

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Knoblochová

Zlaté nanočástice jako nástroj cílené terapie nádorových onemocnění
Gold nanoparticles as a tool of targeted therapy of cancer

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha, 2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi při psaní této práce pomáhali a podporovali mě, zejména svému školiteli MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc. a Mgr. Monice Žárské.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2013

Podpis

OBSAH:

Seznam použitých zkratk:	iv
Abstrakt	vi
Abstract	vii
1. Úvod	1
2. Nanotechnologie a zlaté nanočástice	2
3. Syntéza zlatých nanočástic	4
3.1 Redukce v roztoku	4
3.2 Růst z krystalizačního jádra	6
3.3 Dvoufázová reakce	7
4. Vlastnosti zlatých nanočástic	7
4.1 Surfactanty	7
4.2 Fyzikální vlastnosti	9
4.2.1 Povrchová plazmonová rezonance	9
4.2.2 Rozptyl	10
4.2.3 Fluorescence	11
4.2.4 Luminiscence	11
4.2.5 Fototermální efekt	12
5. Využití zlatých nanočástic v cílené nádorové terapii	12
5.1 Zobrazovací metody	12
5.1.1 Detekce molekul	12
5.1.1.1 Kolorimetrická detekce	12
5.1.1.2 Elektrochemická detekce	12
5.1.1.3 Fluorescenční detekce	13
5.1.1.4 Detekce založená na plazmonové rezonanci	13
5.1.1.5 Detekce založená na SERS	13
5.1.1.6 Nanotechnologie na chipu	13
5.1.2 Mikroskopické zobrazení	13
5.2 Fototermální nádorová terapie	14
5.3 Doručování léčiv	16
5.4 Další medicínské přístupy	17
6. Modifikace zlatých nanočástic pro cílenou terapii nádorových onemocnění	18
7. Cytotoxicita a genotoxicita zlatých nanočástic	20
8. Závěr	21
9. Bibliografie	22

Seznam použitých zkratek:

AFM	atomic force microscopy	mikroskopie atomárních sil
anti-EGFR	anti-EGFR antibody	protilátka proti receptoru epidermálního růstového faktoru
anti-PSMA	anti-PSMA antibody	protilátka proti prostatickému povrchovému membránovému antigenu
AR	aspect ratio	poměr délky ku šířce
CNS	central nervous system	centrální nervová soustava
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide	cetyltrimethylamoniumbromid
D	dimensional	dimenzionální, rozměrné (např. 3D)
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide	1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálního růstového faktoru
EGFR2	epidermal growth factor receptor 2	receptor epidermálního růstového faktoru 2
EPR efekt	enhanced permeability and retention effect	efekt zvýšené propustnosti a zadržování
FRET	Förster resonance energy transfer	Försterův rezonanční přenos energie
GNPs	gold nanoparticles	zlaté nanočástice
GNRs	gold nanorods	zlaté nanotyčky (nanotyčinky)
HaCaT	human keratinocyte line	linie lidských keratinocytů
HER2	human epidermal receptor 2	lidský epidermální receptor 2
HOC 313	human oral squamous carcinoma cell line 313	buněčná linie lidského skvamózního karcinomu úst 313
HSA	human serum albumin	lidský sérový albumin
HSC	human oral squamous carcinoma cell line	epiteliální nádorová buněčná linie
HSC 3	human oral squamous carcinoma cell line3	epiteliální nádorová buněčná linie 3
LNCaP	lymph node carcinoma of prostate cell - line from lymph node metastatic lesion of human prostatic adenocarcinoma.	buněčná nádorová linie derivovaná z metastázy do lymfatické uzliny adenokarcinomu prostaty
MPC	monolayer-protected clusters	klastr chráněný monovrstvou
MPP	matrix metalloproteinase	matrixová metaloproteáza
MTAB	16-mercaptohexadecyl trimethylammonim bromide	16-merkaptohexadecyl trimethylamonimbromid

NHS	N-hydroxysuccinimide	N-hydroxysukcinimid
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
NIR	near-infrared	blízká infračervená oblast spektra
OCT	optical coherent tomography	optická koherentní tomografie
p53	protein 53/tumor protein 53	protein 53, nádorový protein 53
PEG	polyethylene glycol	polyetylglykol
PEG-thiol	polyethylene glycol with an end thiol group	polyetylglykol s koncovou thiolovou skupinou
PSMA	prostatic specific membrane antigen	prostatický specifický membránový antigen
REG-1 aptamer	Regado aptamer	aptamer Regado
RES	reticuloendothelial system	retikuloendoteliální systém
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment	systematická evoluce ligandů exponenciálním obohacováním
SEM	scanning electron microscope	rastrovací elektronový mikroskop
SERS	surface-enhanced Raman scattering	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SK-BR-3	human breast adenocarcinoma cell line	buněčná epiteliální linie rakoviny prsu
SPR	surface plasmon resonance	povrchová plazmonová rezonance
TEM	transmission electron microscope	transmisní elektronový mikroskop
Tf	transferrin	transferin
TNF	tumor necrosis factor	faktor nádorové nekrózy
UV	ultraviolet	ultrafialový, -á, -é
UV/Vis	ultraviolet and visible	ultrafialová a viditelná oblast spektra
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1	vaskulární intercelulární adhezivní molekula-1
VEGF	vascular endothelial growth factor	cévní endotelový růstový faktor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	receptor cévního endotelového růstového faktoru

Abstrakt

Nanomateriály budí zájem biomedicínských oborů a to díky své velikosti (tedy možné interakci s buněčnými strukturami), vysokému měrnému povrchu a jedinečným fyzikálním vlastnostem. Zlaté nanočástice mohou být syntetizovány do různých tvarů. Jejich charakteristickou vlastností je povrchová plazmonové rezonance, díky které jsme mimo jiné schopni je citlivě detekovat pomocí mikroskopie v temném poli. Je možné je účinně modifikovat různými ligandy (např. léčiv, protilátkami, aptamery) a tuto schopnost využít k cílené vazbě na tkáň např. při doručování léčiv. Konjugované zlaté nanočástice se dají aplikovat i v diagnostice nádorových buněk. Fototermální terapie spočívá ve specifickém navázání zlatých nanočástic na nádorovou tkáň, kde po ozáření světelným paprskem o frekvenci blízké infračervené oblasti přemění světelnou energii na tepelnou a tím poškodí buňky ve svém okolí. Zatím nejasné je toxické působení zlatých nanočástic. Modifikace zlatých nanočástic se s velkým očekáváním zkoumají v cílené nádorové terapii, protože se zde naskýtá nástroj selektivní destrukce nádorových buněk.

Klíčová slova: nanotechnologie, zlaté nanočástice, cílená nádorová terapie, fototermální efekt, doručování léčiv, biologické aplikace nanotechnologií, zobrazování nádorové tkáně

Abstract

Nanomaterials have caught the interest of biomedical science because of their size (which enables them to interact with cellular structures), high surface area, and unique physical properties. Gold nanoparticles (GNPs) can be synthesised in various shapes. Their common property is surface plasmon resonance, which makes it possible to detect these particles with high resolution using dark field microscopy. GNPs can be efficiently modified with various ligands such as drugs, antibodies, or aptamers; this can be utilized to selectively bind GNPs to tissues, e.g. for drug delivery. Conjugated GNPs can also be used in diagnostics of tumor cells as well. Photothermal therapy consists of GNPs selectively binding to the tumor tissue, where they transform light into heat upon irradiation by near-infrared (NIR) light, thereby damaging nearby cells. The toxicity of GNPs is currently unclear. Research into modified gold nanoparticles is of great interest for targeted tumor therapy, as it may yield a tool for the selective destruction of tumor cells.

Keywords: nanotechnology, gold nanoparticles, targeted cancer therapy, photothermal effect, drug delivery, biological applications of nanotechnology, cancer cell imaging

1. Úvod

Díky technickým možnostem jsme dnes schopni vytvářet objekty až v nanoměřítku. Rozvoj nanotechnologie v posledních letech je umožněn především díky objevu mikroskopie atomárních sil (AFM - „atomic force microscopy“). Tento obor je zajímavý i z hlediska medicíny, protože díky své velikosti v řádech nanometrů (10^{-9} m) jsou nanočástice schopné proniknout až do buněk. Jejich výhodou je i snadná modifikovatelnost chemickými reakcemi.

Tato práce se zaměřuje na zlaté nanočástice, protože disponují vysokým měrným povrchem a unikátními fyzikálními vlastnostmi. Mezi ně patří povrchová plazmonová rezonance, rozptyl záření, fluorescence, luminiscence a fototermální efekt. Díky povrchové plazmonové rezonanci jsme schopni vizualizovat i jednotlivé nanočástice, čímž lze zlepšit detekční limit, například v porovnání se zatím nejužívanější vizualizační technikou – fluorescencí. Významným jevem je fototermální efekt, tj. přeměna absorbovaného světla na tepelnou energii. Lze jej využít k terapii nádorových onemocnění, protože pomocí navázaných zlatých nanočástic můžeme selektivně zničit nádorové buňky. To je důležité zejména u nádorů neohrazených vazivem, kdy se nádorové buňky vyskytují i ve zdravé tkáni a nelze je chirurgicky odstranit.

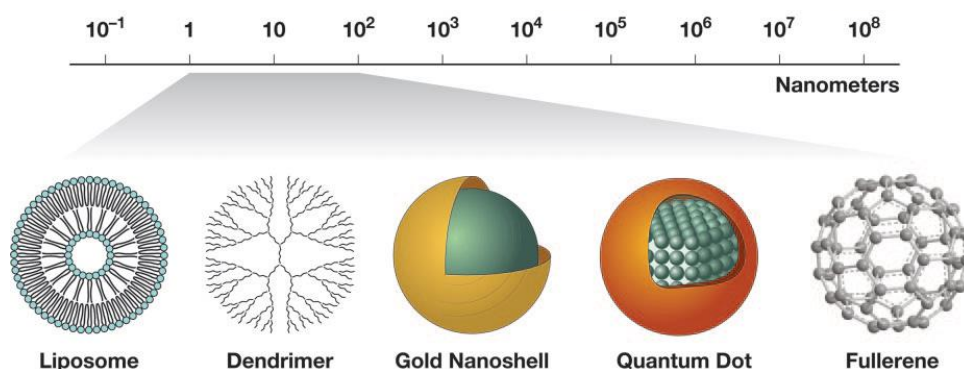
Změnami podmínek při syntéze lze vyrobit nanočástice různých tvarů a ovlivnit tak jejich chování. Zásadní vliv na jejich vlastnosti má i surfaktantový obal tvořený zejména polymery hydrofilního charakteru s nabitými koncovými skupinami. Tyto polymery mohou být modifikovány a následně konjugovány s dalšími ligandy. Ligandy mohou představovat různá léčiva nebo cílicí molekuly, pomocí nichž jsme schopni nanočástice zacílit na konkrétní buňky, např. nádorové. Díky velkému specifickému měrnému povrchu lze zlaté nanočástice modifikovat několika typy takových molekul, což zvyšuje specifitu cílení. Zlaté nanočástice by mohly být využity v cíleném doručování léčiv do nádorové tkáně.

Nakonec zmiňuji toxicitu zlatých nanočástic a jejich chování v organismu, neboť tato problematika předurčuje či limituje jejich aplikaci ve farmakologii.

2. Nanotechnologie a zlaté nanočástice

Nanotechnologie je technický obor zabývající se prací s materiály, jejichž alespoň jeden vnitřní rozměr leží v intervalu od 1 do 100 nm (nanometrů, 1 nanometr je 10^{-9} metru). Využívá fyzikální a chemické vlastnosti látky na úrovni atomů a molekul, které se liší od vlastností materiálu makroskopické velikosti téhož chemického složení. Tzv. nanomateriály mohou ovšem vytvářet struktury až makroskopického charakteru¹.

Nanostruktury dělíme podle počtů souřadnic, ve kterých dosahuje daný objekt velikosti v řádu nanometrů. Zaprvé, jako 0-dimenzionální nanoobjekty (0D) označujeme objekty dosahující nanorozměrů ve všech třech souřadných osách, jedná se o nanočástice, kvantové tečky², nanopěny. Zadruhé, jako 1-dimenzionální nanoobjekty (1D) značíme objekty dosahující nanorozměrů ve dvou souřadných osách – nanovlákná („nanofibers“), nanotyčky („nanorods“), nanotrubičky („nanotubes“, např. uhlíkové)³, nanodráty („nanowires“). Zatřetí, jako 2-dimenzionální objekty (2D) označujeme objekty dosahující nanorozměrů pouze v jedné souřadné ose – nanodesky, tenké vrstvy („layers, films“), rovinné makromolekuly (např. grafénový list – jednoatomární vrstva grafitu). Začtvrté, jako 3-dimenzionální objekty (3D) značíme objekty složené z výše zmíněných. Kombinace nanočástic s pevným materiálem se nazývají nanokompozity („nanocomposites“), nanoobjekty rozptýlené v kapalině nebo v plynu, např. koloidní roztoky nanočástic, se nazývají nanotekutiny („nanofluids“). Dalšími příklady jsou zlaté nanoslupky („nanoshells“) - křemíkové částice pokryté vrstvou zlata, dendrimery – větvené supramolekulární polymerní systémy, liposomy a fullerény – uhlíkové molekuly prostorových tvarů složené z pěti- a šestiúhelníků (obr. 1)^{1,3,4}.



Obr. 1 Různé tvary a velikosti nanočástic. Přepřacováno z reference č. 4.

Nanočástice mají oproti makroskopickým objektům vysoké hodnoty povrchové energie a chemického potenciálu, které ústí v nestabilitu a v tendenci nanočástic růst, tedy adsorbovat částice vlastního složení. Vzhledem k vysokým hodnotám specifického měrného povrchu

disponují rozměrnou plochou, na kterou lze navázat různé ligandy a pomocí nich je cílit na nejrůznější struktury^{5, 6}. Jejich fyzikální vlastnosti závisí na tvaru, složení a velikosti a lze je měnit odlišnou chemickou syntézou⁷. Nanomateriály jsou velmi pevné, protože jsou složené z malých strukturních jednotek (a tedy i relativně malého počtu atomů), u kterých je pravděpodobnost strukturního defektu krystalové mřížky menší než u makroskopických objektů. Nanočástice s rozměry pod 10 nm vykazují společné chování s vlastními kvantovými stavy danými jejich velikostí. Díky nim vykazují unikátní optické a elektrické vlastnosti. Hlavní výhodou nanotechnologií je, že lze provést změny na atomární úrovni látek s viditelnými důsledky na úrovni makroskopické. Odlišnosti v chování látek na úrovni nanočástic a makroskopického světa lze využít při výzkumu nejrůznějších nových materiálů s aplikovatelností v řadě oborů, např. v elektronice, zemědělství, ochraně životního prostředí, energetickém průmyslu, medicíně a dalších^{1, 8}.

Uplatnění nanočástic v klinické praxi závisí na jejich velikosti, rozpustnosti a náboji⁴. Tyto vlastnosti ovlivňují průchod biologickými bariérami, zvl. hematoencefalickou bariérou^{9, 10}. Dalším aspektem je degradace nanočástic v krvi prostřednictvím enzymů¹¹. Lepší rozpustnost a ochranu nanočástic před enzymatickou degradací zajistí navázání hydrofilního polymeru, např. PEGu (polyetylen glykolu), který zvýší hydrataci částice. Díky němu lze navázat na nanočástice i lipofilní molekuly. Zcela nerozpustné molekuly se připojí na povrch nebo se uloží uvnitř dutiny částice (např. v případě nanoslupek)¹². Nanočástice s hydrofilním polymerem vykazují také sníženou opsonizaci a jsou méně pohlcovány makrofágy¹³.

Zdravotní riziko nanomateriálů spočívá zejména v malé velikosti, díky níž mohou pronikat buněčnými membránami, a dále ve schopnosti katalyzovat různé biochemické reakce. Do organismu se mohou dostat nejrůznějšími cestami – vdechnutím, dermální absorpcí, gastrointestinálním traktem, záměrnou aplikací ve formě léčiv a dalšími způsoby. Nebezpečná je zejména absorpce dýchacími cestami. Částice o rozměrech několika nanometrů zůstávají deponovány v nosní sliznici, odkud mohou ovlivnit centrální nervovou soustavu (CNS). Částice o velikosti desítek nanometrů se absorbují plicní tkání do krve a mohou v organismu způsobit oxidační stres. Potenciální toxický účinek mají zejména oxidy kovů, např. Fe_2O_3 , ZnO a TiO_2 ¹.

Zlaté nanočástice mají především unikátní optické vlastnosti. Disponují vysokým měrným povrchem, na kterém dochází k jevu povrchové plazmonové rezonance. Povrchovou plazmonovou rezonanci vytváří skupinová oscilace volných vodivostních elektronů excitovaných světelným paprskem o výrazně větší vlnové délce, než je velikost částice. Tato excitace je velmi silná a umožňuje vizualizaci i jediné nanočástice¹⁴. U zlatých nanočástic splňuje podmínku pro excitaci viditelné světlo (cca 400 – 700 nm) a světlo s vlnovými délkami blízkými infračervené oblasti (blízká infračervená oblast: 650 - 900 nm, tj. NIR – „near infrared“¹⁵; infračervená oblast: 800 – 2500 nm). Proto se roztok zlatých nanočástic jeví jako barevný^{16, 17}.

Frekvence plasmonové rezonance závisí i na přítomnosti ostatních částic a jejich vzájemné vzdálenosti, při agregaci částic mění roztok barvu¹⁸. Důležitým aspektem je kontrolovatelná syntéza a možnost snadného vyladění potřebných vlastností, které závisí na velikosti, tvaru a reakčním prostředí⁴. Další výhodou je jejich stabilita¹⁹. Velký měrný povrch lze modifikovat při chemické syntéze různými ligandy – léčivy, kontrastními látkami (např. fluorescenční značkou) i cílicími molekulami⁴.

Těchto vlastností lze s výhodou využít v řadě biologických aplikací. Zlaté nanočástice mohou sloužit jako senzory pro určení přítomnosti určitého analytu^{19,20}, v diagnostických zobrazovacích technikách, při doručování léčiv, cílené léčbě rakoviny a fototermální terapii²¹. Cílená léčba nanočásticemi spočívá v jejich modifikaci cílicí molekulou, která naváže nanočástici na cílenou tkáň. Účinná látka může být přepravována uvnitř částice a uvolněna po navázání částice na receptor cílové molekuly²² nebo může být účinnou látkou samotná částice. Nanotechnologie umožňuje detekci změn na molekulární a buněčné úrovni regulačních, signálních a transportních drah ve zdravé i poškozené buňce, tedy podstatně zlepšuje možnosti výzkumu⁴.

3. Syntéza zlatých nanočástic

Syntéza nanočástic obecně probíhá dvěma přístupy, „bottom-up“ a „top-down“. První zmíněný přístup („bottom-up“) vytváří nanočástice ze základních prvků, které postupně zvětšuje, a je označován jako chemický (chemická transformace). Druhý přístup („top-down“) naopak vytváří nanočástice z většího již existujícího celku a je označován jako fyzikální (fyzikální manipulace). K metodám „bottom-up“ pro přípravu zlatých nanočástic v roztoku (neboli koloidního zlata) patří tzv. redukce v roztoku, metoda růstu z krystalizačního jádra či dvoufázová reakce^{1,23}. Syntéza nanočástic probíhá v malém objemu a částice se po každé syntéze navzájem trochu liší²³. Zvolením vhodné techniky (např. změnou doby reakce a surfaktantu) je možné změnit velikost a tvar zlatých nanočástic²¹. Zcela jiným typem přípravy je metoda chemické depozice z plynné fáze („chemical vapor deposition“), která využívá vakuového napařování substrátu na podklad²⁴.

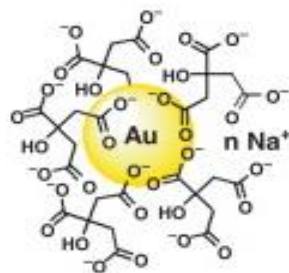
3.1 Redukce v roztoku

První zmínky o syntéze koloidního zlata pochází z roku 1857 od Michaela Faradaye, který upozoroval změnu barvy roztoku při redukci kyseliny chlorozlatité (HAuCl_4) rozpuštěné v sulfidu uhličitým (CS_2). Další pokrok v této oblasti zaznamenal až r. 1951 John Turkewich. Redukcí kyseliny chlorozlatité citrátem sodným vytvořil zlaté nanočástice (gold nanorods - GNRs) o průměru 20 nm²⁰. Změny velikosti bylo dosaženo o 20 let později díky

změně poměru koncentrací obou činidel (tj. poměru mezi redukčním a stabilizačním činidlem - citrátem sodným a zlatem)^{25,26}.

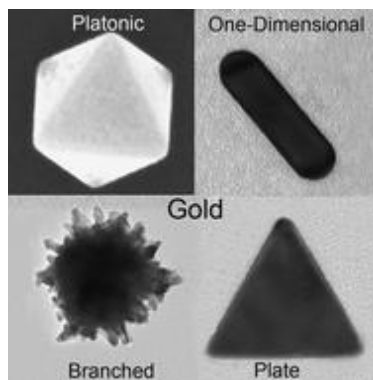
Standardní variantou je redukce kyseliny tetrachlorzlatité citrátem sodným za varu (tepelnou redukcí citrátem). Do vroucího roztoku kyseliny zlatité se přidá roztok citrátu sodného a 15 minut se vaří, následně se ochladí. Nejprve dochází k redukci zlatých kationtů, poté se formují klastry (shluky zlatých atomů), které postupně agregují²⁷. Dalšími možnostmi jsou redukce citrátem sodným, iniciovaná ultrafialovým (UV) zářením v rozmezí od 300 do 400 nm, a redukce kyselinou askorbovou. Obě reakce probíhají za pokojové teploty²⁷.

Velikost částic lze určit poměry koncentrací reaktantů ve všech třech typech syntézy. Vyšší koncentrací citrátu se stabilizují menší částice, u nižších koncentrací je pokrytí zlatých nanočástic citrátem neúplné a částice mají tendenci narůstat do vyšších celků. Vliv na velikost má i koncentrace roztoku kyseliny zlatité. Při její koncentraci vyšší než 0,8 mM dochází k destabilizaci malých nanočástic kvůli jejich zvýšené tendenci agregovat do větších klastrů. Naopak pro dlouhodobé skladování částic v roztoku není vhodná koncentrace vyšší než 1 mM. Oba dva zbývající typy syntézy vykazují podobné chování a kinetiku jako roztoky připravené tepelnou redukcí citrátem. Citrát i askorbát tvoří ochrannou vrstvu zlatých nanočástic, protože se sorbují na jejich povrch²⁷. Repulze mezi zápornými skupinami citrátu (obr. 2) zajišťuje i stabilitu v suspenzi jednotlivých nanočástic^{27,28}. Menší nanočástice vykazují krystalický charakter, větší mají charakter polykrystalický, tj. vykazují nepřesnosti v krystalické mřížce²⁷.



Obr. 2 Zlatá nanokulička pokrytá negativně nabitými ionty citrátu sodného. Převzato z reference č. 28.

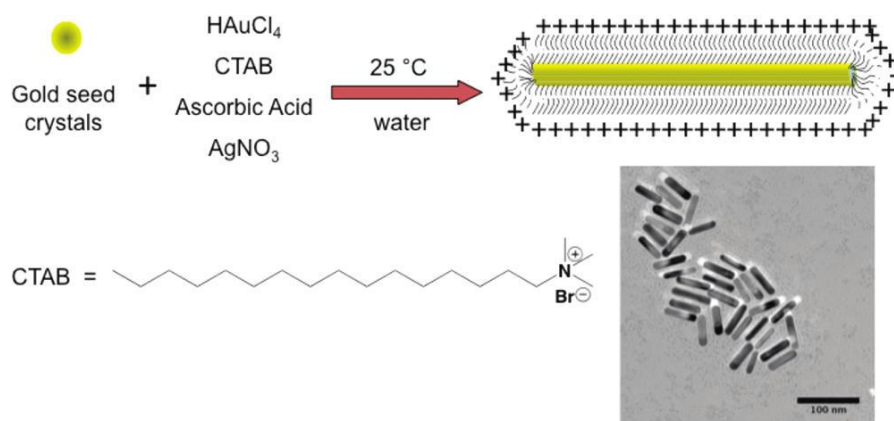
Tepelnou redukcí citrátem se docílí převážně menších zlatých nanokuliček, větší částice jsou charakteristické podélným protažením. V menší míře zde objevíme i trojúhelníkovité útvary (obr. 3)²⁹. Nepřesnosti při syntéze, zvláště tepelný gradient, vede ke vzniku škály různých tvarů. U redukce UV zářením a askorbovou kyselinou lze nalézt i trojúhelníky, nepravidelné šestiúhelníky nebo destičky^{20, 23, 30}.



Obr. 3 Příklad tvarové rozmanitosti zlatých nanočástic – mnohostěn, tyčinka, větvená nanočástice, trojúhelník. Převzato z reference č. 30.

3.2 Růst z krystalizačního jádra

Metoda růstu krystalů z krystalizačního jádra se využívá především při syntéze velkých nanokuliček nebo hvězdic, krychlí, kvádrů a zvláště nanotyček. Krystalická jádra o průměru 4 nm jsou vytvořena přidáním silného redukčního činidla, např. tetrahydroboritanu sodného (NaBH_4). K další krystalizaci se použije slabšího redukčního činidla, např. kyseliny askorbové, aby byla umožněna pouze redukce na povrchu zlatých nanočástic³⁰. Zlaté nanotyčky vznikají přidáním stabilizačního činidla, surfaktantu, který navázáním na nanočástice umožní růst pouze podél dlouhé osy. Surfaktantem může být cetyltrimetylamoniumbromid, CTAB (obr. 4)^{31, 32, 33}. Jsou-li potřeba kratší tyčky (menší specifický povrch), přidají se do roztoku stříbrné ionty ve formě AgNO_3 . Stříbrné ionty se vážou na různé plochy nanočástice s různou koncentrací, snižují rychlost jejich růstu a tím modulují růst nanotyček^{34, 33}. Významnou úlohu zde hraje zřejmě i bromidový anion CTABu, který reaguje se stříbrnými ionty a ve formě bromidu stříbrného (AgBr) stabilizuje zlaté nanotyčky a pomáhá při jejich růstu³³.



Obr. 4 Shrnutí syntézy zlatých nanotyček s dvojvrstvou CTABu. Snímek zlatých nanotyček o poměru délky ku šířce 1:4,6 („aspect ratio“ - AR). Měřítka – 100 nm. Převzato z reference č. 34.

Další zajímavé tvary zlatých nanočástic jsou např. zlaté nanoklece, zlaté nanoježovky, zlaté nanoslupky a zvláštní typ zlatých nanočástic s různými výběžky, tzv. nano-popcorn. Zlaté nanoklece („nanocages“) jsou duté objekty krychlovitého tvaru. Při syntéze se vytvoří ze stříbrné nanokrychle zlatá dutá klec galvanickou transformací (redukce kyseliny zlatité kovovým stříbrem³⁵). Zlaté nanoježovky („urchin-like nanoparticles) jsou kulovité struktury s hroty. Skládají se ze dvou kovů. Základem je zlatá nanokulička, na které se vytvoří stříbrná krystalizační jádra. Na nich posléze vzniknou zlaté ostny³⁶. Zvláštním případem zlatých nanočástic jsou zlaté nanoslupky s křemíkovým jádrem. Jejich fyzikální vlastnosti jsou podobné zlatým nanočásticím a lze je využít ve fototermální terapii³⁷. Zlaté nanočástice označované jako nano-popcorn mají tvar centrální koule, ze které vybíhají menší výběžky, např. nanohvězdy (syntéza probíhá ve dvou krocích, nejdříve pomocí růstu z krystalizačního jádra vzniknou kuličky a posléze díky přidání kyseliny askorobové a CTABu vznikne nano-popcorn)^{38, 39}. Centrální koule slouží jako rezervoár elektronů, zatímco špičky jsou schopné soustředit elektromagnetické pole okolo sebe³⁹.

3.3 Dvoufázová reakce

Dvoufázová reakce se používá v případě, jsou-li potřeba malé nanočástice (1-5 nm). Zlaté nanočástice vytvořené touto metodou jsou stabilní, chráněny surfaktantem navázaným přes thiolovou skupinu (alkanthioly). Při syntéze tvoří organickou fázi surfaktant a posléze se roztok redukuje ve vodné fázi prostřednictvím tetraboritanu sodného⁴⁰. Vzorky je možno uchovat ve vysušené podobě^{20, 23}.

4. Vlastnosti zlatých nanočástic

4.1 Surfaktanty

Surfaktantem je většinou nabitá látka, která je buď na nanočástice kovalentně chemicky navázána, nebo je na ně adsorbována. Stabilizuje nanočástice díky elektrostatickému odpuzování s okolními zlatými nanočásticemi²¹. Surfaktant způsobuje vznik mikroemulzí a přechod kovu z vodné do organické fáze²⁰. Tím stabilizuje růst nanočástic i samotné nanočástice. Surfaktanty tvoří převážně hydrofilní nebo hydrofobní polymery. Zahrnují celou škálu organických látek, např. thioly, aminy, aromatické aminy, aminokyseliny, organoaminy⁴¹ a další.

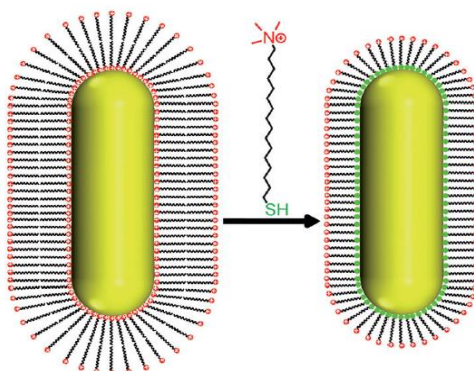
Jednou z nejpoužívanějších strategií ke stabilizaci zlatých nanočástic je použití alkanthiolů, která byla zavedena roku 1993⁴² a později rozšířena v Brust-Schiffrinovu metodu

(použití dodekanthiolu)⁴⁰. Ligandy s thiolovými skupinami jsou často nazývány MPC („monolayer-protected clusters“) a jsou využívány díky unikátní vazbě thiolu na zlaté nanočástice (GNPs - „gold nanoparticles“). Thiolové skupiny silně adsorbují na povrch zlatých nanočástic⁴³. Vazba síry na zlato se skládá z elektrostatického a kovalentního příspěvku. Elektrostatický příspěvek je zhruba dvojnásobný v porovnání s kovalentním příspěvkem⁴⁴. Hodnoty energií vazby síry na zlato se pohybují okolo 14 kcal/mol (pro metanthiol) a 28 kcal/mol (dimetyldisulfid), zatímco energie typické kovalentní vazby je 40 - 100 kcal/mol^{45,46}. Díky ochranné vrstvě polymeru je možné nanočástice izolovat i resuspendovat, aniž by agregovaly⁴⁷. Nanočástice lze modifikovat i pomocí reakce, kdy dojde k vzájemné výměně ligandů reagujících se zlatými nanočásticemi přes thiolové skupiny („ligand-exchange reaction“)⁴⁸. Často se využívají látky s thiolovou skupinou na jedné straně řetězce a s karboxylovou skupinou na straně druhé. Tyto látky zajišťují stabilitu koloidního roztoku (heterogenní soustava s částicemi o velikosti od 1 nm do 1000 nm⁴⁹) díky negativnímu náboji na molekule kyslíku karboxylové skupiny a také díky skutečnosti, že na ně lze biokonjugačními reakcemi připojit další molekuly. Jako ligand se často na zlaté nanočástice váže PEG (polyetylen glykol), protože redukuje nespecifickou adsorpci dalších látek na nanočástice a protože díky sterickým zábránám brání vzájemné agregaci nanočástic^{21,50}. Důležitou vlastností PEGu je i snížená cytotoxicita. K navázání na částice se používá polyetylen glykol modifikovaný koncovou thiolovou skupinou na jedné straně a libovolnou reakční skupinou na straně druhé (PEG-thiol)^{51, 52, 53, 54, 55}.

PEGylované zlaté nanotyčky (pokryté PEGem) kolují v krevním oběhu s poločasem filtrace 19 hodin, jsou ale detekovatelné i po 48 hodinách. Jsou filtrovány převážně slezinou, nalezneme je však i v srdci, ledvinách, mozku, brzlíku a varlatech krys⁵⁶.

Při syntéze zlatých nanotyček se využívá CTABu, pomocí něhož lze zajistit tvar a velikost nanotyčky. CTAB má zásadní vliv na syntézu zlatých nanotyček, zřejmě ovlivňuje rychlost vzniku krystalizačních jader i další růst. Rychlost růstu zvyšuje snížením počtu redukováných zlatých kationtů a slabší vazbou na povrch zlatých nanočástic⁵⁷. Váže se na nanotyčky ve dvojrstevných strukturách a díky němu mají nanotyčky pozitivní náboj⁵⁸. Nanotyčky obalené CTABem jsou stabilní pouze v roztoku o určité koncentraci volného CTABu. Ten je ovšem pro buňky toxický a pro využití v živých organismech je třeba jej odstranit. Jednou z možností je použití PEGu s thiolovou skupinou a využití reakce výměny ligandů⁵⁹. Další variantou je obměna cytotoxického CTABu jeho necytotoxickým analogem, např. (16-merkaptohexadecyl) trimethylammonim bromidem (MTABem). Tato sloučenina se od CTABu liší pouze koncovou thiolovou skupinou. CTAB se váže na zlaté nanotyčky nekovalentní vazbou, zatímco thiolová skupina MTABu se váže silnější elektrostatickou až kovalentní vazbou zmíněnou výše. MTAB je

tedy schopen CTAB ze zlatých nanotyček vytěsnit. CTAB tvoří dvojrstevnou strukturu, MTAB pouze jednovrstevnou strukturu (obr. 5)⁶⁰.



Obr. 5 Výměna dvojrstvy CTABu za monovrstvu MTABu. Převzato z reference č. 60.

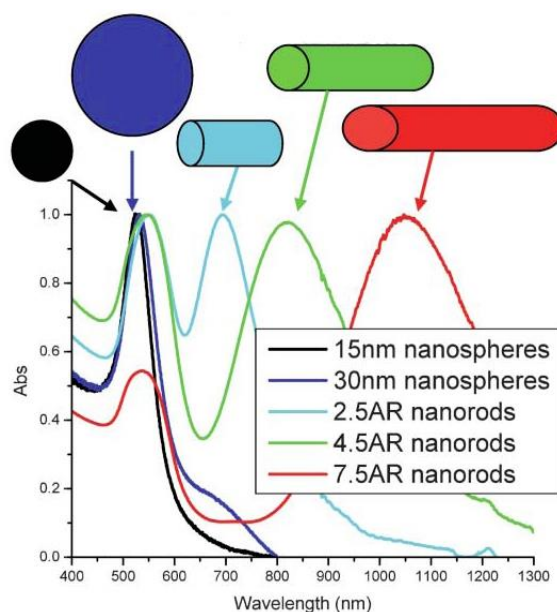
4.2 Fyzikální vlastnosti

4.2.1 Povrchová plazmonová rezonance

Povrchová plazmonová rezonance (SPR – „surface plasmon resonance“) patří mezi nejdůležitější vlastnosti zlatých nanočástic. Tvoří ji skupinová oscilace volných vodivostních elektronů excitovaných monochromatickým světelným paprskem na rozhraní kov/dielektrikum^{30, 61, 62}. Tento paprsek má mít výrazně větší vlnovou délku, než je velikost částice²³. Povrchová plazmonová rezonance nastává pouze tehdy, dopadne-li světelný paprsek pod určitým úhlem⁶¹. Mezi světelným zářením a povrchovými elektrony dojde k rezonanci, tj. ke zvýšení amplitudy světelné vlny. Povrchová plazmonová rezonance má elektromagnetický charakter a je ovlivněna především vlastnostmi kovu, vlnovou délkou dopadajícího světla a indexem lomu média^{30, 61}. Díky SPR mají částice unikátní optické vlastnosti – silnou plazmonovou absorpci, rezonanční elastický Rayleighův rozptyl (odražené záření má stejnou frekvenci jako dopadající) a lokalizované elektromagnetické pole na povrchu částice^{23, 30}. Rezonanční oscilace elektronů vede jak k absorpci, tak k rozptýlení dopadajícího světla⁶³. Malé zlaté nanočástice absorbují více světla, než rozptýlí, větší částice naopak více světla rozptýlí, než absorbují⁶³.

Plazmonová absorpce závisí na tvaru a velikosti částice a dielektrické konstantě okolí. Zlaté nanokuličky vykazují jedno absorpční maximum okolo vlnové délky 520 nm, zlaté nanotyčky vykazují absorpční maxima dvě. První, příčné, se shoduje s absorpčním maximumem nanokuliček a vypovídá o oscilaci elektronů podél krátké osy. Druhé, podélné, roste spolu se zvyšujícím se poměrem délky a průměru nanotyčky a vypovídá o oscilaci elektronů podél dlouhé osy³⁰. Většinou se pohybuje v rozmezí od 600 nm do 1200 nm (obr. 6)²³. Zlaté nanotyčky o určité velikosti lze excitovat viditelným světlem (400 – 750 nm), je možné je

aplikovat v biologické i chemické detekci. Při agregaci zlatých nanočástic dojde ke změně spektra a tím ke změně barvy roztoku. Tohoto principu se využívá v kolorimetrickém stanovení²⁰. Absorbance se měří pomocí UV/Vis spektrofotometrie (spektrofotometrie o vlnových délkách v rozmezí od viditelného světla do UV)⁶⁰.

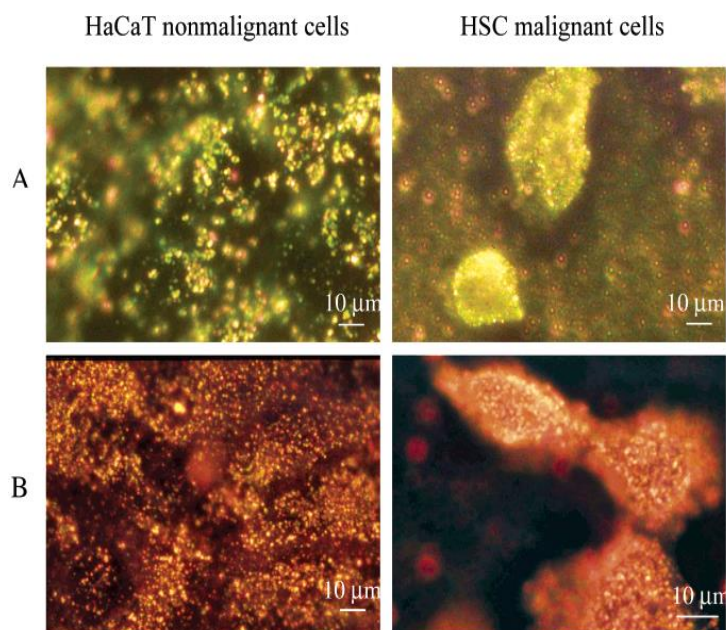


Obr. 6 Absorpční spektra různých tvarů zlatých nanočástic. Přepřacováno z reference č. 23.

4.2.2 Rozptyl

Rezonanční elastický Rayleighův rozptyl světelného paprsku dosahuje frekvence viditelného a blízkého infračerveného záření, závisí na indexu lomu prostředí, jeho chemickém složení a na velikosti a tvaru nanočástice. Zvýšený efekt se dostavuje především díky elektromagnetickému poli na povrchu částic. Nazývá se mj. rezonanční rozptyl povrchového plazmonu („surface plasmon resonance scattering“). Právě tento rozptyl umožňuje vizualizovat GNPs v mikroskopii temného pole (obr. 7)^{23, 30, 64}.

Ramanův rozptyl je neelastický rozptyl viditelného světla a jeho spektrum je charakteristické pro každou molekulu. Využívá se v metodě povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS - „surface-enhanced Raman scattering“)^{30, 64}.



Obř. 7 Zlaté nanokuličky (řluté) a zlaté nanotyčky (oranřové) s konjugovanou anti-EGFR protilátkou inkubované se zdravými (HaCaT) a nádorovými (HSC) epiteliálními buňkami. Měřítko – 10 µm. Převzato z reference ř. 64.

4.2.3 Fluorescence

Zlaté nanokuličky mají vlastní fluorescenci²³, lze je větřinou excitovat vlnovou délkou okolo 530 nm, emitují okolo 610 nm (nezávisí na velikosti). Absorpcí světelného kvanta se excitují povrchové elektrony částice a při přechodu elektronu na základní hladinu se vyzáří foton putující zpět ke zdroji. Zobrazování pomocí fluorescence by mohlo být alternativní metodou k zobrazování pomocí Rayleighova rozptylu. Výhodu oproti jiným fluorescenčním sondám představuje jejich optická stabilita a skutečnost, ře nevyhasínají (nepodléhají „fotobleachingu“)⁶⁵. Zlaté nanočástice jsou schopné do určité vzdálenosti zhášet fluorescenční značky nebo je naopak zesílit a to díky elektromagnetickému poli na povrchu nanočástice částice vyvolaného plazmonovou rezonancí^{20, 23, 30}.

4.2.4 Luminiscence

Zlaté nanočástice vykazují také luminiscenci. Luminiscence spočívá v excitaci elektronu působením jiného záření a posléze v návratu do původního stavu spolu s vyzářením fotonu⁶⁶. Luminiscence je na rozdíl od fluorescence spinově zakázaný přechod a doba jejího trvání je v řádech sekund, u fluorescence v řádech nanosekund⁶⁷. Zlaté nanotyčky jsou schopné jednofotonové i dvoufotonové luminiscence. Při dvoufotonové luminiscenci absorbují zlaté nanotyčky několikrát po sobě fotony⁶⁸. Díky povrchovým plazmonům je luminiscence řádově

silnější a dvoufotonové luminiscence lze například využít při zobrazení nádorové tkáně pomocí cílicí molekuly^{66, 69}.

4.2.5 Fototermální efekt

Fototermální efekt představuje přeměnu světelné energie na tepelnou. Ozáříme-li zlaté nanočástice světelným paprskem s frekvencí odpovídající maximální absorpci jejich SPR, excitují se elektrony a při přechodu na nižší energetickou hladinu se vyzáří tepelná energie. Podstata fototermálního efektu spočívá ve femtosekundové („femtosecond“ – fs; femto – 10^{-15}) tranzici⁷⁰. Fotoexcitace zlatých nanočástic femtosekundovým laserovým pulzem vyústí v zahřátí elektronového oblaku nanočástice, který se následně za dobu pikosekund („picosecond“ – ps, piko – 10^{-12}) ochladí výměnou energie s krystalovou mřížkou nanočástice (elektron-fononové interakce)^{64,70}. Následují fonon-fononové interakce, kdy se vibrační stav molekul přenáší v mřížce a tvoří dojem pohyblivé kvazičástice, tedy fononu⁷⁰. Výměnou energie s okolím v řádu 100 pikosekund se mřížka opět zchladí⁷⁰ a ohřeje okolní tkáň. Nejsilnější zesílení této energie bylo u zlatých nanočástic prokázáno v případě nanotyček⁶⁴. Jejich absorbované světlo má frekvenci blízkou infračervenému záření (NIR)⁶⁶. Díky tomuto efektu přemění nanotyčky až 96% absorbovaných fotonů v tepelné záření neradiačním způsobem¹⁶.

5. Využití zlatých nanočástic v cílené nádorové terapii

5.1 Zobrazovací metody

5.1.1 Detekce molekul

5.1.1.1 Kolorimetrická detekce

Zlaté nanočástice lze použít ke kolorimetrickému stanovení koncentrace analytu. Při přítomnosti analytu dochází k agregaci částic a tím ke změně barvy roztoku⁷¹. Metody pro takové stanovení byly vyvinuty pro různé typy analytů – alkalické kovy, kovy alkalických zemin, těžké kovy, anionty, malé organické molekuly, oligonukleotidy i proteiny a další¹⁹.

5.1.1.2 Elektrochemická detekce

Díky vysoké vodivosti, velkému povrchu a katalytickým schopnostem lze zlaté nanočástice použít v mnoha metodách využívajících elektrochemickou detekci. Příkladem je detekce aktivity kinázy diferenční pulzní voltametrií^{19, 72}.

5.1.1.3 Fluorescenční detekce

Fluorescenční detekce analytů pomocí zlatých nanočástic využívá především schopnosti nanočástic zhaset fluorescenční signál, kdy se emisní spektrum fluorescenční značky shoduje s vlnovou délkou plazmonové rezonance nanočástice. Kvůli silnému elektromagnetickému poli pohltí vyzařované záření samotná částice^{20, 23}. Tohoto jevu se využívá v detekci pomocí metod využívající FRET („Förster resonance energy transfer“)⁷³. Zlatá nanočástice má na sobě navázané fluorescenční značky, které se uvolní v přítomnosti kovových iontů a vyzáří fluorescenční signál. Částice absorbují fotony fluorescenční značky, která je v jejich blízkosti (většinou je na částice navázána)¹⁹. Za přítomnosti stanovovaného analytu dojde k reakci a k uvolnění fluorescenční značky, která se dostane do větší vzdálenosti od částice a začne fluoreskovat¹⁹.

5.1.1.4 Detekce založená na plazmonové rezonanci

Adsorpcí analytu na povrch zlaté nanočástice dochází k posunu absorpčního SPR spektra, který je možné detekovat a díky němu zjistit přítomnost analytu^{19, 74}.

5.1.1.5 Detekce založená na SERS

K zjištění přítomnosti neznámých analytů lze použít techniku povrchem zesíleného Ramanova rozptylu. Dopadne-li na molekulu záření ve formě fotonů, rozptýlené záření má jinou vlnovou délku než původní. Pomocí spekter odraženého záření lze charakterizovat jednotlivé adsorbované analyty na zlaté nanočástice. Díky plazmonové rezonanci elektronů na povrchu částic dojde k několikařádkovému zesílení odraženého záření původního analytu. Toto spektrum se nezmění, pouze zesílí. Tomuto jevu se říká povrchem zesílený Ramanův rozptyl a lze jej využít k detekci různých analytů^{21, 64}. Umožňuje detekovat i jedinou molekulu⁷⁵.

5.1.1.6 Nanotechnologie na chipu

Zlaté nanočástice s připojenými krátkými segmenty DNA lze použít k detekci genetických sekvencí ve vzorku⁷⁶.

5.1.2 Mikroskopické zobrazení

Zlaté nanotyčky se používají jako kontrastní látka, např. ve dvoufotonové luminiscenci, mikroskopii v temném poli, optické koherentní tomografii (OCT) a fotoakustické tomografii. Dvoufotonová luminiscence je založena na emisi fotonů. V mikroskopii v temném poli můžeme vidět objekty díky odraženému světlu, které zviditelňuje struktury buňky i s nanotyčkami. V optické koherentní tomografii snímáme odraz infračerveného paprsku, který je schopen

proniknout až do milimetrové hloubky tkáně²¹. Fotoakustické zobrazování využívá schopnosti tekutin se rozpínat se vzrůstající teplotou. Ozáříme-li částici světelným paprskem, proběhne jejím okolím tepelný puls, tekutina zvětší svůj objem a vytvoří zvukovou vlnu. Vlnu zachytíme mikrofonem²¹. Zlaté nanotyčky lze zacílit na buněčné antigeny pomocí navázané protilátky nebo aptameru⁶⁶. Velmi běžné je zobrazování nanotyček pomocí mikroskopie temného pole, transmisního elektronového mikroskopu (TEM) a rastrovacího elektronového mikroskopu („scanning electron microscope“ – SEM)⁶⁰.

5.2 Fototermální nádorová terapie

Důležitou aplikací zlatých nanotyček je fototermální terapie. Nízkoenergetický laser excituje elektrony zlatých nanočástic, při jejichž přechodu na nižší energetickou hladinu se vyzáří energie ve formě tepla⁶⁴. Tato tepelná energie způsobí ohřátí okolní tkáně na cca 40-50°C (hypertermie), což způsobí nezvratné poškození buněk^{37, 77}. Zahřátí tkáně na teploty v rozmezí od 41°C do 47°C způsobí buněčnou apoptózu, teploty nad 50°C způsobí buněčnou nekrózu⁷⁷. Částice jsou obvykle cílené na nádorové buňky prostřednictvím ligandu nebo se koncentrace zlatých nanočástic v nádoru zvýší díky vyšší penetraci cév nádorové tkáně (mechanismem extravazace)⁷⁸. Zahřejí se ovšem pouze buňky s dostatečným množstvím navázaných zlatých nanočástic, v tomto případě tedy buňky nádorové. Zdravé buňky zůstanou nepoškozené, protože energie potřebná k jejich poškození je dvojnásobná v porovnání s energií nutnou pro poškození buněk s navázanými zlatými nanočásticemi^{64, 78}. Paprsky s nižší hustotou fotonů způsobí lokální hypertermii⁷⁹, paprsky s vyšší hustotou fotonů způsobí přehřátí („superheating“), které vyústí v kavitaci a ve formování zvláštních membránových útvarů způsobených rozvolněním cytoskeletu („cavitation effects“). Tyto útvary vzniknou kvůli zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů a tím způsobené depolymerizaci aktinu⁶⁶. Dalším účinkem světelného záření je termální exploze. Vyzářená tepelná energie je přenesena vodným roztokem do okolí. Zvýšení teploty způsobí výpar ve formě bublinek, které mohou mechanicky poškodit okolní medium v důsledku vzniku tlakových vln⁸⁰.

Fototermální zničení rakovinných buněk lze provést pomocí zlatých nanoslupek⁸¹, nanokuliček⁸², nanotyček⁶⁴, nanoklecí⁸³, nanoježovek³⁶ a dalších struktur. Nanotyčky jsou výhodné zejména díky možnosti vyladění excitační vlnové délky jejich tvarem a velikostí a v nejvyšší efektivitě uvolněné tepelné energie^{64, 84}.

Terapii viditelným světlem lze použít pro nádory na povrchu těla, pro nádory uvnitř organismu lze využít frekvence blízké infračervenému záření (NIR). Tato frekvence odpovídá tzv. biologickému oknu, kdy záření neinteraguje s tkáněmi^{66, 78}. Záření může proniknout

do hloubky až 10 cm díky nízkému rozptylu a nízké absorpci buněčnými chromofory, vodou a ostatními molekulami^{15, 66, 78, 84}.

Cílení na nádorové buňky může být provedeno dvěma způsoby, pasivním a aktivním⁸⁵. Pasivní cílení vychází z předpokladu, že kapiláry nádorových buněk mají širší otvory než v jiných tkáních. V nádorové tkáni tedy dojde k akumulaci nanočástic, které by kapilárami zdravé tkáně neprošly (zvýšená propustnost a zadržování nádorové tkáně, „enhanced permeability and retention effect“ – EPR efekt)^{78, 85}. Tato představa byla využita ve fototermálním odstranění nádoru u myši⁸⁶. Fyziologickou charakteristikou rakovinných buněk je také zvýšená metabolická aktivita, která způsobuje hypoxii⁸⁷. Hypoxie navodí anaerobní metabolismus produkující kyselinu mléčnou a tedy i snížené pH^{88, 87}. Zlaté nanoslupky nesoucí účinnou látku jsou fagocytovány monocyty nebo makrofágy, které v tkáni pevného nádoru doputují chemotaxí až do hypoxického centra, kde je možno je ozářit NIR laserem⁸⁸. Aktivní cílení využívá specifické vazby konjugovaných nanočástic na rakovinné markery pomocí interakcí, např. lektin-sacharid, ligand-receptor, prostřednictvím vazby protilátky na antigen nebo vazby aptameru na různé buněčné struktury^{89, 85}. Různé ligandy (protilátky, oligopeptidy, polynenasycené mastné kyseliny, kyselina listová (folát), kyselina hyaluronová, deltorfíny) se váží na zlaté nanočástice kovalentní i nekovalentní vazbou^{85, 90, 91, 87}.

Aktivní cílení na nádorové buňky můžeme dle strategie rozdělit do dvou skupin – cílení na nádorové buňky a cílení na nádorový endotel⁹². Rychlý růst nádorových buněk vyžaduje také přísun mnoha živin a vitamínů⁸⁷. Proto nádorové buňky exprimují mnoho receptorů ve zvýšeném množství, které lze využít k zacílení ligandů⁸⁷. Cílem navázání přímo na buňky bývá receptor, který se po nasednutí ligandu internalizuje do buňky receptorově zprostředkovanou endocytózou⁹². Mezi tyto receptory patří transferinový receptor a receptor kyseliny listové, glykoproteiny exprimované na povrchu buněk a receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR)⁹². Zničením cévního endotelu nádorové tkáně lze současně usmrtit nádorové buňky kvůli nedostatku kyslíku a živin⁹². Jako hlavní cílové receptory endotelu se používají receptor pro cévní endotelový růstový faktor („vascular endothelial growth factor“ – VEGF), integrin $\alpha_v\beta_3$, vaskulární intercelulární adhezivní molekula-1 („vascular cell adhesion molecule-1“ - VCAM-1) a matrixové metaloproteázy („matrix metalloproteinase“ – MMP)⁹².

Úspěšné využití fototermální terapie *in vitro* i *in vivo* demonstrovalo již několik vědeckých skupin. Lin a kol. označili CD8+ T-lymfocyty *in vitro* pomocí zlatých nanokuliček s konjugovanou protilátkou proti CD8 receptoru a následně ozářili buňky pulzním laserem o frekvenci viditelného záření⁹³. Zlaté nanoklece s navázanou protilátkou HER2 vázající se na EGFR2 receptor v SK-BR-3 epiteliálních buňkách rakoviny prsu ozářila skupina Xia a kol.³⁵. Halas a kol. využili k fototermální terapii PEGylované zlaté nanoslupky s křemíkovým jádrem inkubované také s buněčnou linií SK-BR-3 *in vitro* a ozářili je laserem o frekvenci v pásmu NIR⁸¹.

Demonstrovali i úspěšnou terapii *in vivo* pomocí PEGylovaných nanoslupek akumulovaných v podkožním nádoru díky EPR efektu ozářených laserem o frekvenci NIR⁸⁶. El-Sayed a kol. použili kontinuálního paprsku NIR cíleného na zlaté nanotyčky a nanokuličky s konjugovanou protilátkou proti receptoru EGFR ke zničení nádorových orálních epitelálních buněk HOC 313 a HSC 3 *in vitro*⁶⁴. Koncentrace nanočástic na maligních buňkách byla zhruba dvojnásobná v porovnání s koncentrací nanočástic na zdravých buňkách, nevratně se poškodily tedy jen nádorové buňky⁶⁴. Terapie pomocí anti-EGFR je slibná, protože mnoho nádorů exprimuje na svém povrchu EGFR ve zvýšeném množství⁶⁴. Skupina Lu a kol. demonstrovala úspěšné využití několikanásobného cílení na prostatický membránový antigen (PSMA) prostatických rakovinných buněk LNCaP pomocí zvláštního typu zlatých nanočástic s různými výběžky, tzv. nano-popcorn, na které byl navázán RNA-aptamer A9 proti PSMA a anti-PSMA protilátka³⁹. Dvojitě cílení zvyšuje specifitu, protože receptory, na které cílíme, jsou exprimovány i na zdravých buňkách⁸⁹.

Fototermální odpověď „popcornových“ nanočástic byla o trochu lepší než srovnatelná odpověď zlatých nanotyček³⁹. Beqa a kol. použili k fototermální terapii zlaté nano-popcorn částice navázané na uhlíkové nanotrubičky typu SWCNT („single wall carbon nanotube“) ³⁸. Zlaté nanočástice na sobě měly navázaný DNA aptamer S6 cílící na buňky SK-BR-3 rakoviny prsu³⁸. Oba typy nano-popcornových částic byly ozářeny paprskem NIR^{38,39}.

5.3 Doručování léčiv

Cílení a doručování léčiv je hlavním problémem při výrobě farmak, protože řada protinádorových látek vykazuje toxicitu i pro nenádorové buňky, která by se dala potlačit specifickým cílením na nádorové buňky. Doručovací systémy vytvořené na základě nanotechnologií by mohly tyto problémy vyřešit. Jednou z možností je vytvoření kapslí z nanopolymerů, které by vypouštěly léčiva v konkrétním množství v definovaném prostředí, čímž by se zvýšila pravděpodobnost doručení léčiva přímo do nádorové tkáně⁷⁶. Obal z nanočástic by také mohl být schopen chránit léčivo před nepříznivým prostředím v trávicím traktu, kvůli němuž v současné době není možné podávat léky peptidové nebo proteinové povahy perorální cestou⁷⁶.

Další možností je aplikace nanotechnologií při doručování antigenů při vakcinaci, příjem částic dendritickými buňkami a makrofágy⁹⁴. Tyto výsledky umožňují i použití při selektivní aktivaci imunitní odpovědi regulované T buňkami⁷⁶.

Díky zacílení až do místa účinku se redukuje vedlejší efekty a zvyšuje se terapeutická efektivita léčiva⁹¹. Po zacílení modifikované nanočástice následuje uvolnění aktivní formy léčiva, k selektivnímu uvolňování léčiv vede např. snížené pH⁸⁷. Dále lze dodat zlaté nanotyčky

s konjugovaným transferinem a s léčivem přímo do nádoru, čímž se zvýší pravděpodobnost příjmu do buňky⁹¹. Látky nekovalentně asociované s polymerem se cíleně uvolňují i disociací díky membránově zprostředkované difuze do buňky⁹⁵. Nanočástice zůstane mimo buňku, což umožňuje výhodné použití při pasivním cílení⁹⁵. Jiným typem je selektivní uvolnění látky na místě určení díky zvýšení teploty fototermálním efektem, např. u nukleových kyselin⁶³. Také je možné pokrýt nanotyčky termosenzitivním hydrogelem s vnesenou látkou, která se po zahřátí uvolní⁶³. Další možnost představuje tzv. fotodynamická terapie využívající k indukci apoptózy nebo nekrózy reaktivní formy kyslíku (ROS – „reactive oxygen species“)⁹⁵. Účinnou látku (ftalocyanin) lze inkorporovat do vrstvy PEGu na zlatých nanočásticích⁹⁵. Kromě využití fototermálního efektu lze látky kontrolovaně uvolnit změnou pH⁹⁵, pomocí glutathionu (jakožto surfaktantu s thiolovou skupinou, který vytěsňuje původní látku - „ligand exchange reaction“⁹⁶), enzymů (fosfodiesteráza štěpící fosfátový linker⁹⁵), světelného záření (ligand štěpitelný světelným zářením, na který je navázaná účinná látka⁹⁵) apod.⁶³. Díky výměně ligandů při reakci s glutathionem je možné dopravit tímto způsobem do buňky DNA pro transfekci buněk⁹⁵.

Konkrétně byly zlaté nanočástice aplikovány jako nosiče léčiv v laboratorních podmínkách u platinových konjugátů a konjugátů s malými organickými molekulami⁹⁷. Díky konjugaci na zlaté nanočástice se redukovala nespecifická cytotoxicita způsobená platinou, např. u oxaliplatin⁹⁸ nebo karboplatin⁹¹. Jako příklad lze zmínit konjugáty zlatých nanočástic s paclitaxelem, doxorubicinem, tamoxifenem, polypeptidem Kahalilidem F, 5-fluorouracilem, daunorubicinem a etoposidem^{91, 97, 99}.

Pro aplikaci v budoucnosti bude možné pravděpodobně využít i zlaté nanoklece, účinnou látku lze inkorporovat do vnitřního prostoru nebo ji lze navázat na povrch^{35, 100}.

V klinických studiích byly testovány zlaté nanočástice s adsorbovaným faktorem nádorové nekrózy (TNF - „tumor necrosis factor“), tedy cytokinem způsobujícím apoptózu, a s různými léčivy^{89, 101}. V prodeji jsou již pod názvem Verigene platform zlaté nanočástice s konjugovanou DNA pro diagnózu infekce kmenem *Staphylococcus Aureus* rezistentního na methicilin od firmy Nanosphere Triton BioSystems⁹¹.

5.4 Další medicínské přístupy

Nanotechnologie by mohla být prostředkem pro doručení DNA i při genové terapii. Byly popsány a testovány vektory založené na nanočásticích, které přenášely plazmidovou DNA¹⁰². Jako nástroj při léčbě rakoviny lze použít liposomy o velikosti v řádech nanometrů, složené např. z kladně nabitých lipidů a cholesterolu, které pronikají do tkání lépe než běžně používané prostředky¹⁰³. Transferin (Tf)-lipoplex byl použit jako vektor pro doručení genu proteinu p53

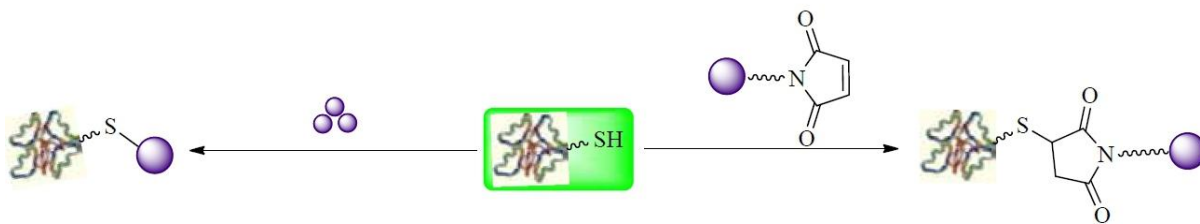
a spolu s chemoterapií a radioterapií vykazoval dobré výsledky. Tímto způsobem by mohly být využity i zlaté nanočástice.

6. Modifikace zlatých nanočástic pro cílenou terapii nádorových onemocnění

Cílicími molekulami navázanými na zlaté nanočástice mohou být léčiva nebo monoklonální protilátky, příp. jejich fragmenty, peptidy, proteiny (lidský sérový albumin - HSA, „human serum albumin“, trasferin a lektiny), aptamery a malé molekuly (kyselina listová a biotin)^{87, 89, 100}. Většina studií se zabývá cílením pomocí protilátek. Moderním trendem jsou aptamery. Aptamery jsou peptidy nebo jednovláknové oligonukleotidové sekvence (RNA, ssDNA) o velikosti v rozmezí přibližně od 25 do 90 bazí, které se vážou na cílovou molekulu s velkou afinitou a specifitou díky terciální struktuře¹⁰⁴. Lze jich využít místo protilátek a jejich výhodou v porovnání s protilátkami jsou vysoká stabilita, snadno reprodukovatelná syntéza, nízká imunogenicita a rozpoznání širšího spektra cílových molekul než u protilátek¹⁰⁴.

Zlaté nanočástice lze modifikovat cílicí molekulou pomocí slabších nekovalentních vazeb založených na elektrostatických interakcích, hydrofobním efektu nebo vodíkových vazbách, čehož lze využít např. při uvolňování léčiv⁹⁷. K nekovalentním navázáním patří i inkorporace látky do monovrstvy polymeru prostřednictvím van der Waalsových sil⁹⁵. Samotná adsorpce proteinů na povrch zlatých nanočástic ovšem nestačí ke stabilizaci zlatých nanočástic, které jsou nestabilní ve fyziologických roztocích, může dojít i ke kompetici se sérovými proteiny⁸⁹.

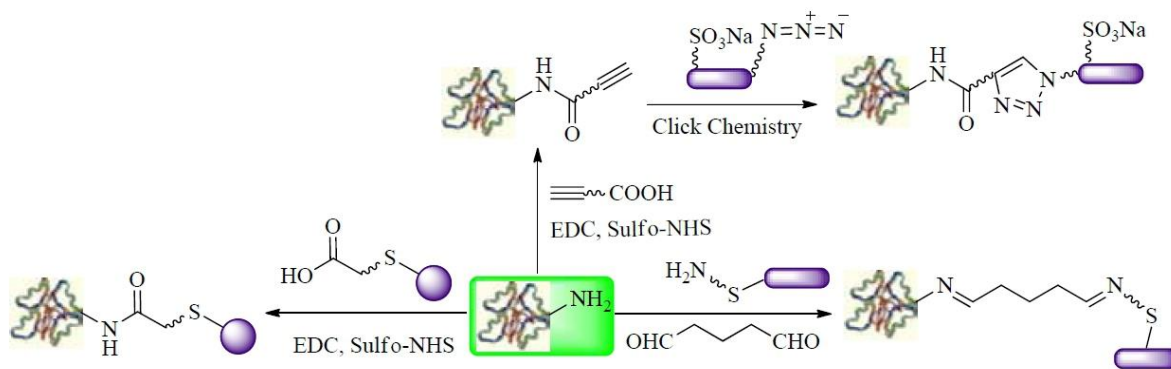
Silnější a stabilnější interakci poskytuje vazba kovalentní. Výhodou protilátek, aptamerů a dalších cílicích molekul zmíněných výše jsou jejich funkční skupiny (aminová, thiolová, karboxylová a alkoholová), které lze využít ke konjugačním reakcím⁸⁹. Kvůli zvýšení cirkulační doby a snížení imunogenicity a cytotoxicity se využívá vazby cílicích molekul přes polymerové linkery, např. PEG⁸⁹. Tyto linkery mají thiolovou skupinu, kterou se vážou na povrch zlatých nanočástic, a funkční skupinu na opačné straně molekuly, přes kterou se naváže cílicí molekula⁸⁹. Jednou z nejvyužívanějších metod navázání molekul na zlaté nanočástice je vazba přes thiolovou skupinu⁹⁷. Thiolová skupina cílicích molekul se může vázat buď přímo na povrch zlaté nanočástice, nebo na dvojnou vazbu imidu kyseliny maleinové navázané na PEGu na zlatých nanočásticích (obr. 8)⁸⁹. Tato vazba se používá i pro navázání aptamerů, které jsou většinou vázány přes linker s thiolovou skupinou^{105, 106, 107}.



Obr. 8 Konjugace protilátek na zlaté nanočástice přes thiolovou skupinu. Přepřacováno z reference č. 89.

Aminové skupiny protilátky lze navázat na zlaté nanočástice pomocí několika reakcí⁸⁹. První z reakcí je využití příčně vazebných činidel 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS), při které se karboxylová skupina aktivuje reakcí s EDC a NHS a následně se vytvoří amidová vazba^{51,108}. Této reakce se využívá i ke konjugaci aptamerů¹⁰⁹. Reakce lze využít s obrácenými skupinami – karboxylovou skupinou protilátky a aminovou skupinou navázanou na ligandu na zlaté nanočástic⁸⁹.

Druhou vysoce účinnou metodou navázání aminové skupiny je azid-alkyn cykloadice tzv. „klik chemie“. Alkylová skupina látky vázané na nanočástice zreaguje s azidovou skupinou za vzniku triazolového kruhu, přičemž sulfonát brání agregaci zlatých nanočástic^{66,108}. Třetí je metoda propojení pomocí glutaraldehydového linkeru. Aminogrupy linkeru vzájemně propojí aminogrupinu modifikovaného polymeru zlaté nanočástice a aminogrupinu protilátky (obr. 9)⁸⁹.



Obr. 9 Konjugace protilátek na zlaté nanočástice přes aminovou skupinu. Vlevo propojení pomocí amidové vazby, nahoře azid-alkyn cykloadice a vpravo připojení prostřednictvím glutaraldehydu. Přepřacováno z reference č. 89.

Vlastní cílení pomocí zlatých nanočástic s protilátkami k PSMA bylo demonstrováno v případech^{110,111}, na pankreatické buňky pomocí F19 protilátky v případech^{51,112}, s protilátkou anti-EGFR v případech^{68,113,114} a v případě buněčné line SKBR3 rakoviny prsu s protilátkou herceptin¹¹⁵. Konjugáty zlatých nanočástic s protilátkami byly použity i k imunodetekci („immunoassay“)^{116,117}.

V praxi se kléčbě makulární degenerace využívá Macugen, RNA aptamer s navázaným PEGem specifický k VEGF¹¹⁸. Cílení na nádorové buňky, jejich zobrazení i terapie byly zkoumány v případě aptameru A10 proti PSMA¹⁰⁷.

7. Cytotoxicita a genotoxicita zlatých nanočástic

Velmi diskutovaným tématem předurčujícím biomedicínské využití zlatých nanočástic je jejich cytotoxicita a genotoxicita. Při interakci s buňkami jsou částice pohlcovány, v buňce je nalezneme v endozomálních kompartmentech, avšak nevyskytují se v jádře (pouze v případě s připojením jaderného lokalizačního signálu, NLS – „nuclear localization signal“)^{60, 63, 119, 120}. Modifikací zlatých nanotyček PEGem lze snížit nespecifickou adsorpci proteinů^{63, 121}. Zlaté nanočástice obalené v PEGu skoro nevstupují do buněk, zatímco částice obalené v MTABu vstupují do buněk hojně^{60, 121}. Pohlcení buňkami závisí na různých povrchových ligandech zlatých nanotyček, na tvaru a velikosti zlatých nanočástic a na jejich náboji^{60, 63, 122}. Kuličky se inkorporují lépe než tyčinky, menší částice se inkorporují lépe než větší¹²². Částice menší než 100 nm s konjugovaným transferinem vstupují do buňky receptorově zprostředkovanou klatrinovou endocytózou, ale přesný mechanismus pohlcování není znám^{63, 121, 122}. Bylo prokázáno, že malé nanokuličky (o průměru 5 nm) s hydrofobním i záporně nabitým ligandem pronikaly do buňky přímo¹²³. Ve studii zkoumající pohlcování zlatých nanočástic se zjistilo, že zlaté nanočástice jsou i exocytovány a to úměrně své velikosti (malé nanočástice veliké 15 nm se exocytovaly rychleji než částice velké 70 nm)¹²².

Zlaté nanočástice interagují s živným médiem buněk, různé molekuly adherují na jejich povrch (např. proteiny) a mohou tím změnit i jejich náboj⁶³. Nespecifická adsorpce krevních proteinů je zodpovědná za rychlou eliminaci z krve retikuloendoteliálním systémem (RES)⁶³. Některé polymery, převážně PEG, se proto využívají, aby zabránily adsorpci proteinů a tím rychlému vyčištění nanočástic z krve⁶³.

Některé zlaté nanočástice mohou vést k poškození DNA způsobeného oxidačním stresem, např. chromozomové zlomy, poškození DNA ovlivňujícím proliferaci, reparaci DNA a změny související se stabilitou DNA^{124, 125}.

Zlaté nanočástice byly dlouho pokládány za netoxické, avšak v posledních letech se objevují důkazy, které tuto teorii vyvracejí. U buněk poškozených různými zlatými nanočásticemi se objevila apoptóza i nekróza¹²⁶. U akumulace zlatých nanotyček v orgánech myši se po dvou týdnech neprokázaly žádné vedlejší efekty a analýza tkání ukázala, že v buňkách nepodléhají oxidaci na ionty⁶³. Ovšem studie toxicity zlatých nanokuliček o různých velikostech pokrytých citrátem na myším modelu ukázala, že kuličky od cca 20 do 40 nm způsobily škody v játrech, slezině a plicích, přestože *in vitro* nevykazovaly cytotoxicitu^{127, 128}. Toxicita závisí

i na surfaktantech – zlaté nanočástice s CTABem vykazují toxické působení zejména kvůli volnému CTABu¹²⁸. Kladně nabitě zlaté nanočástice způsobují hemolýzu a srážení krve, záporně nabitě nanočástice se ukázaly spíše netoxické¹.

8. Závěr

Zlaté nanočástice lze syntetizovat v nepřeberném množství velikostí a tvarů, většina publikací se však zatím soustředila na zlaté nanokuličky, nanotyčky a nanoslupky. Cílená terapie pomocí zlatých nanočástic se jeví nadějně převážně ve dvou biomedicínských oblastech – v doručování léčiv a při fototermální terapii. Nejvhodnějším surfaktantem se ukázal PEG, který je netoxický a lze jej snadno modifikovat funkčními skupinami. Zatímco částice obalené v CTABu a v MTABu buňky pohlcují (ale CTAB je pro buňky toxický), částice obalené PEGem buňky pohlcují minimálně. Cílení zlatých nanočástic pomocí konjugovaných ligandů se zatím ukázalo jako dostatečně spolehlivé a specifické, ve fázi výzkumu je použití několika ligandů zároveň, což by ještě zvýšilo specifitu cílení. Zatímco se většina studií soustředí na cílení pomocí protilátek, aptamery jako takové nejsou příliš rozšířené. Jejich potenciál leží ve stabilitě a vazebných schopnostech, čímž by se mohly stát alternativou k protilátkám. Konjugovat zlaté nanočástice s cílicími molekulami lze několika technikami. Oblíbenou technikou je adsorpce síry na povrch zlaté nanočástice. Silnější kovalentní vazbu ovšem představuje amidová vazba vytvořená díky příčně vazebným činidlům nebo azid-alkynové cykloadice. Ve fototermální terapii lze aplikovat různé tvary částic, výzkum se však zatím soustředil převážně na nanotyčky a nanoslupky. Prostřednictvím zlatých nanotyček bylo prokázáno zničení buněk *in vitro* i *in vivo*, mohou se tedy snad v budoucnu uplatnit i v klinické praxi. V klinických testech jsou zlaté nanočástice fungující jako nosiče léčiv a díky rapidnímu rozvoji nanotechnologií lze doufat i v klinické testy pro fototermální terapii. Spolehlivě bylo prokázáno použití zlatých nanočástic v diagnostických technikách.

Zlaté nanočástice jsou zřejmě pohlcovány buňkami mechanismem klatrinové endocytózy, ovšem jejich chování v buňce není příliš známé. Významnou neprozkoumanou oblastí je toxicita zlatých nanočástic v organismu. Výsledky od mnoha skupin se liší v závislosti na použitém tvaru, velikosti i surfaktantech. Výzkum prokázal, že ač se některé zlaté nanočástice jeví *in vitro* jako netoxické, *in vivo* prokazovaly značnou toxicitu s vysokou úmrtností na myším modelu. Proto je nezbytné podrobně prostudovat dlouhodobé chování konjugovaných zlatých nanočástic v organismu – zda jsou buňky schopné je exocytovat a v jaké míře, jak se změnil expresní profil buňky a zda reagují buňky na zlaté nanočástice jako na stresový faktor.

9. Bibliografie:

1. Hošek, J. *Úvod do nanotechnologie*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2010. 6, 116, 157, 164. ISBN: 978-80-01-04555-8.
2. Jamieson, T. *et al.* Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* **28**, 4717–4732 (2007).
3. Král, V. *et al.* Nanomedicína - současný stav a perspektivy: velký potenciál. *Chemické listy* **100**, 4–9 (2006).
4. McNeil, S. E. Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 585–594 (2005).
5. Jandačka, P. *et al.* Velikost povrchu partikulárních látek. *Chemické listy* **105**, 146–155 (2011).
6. Peigney, A., Laurent, C., Flahaut, E., Bacsa, R. R. & Rousset, A. Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon* **39**, 507–514 (2001).
7. Rosi, N. L. & Mirkin, C. A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews* **105**, 1547–1562 (2005).
8. Salamanca-Buentello, F. *et al.* Nanotechnology and the Developing World. *PLOS Medicine* **2**, 383–386 (2005).
9. Lockman, P. R. & Mumper, R. J. Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **28**, 1–13 (2002).
10. Kreuter, J., Alyautdin, R. N., Kharkevich, D. A. & Ivanov, A. A. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Research* **674**, 171–174 (1995).
11. Akagi, T., Higashi, M., Kaneko, T., Kida, T. & Akashi, M. Hydrolytic and enzymatic degradation of nanoparticles based on amphiphilic poly(γ -glutamic acid)-graft-L-phenylalanine copolymers. *Biomacromolecules* **7**, 297–303 (2006).
12. Unger, G. *Nanoparticle encapsulation system and method*. IPC: C12N 15/88; A61K 9/127; A61K 9/51; B01F 3/00; B01J 13/00. U.S. Patent. US 6632671 B2, 2003-10-14.
13. Moghimi, S. M. & Szebeni, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research* **42**, 463–478 (2003).
14. Raschke, G. *et al.* Biomolecular Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering. *Nano Letters* **3**, 935–938 (2003).
15. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology* **19**, 316–317 (2001).
16. Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry. B* **110**, 7238–7248 (2006).
17. Link, S. & El-Sayed, M. A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry* **54**, 331–366 (2003).
18. Su, K.-H. *et al.* Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Letters* **3**, 1087–1090 (2003).
19. Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews* **112**, 2739–2779 (2012).

20. Daniel, M.-C. & Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews* **104**, 293–346 (2004).
21. Sperling, R. A., Gil, P. R., Zhang, F., Zanella, M. & Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **37**, 1896–1908 (2008).
22. Chen, Y. *et al.* Core/shell structured hollow mesoporous nanocapsules: a potential platform for simultaneous cell imaging and anticancer drug delivery. *ACS Nano* **4**, 6001–6013 (2010).
23. Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews* **35**, 209–217 (2006).
24. Okumura, M., Nakamura, S., Tsubota, S., Nakamura, T. & Azuma, M. Chemical vapor deposition of gold on Al₂O₃, SiO₂, and TiO₂ for the oxidation of CO and of H₂. *Catalysis Letters* **51**, 53–58 (1998).
25. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science* **241**, 20–22 (1973).
26. Frens, G. Particle size and sol stability in metal colloids. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **250**, 736–741 (1972).
27. Kimling, J. *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry. B* **110**, 15700–15707 (2006).
28. Marradi, M., Martín-Lomas, M. & Penadés, S. Glyconanoparticles polyvalent tools to study carbohydrate-based interactions. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry* **64**, 211–290 (2010).
29. Grzelczak, M., Perez-Juste, J., Mulvaney, P. & Liz-Marzan, L. M. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews* **37**, 1783–1791 (2008).
30. Murphy, C. J. *et al.* Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *The Journal of Physical Chemistry. B* **109**, 13857–13870 (2005).
31. Jana, N. R., Gearheart, L. & Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry. B* **105**, 4065–4067 (2001).
32. Nikoobakht, B. & El-sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* **15**, 1957–1962 (2003).
33. Murphy, C. J. *et al.* The Many Faces of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **1**, 2867–2875 (2010).
34. Liu, M. & Guyot-Sionnest, P. Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. *The Journal of Physical Chemistry. B* **109**, 22192–22200 (2005).
35. Skrabalak, S. E. *et al.* Gold Nanocages for Biomedical Applications. *Advanced Materials* **19**, 3177–3184 (2007).
36. Liu, R.-S. *et al.* Highly efficient urchin-like bimetallic nanoparticles for photothermal cancer therapy. *SPIE Newsroom* 2–4 (2013).doi:10.1117/2.1201301.004676
37. Loo, C. *et al.* Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment* **3**, 33–40 (2004).
38. Beqa, L., Fan, Z., Singh, A. K., Senapati, D. & Ray, P. C. Gold nano-popcorn attached SWCNT hybrid nanomaterial for targeted diagnosis and photothermal therapy of human breast cancer cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* **3**, 3316–3324 (2011).

39. Lu, W. *et al.* Gold nano-popcorn-based targeted diagnosis, nanotherapy treatment, and in situ monitoring of photothermal therapy response of prostate cancer cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 18103–18114 (2010).
40. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications* 801–802 (1994).
41. Gold, M. Communications A Simple Large-Scale Synthesis of Nearly with Exchangeable Surfactants. *Chemistry of Materials* **16**, 801–802 (2004).
42. Giersig, M. & Mulvaney, P. Preparation of Ordered Colloid Monolayers by Electrophoretic Deposition. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* 3408–3413 (1993).
43. Bain, C. D., Biebuyck, H. A. & Whitesides, G. M. Comparison of self-assembled monolayers on gold: coadsorption of thiols and disulfides. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **5**, 723–727 (1989).
44. Pakiari, A. H. & Jamshidi, Z. Nature and strength of M-S bonds (m = Au, Ag, and Cu) in binary alloy gold clusters. *The Journal of Physical Chemistry. A* **114**, 9212–9221 (2010).
45. Nuzzo, R. G., Zegarski, B. R. & Dubois, L. H. Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **109**, 733–740 (1987).
46. Whitesides, G. M., Mathias, J. P. & Seto, C. T. Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science* **254**, 1312–1319 (1991).
47. Templeton, A. C., Wuelfing, W. P. & Murray, R. W. Monolayer-Protected Cluster Molecules Characterization of MPCs. *Accounts of Chemical Research* **33**, 27–36 (2000).
48. Templeton, A. C. *et al.* Reactivity of Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules: Steric Effects. *Journal of the American Chemical Society* **7863**, 1906–1911 (1998).
49. Panáček, A., Kvítek, L. & Klečková, M. Výuka chemie: koloidní chemie v praktických soustavách. *Chemické listy* **98**, 39–41 (2004).
50. Kanaras, A. G., Kamounah, F. S., Schaumburg, K., Kiely, C. J. & Brust, M. Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters. *Chemical Communications* 2294–2295 (2002).
51. Eck, W. *et al.* PEGylated gold nanoparticles conjugated to monoclonal F19 antibodies as targeted labeling agents for human pancreatic carcinoma tissue. *ACS Nano* **2**, 2263–2272 (2008).
52. Mallidi, S. *et al.* Multiwavelength photoacoustic imaging and plasmon resonance coupling of gold nanoparticles for selective detection of cancer. *Nano Letters* **9**, 2825–31 (2009).
53. Von Maltzahn, G. *et al.* Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. *Cancer Research* **69**, 3892–900 (2009).
54. Zhang, G. *et al.* Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials* **30**, 1928–1936 (2009).
55. Boca, S. C. & Astilean, S. Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly(ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags. *Nanotechnology* **21**, 1–8 (2010).
56. Lankveld, D. P. K. *et al.* Blood clearance and tissue distribution of PEGylated and non-PEGylated gold nanorods after intravenous administration in rats. *Nanomedicine* **6**, 339–349 (2011).

57. Smith, D. K. & Korgel, B. A. The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **24**, 644–649 (2008).
58. Nikoobakht, B. & El-sayed, M. A. Evidence for Bilayer Assembly of Cationic Surfactants on the Surface of Gold Nanorods. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **17**, 6368–6374 (2001).
59. Niidome, T. *et al.* PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* **114**, 343–347 (2006).
60. Vigdeman, L., Manna, P. & Zubarev, E. R. Quantitative Replacement of Cetyl Trimethylammonium Bromide by Cationic Thiol Ligands on the Surface of Gold Nanorods and Their Extremely Large Uptake by Cancer Cells. *Angewandte Chemie* **124**, 660–665 (2012).
61. Englebienne, P., Hoonacker, A. Van & Verhas, M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* **17**, 255–273 (2003).
62. Patskovsky, S., Kabashin, A. V, Meunier, M. & Luong, J. H. T. Properties and sensing characteristics of surface-plasmon resonance in infrared light. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision* **20**, 1644–1650 (2003).
63. Alkilany, A. M., Thompson, L. B., Boulos, S. P., Sisco, P. N. & Murphy, C. J. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 190–199 (2012).
64. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 2115–2120 (2006).
65. He, H., Xie, C. & Ren, J. Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Analytical Chemistry* **80**, 5951–5957 (2008).
66. Tong, L., Wei, Q., Wei, A. & Cheng, J.-X. Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects. *Photochemistry and Photobiology* **85**, 21–32 (2009).
67. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Druhé vydání. Ostrava: nakl. Pavel Klouda, 2003. 82. ISBN-10: 80-86369-07-2.
68. Durr, N. J. *et al.* Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Letters* **7**, 941–945 (2007).
69. Cai, W., Gao, T., Hong, H. & Sun, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications* **2008:1**, 17–32 (2008).
70. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science* **23**, 217–228 (2008).
71. Srivastava, S., Frankamp, B. L. & Rotello, V. M. Controlled Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles Self-Assembled with PAMAM Dendrimers. *Chemistry of Materials* **17**, 487–490 (2005).
72. Kerman, K., Chikae, M., Yamamura, S. & Tamiya, E. Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation. *Analytica Chimica Acta* **588**, 26–33 (2007).
73. Sapsford, K. E., Berti, L. & Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations. *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 4562–4589 (2006).

74. Anker, J. N., Hall, W. P., Nilam, C., Zhao, J. & Van, P. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials* **7**, 442–453 (2008).
75. Nie, S. & Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **275**, 1102–1106 (1997).
76. Sahoo, S. K., Parveen, S. & Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**, 20–31 (2007).
77. Cherukuri, P., Glazer, E. S. & Curley, S. a Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 339–345 (2010).
78. Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Accounts of Chemical Research* **41**, 1578–1586 (2008).
79. Pissuwan, D., Valenzuela, S. M. & Cortie, M. B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends in Biotechnology* **24**, 62–67 (2006).
80. Rivera Gil, P., Hühn, D., Del Mercato, L. L., Sasse, D. & Parak, W. J. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society* **62**, 115–125 (2010).
81. Hirsch, L. R. *et al.* Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13549–13554 (2003).
82. Elsayed, I., Huang, X. & Elsayed, M. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Letters* **239**, 129–135 (2006).
83. Hu, M. *et al.* Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews* **35**, 1084–94 (2006).
84. Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Au nanoparticles target cancer. *Nano Today* **2**, 18–29 (2007).
85. Huang, X., Neretina, S. & El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials* **21**, 4880–4910 (2009).
86. O’Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D. & West, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer letters* **209**, 171–176 (2004).
87. Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L. V & Ojima, I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & medicinal chemistry* **13**, 5043–5054 (2005).
88. Choi, M.-R. *et al.* A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Letters* **7**, 3759–3765 (2007).
89. Jiao, P. F., Zhou, H. Y., Chen, L. X. & Yan, B. Cancer-targeting multifunctionalized gold nanoparticles in imaging and therapy. *Current Medicinal Chemistry* **18**, 2086–2102 (2011).
90. Black, K. C. *et al.* Gold Nanorods Targeted to Delta Opioid Receptor: Plasmon-Resonant Contrast and Photothermal Agents. *Molecular Imaging* **7**, 50–57 (2008).
91. Parveen, S., Misra, R. & Sahoo, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **8**, 147–166 (2012).
92. Danhier, F., Feron, O. & Pr eat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* **148**, 135–146 (2010).

93. Pitsillides, C. M., Joe, E. K., Wei, X., Anderson, R. R. & Lin, C. P. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophysical Journal* **84**, 4023–4032 (2003).
94. Zhengrong, C. & Mumper, R. J. Microparticles and nanoparticles as delivery systems for DNA vaccines. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **20**, 103–137 (2003).
95. Kim, C., Ghosh, P. & Rotello, V. M. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale* **1**, 61–67 (2009).
96. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1307–1315 (2008).
97. Vigderman, L. & Zubarev, E. R. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2012).doi:10.1016/j.addr.2012.05.004
98. Brown, S. D. *et al.* Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 4678–4684 (2010).
99. Li, J. *et al.* The enhancement effect of gold nanoparticles in drug delivery and as biomarkers of drug-resistant cancer cells. *ChemMedChem* **2**, 374–378 (2007).
100. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* **2**, 751–760 (2007).
101. Paciotti, G. F., Kingston, D. G. I. & Tamarkin, L. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Development Research* **67**, 47–54 (2006).
102. Davis, S. S. Biomedical applications of nanotechnology - implications for drug targeting and gene therapy. *Trends in Biotechnology* **15**, 217–224 (1997).
103. Xu, L., Pirollo, K. F. & Chang, E. H. Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society* **74**, 115–128 (2001).
104. Song, K. M., Lee, S. & Ban, C. Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel, Switzerland)* **12**, 612–631 (2012).
105. Wang, C.-H., Huang, Y.-F. & Yeh, C.-K. Aptamer-conjugated nanobubbles for targeted ultrasound molecular imaging. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **27**, 6971–6976 (2011).
106. Da Pieve, C., Williams, P., Haddleton, D. M., Palmer, R. M. J. & Missailidis, S. Modification of thiol functionalized aptamers by conjugation of synthetic polymers. *Bioconjugate Chemistry* **21**, 169–174 (2010).
107. Kim, D., Jeong, Y. Y. & Jon, S. A Drug-Loaded Aptamer–Gold Nanoparticle Bioconjugate for Combined CT Imaging and Therapy of Prostate Cancer. *ACS Nano* **4**, 3689–3696 (2010).
108. Gole, A. & Murphy, C. J. Azide-derivatized gold nanorods: functional materials for “click” chemistry. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **24**, 266–272 (2008).
109. Farokhzad, O. C. Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. *Cancer Research* **64**, 7668–7672 (2004).
110. Bander, N. H. *et al.* Targeted Systemic Therapy of Prostate Cancer With a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen. *Seminars in Oncology* **30**, 667–677 (2003).
111. Choi, J.-W. *et al.* Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle–antibody complex. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **313-314**, 655–659 (2008).

112. Craig, G., Allen, P. & Mason, M. Synthesis, Characterization, and Functionalization of Gold Nanoparticles for Cancer Imaging. *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols* **624**, 177–193 (2010).
113. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: a potential cancer diagnostic marker. *Nano Letters* **7**, 1591–1597 (2007).
114. El-Sayed, I. H., Huang, X. & El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano letters* **5**, 829–834 (2005).
115. Eghtedari, M., Liopo, A. V., Copland, J. A., Oraevsky, A. A. & Motamedi, M. Engineering of Hetero-Functional Gold Nanorods for the in vivo Molecular Targeting of Breast Cancer Cells 2009. *Nano Letters* **9**, 287–291 (2009).
116. Liu, X. *et al.* A One-Step Homogeneous Immunoassay for Cancer Biomarker Detection Using Gold Nanoparticle Probes Coupled with Dynamic Light Scattering. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 2780–2782 (2008).
117. Yeh, C.-H., Hung, C.-Y., Chang, T. C., Lin, H.-P. & Lin, Y.-C. An immunoassay using antibody-gold nanoparticle conjugate, silver enhancement and flatbed scanner. *Microfluidics and Nanofluidics* **6**, 85–91 (2008).
118. Lee, J.-H., Jucker, F. & Pardi, A. Imino proton exchange rates imply an induced-fit binding mechanism for the VEGF165-targeting aptamer, Macugen. *FEBS Letters* **582**, 1835–1839 (2008).
119. Oyelere, A. K., Chen, P. C., Huang, X., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Peptide-conjugated gold nanorods for nuclear targeting. *Bioconjugate Chemistry* **18**, 1490–1497 (2007).
120. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **4**, 26–49 (2008).
121. Huff, T. B., Hansen, M. N., Zhao, Y., Cheng, J.-X. & Wei, A. Controlling the cellular uptake of gold nanorods. *Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **23**, 1596–1599 (2007).
122. Chithrani, B. D. & Chan, W. C. W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters* **7**, 1542–1550 (2007).
123. Alkilany, A. M. & Murphy, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research* **12**, 2313–2333 (2010).
124. Li, J. J. *et al.* Genomic instability of gold nanoparticle treated human lung fibroblast cells. *Biomaterials* **32**, 5515–5523 (2011).
125. Li, J. J. *et al.* Gold Nanoparticles Induce Oxidative Damage in Lung Fibroblasts In Vitro. *Advanced Materials* **20**, 138–142 (2008).
126. Pan, Y. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **3**, 1941–1949 (2007).
127. Chen, Y.-S., Hung, Y.-C., Liao, I. & Huang, G. S. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* **4**, 858–864 (2009).
128. Chen, H., Zhen, Z., Todd, T., Chu, P. K. & Xie, J. Nanoparticles for improving cancer diagnosis. *Materials Science and Engineering: R: Reports* (2013) doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2013.03.001>.