матрицы других вариантов нанотрубок не давало такого хорошего результата. Интенсивный рост отростков ней-

ронов наблюдался также на поверхности нанотрубок, покрытых 4-гидроксионеналом (фактором роста нейронов) (Mattson et al., 2000). На основании этих данных была предложена схема использования пространственно упорядоченных положительно заряженных нанотрубок в качестве трехмерной матрицы для стимуляции роста нейрональных сетей (Lovat et al., 2005).

Несколько группами исследователей изучалась возможность передачи электрических импульсов от формирующейся нейрональной сети с помощью проводящих нанотрубок. Lovat et al. (2005) установили, что между растущими нейронами и нанотрубками имеется электрическое сопряжение, поскольку подача электрических импульсов на нанотрубки вызывала увеличение постсинаптических токов растущих на трубках нейронов гиппокампа.

Нанотехнологии в травматологии и ортопедии.

В последние годы появились новые методы регенерации костной ткани, основанные на применении наноматериалов. Подобные костные матрицы, содержащие коллаген и гиалуроновую кислоту, уже прошли клинические испытания на пациентах с дефектами костей, возникающими после травмы, удаления опухолей и спондилодеза. Клетки костной ткани также могут эффективно расти и пролиферировать на матрице и нанотрубках, поскольку последние не разрушаются и являются биологически инертными (Zanello et al., 2006). Также было предложено несколько новых методов регенерации хряща, в том числе после травматических повреждений коленного сустава. Нанотехнологии, как и клеточная терапия, рассматриваются как перспективные способы регенерации хряща. Тонкая структура электрощитой поли-L-лактидной матрицы представляет собой идеальную основу для формирования тканей, в частности, хряща. Имплантированные в такую матрицу клетки растут вдоль нановолокон, которые демонстрируют хорошую биосовместимость и в то же время являются биодеградируемыми (Boudriot et al., 2004).

Наноматериалы находят применение и в качестве покрытия конструкций для металлоостеосинтеза. В экспериментальных исследованиях показано, что покрытие титановых конструкций наноразмерными частицами фосфата кальция сопровождается лучшей остеоинтеграцией, чем при покрытии стандартным фосфатом кальция

(Sato et al., 2008). Существует несколько способов нанесения наночастиц фосфата кальция на металлическую поверхность. В последние годы наиболее перспективными считаются методы электростатического распыления и электростатической самосборки. Метод электростатического распыления позволяет создавать пористые покрытия, которые имеют большую площадь поверхности для взаимодействия с белками, клетками и молекулами лекарственных препаратов (Huang et al., 2005). Костная матрица, содержащая наноразмерные волокна оксида алюминия, обеспечивала лучшую адгезию остеобластов, чем матрица на основе стандартных зерен данного материала (Price et al., 2003). Кроме того, в наноматрице отмечалась более высокая активность щелочной фосфатазы и более выраженное отложение кальция.

Серьезным осложнением открытых переломов является инфицирование тканей. Colon et al. (2006) установили, что наноструктурированная частицами оксида цинка и диоксида титана поверхность способствуют лучшей адгезии и функциональной активности остеобластов и, напротив, препятствуют адгезии патогенных бактерий, таких как *Staphylococcus epidermidis*.

Нанотехнологии в офтальмологии.

Более 90% всех используемых в офтальмологии лекарственных форм представлены глазными каплями. Несмотря на относительную эффективность глазных капель, около 95% активного лекарственного начала не достигает клеток-мишеней вследствие защитного механизма слезотечения. Существует еще одна причина низкой биодоступности лекарственных препаратов, входящих в состав глазных капель, – это высокая плотность роговицы. Для оптимизации доставки лекарственных средств к структурам глаза использовались различные нанопереносчики, включая полимерные наночастицы, дендримеры и липосомы (Vandervoort, Ludwig, 2007). Применение этих наночастиц, нагруженных препаратами, обеспечивало более длительный контакт лекарственного средства с клетками-мишениями. Установлено, что при субконъюнктивальном введении полилактидных наночастиц диаметром 200 нм практически все частицы задерживаются в месте введения. Это позволяет уменьшить частоту закапывания и снизить дозу используемого средства. Те же преимущества нанопереносчи-

ков могут быть востребованными при внутриглазном введении препаратов. Внутриглазное введение фактора пигментного эпителия, коньюгиранного с полилактид-ко-гликолидными наночастицами, приводило к более выраженному нейропротективному эффекту у мышей с экспериментальной ишемической ретинопатией, чем введение неконъюгированного фактора пигментного эпителия (Li et al., 2006). В последние годы появились сообщения об эффективной трансфекции генов в клетки структур глаза с помощью наночастиц. Так, de la Fuente et al. (2008) показали эффективность переноса стандартных плазмид в культивированные клетки эпителия роговицы и конъюнктивы с помощью хитозангиалуронатных наночастиц (уровень трансфекции до 15%).

Роль нанотехнологии в лечении инфекционных заболеваний.

Нанотехнологии используются не только для диагностики инфекционных заболеваний, но и для уничтожения патогенных микроорганизмов и их элиминации из организма человека. Определенные составы нанопорошков обладают выраженными противомикробными свойствами. Такие порошки состоят из нанокристаллических частиц оксидов нетоксичных металлов с присоединенными к ним активными формами галогенов (например, $MgO \cdot Cl_2$, $CaO \cdot Br_2$). При контакте этих частиц с патогенными бактериями (например, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus globigii*) последние гибнут в течение нескольких минут.

Определенные наноматериалы также обнаруживают выраженные микробицидные свойства. Например, нанотрубки, синтезированные из углеводородов и аммония, демонстрируют мощный антимикробный эффект (Lee et al., 2004). Хорошо изучены антибактериальные свойства наночастиц серебра (Kim et al., 2007; Chen, Schluesener, 2008). Добавление этих наночастиц в перевязочный материал позволяет снизить риск развития инфекционных осложнений в послеоперационном периоде.

В настоящее время активно исследуются возможности применения нанотехнологии для создания новых противовирусных препаратов. Мишенью для этих воздействий являются вирусы иммунодефицита человека, гепатита С, гриппа и бешенства.

Нанотехнологии в стоматологии.

Существуют основания предполагать, что в

ближайшее время произойдет активное внедрение наноматериалов и наноустройств в стоматологию (Freitas, 2000). Применение нанотехнологичных подходов в стоматологии позволит существенно снизить заболеваемость кариесом и другими заболеваниями органов ротовой полости. Один из аспектов **наностоматологии** – совершенствование приемов местной анестезии с помощью наночастиц. Предполагается, что введение коллоидной суспензии, содержащей несколько миллионов нагруженных анестетиком наночастиц в десневой карман сможет обеспечить их миграцию через слизистую в дентинные канальцы и далее в пульпу зуба. Наночастицы будут двигаться по электрохимическому и температурному градиенту. Не исключается и возможность их позиционной навигации в использовании нанокомпьютера.

Использование нанороботов будет способствовать решению некоторых проблем ортодонтии. В частности, нанороботы смогут осуществлять манипуляции на периодонтальных тканях (десна, цемент, пародонт, альвеолы зуба), обеспечивая быстрое и безболезненное выпрямление зубного ряда, вращение и вертикальную репбзицию зубов. Ожидается, что наностоматология сможет продлить срок службы зубов за счет замены поверхностных слоев эмали ковалентно связанными с ней ультрапрочными материалами, например, сапфиром и алмазом, которые превосходят прочность эмали в 20-100 раз. Наконец, планируется добавление в состав зубных порошков и паст нанороботов, способных полностью очищать над- и поддесневые поверхности зубов от формирующегося налета и камней, превращая полученный органический материал в безопасные пары, лишенные запаха.

Вопросы безопасности наноматериалов и нанотехнологий в медицине.

Активное внедрение наноматериалов в клиническую медицину требует глубокого знания потенциальных рисков и побочных эффектов, сопряженных с использованием этих материалов. Производственные циклы, направленные на создание новых наноматериалов, также могут сопровождаться накоплением отходов, оказывающих токсическое, канцерогенное и мутагенное действие на организм человека. В связи с этим, в специальной литературе последних лет большое внимание уделяется рассмотрению вопро-

сов безопасности наноматериалов и нанотехнологий в медицине и биологии. Отрасль исследований, связанных с изучением безопасности наноматериалов, получила название **нанотоксикология** (Donaldson et al., 2004).

Поступление наночастиц в организм человека возможно ингаляционным, пероральным, перкутанным и парентеральным (в случае введения лекарственных и диагностических агентов, конъюгированных с наночастицами) путями. Контакт человека с наноматериалами может происходить на этапе разработки, производства, использования и переработки (Stern, McNeil, 2008).

За счет броуновского движения наночастицы способны преодолевать большие расстояния в воздушной среде и, следовательно, они с легкостью проникают в альвеолы легких. Установлено, что многие наночастицы, находящиеся в воздухе, имеют ярко выраженную тенденцию к спонтанной агрегации и формированию более крупных частиц (Sioutas et al., 2005). Агрегация воздушных наночастиц может также наступать в результате конденсации на них паров воды. По мере увеличения размера наночастиц вероятность их проникновения в альвеолы снижается. В то же время, агрегация воздушных наночастиц с их укрупнением создает предпосылки для их контактирования с кожей и желудочно-кишечным трактом. С другой стороны, создание искусственных покрытий наночастиц (например, с помощью полиэтиленгликоля), предназначенных для уменьшения взаимодействия между частицами, напротив, препятствует агрегации воздушных наночастиц и делает их попадание в нижние дыхательные пути более вероятным. В нескольких экспериментальных исследованиях, выполненных на грызунах, была показана транслокация наночастиц из просвета альвеол в интерстиций легких (Oberdorster, 2000). Такого рода перенос вдыхаемых наночастиц в легкие и затем в кровь заслуживает особенного внимания, поскольку в некоторых исследованиях была показана роль вдыхаемых наночастиц в патогенезе различных заболеваний. Например, Radomski et al. (2005) показали, что углеродные нанотрубки усиливают агрегацию тромбоцитов *in vitro* и стимулируют процесс тромбообразования *in vivo*.

Результаты исследований, посвященных вопросу о транслокации вдыхаемых наночастиц из легких в другие органы, носят противоречивый

характер. Так, например, Kreyling et al. (2002) установили, что у крыс транслокации из легких в печень, селезенку, сердце и мозг подвергается не более 1% иридиевых наночастиц, имевших диаметр 80 и 15 нм. С другой стороны, у людей не наблюдалось поступления углеродных наночастиц, меченых технецием-99, из легких в другие органы (Brown et al., 2002). В целом, имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют считать, что легкие представляют собой труднопреодолимый барьер для проникновения наночастиц в организм.

В некоторых экспериментальных исследованиях на крысах была показана способность вдыхаемых наночастиц поступать через эпителий носоглотки и обонятельную луковицу в центральную нервную систему (Elder et al., 2006). Результаты этих исследований, по-видимому, не подлежат прямому переносу на аналогичную ситуацию у человека. Это связано с тем, что крысы имеют значительно большую площадь обонятельного эпителия, а относительная масса их обонятельной луковицы в 177 раз больше, чем у человека. Тем не менее, в некоторых клинических исследованиях был обнаружен захват нейронами обонятельной луковицы человека вводимых интраназально наночастиц золота диаметром 50 нм (de Lorenzo, 1970). Кроме того, хорошо известен факт миграции по нервным путям некоторых наноразмерных вирусов. Таким образом, транслокация вдыхаемых с воздухом наночастиц в нейроны ЦНС представляется весьма вероятной. Эти данные вызывают особенную настороженность, поскольку в одном из последних исследований было показано, что магниевые наночастицы обладают выраженной нейротоксичностью, вызывая оксидативный стресс, истощение внутриклеточных запасов дофамина и гибель нейронов (Hussain et al., 2006).

Наночастицы могут поступать в организм человека через кожу. Усиление интереса к перкутанному пути поступления наночастиц связано с активным использованием нанотехнологии в производстве одежды, косметических средств и солнцезащитных кремов. Изучению вопроса о проникновении наночастиц оксида титана (10-60 нм), входящих в состав солнцезащитных кремов в качестве поглотителей ультрафиолетового излучения, в эпидермис человека и животных, был посвящен целый ряд исследований (Gamer et al.,

2006, Mavon et al., 2007). В этих исследованиях не было зафиксировано проникновение наночастиц оксида титана глубже рогового слоя эпидермиса, хотя в некоторых случаях отмечалось избирательное накопление наночастиц в волосяных фолликулах (Nohynek et al., 2007). С другой стороны, в последнее время были получены данные о хорошей проникающей способности квантовых точек через кожу. В работе Ryman-Rasmussen et al. (2006) изучалось влияние размера, заряда и формы квантовых точек на глубину их проникновения через кожу свиньи *in vitro*. При этом мелкие сферические квантовые точки, в отличие от крупных квантовых точек эллиптической формы проходили через эпидермис и накапливались в дерме. В то же время, прохождения квантовых точек через все слои кожи авторы этой работы не наблюдали. Проникновение наночастиц железа, имеющих диаметр менее 10 нм, в дерму кожи человека *in vitro* было показано в работе Baroli et al. (2007). Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что «мелкие» наночастицы могут преодолевать кожный барьер, особенно в условиях повреждения кожи или ее заболеваний.

Пероральное поступление наночастиц представляет собой еще один путь их попадания в организм. Пероральное поступление возможно в случае контаминации наночастиц пищи, переноса наночастиц в ротовую полость с кожных покровов и, наконец, при пероральном приеме лекарственных препаратов, созданных на основе наночастиц. Хотя всасывание наночастиц в желудочно-кишечном тракте незначительно, в большинстве исследований было показано, что пероральное введение сопровождается некоторым повышением их уровня в плазме крови. Известно, что степень всасывания наночастиц в желудочно-кишечный тракт зависит от размера и характеристик поверхности, причем мелкие, нейтральные гидрофобные наночастицы всасываются лучше, чем крупные и гидрофильные (Hussain et al., 2001).

Токсичность наночастиц может быть связана с двумя основными перекликающимися механизмами - воспалением и оксидативным стрессом (Dick et al., 2003). В то же время, совершенно очевидно, что далеко не все наночастицы обладают способностью индуцировать воспаление и оксидативный стресс. Так, например, в исследовании Xia et al. (2006) было обнаружено, что

оксид титана, нанодисперсный углерод и карбоксилированный полистирол не вызывают окислительного стресса в линии макрофагов мыши, тогда как катионный полистирол и наночастицы, загрязняющие воздух, вызывали значимое усиление образования свободных радикалов. Потенциальная токсичность некоторых типов наночастиц может быть связана со специфическими механизмами. В частности, катионные дендримеры могут вызывать дезинтеграцию плазмалеммы за счет взаимодействия положительно заряженных терминальных группировок дендримера и отрицательно заряженных липидов, входящих в состав мембранны (Mecke et al., 2004).

Установлено, что провоспалительные эффекты наночастиц зависят от площади их поверхности. Так, ингаляция наноразмерных частиц оксида титана в течение 3 месяцев вызывала более выраженные воспалительные изменения в легких, чем ингаляция микрочастиц того же вещества (Oberdorster et al., 1994). Аналогичная зависимость провоспалительного эффекта от удельной площади поверхности наблюдалась и для углеродных наночастиц в экспериментах на крысах (Donaldson et al., 2002). С другой стороны, некоторые исследования не подтверждают зависимость выраженности воспалительного ответа от размера и площади поверхности наночастиц (Sayes et al., 2006). Существует мнение, что наличие провоспалительных эффектов наночастиц зависит не от площади их поверхности, а от свойств поверхности как таковой. В исследовании Warheit et al. (2006) реактивность поверхности кварцевых наночастиц различного размера оценивалась с помощью гемолитического потенциала. При этом выраженность воспалительных изменений в легких коррелировала не с размером наночастиц, а с реактивностью их поверхности.

В настоящее время мы располагаем результатами целого ряда экспериментальных исследований, выполненных на мелких грызунах и посвященных изучению токсичности нанотрубок при их ингаляционном введении. Эти исследования показали, что пролонгированное введение однослойных и многослойных нанотрубок может вызывать хроническое воспаление легких, формирование грануллем, фиброз и, в некоторых случаях, смерть (Warheit et al., 2004, Saggio-Sanchez et al., 2006). Интратрахеальное введение эквивалентной массы нанотрубок и нанодисперсного

углерода позволило определить, что воспалительные изменения в легких являются специфическими именно для нанотрубок, поскольку введение углеродных наночастиц не сопровождалось какими-либо гистологическими нарушениями в легких (Shvedova et al., 2005).

Исследования кожной токсичности наноматериалов не выявили сколько-нибудь значимых негативных эффектов при локальном нанесении на кожу различных рецептур, содержащих наночастицы. С другой стороны, некоторые наноматериалы обладали достаточно высокой цитотоксичностью, выявленной на клеточных культурах *in vitro* (Sayes et al., 2006). Такое противоречие с результатами, полученными *in vivo*, может объясняться меньшей проникающей способностью наночастиц через интактную кожу. Эта точка зрения находит дополнительное обоснование в виде результатов экспериментов Sato et al. (2005), которые показали формирование крупных грануллем при подкожной имплантации нанотрубок крысам.

Исследования острой системной токсичности наночастиц немногочисленны. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что большинство наноматериалов могут быть отнесены к разряду умеренно токсичных и малотоксичных по классификации Hodge и Stern (1949). LD 50 этих веществ колеблется от 50 до 5000 мг/кг. Интересным является тот факт, что органы-мишени для большинства наночастиц входят в состав ретикуло-эндотелиальной системы. Так, например, при исследовании острой системной токсичности G3 катионного меламинового дендримера в качестве органа-мишени была идентифицирована печень (Neerman et al., 2004). Эти данные вполне объяснимы, поскольку наночастицы после опсонизации действительно активно захватываются элементами ретикуло-эндотелиальной системы. Поскольку наночастицы, используемые в биомедицинских целях, зачастую покрывают биосовместимыми покрытиями, затрудняющими их распознавание и поглощение фагоцитами, органы-мишени для таких частиц могут быть иными. В частности, важную роль в элиминации такого рода наночастиц могут играть почки. Такие наночастицы, как углеродные нанотрубки, водорастворимые производные фуллеренов и дендримеры невысоких порядков преимущественно выводятся из организма почками (Stern, McNeil, 2008).

Известно, что некоторые наночастицы вызывают нарушение функции лизосом. Так, например, было показано, что кварцевые наночастицы могут вызывать повышение проницаемости мембраны лизосом и высвобождение лизосомальных ферментов с последующим запуском апоптоза альвеолярных макрофагов (Thibodeau et al., 2004). Активация аутофагии *in vitro* была отмечена под действием наноразмерных частиц оксида неодима (Chen et al., 2005), квантовых точек (Seleverstov et al., 2006) и фуллеренов (Yamawaki, Iwai, 2006).

К настоящему времени было опубликовано всего несколько исследований, посвященных изучению потенциальных канцерогенных эффектов наночастиц и наноматериалов. Согласно данным Nelson et al. (1993) и Mori et al. (2006), фуллерены не стимулируют формирования опухолей при длительном нанесении на кожу животных и не обладают мутагенным действием на клеточных культурах. С другой стороны, было показано, что фуллерены могут оказывать мутагенный эффект *in vitro* при облучении видимым светом и наличии микросом, выделенных из гепатоцитов (Sera et al., 1996). Мутагенность фуллеренов при их облучении, по-видимому, связана с образованием липоперекисей за счет высвобождения синглетного кислорода в процессе перехода молекулы фуллерена из возбужденного в стационарное состояние. Суммируя результаты исследований, посвященных изучению мутагенных эффектов наночастиц оксида титана, можно сделать следующий вывод. Некоторые исследования, выполненные *in vitro* на изолированных клетках и клеточных культурах, показали, что воздействие ультрафиолета может приводить к цитотоксическим и генотоксическим эффектам. С другой стороны, исследования, проведенные *in vivo*, не подтверждают наличия какого-либо онкогенного эффекта данных наночастиц.

Подводя итог, следует отметить, что нанотоксикология как самостоятельная область наномедицины в настоящее время находится в самом начале своего развития. Информация о потенциально опасных эффектах наночастиц на организм человека плохо систематизирована, а имеющиеся данные зачастую требуют подтверждения на других, более релевантных моделях.

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. Шляхто Е. В. с соавторами. Нанотехнологии в биологии и медицине: современное состояние вопроса. <http://prostonauka.com/nano/nanotechnologii-v-biologii-i-medicine/nanomaterialy/nanochasticy>
2. Freitas Jr RA. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. *Int J Surg.* 2005; 3: 243-246.
3. Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Eng Sci.* 1960; 23: 22-36.
4. Desai TA, Chu WH, Tu JK et al. Microfabricated immunoisolating biocapsules. *Biotechnol Bioeng.* 1998; 57(1): 118—120.
5. Leoni L, Desai TA. Nanoporous biocapsules for the encapsulation of insulinoma cells: biotransport and biocompatibility considerations. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2001; 48(11): 1335-1341.
6. Nishizawa M, Menon VP, Martin CR. Metal nanotube membranes with electrochemically switchable ion-transport selectivity. *Science.* 1995; 268(5211): 700-702.
7. Siwy Z, Fulinski A. Fabrication of a synthetic nanopore ion pump. *Phys Rev Lett.* 2002; 89(19): 198103.
8. Schmidt J 11th Foresight Conference on Molecular Nanotechnology, Palo Alto, CA (2003).
9. Cornell BA, Braach-Maksvytis VL, King LG et al. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature.* 1997; 387(6633): 580-583.
10. Meller A, Nivon L, Brandin E et al. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(3): 1079-1084.
11. Li J, Gershoff M, Stein D et al. DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope. *Nat Mater.* 2003; 2(9): 611—615.
12. Rhee M, Burns MA. Nanopore sequencing technology: nanopore preparations. *Trends Biotechnol.* 2007; 25(4): 174—181.
13. Deamer DW, Akeson M. Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol.* 2000; 18(4): 147—151.
14. Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties. *Nanomedicine.* 2008 Jun 11.
15. Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine.* 2008 Jun 11.
16. Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y et al. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials.* 2005; 26(34): 7154-7163.
17. Kam NW, O'Connell M, Wisdom JA, Dai H Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 11600-11605.
18. Wu W, Wieckowski S, Pastorin G et al. Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew Chem Int Edn Engl.* 2005; 44: 6358-6362.
19. Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J Am Chem Soc.* 2004; 126: 6850-6851.
20. Zhang Z, Yang X, Zhang Y et al. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with

- positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4933-4939.
21. Pantarotto D, Singh R, McCarthy D et al. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Edn Engl.* 2004; 43: 5242-5246.
 22. Cai D, Mataraza JM, Qin ZH et al. Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing. *Nat Methods.* 2005; 2: 449-454.
 23. Shaitan K, Tourleigh Y, Golik D, Kirpichnikov M. Computer-aided molecular design of nanocontainers for inclusion and targeted delivery of bioactive compounds. *J Drug Del Sci Tech.* 2006; 16: 253—258.
 24. Cui D, Ozkan C, Kong Y, Gao H. Encapsulation of Pt-labeled DNA inside carbon nanotubes. *Mech Chem Biosys.* 2004; 1: 113—121.
 25. Yeh IC, Hummer G. Nucleic acid transport through carbon nanotube membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 12177-12182.
 26. Schinazi RF, Sijbesma R, Srdanov G et al. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60 fullerene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(8): 1707—1710.
 27. Bosi S, Da Ros T, Caste llano S et al. Antimycobacterial activity of ionic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000; 10(10): 1043-1045.
 28. Mroz P, Pawlak A, Satti M et al. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43(5): 711-719.
 29. Dugan LL, Lovett E, Cuddihy S et al. In *Fullerenes: Chemistry, Physics, and Technology*, edited by KM Kadish and RS Ruoff, John Wiley and Sons, New York (2000), p.467.
 30. Cheng Y, Wang J, Rao T et al. Pharmaceutical applications of dendrimers: promising nanocarriers for drug delivery. *Front Biosci.* 2008; 13: 1447-1471.
 31. Kojima C, Kono K, Maruyama K, Takagishi T. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. *Bioconjug Chem.* 2000; 11: 910-917.
 32. Fu HL, Cheng SX, Zhang XZ, Zhuo RX. Dendrimer/DNA complexes encapsulated in a water soluble polymer and supported on fast degrading star poly(DL-lactide) for localized gene delivery. *J Control Release.* 2007; 124: 181-188.
 33. Kobayashi H, Kawamoto S, Jo SK et al. Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers: pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjug Chem.* 2003; 14: 388—394.
 34. Mecke A, Uppuluri S, Sassanella TM et al. Direct observation of lipid bilayer disruption by poly(amidoamine) dendrimers. *Chem Phys Lipids.* 2004; 132: 3-14.
 35. Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine.* 2008 Jul 17.
 36. Fenske DB, Chonn A, Cullis PR. Liposomal nanomedicines: an emerging field. *Toxicol Pathol.* 2008; 36(1): 21-29.
 37. Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release.* 2005; 109: 169-188.
 38. Kwon GS. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2003; 20: 35 7—403.
 39. Fahmy TM, Fong PM, Park J et al. Nanosystems for simultaneous imaging and drug delivery to T cells. *AAPS J.* 2007; 9: E171-E 180.
 40. Tanaka R, Yuhji T, Nagatani N et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem.* 2006; 385(8): 1414-1420.
 41. Ou Q, Yuan R, Chai Y et al. A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles-multi-walled carbon nanotubes-thionine multilayer films on polyelectrolyte surface. *Anal Chim Acta.* 2007; 603(2): 205-213.
 42. Asian K, Holley P, Geddes CD. Microwave-Accelerated Metal-Enhanced Fluorescence (MAMEF) with silver colloids in 96-well plates: Application to ultra fast and sensitive immunoassays, high throughput screening and drug discovery. *J Immunol Methods.* 2006; 312(1-2): 137-147.
 43. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(7): 2273-2276.
 44. Doria G, Franco R, Baptista P. Nanodiagnosis: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. *IET Nanobiotechnol.* 2007; 1(4): 53-57.
 45. Baptista PV, Koziol-Montewka M, Paluch-Oles J et al. Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples. *Clin Chem.* 2006; 52(7): 1433-1434.
 46. Yao X, Li X, Toledo F et al. Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticle signal amplification. *Anal Biochem.* 2006; 354(2): 220-228.
 47. Baptista P, Pereira E, Eaton P et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391(3): 943-950.
 48. Mo Y, Barnett ME, Takemoto D et al. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. *MoI Vis.* 2007; 13: 746-757.
 49. Till MC, Simkin MM, Maebius S. Nanotech meets the FDA: a success story about the first nanoparticulate drugs approved by the FDA. *Nanotechnol Law Business.* 2005; 2: 163—167.
 50. Damascelli B, Cantu Q, Mattavelli F et al. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-OO7): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity. *Cancer.* 2001; 92: 2592-2602.
 51. Yang SC, Lu LF, Cai Y et al. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J Control Release.* 1999; 59: 299-307.
 52. Vasir JK, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(8): 718-728.
 53. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S et al. Rapid endolysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEBJ* 2002; 16: 1217-1226.

54. Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 8786-8791.
55. Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol Pharmacol.* 2005; 2: 373-383.
56. Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel—loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2004; 112: 335-340.
57. Azzazy HM, Mansour MM, Kazmierczak SC. From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots. *Clin Biochem.* 2007; 40(13-14): 917-927.
58. Hanaki K, Momo A, Oku T et al. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 302(3): 496-501.
59. Lim YT, Kim S, Nakayama A et al. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol Imaging.* 2003; 2(1): 50—64.
60. Mattrey RF. The potential role of perfluorochemicals (PFCs) in diagnostic imaging. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1994; 22(2): 295-313.
61. Winter PM, Cai K, Caruthers SD et al. Emerging nanomedicine opportunities with perfluorocarbon nanoparticles. *Expert Rev Med Devices.* 2007; 4(2): 137-145.
62. Crowder KC, Hughes MS, Marsh JN et al. Sonic activation of molecularly-targeted nanoparticles accelerates transmembrane lipid delivery to cancer cells through contact-mediated mechanisms: implications for enhanced local drug delivery. *Ultrasound Med Biol.* 2005; 31(12): 1693-1700.
63. Winter PM, Caruthers SD, Kassner A et al. Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu) beta3—targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2003; 63(18): 5838-5843.
64. Flacke S, Fischer S, Scott MJ et al. Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation.* 2001; 104(11): 1280-1285.
65. Partlow KC, Chen J, Brant JA et al. 19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB J.* 2007; 21(8): 1647-1654.
66. Tartaj P, Morales MdP, Veintemillas—Verdaguer S et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys.* 2003; 36(13): R182-197.
67. Ji X, Shao R, Elliott AM et al. Bifunctional gold nanoshells with a superparamagnetic iron oxide—silica core suitable for both MR imaging and photothermal therapy. *J Phys Chem C* 2007; 111(17): 6245-6251.
68. Laurent S, Forge D, Port M et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008; 108(6): 2064-2110.
69. Ishiyama K, Sendoh M, Aral KI. Magnetic micromachines for medical applications. *J Magn Magn Mater* 2002; 242—245: 1163-1165.
70. Mathieu JB, Martel S, Yahia L et al. MRI systems as a mean of propulsion for a microdevice in blood vessels. In: Proceedings of 25th annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology. 2003 Sep 17-21, Cancun, Mexico; 2003.
71. Nelson B, Rajamani R. Biomedical micro—robotic system. In: Eighth international conference on medical image computing and computer assisted intervention, 26-29 October 2005, Palm Springs, CA.
72. Drexler KE. Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation. New York: John Wiley & Sons; 1992.
73. Merkle RC, Freitas Jr RA. Theoretical analysis of a carbone carbon dimer placement tool for diamond mechanosynthesis. *J Nanosci Nanotechnol* 2003; 3: 319-324.
74. Freitas Jr RA. Exploratory design in medical nanotechnology: a mechanical artificial red cell. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1998; 26: 411-430.
75. Freitas Jr RA. Microbivores: artificial mechanical phagocytes using digest and discharge protocol. *J Evol Technol.* 2005; 14: 1-52.
76. Sacconi L, Tolic—Norrelykke IM, Antolini R, Pavone FS. Combined intracellular three-dimensional imaging and selective nanosurgery by a nonlinear microscope. *J Biomed Opt.* 2005; 10: 14002.
77. Konig K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber KJ. Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses. *Cell Mol Biol.* 1999; 45: 195-201.
78. Hirsch LR, Halas NJ, West JL. Whole-blood immunoassay facilitated by gold nanoshell-conjugate antibodies. *Methods Mol Biol.* 2005; 303: Willi.
79. DeNardo SJ, DeNardo GL, Miers LA et al. Development of tumor targeting bioprobes ((III)In-chimeric L6 monoclonal antibody nanoparticles) for alternating magnetic field cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(19 Pt 2): 7087s-7092s.
80. Bao YP, Huber M, Wei TF et al. SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticle probes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: e15.
81. Pereira RS. Atomic force microscopy as a novel pharmacological tool. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62(8): 975-983.
82. Kanger JS, Subramaniam V, van Driel R. Intracellular manipulation of chromatin using magnetic nanoparticles. *Chromosome Res.* 2008; 16(3): 511-522.
83. Jain KK. Current status of molecular biosensors. *Med Device Technol.* 2003; 14: 10-15.
84. Cui Y, Wei Q, Park H, Lieber CM. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science* 2001; 293: 1289-1292.
85. Cornell BA. Optical biosensors: present and future. In: Lighter F, Tait CR, editors. *Membrane based biosensors.* Amsterdam: Elsevier; 2002. p. 457. Chapter 12.
86. Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y et al. Viral-induced self—assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 10192-10193.
87. Sumner JP, Aylott JW, Monson E, Kopelman R. A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc. *Analyst.* 2002; 127: 11—16.
88. Cao Y, Lee Koo YE, Kopelman R. Poly(decyl methacrylate)—based fluorescent PEBBLE swarm nanosensors for measuring dissolved oxygen in biosamples. *Analyst.* 2004; 129: 745—750.

89. Gupta AK, Nair PR, Akin D et al. Anomalous resonance in a nanomechanical biosensor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:13362—13367.
90. Akerman ME, Chan WC, Laakkonen P et al. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(20): 12617-12621.
91. Cai W, Shin DW, Chen K et al. Peptide—labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.* 2006; 6(4): 669-676.
92. Gao X, Cui Y, Leve RM et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2004; 22(8): 969—76.
93. Yu X, Chen L, Li K et al. Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma in vivo. *J Biomed Opt.* 2007; 12(1): 014008.
94. Tada H, Higuchi H, Wanatabe TM, Ohuchi N In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti—HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1138—1144.
95. Hyafil F, Cornily JC, Feig JE et al. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat Med.* 2007; 13(5): 636-641.
96. Rabin O, Manuel Perez J, Grimm J et al. An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles. *Nat Mater.* 2006; 5(2): 118-122.
97. Reimer P, Jahnke N, Fiebich M et al. Hepatic lesion detection and characterization: value of nonenhanced MR imaging, superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging, and spiral CT-ROC analysis. *Radiology.* 2000; 217(1): 152-158.
98. Weissleder R, Stark DD, Rummey EJ et al. Splenic lymphoma: ferrite—enhanced MR imaging in rats. *Radiology.* 1988; 166(2): 423-430.
99. Mack MG, Balzer JO, Straub R et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of head and neck lymph nodes. *Radiology.* 2002; 222(1): 239-244.
100. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRL Magn Reson Med. 2006; 55(2): 242-249.
101. Stuckey DJ, Carr CA, Martin—Rendon E et al. Iron particles for noninvasive monitoring of bone marrow stromal cell engraftment into, and isolation of viable engrafted donor cells from, the heart. *Stem Cells.* 2006; 24(8): 1968-1975.
102. Sipkins DA, Cheresh DA, Kazemi MR et al. Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3—targeted magnetic resonance imaging. *Nat Med.* 1998; 4(5): 623-626.
103. Winter PM, Neubauer AM, Caruthers SD et al. Endothelial alpha(v) beta3 integrin—targeted fumagillin nanoparticles inhibit angiogenesis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2006; 26(9): 2103-2109.
104. Lanza GM, Yu X, Winter PM et al. Targeted antiproliferative drug delivery to vascular smooth muscle cells with a magnetic resonance imaging nanoparticle contrast agent: implications for rational therapy of restenosis. *Circulation.* 2002; 106(22): 2842-2847.
105. Hu G, Lijowski M, Zhang H et al. Imaging of Vx-2 rabbit tumors with alpha(nu)beta3—integrin—targeted 11 Hn nanoparticles. *Int J Cancer.* 2007; 120(9): 1951-1957.
106. Liu Z, Cai W, He L et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nanotechnol.* 2007; 2(1): 47-52.
107. Mulder WJ, Strijkers GJ, Habets JW et al. MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle. *FASEB J.* 2005; 19(14): 2008-2010.
108. Cai W, Chen K, Li ZB et al. Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *J Nucl Med.* 2007; 48(11): 1862-1870.
109. Medarova Z, Pham W, Farrar C In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat Med.* 2007; 13(3): 372-377.
110. Brayden DJ Controlled release technologies for drug delivery. *Drug Discov Today.* 2003; 8: 976-978.
111. Nelson JL, Roeder BL, Carmen JC et al. Ultrasonically activated chemotherapeutic drug delivery in a rat model. *Cancer Res.* 2002; 62: 7280-7283.
112. Meyer DE, Shin BC, Kong GA et al. Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia. *J Control Release.* 2001; 74:213-224.
113. Woodle MC Surface-modified liposomes: assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation. *Chem Phys Lipids.* 1993; 64: 249-262.
114. Allen TM, Everest JM. Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983; 226: 539-544.
115. Bimbaum Y, Luo H, Nagai T et al. Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug: recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles. *Circulation.* 1998; 97(2): 130-134.
116. Daffertshofer M, Hennerici M. Sonothrombolysis: experimental evidence. *Front Neurol Neurosci.* 2006; 21: 140-149.
117. Unger E. Treatment of ischemic stroke with nanobubbles and ultrasound. *J Acoust Soc Am.* 2006; 119(5): 3437.
118. Chnari E, Nikitczuk JS, Uhrich KE, Moghe PV. Nanoscale anionic macromolecules can inhibit cellular uptake of differentially oxidized LDL Biomacromolecules. 2006; 7: 597-603.
119. Cavalcanti A, Shirinzadeh B, Kretly LC Medical nanorobotics for diabetes control. *Nanomedicine.* 2008; 4(2): 127-138.
120. Gough DA, Bremer T. Immobilized glucose oxidase in implantable glucose sensor technology. *Diabetes Technol Ther.* 2000; 2(3): 377-380.
121. Hartman KB, Wilson Li, Rosenblum MG Detecting and treating cancer with nanotechnology. *Mol Diagn Ther.* 2008; 12(1): 1-14.
122. Gobin AM, Lee MH, Halas NJ et al. Near—infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Lett.* 2007; 7(7): 1929-1934.
123. Toma A, Otsuji E, Kuriu Y et al. Monoclonal antibody A7-superparamagnetic iron oxide as contrast agent of MR imaging of rectal carcinoma. *Br J Cancer.* 2005; 93(1): 131—136.
124. Funovics MA, Kapeller B, Hoeller C et al. MR imaging of the her2/neu and 9.2.27 tumor antigens using immunospecific contrast agents. *Magn Reson Imaging.* 2004; 22(6): 843-850.
125. Sun C, Sze R, Zhang M. Folic acid—PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRL J Biomed Mater Res A. 2006; 78(3): 550-557.

126. Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K et al. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial Int J Hyperthermia. 2007; 23(3): 315-323.
127. Ashcroft JM, Tsybouski DA, Hartman KB et al. Fullerene (C₆₀) immunoconjugates: interaction of water-soluble C₆₀ derivatives with the murine anti-gp240 melanoma antibody. Chem Commun. 2006; 28: 3004-3006.
128. Rancan F, Helmreich M, Moelich A et al. Synthesis and in vitro testing of a pyropheophorbide-a—fullerene hexakis adduct immunoconjugate for photodynamic therapy. Bioconj Chem. 2007; 18(4): 1078-1086.
129. Lammers T, Hennink WE, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. Br J Cancer. 2008; 99(3): 392—397.
130. Powanda D, Chang TMS. Cross-linked PolyHbsuperoxide dismutase-catalase supplies oxygen without causing blood brain barrier disruption or brain edema in a rat model of transient global brain ischemia-reperfusion. Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol 2002; 30: 25-42.
131. Chang TM, Powanda D, Yu WP. Analysis of polyethylene-glycol-polylactide nano-dimension artificial red blood cells in maintaining systemic hemoglobin levels and prevention of methemoglobin formation. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2003; 31(3): 231-247.
132. Pison U, Welte T, Giersig M, Groneberg DA. Nanomedicine for respiratory diseases. Eur J Pharmacol. 2006; 533(1-3): 341-350.
133. John AE, Lukacs NW, Berlin AA et al. Discovery of a potent nanoparticle P—selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic airway disease. FASEBJ 2003; 17(15): 2296-2298.
134. Kumar M, Kong X, Behera AK et al. Chitosan IFN-gamma-pDNA nanoparticle (CIN) therapy for allergic asthma. Genet Vaccines Ther. 2003; 1(1): 3.
135. Truong-Le VL, Walsh SM, Schweibert E et al. Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. Arch Biochem Biophys. 1999; 361(1): 47-56.
136. Pandey R, Sharma A, Zahoor A et al. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. 2003; J Antimicrob Chemother. 2003; 52: 981-986.
137. Kumar M, Behera AK, Lockey RF et al. Intranasal gene transfer by chitosan—DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. Hum Gene Ther. 2002, 13: 1415-1425.
138. Hu H, Ni Y, Montana V et al. Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth. Nano Lett. 2004; 4: 507-511.
139. Hu H, Ni Y, Mandal SK et al. Polyethyleneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys. 2005; 109: 4285-4289.
140. Mattson MP, Haddon RQ, Rao AM. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. J Mol Neurosci. 2000; 14: 175-182.
141. Lovat V, Pantarotto D, Lagostena L et al. Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. Nano Lett. 2005; 5: 1107-1110.
142. Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. Nano Lett. 2006; 6: 562—567.
143. Boudriot I, Dersch R, Goetz B et al. Electrospun poly(lactide) nanofibres as scaffolds for tissue engineering (in German). Biomed Tech (Berl) 2004; 49: 242-247.
144. Sato M, Aslani A, Sambito MA et al. Nanocrystalline hydroxyapatite/titania coatings on titanium improves osteoblast adhesion. J Biomed Mater Res A. 2008; 84(1): 265-272.
145. Huang J, Jayasinghe SN, Best SM et al. Novel deposition of nano-sized silicon substituted hydroxyapatite by electrostatic spraying. J Biomed Mater Res. 2005; 16: 1137-1142.
146. Price RL, Waid MQ, Haberstroh KM, Webster TJ. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. Biomaterials. 2003; 24: 1877-1887.
147. Vandervoort J, Ludwig A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. Nanomedicine. 2007; 2: 11—21.
148. Li H, Tran W, Hu Y et al. A PEDF N-terminal peptide protects the retina from ischemic injury when delivered in PLGA nanospheres. Exp Eye Res. 2006; 83(4): 824-833.
149. De la Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(5): 2016-2024.
150. Lee SB, Koepsel R, Stoltz DB et al. Self-assembly of biocidal nanotubes from a single-chain diacetylene amine salt. J Am Chem Soc. 2004; 126(41): 13400-13405.
151. Kim JS, Kuk E, Yu KN et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007; 3(1): 95-101.
152. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicol Lett. 2008; 176(1): 1-12.
153. Freitas Jr RA. Nanodentistry. J Am Dent Assoc. 2000; 131: 1559-1565.
154. Donaldson K, Stone V, Tran CL et al. Nanotoxicology. Occup Environ Med. 2004; 61: 727-728.
155. Stern ST, McNeil SE. Nanotechnology safety concerns revisited. Toxicol Sci. 2008; 101(1): 4-21.
156. Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. Environ Health Perspect. 2005; 113: 947-955.
157. Oberdorster G. Toxicology of ultrafine particles: In vivo studies. Philos Trans R Soc Lond. 2000; A 358: 2719-2740.
158. Radomski A, Jurasz P, Alonso D et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. Br J Pharmacol. 2005; 146: 882-893.
159. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J Toxicol Environ Health Part A. 2002; 65: 1513-1530.
160. Brown JS, Zeman KL, Bennett WD. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166: 1240-1247.
161. Elder A, Gelein R, Silva V et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. Environ Health Perspect. 2006; 114: 1172-1178.
162. de Lorenzo AJ. The olfactory neuron and the blood-brain barrier. In Taste and Smell in Vertebrates (G. Wolstenholme and J. Knight, Eds.), pp. 151-176. London: J&A Churchill. 1970.
163. Hussain SM, Javorina AK, Schrand AM et al. The

- interaction of manganese nanoparticles with PC—12 cells induces dopamine depletion. *Toxicol Sci.* 2006; 92: 456-463.
164. *Gamer AO, Leibold E, van Ravenzwaay B.* The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20: 301-307.
165. *Mavon A, Miquel C, Lejeune O et al.* In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007; 20: 10—20.
166. *Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts M.S.* Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37: 251-277.
167. *Ryman—Rasmus sen JP, Riviere JE, Monteiro—Riviere NA.* Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci.* 2006; 91: 159-165.
168. *Baroli B, Ennas MG, Loffredo F et al.* Penetration of metallic nanoparticles in human fullthickness skin. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 1701-1712.
169. *Hussain N, Jaitley V, Florence AT.* Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50: 107-142.
170. *Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V.* The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol.* 2003; 15: 39-52.
171. *Xia T, Kwochich M, Brant J et al.* Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 2006; 6: 1794—1807.
172. *Oberdorster G, Ferin J, Lehner BE.* Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 (Suppl. 5): 173-179.
173. *Donaldson K, Brown D9 Clouter A et al.* The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med.* 2002; 15: 213—220.
174. *Sayes CM, Wahi R, Kurian PA et al.* Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2006; 92: 174-185.
175. *Warheit DB, Webb TR, CoMn VL et al* Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicol Sci* 2006; 95: 270-280.
176. *Warheit DB, Laurence BR, Reed KL et al.* Comparative pulmonary toxicity assessment of single—wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci.* 2004; 77: 117-125.
177. *Carrero—Sanchez JC, Elias AL, Mancilla R. et al.* Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett.* 2006; 6: 1609-1616.
178. *Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R et al.* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single—walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 289: L698-L70Q.
179. *Sato Y, Yokoyama A9 Shibata K et al.* Influence of length on cytotoxicity of multi—walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-I in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *MolBiosyst.* 2005; 1: 176-182.
180. *Neerman MF9 Zhang W9 Parrish AR9 Simanek EE.* In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery. *Int J Pharm.* 2004; 281: 129-132.
181. *Thibodeau MS, Giardina C, Knecht DA et al.* Silica—induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol Sci.* 2004; 80: 34-48.
182. *Chen Y9 YangL, Feng C, Wen LP.* Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non—small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 337: 52-60.
183. *Seleverstov O9 Zabirnyk O, Zschdmack M et al.* Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. *Nano Lett.* 2006; 6: 2826-2832.
184. *Yamawaki H, Iwai N.* Cytotoxicity of water—soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1495-C1502.
185. *Nelson MA, Domann FE, Bowden GT et al.* Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health.* 1993; 9: 623—630.
186. *Mori T, Takada H, Ito S et al.* Preclinical studies on safety of fullerene upon acute oral administration and evaluation for no mutagenesis. *Toxicology.* 2006; 225: 48-54.
187. *Sera N, Tokiwa H, Miyata N.* Mutagenicity of thefullerene C60—generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 2163-2169.