

Использование меченых антителами золотых наностержней при фототермическом воздействии ИК лазерного излучения на *Staphylococcus aureus*

Е.С.Тучина, П.О.Петров, К.В.Козина, Ф.Ратто, С.Центи, Р.Пини, В.В.Тучин

Исследовано влияние ИК лазерного излучения (808 нм) и золотых наностержней на клетки двух штаммов Staphylococcus aureus – метициллин-чувствительного и метициллин-устойчивого. Синтезированы наностержни с размерами 13 × 45 нм и максимумом поглощения в ИК области спектра, функционализированные иммуноглобулинами человека IgA и IgG. Показано, что использование наночастиц в сочетании с ИК излучением приводит к гибели до 97% популяции микроорганизмов.

Ключевые слова: ИК лазеры, наночастицы, антитела, стафилококки.

1. Введение

За последние 5 лет число научных исследований, посвященных изучению биологических свойств конъюгатов наночастиц и иммуноглобулинов, резко возросло [1–4]. Такие комплексные соединения используются в диагностике и терапии различных патологических состояний [3]. Ожидается, что круг их применения будет еще более расширяться.

Благодаря небольшим размерам и молекулярной структуре наночастицы различных металлов и их оксидов обладают рядом уникальных физико-химических свойств, что определяет их использование в биосенсорике, микроскопии, диагностике патологических состояний и инфекционных заболеваний, лазерной терапии, и т.д. Современные технологии позволяют создавать наночастицы заданного размера и формы с характеристиками, адаптированными для каждой конкретной области применения [4–9].

Антитела, представляющие собой небольшие (150 кДа) белковые молекулы, являются компонентами иммунной системы, которые нейтрализуют инфекционные агенты (вирусы, бактерии) и их токсины, а также обеспечивают активацию иммунных клеток [10].

Объединение наночастиц и антител в функциональный комплекс позволяет сочетать уникальные свойства

наночастиц и селективность антител для целевого воздействия на биологическую мишень и распознавания ее особенностей [2, 5]. При этом одним из наиболее перспективных путей использования таких конъюгатов является адресная доставка лекарственных препаратов в сочетании с локальным лазерным нагревом клеток и их компонентов. Создание таких условий возможно при синергетическом воздействии на клетки ИК излучения и золотых наночастиц с настраиваемым плазмонным резонансом в ИК области спектра. В результате такой терапии обеспечивается не только избирательное уничтожение определенных клеток (адресное взаимодействие с участием антител, химическое и термическое повреждение с участием наночастиц), но и регенерация окружающих тканей в результате стимулирующего действия ИК излучения [11–13].

Как правило, для функционализации наночастиц используют моноклональные антитела с внешним Fab-фрагментом (антигенсвязывающим фрагментом), специфичным для определенного белка в составе целевого объекта [2, 3, 12–21]. Однако довольно перспективным при терапии инфекционных заболеваний является применение инвертированных молекул антител, когда наружное положение занимает константный Fc-фрагмент [2, 12]. В таком случае возможно обратное распознавание: не антитело «узнает» мишень, а мишень «узнает» антитело. Особенностью избирательного взаимодействия с Fc-фрагментами иммуноглобулинов человека обладает ряд микробных поверхностных или секреторируемых протеинов (белок А стафилококка, белок G стрептококка), эволюционно сформировавшихся для уклонения от ответа со стороны иммунной системы [22, 23].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении эффективности селективного фототермического воздействия лазерного ИК (808 нм) излучения на метициллин-чувствительный (MS) и метициллин-устойчивый (MR) штаммы *Staphylococcus aureus*, селективность которого обеспечена специфическими метками в виде золотых наностержней, функционализированных иммуноглобулинами А и G человека с внешне ориентированными Fc-фрагментами.

Е.С.Тучина, П.О.Петров, К.В.Козина. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: kliany@rambler.ru

F.Ratto, R.Pini. Italian National Research Council, Institute of Applied Physics, via Madonnadel Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

S.Centi. University of Florence, Dept. Experimental and Clinical Biomedical Sciences, viale Morgagni 50, 50134 Firenze, Italy

В.В.Тучин. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83, Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24, University of Oulu, 90014 Oulu, P.O.Box 4500, Finland

Поступила в редакцию 23 марта 2014 г., после доработки – 17 мая 2014 г.

2. Материалы и методы

В качестве модельных объектов были выбраны бактерии *Staphylococcus aureus* двух штаммов – MS и MR (ГИСК им. Л.А.Тарасевича, Москва). Стафилококки выращивали при температуре 37 °С на универсальной плотной питательной среде – ГРМ-агар (Оболенск, Россия).

Источником ИК излучения служил диодный лазер с максимумом излучения на длине волны $\lambda = 808$ нм и плотностью мощности 100 мВт/см² (LAS, Санкт-Петербург) (рис.1). Все эксперименты проводились в непрерывном режиме генерации излучения. Для измерения температуры растворов использовали цифровой мультиметр МУ62 (Mastech, Китай) с погрешностью измерения ± 0.5 °С.

Протокол синтеза золотых наностержней состоял из двух основных частей (рис.2). На первом этапе проводилось аутокаталитическое восстановление золотохлоридной кислоты (HAuCl₄) аскорбиновой кислотой в присутствии бромида цетримония, нитрата серебра и ультрамалых золотых наносфер, как описано в работах [24, 25]. Покрытие наночастиц полиэтиленгликолем (ПЭГ) осуществлялось в ацетатном буфере с концентрацией 100 мМ (рН 5.0), содержащем 50 мкМ гетеробифункциональных

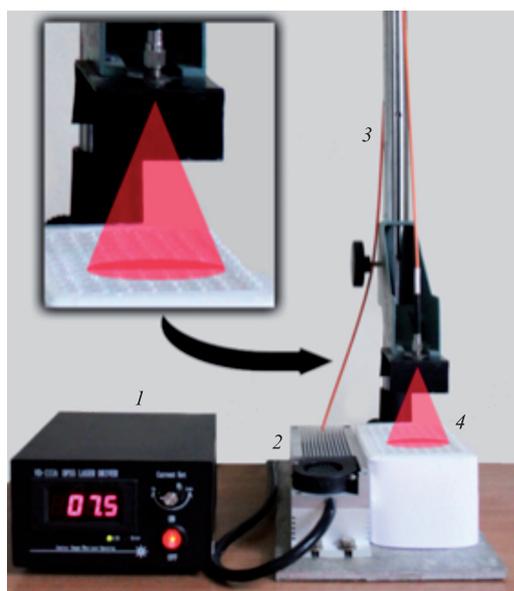


Рис.1. Схема экспериментальной установки на основе диодного ИК лазера с длиной волны 808 нм:
1 – блок питания лазера; 2 – излучающий модуль; 3 – вертикальная стойка со световодом; 4 – планшет с суспензиями бактерий; на вставке более детально показана конфигурация облучения планшета с бактериями.

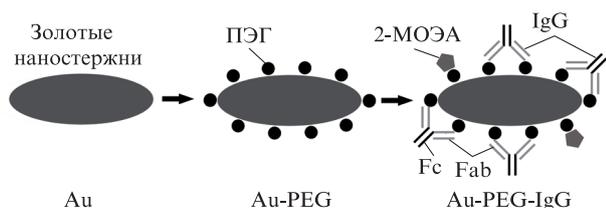


Рис.2. Схема синтеза конъюгатов наностержней с антителами. Золотые наностержни (Au) покрывались слоем полиэтиленгликоля (ПЭГ), затем путем амидирования к ним через Fab-фрагмент присоединялись антитела (Ig). Частицы стабилизировались 2-метоксиэтанолом (2-МОЭА).

нитий ПЭГ в виде смеси α -меркапто- ω -метокси-ПЭГ и α -меркапто- ω -карбокси-ПЭГ (соотношение 9:1, молекулярная масса ~ 5000 г/моль). Данная смесь характеризуется коллоидной стабильностью, получаемое покрытие обеспечивает взаимодействие поверхности частиц с аминогруппами функциональных молекул [6, 26].

На следующем этапе путем формирования сукцинимид-карбодимидных связей в буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) с концентрацией 10 мМ (рН 5.5) выполняли амидирование [27, 28]. Функционализацию проводили в растворе 2-метоксиэтиламина при добавлении иммуноглобулина А человека (IgA, лиганд с низким сродством к белку А стафилококка) или иммуноглобулина G (IgG, лиганд с высоким сродством к белку А стафилококка). При этом аминогруппы, не связавшиеся с Fab-фрагментами антител, блокировались 2-метоксиэтиламином (рис.2). Концентрация частиц составляла 4 мМ.

Исследование морфологии частиц проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа SM12(S) TEM (Philips). Как видно из электронной микрофотографии (рис.3), полученные частицы имеют среднюю длину 44 ± 4 нм и диаметр 10 ± 3 нм. Оптические характеристики (экстинкцию) измеряли в единицах $\text{см}^{-1} \cdot \text{M}_{\text{Au}}^{-1}$ с помощью спектрофотометра V-560 (Jasco). Оказалось, что частицы обладают выраженным плазмонным резонансом с пиком вблизи 800 нм (рис.4), характер спектров идентичен для всех типов полученных частиц.

Таким образом, для проведения экспериментов по фототермическому воздействию лазерного ИК излучения (808 нм) использовали три типа золотых наностержней: золотые наностержни, покрытые ПЭГ (Au-PEG), золотые наностержни, покрытые ПЭГ и функционализированные IgA (Au-PEG-IgA), и золотые наностержни, покрытые ПЭГ и функционализированные IgG (Au-PEG-IgG). Использовали суспензии с концентрацией наночастиц 0.4 мМ.

В ходе экспериментов лазер с выводом излучения через волоконный световод располагали над ячейками сте-

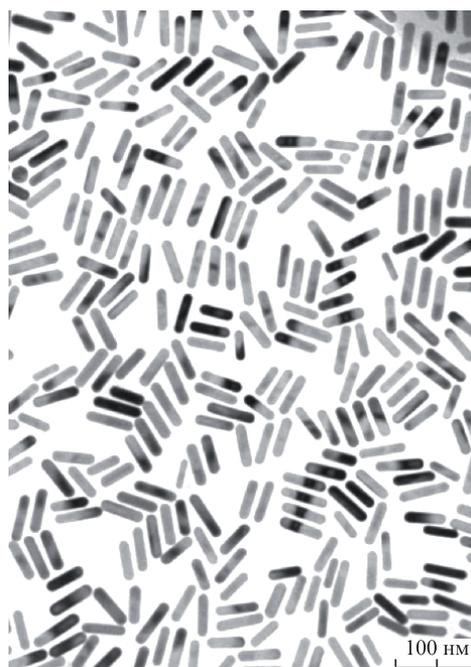


Рис.3. Электронная микрофотография (25000 \times) синтезированных наностержней.

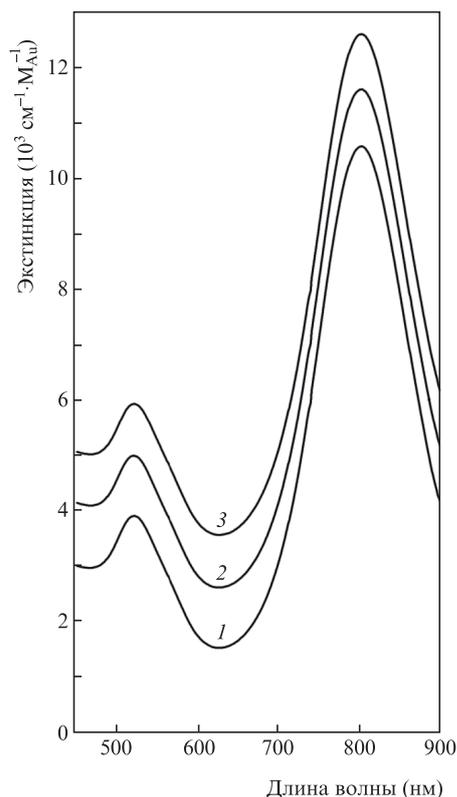


Рис.4. Спектры экстинкции золотых наностержней Au-PEG (1), Au-PEG-IgA (2) и Au-PEG-IgG (3). В пределах погрешности эксперимента спектры для всех образцов имеют одинаковые значения, на рисунке они искусственно разнесены на $10^3 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}_{\text{Au}}$ для большей наглядности.

рильного полистирольного планшета (см. рис.1). При постановке опытов использовали бактериальную культуру, предварительно выращенную в течение 24 ч при температуре 37°C на плотной питательной среде. Бактериальную взвесь готовили в стерильном физиологическом растворе методом последовательных десятикратных разведений; конечная концентрация составляла 10^3 микробных клеток (м.к.) в 1 мл. Затем 0.1 мл взвеси из разведения 10^4 м.к./мл вносили в 0.9 мл суспензии наночастиц и инкубировали в течение 15 мин без доступа света.

Бактериальную взвесь из конечного разведения 10^3 м.к./мл, а также из растворов с наночастицами вносили в ячейки планшета в объеме 0.1 мл. Облучение взвеси проводили в течение 5, 10, 15 и 30 мин.

По истечении времени воздействия лазер отключали, в ячейки планшета быстро помещали датчик мультиметра и измеряли температуру исследуемых растворов. Затем взвеси бактерий из данных ячеек переносили на чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем. Результаты учитывали путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) через 24 ч после инкубации при 37°C . Контролем служили взвеси бактерий, не обработанные сенсibilизатором и не подвергнутые облучению. Каждый эксперимент повторяли десятикратно. При работе с лазерным излучением руководствовались ГОСТом Р 50723-94 «Лазерная безопасность. Общие требования безопасности при разработке и эксплуатации лазерных изделий» и Санитарными нормами и правилами устройства и эксплуатации лазеров № 5804-91.

3. Результаты

Установлено, что ИК лазерное излучение с длиной волны 808 нм и плотностью мощности 100 мВт/см^2 подавляет рост клеток *S. aureus* MS. При времени облучения до 30 мин отмечено уменьшение числа КОЕ на 25%–56% по сравнению с контролем (рис.5,а). Данные, полученные при воздействии ИК лазерного излучения на клетки *S. aureus* MR, отражают сходную тенденцию. Однако этот штамм был более устойчив к воздействию излучения – число КОЕ сократилось на 15%–44% (рис.5,б). При этом среднее повышение температуры облученных бактериальных взвесей составило примерно 2.75°C (табл.1).

Добавление покрытых ПЭГ золотых наностержней в суспензию клеток несколько подавляет рост бактерий *S. aureus* MS в отсутствие облучения, однако ИК облучение приводит к существенному снижению их численности: на 27% (5 мин воздействия), на 61% (10 мин), на 72% (15 мин) и на 82% (30 мин) (рис.5,а). При воздействии излучения на *S. aureus* MR, инкубированные с золотыми наностержнями, число КОЕ сократилось на 20%–87% (рис.5,б). За все время облучения средняя температура раствора, содержащего клетки стафилококков и золотые наностержни, возросла на 8.7°C (табл. 1) по сравнению со случаем облучения чистых взвесей.

В ходе экспериментов было установлено, что применение конъюгатов наночастиц с Fc-фрагментами иммуноглобулинов приводит к усилению воздействия ИК лазерного излучения. При использовании ИК излучения и наностержней, меченых антистафилококковыми IgA, показатель КОЕ *S. aureus* MS уменьшался на 33%–87% (рис.6,а). Инкубация *S. aureus* MR с IgA-конъюгатами наностержней с последующим лазерным облучением приводила к снижению численности КОЕ на 26%–94% (рис.6,б). При этом средняя температура облученных растворов по сравнению с температурой при облучении лазером взвесей, не содержащих золотых наночастиц, повышалась на 12.7°C (см. табл.1).

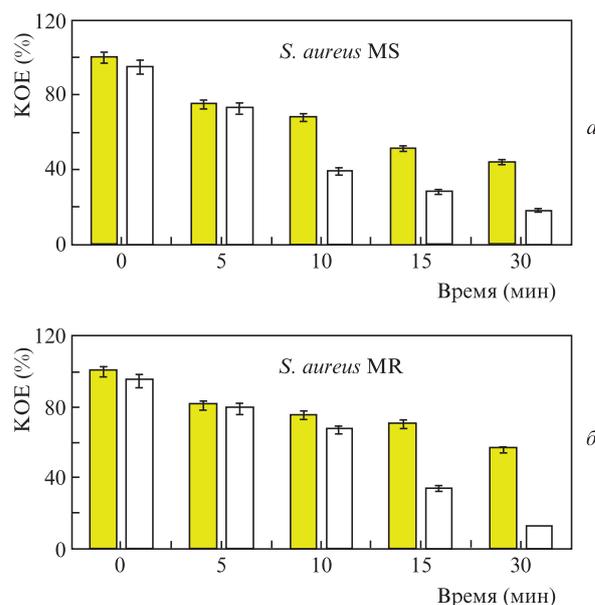


Рис.5. Влияние ИК (808 нм) излучения на бактерии без наночастиц (■), а также на бактерии в суспензии с золотыми наностержнями в оболочке из ПЭГ (Au-PEG) (□).

Табл.1. Изменение средней температуры бактериальных взвесей при воздействии ИК лазерного излучения ($\lambda = 808$ нм).

Способ воздействия	Средняя температура (°C) при различном времени воздействия ИК лазерного излучения					ΔT (°C)	$\Delta T_{\text{sol}} - \Delta T_{\text{IR}}$ (°C)
	0	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин		
ИК излучение	20.0 ± 0.0	20.0 ± 0.2	20.7 ± 0.2	21.2 ± 0.2	22.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	–
ИК + Au-PEG	20.0 ± 0.0	34.5 ± 0.2	36.5 ± 0.2	39.7 ± 0.2	41.5 ± 0.2	11.5 ± 0.2	8.7 ± 0.2
ИК + Au-PEG-IgA	20.0 ± 0.0	36.7 ± 0.2	38.2 ± 0.2	41.5 ± 0.2	45.5 ± 0.2	15.5 ± 1.0	12.7 ± 0.7
ИК + Au-PEG-IgG	20.0 ± 0.0	37.5 ± 0.2	41.2 ± 0.2	43.5 ± 0.2	48.0 ± 0.2	18.0 ± 1.0	15.2 ± 1.2

Примечание: ИК + Au-PEG – ИК излучение и золотые наностержни; ИК + Au-PEG-IgA – ИК излучение и конъюгаты золотых наностержней с иммуноглобулином А; ИК + Au-PEG-IgG – ИК излучение и конъюгаты золотых наностержней с иммуноглобулином G.

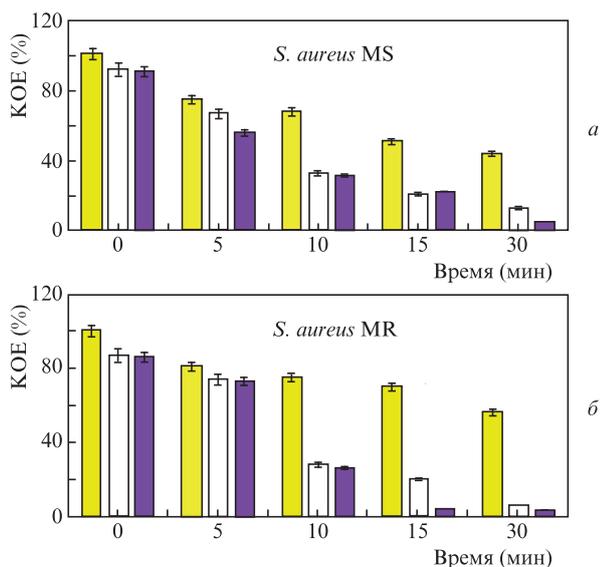


Рис.6. Влияние ИК (808 нм) излучения на бактерии, обработанные золотыми наностержнями в оболочке из ПЭГ (□), конъюгированными с антителами IgA (Au-PEG-IgA) (□) и IgG (Au-PEG-IgG) (■).

Использование в качестве маркерных молекул Fc-фрагментов иммуноглобулинов класса G повышало эффективность комплексного воздействия наночастиц и ИК лазерного излучения. Численность клеток *S. aureus* MS в суспензии с золотыми наностержнями после 5 мин облучения снизилась на 44%, после 10 мин – на 69%, после 15 мин – на 78% и после 30 мин – на 95% (рис.6,а). Для штамма *S. aureus* MR выраженное угнетение по сравнению с предыдущим вариантом эксперимента отмечено после 15 мин облучения. Численность клеток, инкубированных с IgG-конъюгатами золотых наностержней, снижалась на 96% после 15 мин воздействия излучения и на 97% – после 30 мин (рис.6,б). Средняя температура бактериальных суспензий возрастала на 15.2°C при увеличении времени облучения от 0 до 30 мин (см. табл.1).

4. Обсуждение

Комплексное фотодинамическое/фототермическое воздействие лазерного излучения с длинами волн в красной и ИК областях спектра в сочетании с золотыми наночастицами обладает выраженными антимикробными свойствами [1, 29–35]. Как показывает анализ литературных данных, основное внимание исследователей сосредоточено на подавлении роста таких клинически значимых бактерий, как *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [29–31], характеризующихся устойчивостью ко многим современным антибиотикам [36–38]. При этом иммуно-

глобулины используются для целевой доставки таких фотосенсибилизаторов, как хлорин е6 [29], золотые наночастицы, содержащие ванкомицин [30–32], золотые наностержни, покрытые толуидиновым синим [33].

В наших предыдущих исследованиях были использованы сходные схемы [8, 9, 35]. При этом было установлено, что ИК лазерное излучение (805, 808 нм; 46–60 мВт/см²) в сочетании с золотыми плазмонными наночастицами, конъюгированными с красителем индоцининовым зеленым, приводит к гибели 75% популяции метициллин-чувствительного штамма *S. aureus* [8, 35]. Несмотря на обнаруженный в этих работах синергетический эффект от совместного действия фотодинамического/фототоксического красителя и плазмонных наночастиц с близкими полосами поглощения в области 800 нм при их лазерном облучении, подавление бактериальной флоры оказалось не очень выраженным. В связи с этим логичным продолжением исследований стало создание наночастиц, меченых антителами, для адресного взаимодействия с поверхностью бактериальных клеток.

На скорость и качество борьбы с инфекционными агентами влияет в первую очередь состояние иммунной системы макроорганизма и лишь затем эффективность схемы фармацевтического или иного лечения. В норме фагоциты распознают общие микробные антигены с помощью собственных рецепторов или используют антитела, синтезированные организмом, в качестве опсонов – молекул, активизирующих распознавание (рис.7,а). Однако известно множество приспособлений, позволяющих микроорганизмам нейтрализовать действие факторов иммунитета [37, 39, 41]. Типичным примером является наличие у бактерий белков-ловушек (белок А стафилококка, белок G стрептококка), которые обладают высокой степенью сродства к тем или иным эффекторным молекулам иммунной системы. Стафилококковый белок А – это небольшой протеин (42 кДа), ковалентно связанный с пептидогликаном клеточной стенки и способный с высокой аффинностью связывать Fc-фрагмент молекул иммуноглобулинов (IgG и IgA), делая клетку «невидимой» для фагоцитов (рис.7,б).

В настоящей работе предложено использовать сродство белка А стафилококка и Fc-фрагмента молекул антител для повышения эффективности связывания наночастиц с микроорганизмами и, следовательно, эффективности воздействия лазерного излучения на меченые золотыми наночастицами бактерии. Преимуществом в данном случае является не только селективность взаимодействия наночастиц и бактериальных клеток, но и улучшение опсонизации бактерий и стимуляция фагоцитоза (рис.7,в), что положительно скажется на работе всей иммунной системы.

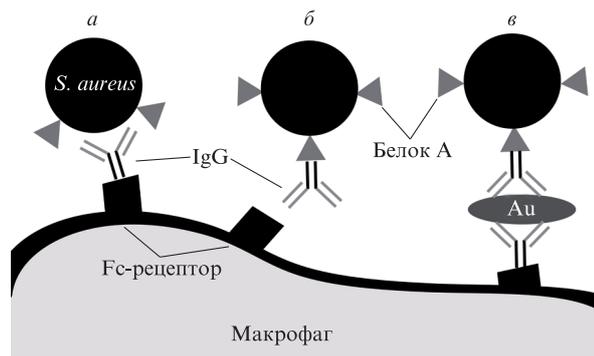


Рис.7. Взаимодействие рецепторов на мембране макрофага с клетками *S.aureus*:

a – иммуноглобулин (IgG) выступает как опсонин, стимулирует фагоцитоз через Fc-рецептор; *б* – белок А связывает Fc-фрагмент IgG, что делает невозможной связь с макрофагом; *в* – золотые наностержни связываются с белком А и несут дополнительные IgG для взаимодействия с макрофагом.

В ходе исследования было показано, что без доступа света покрытые ПЭГ наностержни не обладают выраженным токсическим действием. Небольшое снижение численности стафилококков (на 7%–13%) было обнаружено при использовании конъюгатов золотых наностержней и иммуноглобулинов. Это, вероятно, связано с эффектом агглютинации – образованием крупных макромолекулярных комплексов антител и антигенов, что приводит к инактивации бактерий.

Основное повреждающее действие лазерного ИК излучения и золотых наночастиц связано с локальным нагревом среды вблизи клеточных мембран. Поглощение излучения наночастицами на длинах волн в пределах их плазмонного резонанса приводит к значительному повышению температуры вблизи наночастиц и соответственно к повреждению клеточных структур [1, 3, 5, 6]. Усредненный контроль за температурными эффектами в настоящей работе осуществлялся путем измерения температуры суспензии клеток сразу после облучения. Увеличение температуры бактериальных суспензий происходило дозозависимо: максимальные значения были зарегистрированы после 30 мин ИК облучения. Температура взвесей, не содержащих наночастицы, после облучения повышалась незначительно (см. табл.1).

Обсудим результаты исходя из концепции, что локальный нагрев в области соприкосновения наночастицы со стенкой микроорганизма существенно выше, чем средняя величина нагрева суспензии клеток. В результате локального нагрева сразу несколькими наночастицами клеточная стенка и мембрана повреждаются и клетка гибнет. Соответствующие расчеты для локального нагрева представлены в [42]. В работах [8, 9] показано, что гибель микроорганизмов происходит при нагреве суспензии всего на несколько градусов. Это говорит о том, что локальная температура вблизи наночастиц, прикрепленных к стенке клетки, существенно выше средней, поскольку порог разрушения биологического материала для непрерывного излучения составляет 50–60 °C [43]. Однако для микроорганизмов с достаточно толстой (100 нм) стенкой пороги разрушения оказываются несколько выше [41].

Все типы синтезированных частиц имели идентичные спектры экстинкции (см. рис.4). Наблюдаемое повышение средней температуры суспензий клеток в ряду суспен-

зий с покрытыми ПЭГ наночастицами (контроль) (8.7 ± 0.2 °C) и с наночастицами, функционализированными иммуноглобулинами А (12.7 ± 0.7 °C) и G (15.2 ± 1.2 °C), по отношению к лазерному нагреву суспензии в отсутствие частиц может быть связано с образованием кластеров наночастиц в результате их эффективного накопления на поверхности клеток при функционализации. Это, вероятно, приводит как к более сильному фототермическому эффекту на локальном уровне, так и к некоторому повышению средней температуры [3, 44].

Несмотря на то что увеличение средней температуры среды при нагреве ИК излучением не превышало 15–16 °C, локальный нагрев наностержней и вблизи клеточных стенок мог достигать десятков и сотен градусов. Специальные контрольные исследования выживаемости исследуемых бактерий при нагревании суспензии до 50 °C в течение 30 мин показали, что стафилококки сохраняют жизнеспособность при таких условиях. Это полностью согласуется с литературными данными о толерантности стафилококков к факторам окружающей среды, в том числе и к температуре до 65–70 °C [41]. Кроме того, повышение температуры на 15–16 °C наблюдалось лишь к концу световой экспозиции в 30 мин. Поскольку численность микроорганизмов двух исследованных штаммов в эксперименте по воздействию ИК излучения и золотых наностержней снижалась пропорционально увеличению средней температуры, можно предположить, что основной вклад в повреждение бактериальных клеток вносит не общий нагрев суспензии, а локальный фототермический эффект, ассоциированный с активацией плазмонного резонанса на поверхности наночастиц и с образованием кластеров.

Известно, что иммуноглобулины класса G обладают более выраженным сродством к белку А стафилококка, чем иммуноглобулины класса А [45, 46]. Вероятно, именно недостаточной силой связывания наночастиц с поверхностью бактерий можно объяснить меньшую чувствительность стафилококков к действию излучения и конъюгатов на основе IgA (сокращение КОЕ на 33%–87% для *S. aureus* MS и на 36%–94% для *S. aureus* MR) по сравнению с конъюгатами на основе IgG (сокращение КОЕ на 44%–95% для *S. aureus* MS и на 37%–97% для *S. aureus* MR).

Интересен тот факт, что кинетика сокращения численности популяций под действием ИК излучения и наностержней, меченых антителами, для обоих исследованных штаммов *S. aureus* была сходной. При кратковременном облучении (5 мин) большую восприимчивость демонстрировал метициллин-чувствительный штамм, более длительное облучение (10 мин и больше) эффективнее подавляло рост метициллин-устойчивого штамма, и к 30 мин отмечено снижение числа КОЕ на 97% (рис.6,б). Таким образом, разработанный метод может быть использован для эффективного уничтожения бактерий с разной степенью устойчивости к антибиотикам.

5. Заключение

В ходе работы впервые применялось инвертированное прикрепление молекул иммуноглобулинов к покрытой ПЭГ поверхности золотых наностержней для связывания белка А стафилококка с целью его использования при фототермическом воздействии ИК (808 нм) лазерного излучения на бактерии. При этом конъюгаты нано-

частиц с IgG оказались более эффективными, чем с IgA. Показана достаточно высокая эффективность новой технологии для селективного подавления роста бактерий золотистого стафилококка, как резистентного, так и нерезистентного к действию антибиотиков. Однако для обеспечения оптимального локального нагрева наночастиц и окружающих их биологических структур без существенного нагрева самой среды обитания микроорганизмов данный метод следует оптимизировать по концентрациям всех компонентов, включая наночастицы, и по плотностям мощности лазерного излучения, дозе, а также, возможно, по переходу к импульсному режиму.

Необходимо дальнейшее изучение влияния конъюгатов наночастиц с иммуноглобулинами на иммунную систему человека на моделях лабораторных животных. Такие исследования позволят установить новые закономерности лазерной дезактивации стафилококковой инфекции в условиях живого организма с учетом влияния иммунного отклика и в реальных условиях освещения и распределения микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта под руководством ведущего ученого (№ 14.Z50.31.0004), поддержанного правительством РФ, и при частичной поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ РФ № НШ-703.2014.2 и гранта FiDiProTEKES (№ 40111/11), Финляндия.

- Zharov V.P., Mercer K.E., Galitovskaya E.N., Smeltzer M.S. *J. Biophys.*, **90**, 619 (2006).
- Arruebo M., Valladares M., Gonzalez-Fernandes A. *J. Nanomat.*, **24**, 2009 (2009).
- Khlebtsov B., Zharov V., Melnikov A., Tuchin V., Khlebtsov N. *Nanotechnol.*, **17**, 5167 (2006).
- Dykman L.A., Khlebtsov N.G. *Acta Naturae*, **3**, 34 (2011).
- Li P.C., Wang C.R.C., Shieh D.B., Wei C.W., Liao C.K., Poe C., Jhan S., Ding A.A., Wu Y.N. *Opt. Express*, **16**, 18605 (2008).
- Ungureanu C., Kroes R., Petersen W., Groothuis T.A.M., Ungureanu F., Janssen H., van Leeuwen F.W.B., Kooyman R.P.H., Manohar S., van Leeuwen T.G. *Nano Lett.*, **11**, 1887 (2011).
- Kirui D.K., Rey D.A., Batt C.A. *Nanotechnol.*, **21**, 105 (2010).
- Saira Mian I., Bradwell A.R., Olson A.J. *J. Molec. Biol.*, **217**, 133 (1991).
- Тучина Е.С., Тучин В.В., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **41**, 354 (2011).
- Khlebtsov B.N., Tuchina E.S., Khanadeev V.A., Panfilova E.V., Petrov P.O., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. *J. Biophotonics*, **6**, 338 (2013).
- Kou G., Gao J., Wang H. *J. Biochem. Molec. Biology*, **40**, 731 (2007).
- Kumar S., Aaron J., Sokolov K. *Nat. Protoc.*, **3**, 314 (2008).
- Terentyuk G.S., Maksimova I.L., Dikht N.I., Terentyuk A.G., Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V., in *Lasers for Medical Applications: Diagnostics, Therapy and Surgery. Electronic and Optical Materials Ser.* (Cambridge: Woodhead Publ. Ltd, 2013, p. 37).
- Stuchinskaya T., Moreno M., Cook M.J., Edwards D.R., Russell D.A. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10**, 822 (2011).
- Chen J.Y., Wang D.L., Xi J.F., Au L., Siekkinen A., Warsen A., Li Z.Y., Zhang H., Xia Y.N., Li X.D. *NanoLett.*, **7**, 1318 (2007).
- Tong L., Zhao Y., Huff T.B., Hansen M.N., Wei A., Cheng J.X. *Adv. Mater.*, **19**, 3136 (2007).
- Eck W., Craig G., Sigdel A., Ritter G., Old L.J., Tang L., Brennan M.F., Allen P.J. *ACS Nano*, **2**, 2263 (2008).
- Puertas S., Batalla P., Moros M., Polo E., Del Pino P., Guisan J.M., Grazu V., de la Fuente J.M. *ACS Nano*, **28**, 4521 (2011).
- Puvanakrishnan P., Diagaradjane P., Shams Kazmi S.M., Dunn A.K., Krishnan S., Tunnell J.W. *Lasers Surg. Med.*, **44**, 310 (2012).
- Baniukevic J., Boyaci I.H., Bozkurt A.G., Tamer U., Ramanavicius A., Ramanaviciene A. *Biosens. Bioelectron.*, **43**, 281 (2013).
- Parolo C., de la Escosura-Muniz A., Polo E., Grazu V., de la Fuente J.M., Merkoci A. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 10753 (2013).
- Boyle M.D.P., Reis K.J. *Biotechnol.*, **5**, 697 (1987).
- Fisher R.G., Crowe J.E., Johnson T.R., Tang Y.-W., Graham B.S. *J. Infectious Diseases*, **180**, 1324 (1999).
- Nikoobakht B., El-Sayed M.A. *Chem. Mater.*, **15**, 1957 (2003).
- Ratto F., Matteini P., Rossi F., Pini R. *J. Nanopart. Res.*, **12**, 2029 (2010).
- Choi J., Yang J., Bang D., Park J., Suh J.S., Huh Y.M., Haam S. *Small*, **8**, 746 (2012).
- Niidome T., Yamagata M., Okamoto Y., Akiyama Y., Takahashi H., Kawano T., Katayama Y., Niidome Y. *J. Control Release*, **114**, 343 (2006).
- Lipka J., Semmler-Behnke M., Sperling R.A., Wenk A., Takenaka S., Schleh C., Kissel T., Parak W.J., Kreyling W.G. *Biomater.*, **31**, 6574 (2010).
- Embleton M.L., Nair S.P., Cookson B.D., Wilson M. *Microb. Drug Resist.*, **10**, 92 (2004).
- Williams D.N., Ehrman S.H., Holoman T.R.P. *J. Nanobiotechnol.*, **4**, 3 (2006).
- Huang W.-C., Tsai P.-J., Chen Y.-C. *Nanomedicine*, **2**, 777 (2007).
- Norman S.R., Stone J.W., Gole A., Murphy C.J., Sabo-Attwood T.L. *Nano Lett.*, **8**, 302 (2008).
- Kuo W., Chang C.N., Chang Y.T., Yeh C.S. *Chem. Commun.*, **32**, 4853 (2009).
- Jerjes W., Tan H.B., Hopper C., Giannoudis P.V. *Hard Tissue*, **1**, 1 (2012).
- Tuchina E.S., Ratto F., Khlebtsov B.N., Centi S., Matteini P., Rossi F., Fusi F., Khlebtsov N.G., Pini R., Tuchin V.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7911**, 79111C-1 (2011).
- Lowy F.D.N. *Engl. J. Med.*, **339**, 520 (1998).
- Foster T.J., Höök M. *Trends Microbiol.*, **6**, 484 (1998).
- Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L. *Lancet Infect. Dis.*, **5**, 751 (2005).
- Inghanas M. *Scand. J. Immunol.*, **13**, 343 (1981).
- Lindmark W.J., Thoren-Tolling R.K., Sjoquist J. *J. Immunol. Methods*, **62**, 1 (1983).
- Verrips C.T., Van Rhee R. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1128 (1981).
- Avetisyan Yu.A., Yakunin A.N., Tuchin V.V. *J. Biophotonics*, **5**, 734 (2012).
- Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (М: Физматлит, 2010, с. 76).
- Zharov V.P., Galanzha E.I., Shashkov E.V., Kim J.-W., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **12**, 051503-1 (2007).
- Ljungberg U.K., Jansson B., Niss U., Nilsson R., Sandberg B.E., Nilsson B. *Mol. Immunol.*, **30**, 1279 (1993).
- Verkaik N.J., de Vogel C.P., Boelens H.A., Grumann D., Hoogenboezem T., Vink C., Hooijkaas H., Foster T.J., Verbrugh H.A., van Belkum A., van Wamel W.J. *J. Infect. Dis.*, **199**, 625 (2009).