

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**В.Ф. Сыч, Е.П. Дрождина, Н.А. Курносова, Н.А. Цыганова,
О.В. Столбовская, С.М. Слесарев, А.Ф. Санжапова**

ВВЕДЕНИЕ В НАНОТЕХНОЛОГИИ

Модуль «Биология» Элективный курс

Учебное пособие
для 10-11 классов
средней общеобразовательной школы

Ульяновск

2008

УДК 573.6.08.83(075.3)

ББК 30.16 Я 721

В 24

Учебное пособие подготовлено по результатам исследований, выполняемых в рамках проекта «Разработка программы и учебно-методического сопровождения учебного модуля «Введение в нанотехнологии» в программы по физике, химии, биологии основного и среднего общего образования; апробация курса «Введение в нанотехнологии» Федеральной целевой программы развития образования на 2006-2010 годы

Рецензенты:

действительный член РАМН, директор НИИ общей патологии
и патофизиологии РАМН профессор *Кубатиев Аслан Амирханович*;

д.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических основ онтогенеза
Института биологии развития РАН профессор *Зиновьева Рина Дмитриевна*;

д.б.н., руководитель Отдела клеточной биотехнологии ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко,
заслуженный деятель науки РФ, профессор *Дьяконов Лев Петрович*;

д.б.н., ведущий научный сотрудник кафедры эмбриологии биологического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова *Мелехова Ольга Петровна*;

д.м.н., главный научный сотрудник НИИ общей патологии
и патофизиологии РАМН профессор *Сороковой Вячеслав Иванович*;

д.б.н., зав. каф. цитологии, гистологии, эмбриологии Мордовского государственного
университета им. Н.П. Огарева профессор *Балашов Владимир Павлович*

Коллектив авторов:

**Сыч В.Ф., Дрождина Е.П., Курносова Н.А., Цыганова Н.А.,
Столбовская О.В., Слесарев С.М., Санжапова А.Ф.**

В 24 Введение в нанотехнологии. Модуль «Биология». Элективный курс:
учебное пособие для 10-11 классов средней общеобразовательной школы /
В.Ф. Сыч и др.; под ред. В.Ф. Сыча. – Ульяновск: УлГУ, 2008. – 100 с.
ISBN 978-5-88866-325-7

Учебное пособие отражает основные направления нанотехнологий в области биологических исследований и практическое применение их результатов в медицине, охране окружающей среды, сельскохозяйственном и других производствах. Особое внимание уделено углублению знаний учащихся о молекулярном, субклеточном (надмолекулярном) и клеточном уровнях организации живых систем, которые должны составить теоретическую основу для ознакомления с методами нанотехнологий.

Учебное пособие предназначено для учащихся 10-11 классов средней общеобразовательной школы.

ISBN 978-5-88866-325-7

© Сыч Виталий Федорович, 2008

© Коллектив авторов, 2008

© Ульяновский государственный университет, 2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	7
Глава 1. Нанобиотехнологии – новый этап развития биологической науки	10
1.1. Эволюционно обусловленные структурно-функциональные уровни организации живых систем	10
1.2. Определение понятий «наноструктуры» и «нанотехнологии»	12
1.3. Молекулярный и субклеточный уровни организации живых систем как основные в манипуляциях с наноструктурами	13
1.4. Основные направления разрабатываемых нанобиотехнологий	14
Глава 2. Биомакромолекулы (молекулы биополимеров) как составляющие наномира	16
2.1. Биомакромолекулы. Мономеры и биополимеры. Нуклеиновые кислоты и белки – критическая тройка биомакромолекул	16
2.2. ДНК как носитель и хранитель генетической информации в клетке	16
2.3. Биологическая роль РНК, особенности ее строения и функции	17
2.4. Белки: структурная организация и функции в клетке	18
2.5. Белки-переносчики: особенности расположения и функционирования в клетке	19
2.6. Строение, расположение и функции белков-рецепторов	19
2.7. Достижения нанобиологии в изучении рецепторной функции мембраны	20
2.8. Нанобиотехнологии на основе белков-переносчиков и белков-рецепторов. Нанобиосенсоры, их применение в диагностике заболеваний	21
Глава 3. Нанобиотехнологии на основе амплификации и репликации молекул нуклеиновых кислот	24
3.1. Свойства ДНК, используемые в нанотехнологиях. Механизм репликации ДНК	24
3.2. Гибридизация нуклеиновых кислот, ее практическое применение	25
3.3. Амплификация молекул нуклеиновых кислот как основа для разработки методов диагностики заболеваний	26
3.4. Создание биочипов на основе ДНК	29
3.5. Наноконплексы в диагностике мутаций	31

Глава 4. Нанобиотехнологии на основе метода генетической инженерии	34
4.1. Генетическая инженерия как одно из направлений нанобиотехнологии: понятие, цели, основные принципы	34
4.2. Способы получения генов для трансплантации	35
4.3. Технологии переноса генов в клетку	36
4.4. Методы внедрения чужеродной ДНК в геном клетки	37
4.5. Перспективы развития нанобиотехнологии в производстве биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Генная терапия и генный таргетинг	38
4.6. Основные стратегии создания наноконструкций на основе нуклеиновых кислот	39
4.6.1. Конструирование «шаг за шагом»	40
4.6.2. Конструирование по типу «все сразу»	42
4.7. Области применения наноконструкций на основе ДНК	43
4.7.1. Доставка лекарств	43
4.7.2. Биодатчики	43
4.7.3. Оптические фильтры	44
Глава 5. Нанобиотехнологии надмолекулярного (субклеточного) уровня организации живых систем	45
5.1. Структурная организация плазматической мембраны (плазмалеммы)	45
5.2. Типы мембранных белков (интегральные, полуинтегральные, периферические)	46
5.3. Функции плазмалеммы: барьерная, рецепторная, транспортная	46
5.4. Понятие об элементарной биологической мембране	47
5.5. Нанобиотехнологии для направленного транспорта веществ	47
5.5.1. Белково-липидные нанотрубки	48
5.5.2. Открытие наноконтейнеров в живых клетках	49
5.5.3. Наноконтейнеры для транспорта веществ на основе биологических мембран	49
5.6. Использование искусственных мембран в качестве биофильтров	52
Глава 6. Фибриллярные структуры биологических тканей, естественные и искусственные нановолокна	54
6.1. Макромолекулы, образующие фибриллярные (волокнистые) структуры в клетках и тканях живого организма: особенности структуры и функции	54

6.2. Цитоскелет клетки как система нановолокон	55
6.3. Микрофиламенты: строение, роль в клетке, актин и другие белки микрофиламентов	55
6.4. Микротрубочки: состав, строение, биологическая роль	56
6.5. Создание аналогов биологических ресничек методами нанотехнологий	57
6.6. Промежуточные филаменты	58
6.7. Фибриллярные белки соединительных тканей. Свойства, распространение и образование в живых тканях коллагеновых и эластических волокон	59
6.8. Биоволокна на основе полисахаридов	60
6.9. Методы создания искусственных нановолокон	60
6.10. Применение искусственных нановолокон в биологии и медицине	62
Глава 7. Неклеточные и прокариотические формы жизни в наноконструкциях и нанобиотехнологиях	64
7.1. Общая характеристика прокариотических организмов	64
7.2. Использование бактерий в нанотехнологиях	65
7.2.1. Внутриклеточная доставка лекарств	65
7.2.2. Перспектива использования бактерий как источника энергии	66
7.3. Нанобактерии в системе живой природы	67
7.4. Особенности строения и функционирования вирусов как представителей неклеточной формы жизни	69
7.5. Вирусы в борьбе против раковых заболеваний	72
7.6. Нанотехнологии на основе вирусов	73
7.7. «Искусственные вирусы» в коррекции наследственных аномалий	74
Глава 8. Нанобиореакторы как устройства для изучения и производства ферментов	75
8.1. Структурно-функциональные особенности ферментов как биологических катализаторов	75
8.2. Применение ферментов	76
8.3. Микроорганизмы как наиболее распространенные биореакторы ферментов	77
8.4. Ферменты, синтезируемые бактериальной клеткой	78
8.5. Использование микроорганизмов для получения наночастиц	78

Глава 9. Нанобиотехнологии в иммунологии	81
9.1. Нанобиотехнологии в иммунологии: проблемы и перспективы	81
9.2. Диагностика иммуноглобулинов, получение и применение моноклональных антител	81
9.3. Перспективы создания иммунобиопрепаратов нового поколения	84
9.4. Наноэмульсии в борьбе с инфекционными заболеваниями	85
Глава 10. Наночастицы в антропогенных экосистемах. Биологическая безопасность наноконструкций и нанотехнологий	86
10.1. Основные типы антропогенных экосистем, их отличие от естественных экосистем	86
10.2. Достижения сельскохозяйственной биотехнологии	86
10.3. Понятие об экологической биотехнологии, ее задачи. Биodeградация ксенобиотиков	87
10.4. Особенности влияния наночастиц на живые организмы	88
10.5. Наноструктуры на основе углерода: фуллерены, одно- и многослойные нанотрубки	90
10.6. Влияние наночастиц углерода, фуллеренов и углеродных нанотрубок на свертываемость крови	92
10.7. Нанобиотехнологии в контроле качества пищевых продуктов	93
Литература	95

ВВЕДЕНИЕ

Век биологии или век вымирания человечества! Только таким может стать XXI век по мнению многих ученых, требующих незамедлительно объявить начавшее отсчет столетие веком биологии. Однако смена «века физики» «веком биологии», предрекавшаяся последние десятилетия XX века, к сожалению, еще не состоялась. И это несмотря на то, что на пути развития человечества уже зияют на расстоянии в 20-40 лет четыре пропасти, грозящие стать катастрофами человечества.

1. Инфекционно-иммунная катастрофа. Производство и широкое применение с середины XX века антибиотиков обернулось двумя бедами: освобожденные временно пострадавшими от антибиотиков бактериями экологические ниши заняли более опасные вирусы; к их массивному наступлению на человечество на исходе XX века подключились выдержавшие многочисленные атаки антибиотиков бактерии. В их «возмужание» и беспрецедентную устойчивость самый весомый вклад внес человек, осуществляя масштабную непрекращающуюся селекцию бактерий на устойчивость к антибиотикам, с одной стороны, и ослабляя (детренируя и истощая) иммунную защиту собственного организма – с другой.

2. Продовольственная катастрофа проявляется уже сейчас: более 1 млрд людей планеты голодают, в первую очередь от нехватки тех производимых продуктов питания, к которым их приучили. Даже если осушить все болота, оросить и облагородить все пустыни планеты, затем распахать и засеять, через 30-40 лет человечество вступит в эпоху массовой гибели от нехватки традиционных продуктов питания.

3. Онкологическая катастрофа неуклонно готовилась на протяжении всего XX века и малоподвижным образом жизни, и структурой и режимом калорийного питания, и постоянными стрессами, и многим другим. Заболеваемость раком выросла в течение XX века более чем в 9 раз и продолжает неуклонно расти такими темпами, что в середине нынешнего века может разразиться онкологическая катастрофа – массовая гибель людей от раковых заболеваний.

4. Глобальная экологическая катастрофа рассматривается большинством ученых уже как неизбежная. Дискутироваться могут только сроки ее наступления. Общая нагрузка на окружающую среду, связанная с деятельностью человека, в 10 раз превысила допустимую. Биосфера необратимо утратила способность к саморегуляции и самовосстановлению как целостная «живая пленка» Земли.

Если не предотвратить, то хотя бы отсрочить время указанных катастроф человечества в состоянии лишь серьезный прорыв в биологических исследованиях. Прорыв, который должен обеспечить так необходимые последующие грандиозные достижения в медицине, сельском хозяйстве, природопользовании и охране окружающей среды.

Вполне возможно, что ожидаемый прорыв в биологических исследованиях обеспечат стремительно развивающиеся нанотехнологии. Под нанотехнологиями понимают фундаментальные технологии, основанные на манипуляциях с наноструктурами (наночастицами). Наноструктуры – это объекты, размеры которых лежат в диапазоне от 0,1 до 100 нанометров (1 нанометр равен 10^{-9} метра). Наноструктуры не просто меньше всего, что создавал человек, они являются наименьшими твердыми материалами, которые можно произвести и с которыми можно осуществить манипуляции. Наномасштаб уникален, поскольку наиболее фундаментальные свойства материалов наномира зависят от их размера так, как не зависят ни при одном другом масштабе. На молекулярном уровне проявляются новые свойства, определяемые поведением молекулярных наноконплексов. Возможность понимать, разрабатывать и контролировать эти свойства открывает целый мир функциональных молекулярных устройств.

Использование достижений нанотехнологий в биологии привело к появлению нового направления – нанобиотехнологии. Нанобиотехнологии – раздел в нанотехнологиях, посвященный изучению воздействия наночастиц на живые системы, а также разработке способов применения биологических наноструктур в экспериментальной биологии, медицине, экологии, сельском хозяйстве и других отраслях экономики.

В настоящее время оформились два направления в создании и развитии нанобиотехнологий.

Задачей первого направления является создание новых материалов, биосенсоров, биоэлектронных устройств, наномашин с биологическими компонентами, биороботов для внутриклеточных манипуляций и доставки веществ (гормонов, ферментов и др.) внутрь клетки.

Второе направление предполагает разработку методов и способов принесения искусственных наноразмерных частиц, технических материалов и интерфейсов в мир живых систем с целью их:

- инструментального исследования;
- диагностики состояния (норма, предпатология, патология);
- лечения заболеваний.

Настоящее пособие преследует цель первого общего ознакомления уча-

щихся с сущностью методов нанотехнологий, используемых в биологических исследованиях, и их возможным практическим применением в медицине, экологии, промышленном и сельскохозяйственном производствах. Достижение этой цели невозможно без углубления знаний учащихся об организации биологических систем на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях, расширения знаний о методах генетических и селекционных исследований. Необходимый для этого теоретический материал приведен соответственно теме в каждой из 10 глав данного учебного пособия.

Авторы выражают глубокую признательность за рецензирование рукописи настоящего пособия, а также за полезные советы, рекомендации и критические замечания: действительному члену РАН, д.м.н., профессору А.А. Кубатиеву; д.б.н., профессору Р.Д. Зиновьевой; д.б.н., профессору Л.П. Дьяконову; д.б.н. О.П. Мелеховой; д.м.н., профессору В.И. Сороковому; д.б.н., профессору В.П. Балашову.

Глава 1. Нанобиотехнологии – новый этап развития биологической науки

1.1. Эволюционно обусловленные структурно-функциональные уровни организации живых систем

В ходе эволюции живой природы сформировалась иерархия живых систем, отчетливо проявляющаяся в их многоуровневой организации (рис. 1). Каждый уровень организации живого характеризуется своей дискретной структурно-функциональной единицей – структурой (системой), исторические изменения которой составляют содержание эволюционного процесса на данном уровне. На всех уровнях проявляются основные атрибуты жизни. При этом жизненные процессы более высокого уровня обеспечиваются (определяются) структурами низшего уровня.

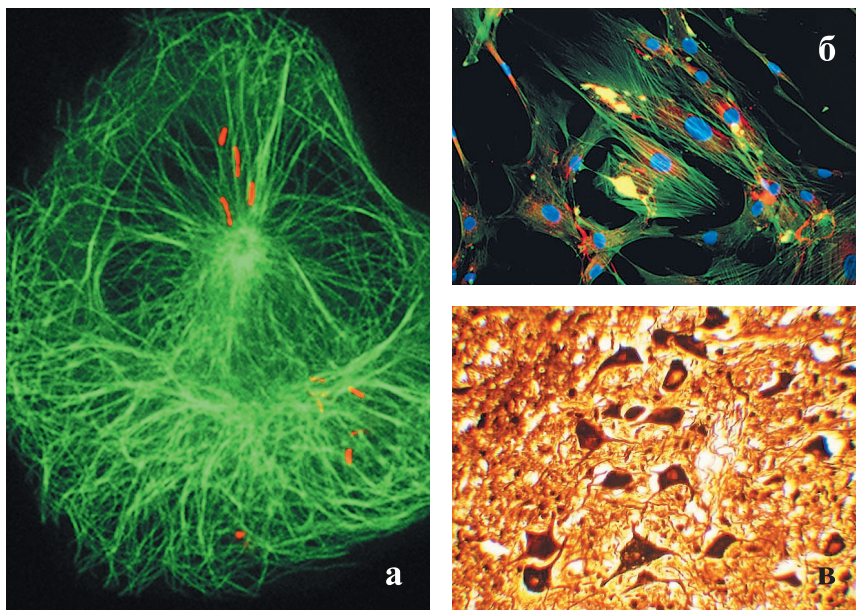


Рис. 1. Уровни организации живых систем: а – молекулярный (флуоресцентная микрофотография тубулина микротрубочек живой клетки); б – клеточный (фибробласты кожи человека, ядра фибробластов окрашены в синий цвет, цитоплазма – в красный цвет, актиновые волокна – в зеленый цвет); в – тканевой (нервная ткань)

Молекулярный уровень, являющийся начальным (наиболее глубинным) уровнем организации живого, представлен биомолекулами, в первую очередь молекулами биополимеров – нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов. На этом уровне осуществляются важнейшие процессы жизнедеятельности: кодирование и передача наследственной информации, пластический и энергетический обмен, дыхание и др. Из биомолекул формируются надмолекулярные структуры.

Субклеточный уровень является переходным между молекулярным и клеточным уровнями. Дискретной единицей уровня рассматривается надмолекулярная структура живой системы (элементарная биологическая мембрана, субчастица органоида, органоид). Процессы жизнедеятельности, протекающие на этом уровне, обеспечивают рост и специализацию клетки, самовосстановление и саморазрушение ее органоидов и др.

Клеточный уровень представлен клетками как самостоятельных организмов (бактерии, простейшие), так и клетками многоклеточных организмов. Обладая способностью к матричному синтезу и размножению, питанию, дыханию, росту, развитию и т.п., клетка является основной формой организации живой природы, структурно-функциональной единицей жизни.

Тканевой уровень возник в ходе эволюции в связи со становлением многоклеточности как следствие дифференциации клеток. Его дискретная единица – ткань объединяет клетки и их производные, характеризующиеся однородностью происхождения, сходством функции, расположения, а в ряде случаев и строения. На тканевом уровне происходит специализация новообразующихся клеток, образование внеклеточных структур, становление, функционирование и регенерация тканей.

Органный уровень характеризует сложные многотканевые живые системы. Дискретная единица уровня – орган представляет собой часть организма, имеющую определенную форму и выполняющую специфические функции. Взаимосвязанные в первую очередь общей функцией или биологической ролью в организме органы формируют системы органов.

Организменный уровень представлен одноклеточными и многоклеточными организмами. На этом уровне происходит становление, рост и развитие организма как единого целого, его приспособление к факторам внешней среды.

Популяционный уровень представлен минимальными группами особей, вовлеченными в эволюционный процесс, – популяциями. Дискретная единица этого уровня – популяция является элементарной единицей эволю-

ции. Объединение отдельных особей в популяции обеспечивает их приспособление, выживание, репродуктивный успех и успех в эволюции в целом.

Видовой уровень представлен надпопуляционными объединениями особей – биологическими видами. Как и популяция, вид – реально существующая в природе группа особей, завершающий этап микроэволюционного процесса.

Биоценотический уровень представлен сообществами взаимозависимых организмов разных видов – биоценозами. В ходе эволюции сформировались биогеоценозы (экосистемы), включающие, кроме взаимозависимых организмов, абиотические факторы окружающей среды.

Биосферный уровень – высший уровень организации живых систем, на котором все биоценотические круговороты вещества и энергии объединяются в единый биосферный (глобальный) круговорот вещества и энергии.

1.2. Определение понятий «наноструктуры» и «нанотехнологии»

Под **нанотехнологиями** понимают фундаментальные технологии, основанные на манипуляциях с наноструктурами (наночастицами). **Наноструктуры** – это объекты, размеры которых лежат в диапазоне от 0,1 до 100 нанометров (нанометр – одна миллиардная часть метра, 10^{-9} метра). Наноструктуры (рис. 2) не просто меньше всего, что создавал человек, они являются наименьшими твердыми материалами, которые можно произвести и с которыми можно осуществить манипуляции. Наномасштаб чрезвычайно уникален, поскольку наиболее фундаментальные свойства материалов наномира зависят от их размера в такой степени, в какой не зависят ни при одном другом масштабе. На молекулярном уровне возникают новые физические и химические свойства, определяемые поведением атомов, молекул и наноконплексов.

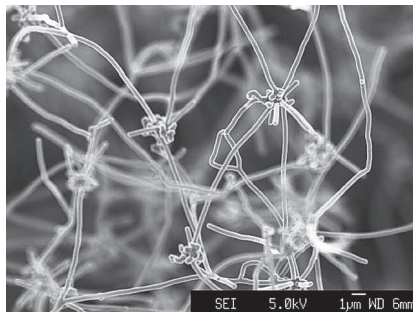
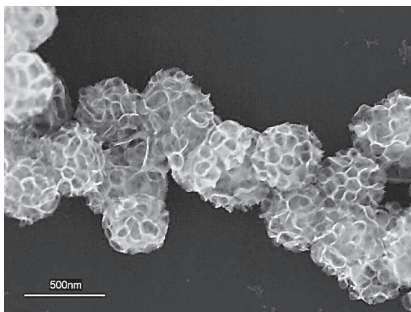


Рис. 2. Наноструктуры

1.3. Молекулярный и субклеточный уровни организации живых систем как основные в манипуляциях с наноструктурами

Определяющими структурами молекулярного уровня организации живых систем являются молекулы биополимеров (биомакромолекулы), которые включают молекулы нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов. Эти молекулы обладают свойством формирования надмолекулярных структур биологических систем и своего рода атомно-молекулярных кластеров. Последние образуются:

- макромолекулами белков, нуклеиновых кислот, углеводов и их комбинациями (сложные белки, нуклеопротеиды и др.);
- регуляторными молекулами (гормоны, ферменты, медиаторы, разнообразные биологически активные вещества);
- молекулами воды, липидов и других веществ;
- ионами;
- атомно-молекулярными кластерами, состоящими из неразрывно связанных ионов и молекул воды и всех перечисленных выше органических веществ в клетке.

Коллективное поведение молекул и ионов в составе таких атомно-молекулярных кластеров, соизмеримых с наночастицами, крайне своеобразно, но, к сожалению, практически не изучено. Образование, функционирование и распад подобных наноконплексов представляет более высокий – надмолекулярный, или субклеточный уровень организации живых систем. Особое место в нем занимают биологические мембраны, формирующие плазмалемму и многие органоиды клетки всех живых организмов. Возможность понимать, разрабатывать и контролировать эти свойства открывает целый мир функциональных молекулярных устройств – предмет бурно развивающихся во всем мире нанотехнологий.

Фундаментальные исследования в области нанотехнологий направлены на познание биологических, химических, физических свойств и явлений наномира, а также на разработку способов комбинирования этих свойств при производстве новых материалов и создании новых технологий. Открытия в области наноисследований уже успешно используются в биотехнологиях, медицине, электронике, транспорте, сельском хозяйстве, охране окружающей среды и др. Нанотехнологии, аккумулируя последние достижения всех естественных наук, создают основу очередной технологической революции, предусматривающей переход от работы с веществом к манипуляциям с отдельными атомами, молекулами и их комплексами.

1.4. Основные направления разрабатываемых нанобиотехнологий

Основными направлениями нанобиотехнологий в настоящее время рассматриваются:

- решение фундаментальных биологических задач, нерешенных с помощью традиционных цитологических и цитохимических методик (моделирование биологических процессов, анализ поведения биомолекул и атомно-молекулярных кластеров живых клеток, мониторинг состояния процессов жизнедеятельности отдельных клеток);

- изучение взаимодействия наночастиц с молекулами ДНК с целью разработки новых методов генной инженерии;

- изучение механизмов транспорта биомакромолекул (белковые, липидные молекулы, нуклеиновые кислоты) и веществ (включая лекарственные средства) с применением наночастиц через мембраны и создание нанотехнологий направленной доставки лекарств к клеткам-мишеням или органам;

- разработка и создание биосенсорных систем (индикаторные и диагностические тест-системы для биологии и медицины) на основе комплексов наномаркерных биомолекул для выявления определенного вещества в окружающей среде или организме человека, а также для определения нуклеотидных последовательностей с целью обнаружения мутаций;

- изучение возможностей применения наночастиц как новых наноматериалов медицинского назначения: энтеросорбенты для выведения из организма или удаления с его поверхности нежелательных и токсичных соединений (продукты метаболизма, тяжелые металлы, радионуклиды, ксенобиотики);

- создание новых высокочувствительных и удобных в применении систем для диагностики и эффективного лечения заболеваний на самых ранних стадиях развития;

- разработка и создание на основе нанобиочастиц нанотехнологий и новых наноматериалов для выделения белков, их модификации и последующего производства белковых препаратов;

- разработка самореплицирующихся систем на основе биоаналогов – бактерий, вирусов, простейших животных;

- изучение влияния наночастиц на сложноорганизованные биологические системы, включая организмы животных и человека;

- разработка на основе нанобиотехнологий лекарственных препаратов нового поколения;

- создание биологически совместимых (неотторгаемых организмом) медицинских материалов;
- разработка нанороботов, не провоцирующих иммунные реакции и способных устранять возникающие в органах очаги поражения.

Вопросы для повторения:

1. Дайте определение понятию «нанотехнологии».
2. Чем характеризуются наноструктуры?
3. Что такое нанобиотехнологии?
4. Почему молекулярный уровень организации живых систем является основным в манипуляциях с наноструктурами?
5. Каким образом субклеточный и клеточный уровни выступают моделями для разработки и использования наномеханизмов?
6. Охарактеризуйте тканевый, органнй и организменный уровни организации живых систем.
7. Опишите популяционный, видовой и биоценотический уровни живой природы.
8. Какие основные направления разработки нанотехнологий выделяют в биологии?
9. Как используют достижения нанобиотехнологий в медицине и промышленности?

Глава 2. Биомакромолекулы (молекулы биополимеров) как составляющие наномира

2.1. Биомакромолекулы. Мономеры и биополимеры.

Нуклеиновые кислоты и белки – критическая тройка биомакромолекул

Макромолекула – это гигантская молекула полимера, построенная из многих повторяющихся единиц – мономеров. Существует три типа макромолекул: полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Мономерами для них служат, соответственно, моносахариды, аминокислоты и нуклеотиды.

Молекулы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) являются носителями генетической информации, необходимой для существования и размножения живой клетки. Белки выступают в роли действующего начала: молекулы белков-ферментов катализируют разнообразные химические реакции, протекающие в клетке. Таким образом, ДНК, РНК, белки являются системой макромолекул, ответственных за генетическую информацию и выполняющих над ней различные операции: копирование, хранение, изменение, считывание, исполнение и т.д.

2.2. ДНК как носитель и хранитель генетической информации в клетке

Материальным носителем генетической информации (наследуемой из поколения в поколение информации о развитии, структуре и жизнедеятельности живых организмов) является ДНК (рис. 3), а в ряде случаев (например, у вирусов) – РНК. Генетическая информация определяет последовательность аминокислот в полипептидных цепочках, а тем самым и их структуру. Генетическая информация записана в ДНК посредством 4-буквенного

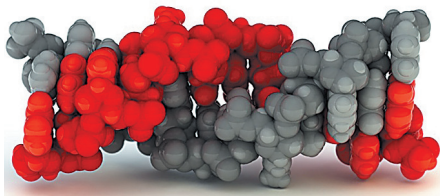


Рис. 3. Модель молекулы ДНК

алфавита (А, Г, Т, Ц) и отражается в последовательности нуклеотидов, содержащих 4 типа азотистых оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин). Участок ДНК, кодирующий структуру молекулы одного из видов РНК, назван геном.

ДНК органоидов цитоплазмы (хлоропластов, митохондрий) получила название внеядерной, или цитоплазматической ДНК. Она также является носителем наследственной информации, передающейся преимущественно по материнской линии.

2.3. Биологическая роль РНК, особенности ее строения и функции

Молекулы РНК состоят из одной полинуклеотидной цепочки, которая синтезируется на молекуле ДНК и является комплементарной копией участка одной из цепочек ДНК. Отличием химического состава РНК является то, что вместо тимина она содержит азотистое основание урацил, а в состав нуклеотида вместо дезоксирибозы включена рибоза. Существуют разные типы РНК, различающиеся по величине молекул, структуре, расположению в клетке и функциям. Низкомолекулярные транспортные РНК (тРНК) составляют примерно 10% от всей клеточной РНК (рис. 4).

При реализации генетической информации каждая тРНК присоединяет и переносит определенную аминокислоту к рибосомам – месту синтеза белка. Рибосомные РНК (рРНК) составляют до 85% всей РНК клетки. Они входят в состав рибосом и выполняют структурную функцию. Кроме того, рРНК участвуют в формировании активного центра рибосомы, где происходит образование пептидных связей между молекулами аминокислот в процессе биосинтеза белка. Информационные, или матричные РНК (иРНК) программируют синтез белков клетки, осуществляя непосредственную передачу кода ДНК к месту синтеза белков.

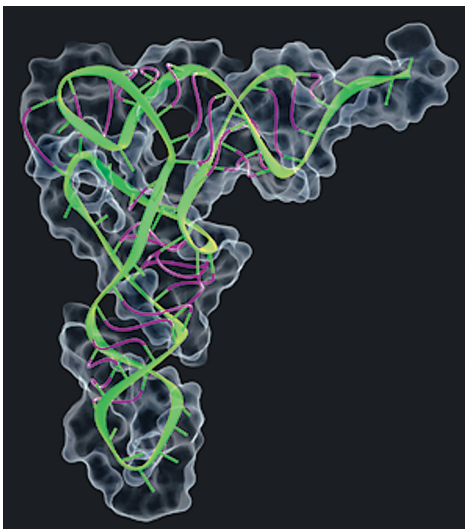


Рис. 4. Третичная структура тРНК дрожжей. Зеленым цветом обозначено пространственное расположение сахарофосфатного остова тРНК, а фиолетовым – азотистые основания

2.4. Белки: структурная организация и функции в клетке

Мономерами белков являются аминокислоты, имеющие как минимум одну аминогруппу ($-\text{NH}_2$) и карбоксильную группу ($-\text{COOH}$) и различающиеся структурой и физико-химическими свойствами радикалов. Пептидная (ковалентная азот-углеродная) связь образуется в результате взаимодействия аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой с выделением молекулы воды. Соединяясь друг с другом пептидными связями, аминокислоты образуют различной длины пептиды (дипептиды, тетрапептиды). При взаимодействии множества аминокислот образуется полипептид. Большинство белков представляют собой высокомолекулярные полипептиды, в состав которых входят от ста до нескольких тысяч аминокислот. Последовательность аминокислот в составе полипептидной цепи определяет первичную структуру белка, от которой зависят форма, свойства и функции белковой молекулы. Вторичная структура большинства белков связана с формированием правозакрученной α -спирали и возникает в результате образования водородных связей между $-\text{CO}-$ и $-\text{NH}-$ группами разных аминокислотных остатков полипептидной цепи.

У большинства белков полипептидные цепи свернуты особым образом в компактную глобулу (третичная структура). Прочность глобулы обеспечивается разнообразными связями, возникающими между радикалами аминокислот (дисульфидными, ионными, водородными и гидрофобными). Некоторые белки характеризуются четвертичной структурой (мультимерные белки). Они состоят из нескольких полипептидных цепей, удерживаемых в молекуле вместе за счет гидрофобных взаимодействий, а также при помощи водородных и ионных связей (гемоглобин и т.п.).

Белки являются одним из наиболее распространенных веществ в клетке и в организме в целом, что обусловлено многогранностью функций, которые они выполняют. В качестве основных функций можно рассматривать следующие: пластическую (строительную), каталитическую (ферментативную), транспортную, гормональную, защитную, двигательную, опорную и формообразующую, энергетическую, рецепторную (чувствительную), запасующую, антибиотическую, токсическую. Среди всех функций, выполняемых белками в клетке, особое место занимают функции транспорта веществ и рецепции.

2.5. Белки-переносчики: особенности расположения и функционирования в клетке

Белки-переносчики – это трансмембранные белки, которые специфически связывают молекулу транспортируемого вещества и, изменяя конформацию, осуществляют перенос молекулы через липидный слой мембраны. В белках-переносчиках всех типов имеются определенные участки связывания для транспортируемой молекулы. Они работают в механизмах как пассивного, так и активного мембранного транспорта, выступая в этом процессе как связанные с мембраной ферменты. Примером белка-переносчика, использующего энергию гидролиза АТФ для перекачивания ионов, служит натрий-калиевый насос, играющий решающую роль в образовании мембранного потенциала на плазматических мембранах животных клеток.

2.6. Строение, расположение и функции белков-рецепторов

На наружной мембране клетки, в цитоплазме, на ядерной мембране и на других оргanelлах клетки располагаются специальные белки-рецепторы (рис. 5). Они обладают свойством специфически взаимодействовать с определенными химическими веществами (лигандами). Такие рецепторы, чувствительные к отдельным веществам, разбросаны по поверхности клетки или собраны в небольшие зоны. На мембране обычно имеется около 100 различных разновидностей рецепторов, и



Рис. 5. Механизм работы белков-рецепторов и белков-переносчиков. Рецепторный белок при взаимодействии с сигнальной молекулой изменяет свою конформацию и становится доступным для взаимодействия с G-белком. G-белок активирует фермент аденилатциклазу, которая продуцирует цАМФ, благодаря чему ионные каналы открываются

каждый из них «узнает» определенный лиганд. Роль многих клеточных рецепторов заключается не только в связывании специфических веществ, но и в передаче сигналов с поверхности внутрь клетки. Разнообразие и специфичность наборов рецепторов на поверхности клеток приводит к созданию очень сложной системы маркеров, позволяющих клеткам отличать «своих» (той же особи или того же вида) от «чужих».

Любой белок-рецептор состоит как минимум из двух участков, которые обеспечивают узнавание лиганда, а также преобразование и передачу полученного сигнала в клетку.

Белок-рецептор обладает участком, комплементарным определенной части сигнальной молекулы. Процесс связывания рецептора с лигандом похож на процесс связывания фермента с субстратом и определяется степенью сродства рецептора и лиганда. Между молекулой специфического химического вещества и рецептором формируются электростатические и гидрофобные взаимодействия. Они вызывают конформационные изменения белка-рецептора, вследствие которых активируется комплекс лиганда с белком-рецептором. В активном состоянии белок-рецептор может вызывать специфические внутриклеточные реакции в ответ на принятый сигнал.

2.7. Достижения нанобиологии в изучении рецепторной функции мембраны

Одной из важнейших функций плазматической мембраны (плазмалеммы) является рецепторная. Роль рецепторов на мембране могут выполнять трансмембранные белки GPCR, отвечающие за передачу внешних сигналов внутрь клетки. Около трети всех производимых лекарств оказывают воздействие на клетки, взаимодействуя с белками GPCR. Чтобы целенаправленно создавать молекулы лекарств, которые могут эффективно соединиться с рецепторами, важно знать пространственную структуру последних. Однако определить ее оказалось очень трудно, поскольку большинство трансмембранных белков сразу распадается после извлечения из клеточной мембраны. Те немногие рецепторные белки, трехмерную структуру которых удалось определить, оказались неподходящими мишенями для лекарств.

По-другому подошли к решению этой проблемы в лаборатории биологических систем Технологического института штата Джорджия. Группа исследователей под руководством Джеффри Сколника просто смоделировала структуру трансмембранных белков на компьютере. Для этого была

применена специальная компьютерная программа TASSER, разработанная Сколником с коллегами в 2004 году в Университете Буффало.

Программа TASSER позволяет на основе последовательности аминокислот в белковой молекуле предсказывать с высокой точностью ее пространственную укладку. В качестве исходных данных были взяты генетические коды 907 белков GPCR, не превышающих по длине 500 аминокислот. Для 820 из них удалось получить модели, пригодные для использования в дальнейших исследованиях. В перспективе в лаборатории планируется моделирование молекул различных лекарств и изучение их взаимодействия с трансмембранными белками.

2.8. Нанобиотехнологии на основе белков-переносчиков и белков-рецепторов. Нанобиосенсоры, их применение в диагностике заболеваний

На основе механизмов функционирования белков-переносчиков и белков-рецепторов учеными разработаны нанобиосенсоры, обеспечивающие высокочувствительное и специфичное выявление белков, вирусов или ДНК в биологическом материале, способные внести революционные изменения в диагностическую медицину. В частности, созданы нанобиосенсоры, которые запрограммированы на обнаружение в биологическом субстрате (слюна, кровь и др.) комплекса белков, являющихся индикаторами развития тех или иных заболеваний.

В настоящее время создаются полупроводниковые устройства на основе нанопроводов, на поверхность которых наносится слой специальных белков-рецепторов (сенсорных молекул). Они образуют точный биоаналитический сенсор, который способен специфически связываться с биологическими макромолекулами. В результате этого взаимодействия из-

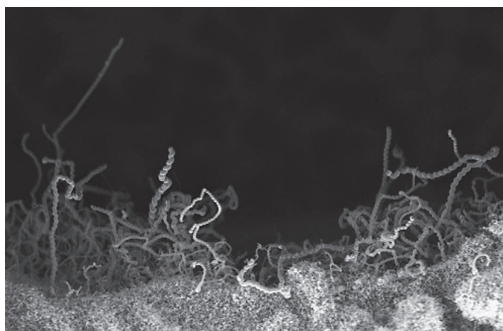


Рис. 6. Биосенсор на основе выращенных в титане углеродных нанотрубок, позволяющий измерять проводимость ткани. По величине проводимости можно определить тип ткани

меняется электрическая проводимость нанопровода, что сигнализирует о выявлении определенной субстанции (рис. 6). К настоящему времени создан нанобиосенсор на основе нанопроводов, позволяющий детектировать единичные вирусные частицы. Связывание вируса со специфическим белком-рецептором (антителом), нанесенным на поверхность нанопровода, вызывает значимое изменение электрической проводимости.

Ученым удалось сконструировать наносенсор, способный одновременно выявлять несколько видов вирусов на основе нескольких различных антител, специфических для каждого из них. Такие устройства, несомненно, найдут применение в медицинской диагностике.

Особо перспективными представляются создаваемые наносенсоры, которые выявляют определенную последовательность нуклеотидов ДНК. В одном из таких устройств рецепторы, нанесенные на нанопровода, способны детектировать гены, несущие специфическую мутацию, которая в 75% случаев вызывает заболевание муковисцидоз.

Перспективная область применения создаваемых нанобиосенсоров – диагностика заболеваний на основе обнаружения специфических маркерных белков. Уже разработан способ выявления злокачественных клеток некоторых опухолей с помощью покрытых антителами углеродных нанотрубок. В ответ на появление в организме чужеродных веществ, называемых антигенами, иммунная система вырабатывает антитела. Каждый вид антител избирательно взаимодействует с определенным антигеном. Используя антитела, специфичные к рецепторам (антигенам) на поверхности раковых клеток, можно обнаружить злокачественную опухоль в организме человека.

Кроме диагностики заболеваний, нанобиосенсоры могут найти применение в направленном транспорте лекарственных веществ к клеткам-мишеням. В настоящее время создаются наноконтейнеры (липосомы, мицеллы, полимерные наночастицы), поверхность которых покрыта специальными сенсорными молекулами (своеобразными антителами), обеспечивающими возможность найти клетку-мишень в любой части организма. Внутри наноконтейнера могут помещаться молекулы лекарственного вещества или, например, ген, кодирующий белок, который запускает процесс самоуничтожения клетки. При связывании антител с рецепторами «больных» клеток содержимое контейнера перемещается внутрь клетки, что приводит к их «выздоровлению» или гибели (раковые клетки).

Таким образом, перспективными представляются два направления использования нанобиосенсоров в совокупности с наноконтейнерами в ме-

дицине: 1) для обнаружения антител, специфичных к антигенам больных клеток; 2) для локальной доставки лекарственных средств непосредственно к больным клеткам. При использовании медикаментозных препаратов, заключенных в наночастицы, минимизируется их разрушение и инактивация при применении, предотвращается возникновение побочных эффектов, а также увеличивается биодоступность за счет доставки лекарства непосредственно в патологический очаг.

Вопросы для повторения:

1. Что представляют собой биомакромолекулы? Охарактеризуйте мономеры биомакромолекул.
2. Опишите строение и функции ДНК.
3. Каковы структурные особенности строения РНК?
4. Какие виды РНК функционируют в клетке?
5. Охарактеризуйте строение и роль в клетке белков. Каков механизм образования пептидной связи?
6. Что представляют собой вторичная, третичная и четвертичная структуры белков?
7. Какова роль трансмембранных белков в составе плазматической мембраны?
8. Какие исследования проводились в области трансмембранных белков плазмалеммы?
9. Как устроены белки-рецепторы?
10. На каких особенностях строения и функционирования белков-переносчиков и белков-рецепторов основана работа нанобиосенсоров?
11. Каким образом применяют нанобиосенсоры для диагностики заболеваний?
12. На чем основан направленный транспорт лекарственных веществ?

Глава 3. Нанобиотехнологии на основе амплификации и репликации молекул нуклеиновых кислот

3.1. Свойства ДНК, используемые в нанотехнологиях. Механизм репликации ДНК

Использование ДНК в нанотехнологиях обусловлено ее особыми свойствами.

Во-первых, молекула ДНК, являясь носителем генетической информации, обладает уникальной способностью к репликации. Способность ДНК к самовоспроизводству обеспечивает размножение живых организмов, развитие многоклеточного организма из оплодотворенной яйцеклетки, передачу наследственной информации из поколения в поколение (рис. 7).

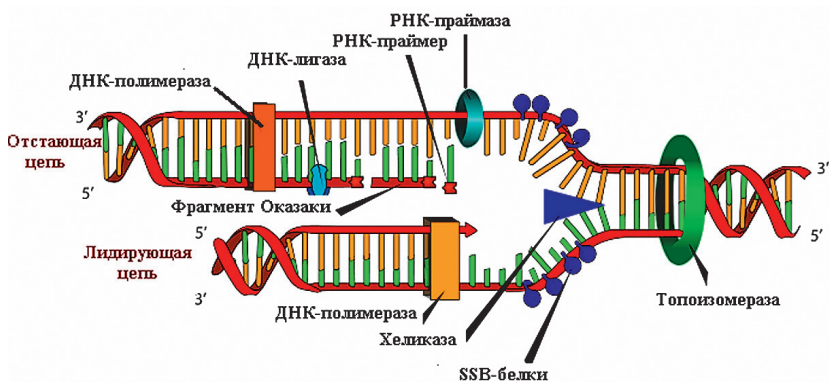


Рис. 7. Схема репликации ДНК

Удвоение ДНК происходит таким образом, что особые ферменты разъединяют полинуклеотидные цепи, затем каждая цепь служит матрицей для сборки с помощью фермента ДНК-полимеразы комплементарной новой цепи ДНК. Особенность работы ДНК-полимеразы состоит в том, что она не может начать синтез дочерней ДНК с нуля, а способна наращивать нуклеотиды только на уже имеющийся свободный 3'-конец цепи, т.е. двигается в направлении по материнской цепи только от 3'- к 5'-концу. Поэтому сначала другой фермент РНК-праймаза строит РНК-затравку, на основе которой ДНК-полимераза наращивает дочернюю цепь, комплементарную материнской.

В конечном итоге образуются две дочерние двухцепочечные молекулы, неотличимые по строению от материнской ДНК. Каждая из них состоит из одной цепи исходной материнской молекулы ДНК и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм репликации ДНК, при котором от одного поколения к другому передается лишь одна из двух материнских цепей молекулы ДНК, получил название полуконсервативного.

Во-вторых, молекулы ДНК обладают способностью к гибридизации, в результате которой образуются рекомбинантные ДНК.

3.2. Гибридизация нуклеиновых кислот, ее практическое применение

Установлено, что при нагревании до 100°C водородные связи между комплементарными парами оснований разрушаются и ДНК диссоциирует на две самостоятельные цепочки (рис. 8). Этот процесс назван денатурацией ДНК («плавлением»). Выдерживание комплементарных цепей при температуре 65°C приводит к их спариванию и восстановлению структуры двойной спирали (гибридизация, или «отжиг»).

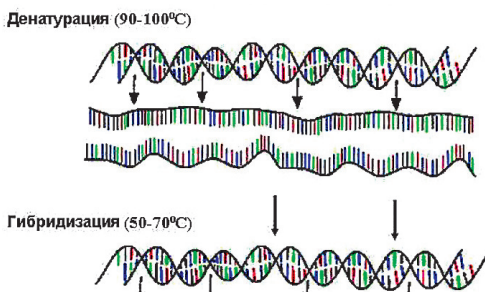


Рис. 8. Схема гибрилизации ДНК

Гибридизация – это способность одиночных цепей нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) комплементарно спариваться между собой с восстановлением двухцепочечной структуры. При этом могут образовываться как комплексы ДНК-ДНК, так и комплексы ДНК-РНК.

Метод гибрилизации нуклеиновых кислот может быть использован:

- для нахождения числа определенных нуклеотидных последовательностей (генов) в ДНК, с высокой степенью точности позволяющей выявить один-единственный ген в клетке;
- для выявления локализации определенных видов матричной РНК в клетках, что позволяет судить о дифференциальной активности генов в эмбриогенезе и процессе дифференцировки в клетках эмбриона (популярной биологической моделью в таких исследованиях являются эмбрионы плодовой мушки дрозофилы);

– для выявления транскрибируемых и нетранскрибируемых последовательностей в ДНК (подобный анализ результатов гибридизации ДНК:РНК позволил У. Гилберту выявить мозаичное строение генов у эукариот, что стало одним из крупнейших открытий в молекулярной биологии).

3.3. Амплификация молекул нуклеиновых кислот как основа для разработки методов диагностики заболеваний

Способность ДНК к репликации и гибридизации легла в основу разработки метода **амплификации** (увеличения числа копий) нуклеиновых кислот или их фрагментов – полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полимеразную цепную реакцию впервые осуществил в 1983 году американский ученый Кэри Мюллис.

С помощью ПЦР можно достаточно быстро (в течение нескольких часов) получить миллионы копий определенных нуклеотидных последовательностей (генов), что позволяет затем обнаруживать и изучать их с помощью обычных лабораторных методов.

Для проведения ПЦР необходимы следующие компоненты:

- *ДНК-матрица* – молекула ДНК или ее часть, содержащая искомым ген (это может быть всего одна-единственная молекула ДНК вируса или бактерии, оказавшаяся в пробе для анализа);

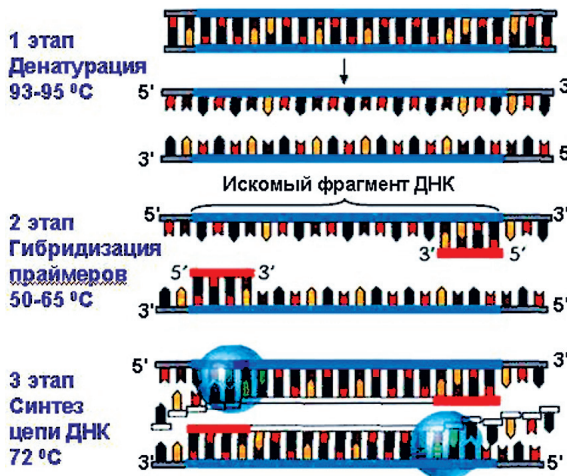


Рис. 9. Схема 1-го цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- *праймеры* (небольшие фрагменты из 20-30 нуклеотидных пар), комплементарные последовательностям нуклеотидов на концах искомого гена. Праймеры служат, по существу, для двух целей: во-первых, инициируют работу ДНК-полимеразы, предоставляя ей свободный 3'-конец, а во-вторых, ограничивают ее действие, как бы «застопоривают» фермент в рамках выбранного для копирования участка ДНК, ограничивая его с двух сторон;

- *смесь нуклеотидов* (являющихся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК);

- *фермент ДНК-полимераза*;

- *буферный раствор* (реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента).

Полимеразная цепная реакция включает множество циклов, каждый из которых протекает в 3 этапа (рис. 9):

1 этап – денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93-95°C в течение 30-40 сек. Под воздействием температуры разрушаются водородные связи, и цепи ДНК расходятся.

2 этап – присоединение праймеров (гибридизация). Температуру раствора снижают, и праймеры соединяются с комплементарными им участками ДНК на границах искомого гена. Время гибридации – 20-60 сек.

3 этап – синтез цепей ДНК. Осуществляется с помощью ДНК-полимеразы. В качестве затравки этот фермент использует 3'-конец праймера. Полимераза всегда строит новую цепь в направлении от 5'- к 3'-концу ДНК.

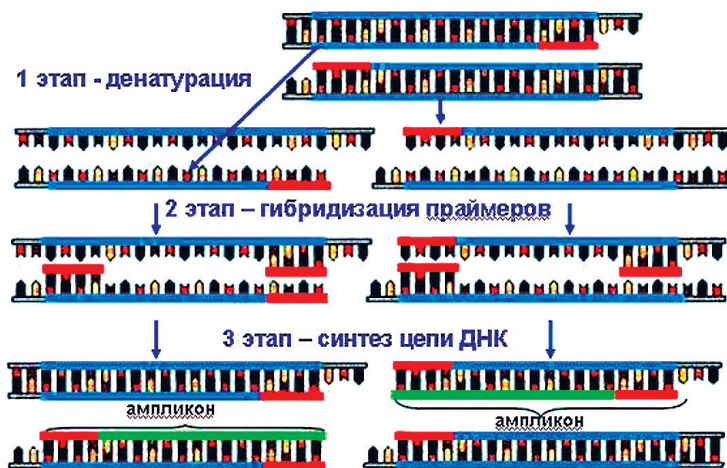


Рис. 10. Схема 2-го цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор нуклеотиды. Процесс проходит при температуре 70-72°C. Время протекания синтеза – 20-40 сек.

К концу 1-го цикла ПЦР в растворе содержатся два двухцепочечных фрагмента ДНК, каждый из которых включает в себя одну исходную цепь и одну цепь, образованную по праймерам.

При втором цикле амплификации все описанные выше этапы повторяются. Происходит денатурация цепей ДНК. Затем каждая из 4 цепей снова взаимодействует с праймерами, и в конечном итоге появляются фиксированные по длине фрагменты, соответствующие искомому гену, ограниченные с двух сторон праймерами – ампликонами (рис. 10). Таким образом, к концу 2-го цикла ПЦР появляется 2 ампликона.

Процесс ПЦР отличается цепным характером, так как синтезированные ампликоны в дальнейшем сами служат матрицей, на которой протекает процесс копирования. Вследствие этого с каждым новым циклом число копий ДНК увеличивается в геометрической прогрессии (рис. 11), при этом большинство продуктов реакции будут представлять собой ампликоны.

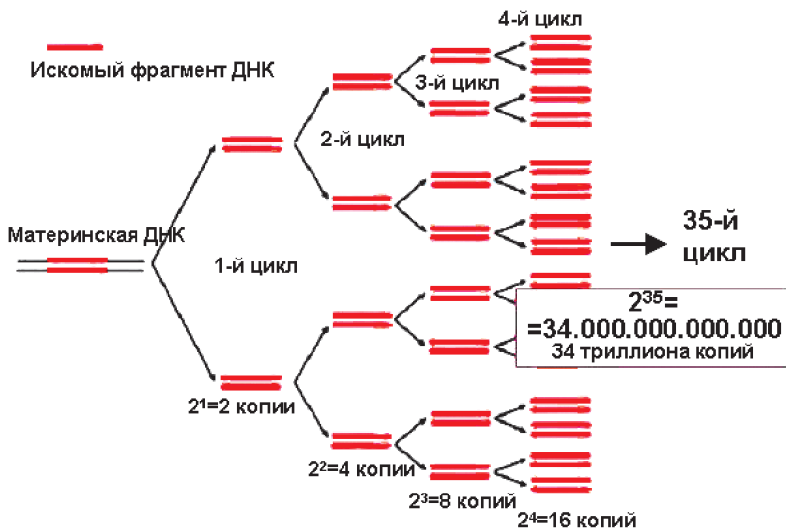


Рис. 11. Обобщенная схема полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Поэтому даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК (например, ДНК какого-либо вируса), то через 30-40 циклов (всего 4-5 часов) в растворе накапливается

достаточно много ее копий, что позволяет обнаружить данные гены с помощью обычных лабораторных методов (например, метода электрофореза).

Процесс ПЦР проводится в специальной лаборатории и особом программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно количеству циклов амплификации (рис. 12).

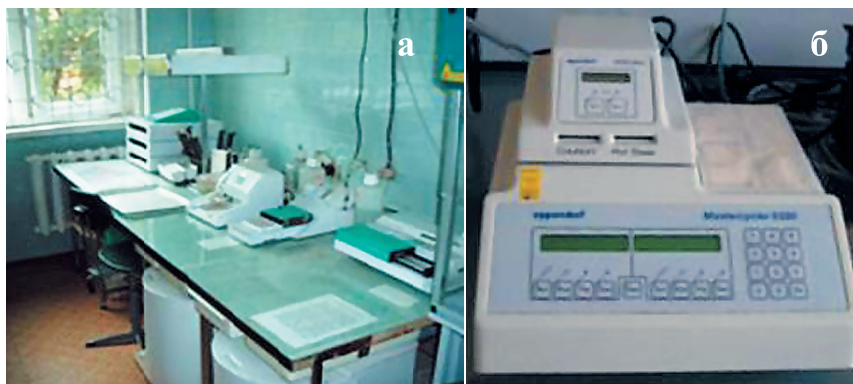


Рис. 12. Лаборатория для проведения ПЦР (а); амплификатор (б)

Результаты, достигаемые с помощью ПЦР, позволили этому методу занять ведущее место как в научных исследованиях фундаментального характера, так и в практическом применении в медицинских целях. В настоящее время полимеразная цепная реакция широко применяется в медицинской диагностике большинства бактериальных и вирусных заболеваний. Также ПЦР широко используется в криминалистике (для идентификации личности), ветеринарии (для диагностики заболеваний), генетике (для изучения активности генов), молекулярной биологии (для увеличения числа копий нуклеиновых кислот).

3.4. Создание биочипов на основе ДНК

При высоком числе генов у эукариот (от 6200 у дрожжей до 100 000 и более у человека) возникает необходимость в использовании специальной техники для одновременного получения экспериментальной информации об активности большого числа генов в клетке.

Современная экспериментальная техника позволяет создать матрицу – биочип размером всего несколько сантиметров, с помощью которой можно

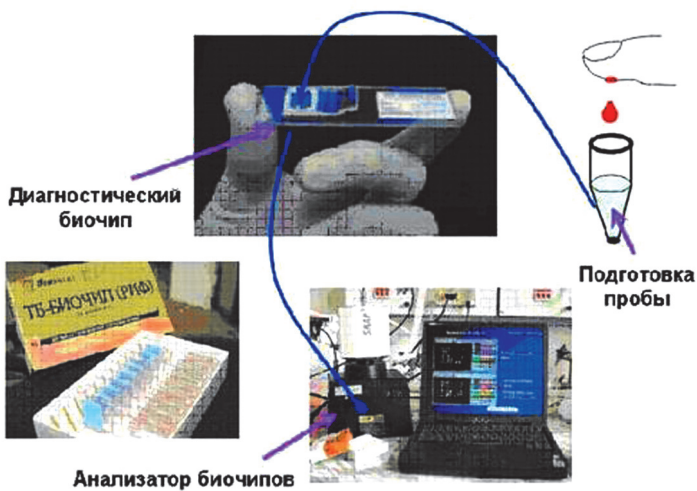


Рис. 13. Основные компоненты комплексной системы анализа с помощью биочипов

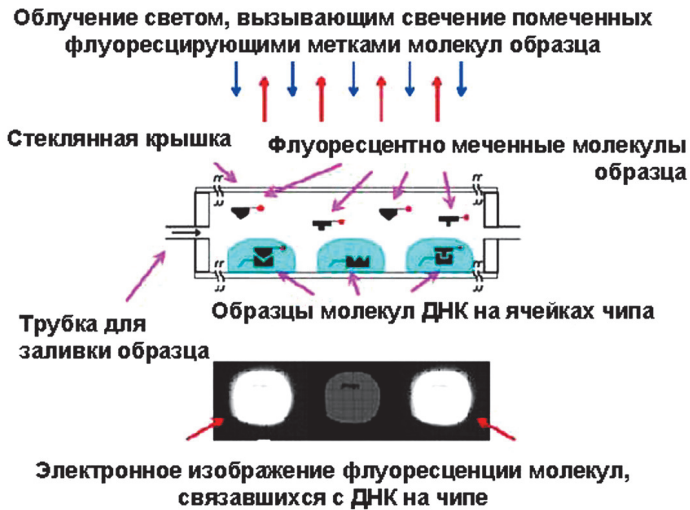


Рис. 14. Схема работы биочипа

получить данные о функциональной активности многих (если не всех) генов организма.

Технология биочипов разработана в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта под руководством академика А.Д. Мирзабекова. При создании биочипа на специальную (стеклянную) подложку с помощью роботов наносят образцы молекулы ДНК, которые представляют собой либо отдельные гены, либо молекулы ДНК, полученные в результате полимеразной цепной реакции.

Для проведения анализа образец ткани (например, взятая для анализа кровь) проходит предварительную обработку, включающую флуоресцентное мечение присутствующих в нем молекул ДНК или РНК, а затем наносится на биочип, помещенный в специальную микрокамеру (*рис. 13*).

Затем проводят гибридизацию между содержащимися на чипах генами, с одной стороны, и содержащимися в пробе флуоресцирующими ДНК или РНК – с другой (*рис. 14*). После того как молекулы образца провзаимодействовали по принципу комплементарности с соответствующими генами на чипе, при облучении светом определенной длины волны появляется свечение соответствующих ячеек. По характеру свечения прибор-анализатор определяет количество характерных последовательностей ДНК, РНК или набора белков в исследуемом образце.

Использование биочипов перспективно в разных направлениях и прежде всего для выявления генов, реагирующих на негативное (стрессовое) воздействие окружающей среды и осуществляющих защитные функции в организме. Применение биочипов позволяет оперативно выявлять бактерии и вирусы, выяснять индивидуальные генетические особенности пациента, определяющие предрасположенность к наследственным и онкологическим заболеваниям.

3.5. Наноконплексы в диагностике мутаций

В настоящее время ведутся работы по созданию сверхточного и быстрого ДНК-секвенатора на основе нанопор. Новое наноустройство способно контролировать положение молекулы ДНК в нанопоре с точностью до одного нуклеотида и может совершить переворот в современной технологии секвенирования – определения последовательности нуклеотидов в ДНК. Создание данного устройства позволит расшифровывать геном человека всего за несколько часов, при этом процедура не будет дорогостоящей: ее смогут применять любые медицинские учреждения.

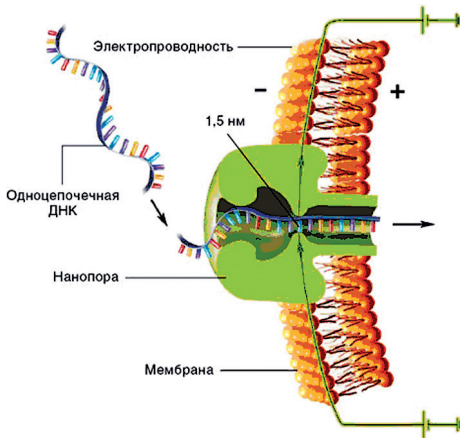


Рис. 15. Схема функционирования наносеквенатора

Сущность метода заключается в изменении электрического потенциала при прохождении ДНК через нанопору (рис. 15). Ученые разработали математическую модель наносеквенатора, читающего отдельные нуклеотиды ДНК, что позволяет быстро устанавливать наличие той или иной мутации в геноме. Начаты работы по созданию ДНК-транзистора, с помощью которого будет производиться более эффективное

секвенирование генома. ДНК-транзистор – это достаточно длинная нанопора с рядом полупроводниковых и металлических добавок, внутри которой находится длинная молекула ДНК. Диаметр нанопоры должен быть всего в несколько нанометров. Внутри нанопоры (ДНК-канала) благодаря добавкам располагаются заряды, сравнимые с зарядами одиночных электронов. Из-за разности потенциалов между центральным и боковыми электродами формируется электростатическая ловушка для ДНК. Изменение частоты напряжения приведет к движению молекулы внутри поры с заданной точностью, в частности, с точностью до одного нуклеотида, чего ранее достичь не удавалось. Нанопоры для ДНК-транзисторов можно будет изготавливать в больших количествах с помощью современных методов микроэлектронного производства.

Для сравнительной оценки нового способа следует упомянуть, что секвенирование ДНК одного человека с помощью существующей техники занимает несколько месяцев и обходится в миллионы долларов. Естественно, это не позволяет изучать геномы пациентов с целью лечения генетических болезней. Создание массового производства описанного устройства быстрого секвенирования сделает анализ ДНК вполне обычной клинической процедурой, подобно анализу крови. Это, бесспорно, станет знаменательной вехой в развитии мировой медицины.

Вопросы для повторения:

1. Почему способ репликации ДНК получил название полуконсервативного?
2. Что лежит в основе метода гибридизации нуклеиновых кислот и где он может быть использован?
3. Охарактеризуйте сущность метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).
4. С какой целью метод полимеразной цепной реакции используется в медицине?
5. На чем основан принцип работы биочипа?
6. Что такое секвенирование?
7. Какие наноконструкции можно использовать для диагностики генных мутаций?

Глава 4. Нанобиотехнологии на основе метода генетической инженерии

4.1. Генетическая инженерия как одно из направлений нанобиотехнологии: понятие, цели, основные принципы

Одним из основных методов нанобиотехнологии является целенаправленное конструирование биологических молекул (в первую очередь ДНК) с целью создания новых форм организмов с заданными (необходимыми человеку) свойствами. Раздел биологии, разрабатывающий приемы экспериментальной перестройки генома организмов, получил название **генетической инженерии**. Молекулы ДНК, создаваемые методами генетической инженерии, часто называют рекомбинантными, или, чтобы подчеркнуть их отличие от молекул, образуемых в результате естественной рекомбинации, гибридными.

В 1972 году американский ученый Пол Берг создал *in vitro* (вне организма) рекомбинантную ДНК, которая состояла из фрагментов ДНК вируса, фага и бактерии. Этим опытом было положено начало новой отрасли молекулярной биологии – генетической инженерии. Ее развитие стало возможным благодаря открытию двух типов ферментов – рестриктаз, разрезающих молекулу ДНК в строго определенных участках, и лигаз, сшива-

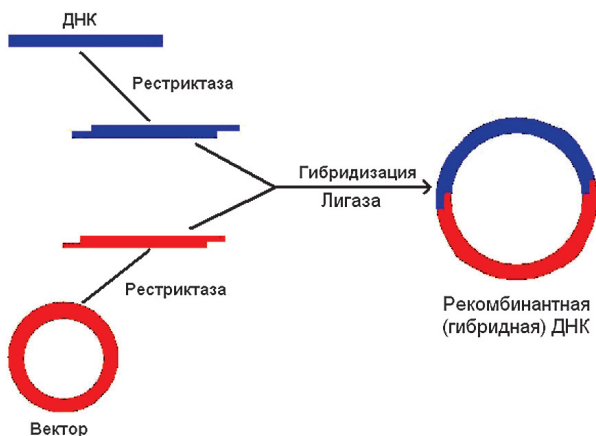


Рис. 16. Схема создания рекомбинантной (гибридной) ДНК

ющих отрезки различных молекул ДНК друг с другом. Рестриктазы были названы «биологическими ножами», которыми манипулируют генные инженеры, или генные «хирурги». Важным для генетической инженерии стало открытие векторов. Векторы представляют собой вирусы или короткие внехромосомные, самостоятельно размножающиеся генетические элементы бактерий (плазмиды). С помощью рестриктаз и лигаз в векторы встраивают необходимый ген, добиваясь впоследствии его включения в геном клетки-хозяина (рис. 16).

Основные направления генетической инженерии – создание трансгенных организмов и разработка принципов генной терапии. Благодаря развитию и совершенствованию методов генетической инженерии стало возможным объединение генетической информации организмов разных видов, в том числе стоящих на разных ступенях эволюции. Кроме того, «в пробирке» можно управлять процессом рекомбинации, минуя запрещающие механизмы организма. Для выполнения генно-инженерных работ необходимо решить следующие задачи: 1) создать рекомбинантные ДНК, пригодные для переноса в клетку; 2) разработать методы введения рекомбинантных ДНК в клетку; 3) создать условия для нормальной работы генов, введенных в клетку.

Генно-инженерные работы выполняются в несколько этапов: 1) нужный ген выделяют из естественных источников (клонирование) или синтезируют химическим путем; 2) подбирают вектор (молекулу ДНК, переносящую нужный ген в клетку); 3) объединяют вектор и переносимый ген; 4) вводят конструкцию из вектора и гена (рекомбинантную ДНК) в клетку-мишень, осуществляя ее трансформацию, т.е. изменение ее свойств.

4.2. Способы получения генов для трансплантации

Искусственный химический синтез структурной части гена был впервые осуществлен в 1969 году Г. Кораной. Так как синтезированный ген не имел регуляторной части, то функционирование его было невозможным. Позднее научный коллектив Г. Кораны синтезировал первый функционально активный ген, кодирующий синтез тирозиновой тРНК кишечной палочки. В настоящее время осуществляется химический синтез генов, кодирующих образование таких гормонов человека, как инсулин, соматостатин, соматотропин и др.

Получение генов можно осуществить, используя реакцию обратной транскрипции, при которой фермент ревертаза строит копии ДНК на раз-

личных РНК. С помощью ревертазы можно синтезировать практически любой ген в присутствии соответствующих мРНК, методы выделения которых достаточно хорошо разработаны. Таким способом получены гены, кодирующие синтез белка хрусталика глаза человека, яичного белка, фиброина шелка и др.

Выделение генов из естественных источников является сложнейшей задачей, так как из многих тысяч генов, имеющих в геноме клетки, нужно выделить единственный конкретный ген, контролирующий развитие того или иного признака. Для этого необходимо точно знать расположение гена и произвести его вырезание при помощи соответствующих ферментов. Для точного определения места расположения необходимого гена используют меченую плазмиду, которая, встраиваясь в различные гены, вызывает их мутации. По мутантному фенотипу отбирают встройку в нужный ген, а затем отделяют его от меченой плазмиды.

4.3. Технологии переноса генов в клетку

Выделенный или синтезированный фрагмент ДНК (ген) не может самостоятельно встраиваться в ДНК клетки-мишени и тем более начинать функционировать. Для переноса необходимого гена создается векторная конструкция (вектор), несущая необходимый ген и способная встраиваться в геном клетки. Кроме того, вектор обеспечивает стабильное наследование встраиваемого гена и может иметь маркер для обнаружения. Векторные конструкции обычно создают на основе плазмид и вирусов. В качестве примера рассмотрим, как образуются плазмидные векторы.

Простейшие плазмидные векторы включают следующие компоненты: 1) участок, обеспечивающий репликацию плазмиды и перенесенного гена; 2) маркер, позволяющий определить клетку, несущую плазмиду со встроенным геном; 3) встроенный ген.

В организме (клетке) процесс рекомбинации возможен только между гомологичными молекулами ДНК. Однако оказалось, что *in vitro* возможно взаимодействие (гибридизация) молекул ДНК, имеющих различное происхождение. Для этого необходимо лишь наличие коротких (от 4 до 20 нуклеотидов) односпиральных участков на концах молекул ДНК, которые получили название «липких концов». Они позволяют соединиться («слипаться») различным фрагментам ДНК посредством образования водородных связей между односпиральными участками.

После обработки ДНК плазмиды и ДНК вводимого гена рестриктазой получают линейные ДНК плазмиды и гена, имеющие «липкие» концы. Обработка смеси ДНК плазмиды и гена ДНК-лигазой приводит к образованию плазмиды, содержащей встроенный чужеродный ген.

Для создания векторных конструкций часто используют линейные или кольцевые плазмиды митохондрий или бактерий, имеющие микроскопические размеры (около 1-2 тысяч пар нуклеотидов). Необходимо подчеркнуть, что получаемые для трансплантации комплексы генов и векторов представляют собой также мельчайшие частицы. После получения векторной конструкции исследователю необходимо обеспечить «доставку» гена в составе вектора в геном клетки.

4.4. Методы внедрения чужеродной ДНК в геном клетки

В качестве объектов-мишеней, в геном которых встраивают чужеродные гены, используют клетки прокариот, эмбриональные клетки животных и растений, ядра клеток животных, изолированные клетки, ткани и споры растений. Каким же способом можно ввести вектор в клетку?

1. *Микроинъекция.* При помощи тончайшей стеклянной трубочки (диаметр около 100 нм) и микроманипулятора в ядро клетки можно ввести векторную ДНК с включенным в нее трансгеном. Число молекул ДНК, вводимых за одну инъекцию, может составлять от 100 до 300 000.

2. *Электропорация.* Под действием импульсов высокого напряжения (200-350 В, длительность 54 мс) обратимо увеличивается проницаемость мембран. В результате через образующиеся на короткое время в мембране микропоры ДНК из окружающей среды проникает в клетку.

3. *Трансфекция.* Вектор обрабатывают ионами Са. Образующиеся нанокомплексы ионов и вектора проникают в клетку путем пиноцитоза. Метод применяют для внедрения трансгенов в эукариотические клетки.

4. *Упаковка в липосомы.* Липосомы – сферические образования, покрытые фосфолипидами и содержащие внутри вектор, способные проникать в клетку вследствие их растворения в липидах плазмалеммы.

5. *Бомбардирование микрочастицами.* Это один из самых эффективных методов трансформации растений. Для внедрения используют незрелые зародыши семян, которые бомбардируют частицами золота или вольфрама (диаметр около 600 нм), на которые наносится покрытие из вектора. Этими частицами заряжают «генные пушки», после выстрелов из которых части-



Рис. 17. «Генная пушка»
Р.К. Салаева

цы проникают в клетки. Клетки в направлении выстрела чаще всего гибнут, в то время как в зоне 0,6-1 см от центра находятся наиболее удачно трансформированные клетки. Частицы могут проникать на глубину 2-3 клеточных слоев. Удивительную по простоте и дешевизне конструкцию «генной пушки» предложил отечественный ученый Р.К. Салаев (*рис. 17*).

Золотые шарики, на которые нанесена ДНК, прикрепляются на фронтальную сторону тefлоновой пульки от духового ружья. На свободный конец ствола надевается специальная насадка. После выстрела пуля вылетает из ствола и застревает в отверстии насадки. Золотые шарики с прикрепленной ДНК в силу инерции отрываются, летят в сторону клеточной суспензии, помещенной в 10-15 см от конца насадки, и прошивают клетки и ядра.

4.5. Перспективы развития нанобиотехнологии в производстве биологически активных веществ и лекарственных препаратов.

Генная терапия и генный таргетинг

В настоящее время широко налажено производство инсулина для лечения сахарного диабета, интерлейкина – эффективного противоракового препарата, интерферона – противовирусного и противоракового препарата и ряда других лекарственных средств. Неблагоприятная экологическая обстановка приводит к тому, что все больше детей рождается с серьезными наследственными дефектами. Бионанотехнологии уже внесли свой вклад в решение этой проблемы: разработаны диагностические препараты, позволяющие обнаружить генетические аномалии в период ранней беременности. Наиболее обнадеживающие результаты ожидаются в тех случаях, когда заболевание обусловлено дефектом одного гена. Здесь возможно

введение нормального гена в соматические клетки прицельно в то место хромосомы, где находится дефектный ген. Такой однократной процедуры может быть достаточно, чтобы излечить болезнь.

В ряде случаев излечение возможно при выключении функции определенного гена. Такое явление называют генным нокаутом, или генным таргетингом. Нормальный ген выделенной из организма стволовой клетки заменяется на «сломанную» копию. В результате последующего введения трансформированных стволовых клеток в организм белок, который кодируется этим геном, не синтезируется. Уже около 10 000 болезней человека поддаются излечению с помощью генной терапии.

В сельском хозяйстве бионанотехнологии находят применение при создании трансгенных растений и животных. Перенос чужеродных генов обуславливает рост их урожайности (плодовитости), повышает устойчивость к заболеваниям, защищает от паразитов. Так, в Бельгии и США выведены сорта картофеля и томатов, которые устойчивы к колорадскому жуку и позволяют на 40-60% сократить применение инсектицидов.

4.6. Основные стратегии создания наноконструкций на основе нуклеиновых кислот

В процессе эволюции биологические молекулы приобрели свойства, которые делают их идеальным материалом для создания структур нанометрового размера. Необходимо отметить, во-первых, многообразие биологических молекул (аминокислоты, липиды, нуклеотиды). Во-вторых, многие биомолекулы способны к спонтанному образованию сложных пространственных структур. В-третьих, сборка биологических полимеров подвергается тонкой регуляции, что открывает возможность создания самых разных наноконструкций. Иерархия самособирающихся биологических структур начинается с мономеров, то есть нуклеотидов, аминокислот, моносахаридов. Они образуют полимеры, такие как ДНК, РНК, белки, полисахариды. Полимеры организуются в ансамбли (мембраны, органеллы). Затем формируются клетки, органы и целые организмы. Использование биологических молекул для синтеза искусственных наноструктур на основе принципов, предлагаемых природой, одно из наиболее перспективных направлений нанобиотехнологии. В результате самосборки можно получить вещества с уникальными свойствами, что открывает широкие возможности для конструирования наноматериалов и «переноса» биополимеров из мира биологии в мир техники.

Нуклеиновые кислоты находят все более широкое применение для получения наноматериалов. Существует два основных направления создания наноконструкций на основе нуклеиновых кислот: конструирование «шаг за шагом» и конструирование по типу «все сразу».

4.6.1. Конструирование «шаг за шагом» – подход, основанный на последовательной модификации исходной молекулы ДНК или синтетического полинуклеотида. Этот подход был теоретически обоснован в 1982 году в работе американского ученого Нейдриена Симана. Первый шаг сборки – получение фрагментов ДНК с «липкими» одноцепочечными концами. Когда «липкие» концы разных фрагментов ДНК склеиваются друг с другом, образуется структура с небольшими дефектами – разрывами в сахарофосфатных цепях. Разрывы сшиваются лигазой (рис. 18).

Второй шаг состоит в создании точки ветвления, необходимой для формирования крестообразной структуры. Это возможно при использовании фрагментов ДНК со специфической последовательностью азотистых оснований (рис. 19). Крестообразные структуры нуклеиновых кислот встречаются также в природе (например, в составе молекул ДНК некоторых бактерий). Искусственно созданную крестообразную молекулу ДНК можно снабдить «липкими» концами. В результате последовательного сшивания «липких» концов формируется плоская нанорешетка. Из-за подвижности молекулы ДНК жесткость получившейся наноструктуры в точке ветвления снижена. Благодаря этому такую решетку, при правильном подборе последовательности нуклеотидов, легко сгибать. Н. Симан в 1991 году получил из молекул ДНК наноструктуру, имеющую форму куба. Можно создавать и другие объемные конструкции, например, сцепленные октаэдры (рис. 20).

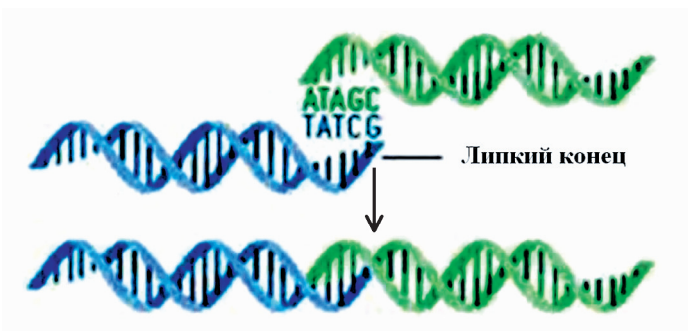


Рис. 18. Схема образования водородных связей между комплементарными парами азотистых оснований «липких» концов ДНК

Практическое применение наноконструкций во многом связано с молекулами или атомами («гостями»), которые встраиваются в состав исходных цепочек ДНК или в уже готовую структуру. Так, ученые начали применять в качестве «строительных блоков» синтетические одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот, присоединенные к наночастицам коллоидного золота. Из таких «блоков» удастся получить структуры, в которых частицы золота расположены на строго фиксированном расстоянии, кратном $3,4 \text{ \AA}$ – шагу витка двойной спирали. Если объединить наночастицы золота сразу с несколькими фрагментами, то можно создавать трехмерные наноструктуры с регулярным чередованием молекул нуклеиновых кислот и атомов золота. Внутри наноструктур можно встраивать не только золото, но и другие металлы, например, серебро. Нанoeлектроника пока еще не может полагаться на электропроводящие свойства одной молекулы ДНК, а металлические включения с гарантией обеспечивают электропроводность. Это позволит использовать фрагменты нуклеиновых кислот, обогащенные атомами металла, для создания различных электронных устройств, например, биодатчиков.

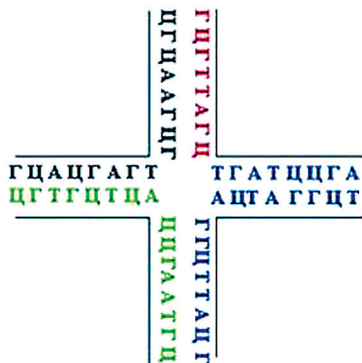


Рис. 19. Крестообразная структура, созданная за счет комплементарного взаимодействия фрагментов ДНК

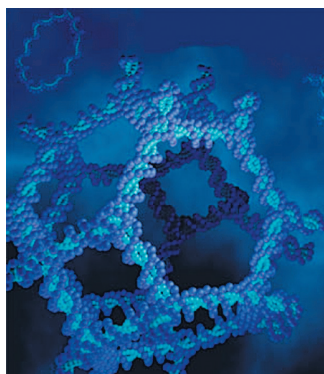


Рис. 20. Пространственные наноструктуры на основе ДНК, созданные Н. Симаном: слева – упрощенная схема куба, справа – октаэдр

4.6.2. Конструирование по типу «все сразу». Стратегия создания наноконструкций, содержащих двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, разработана в Институте молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта. Этот подход позволяет получить упорядоченную трехмерную структуру за один прием. Он основан на использовании не единичных молекул нуклеиновых кислот, а их жидкокристаллических дисперсий. Жидкокристаллические «капельки» ДНК размером около 0,5 мкм включают примерно десять тысяч молекул, которые располагаются ровными рядами на расстоянии 30-50 Å. Упорядоченность придает частицам свойства кристалла, но при этом соседние молекулы образуют подвижные слои, то есть сохраняют свойства жидкости. Это означает, что получившаяся структура представляет собой жидкий кристалл, причем со спиральной закруткой. Важно то, что при образовании жидкокристаллической дисперсии молекулы нуклеиновых кислот сохраняют способность вступать в химические реакции и образовывать соединения с другими веществами. Стабилизация полученной трехмерной структуры достигается за счет строительства «наномостиков», материалом для которых служат соединения антрациклиновой группы. Главная особенность антрациклинов – способность симметрично встраиваться между соседними молекулами нуклеиновых кислот (рис. 21).

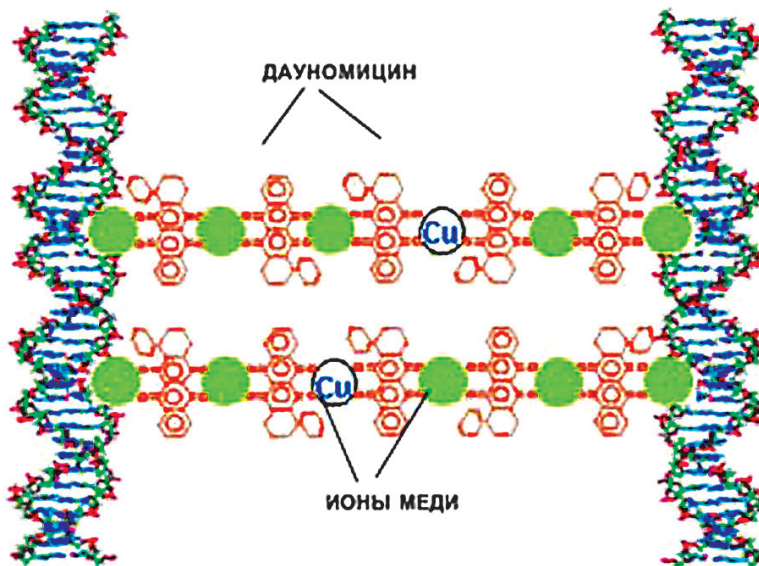


Рис. 21. Наномостики из дауномицина и меди, встраивающиеся между двумя соседними молекулами ДНК

Полученная наноконструкция стабильна и не распадается в водно-солевом растворе. Соседние молекулы нуклеиновых кислот образуют слои, внутри которых и между которыми располагаются полимерные наномостики из чередующихся молекул антибиотика и ионов металла. Мостики придают всей конструкции жесткость, резко уменьшая диффузионную подвижность соседних молекул нуклеиновых кислот (рис. 22).

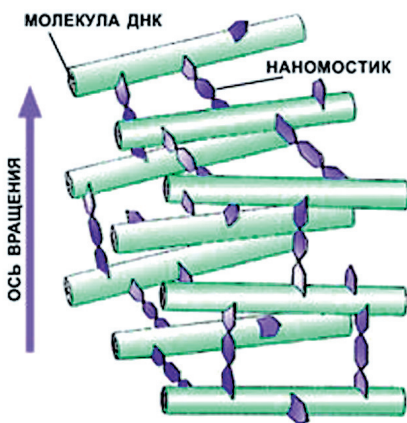


Рис. 22. Трехмерная конструкция ДНК, связанная наномостиками

4.7. Области применения наноконструкций на основе ДНК

4.7.1. Доставка лекарств. Наноструктуры могут выступать в качестве носителей генетического материала или введенных в их состав биологически активных соединений. Когда «нанопосылка» попадает в клетку, наномостики, скрепляющие конструкцию, разрушаются и содержимое, например, молекулы антибиотика, высвобождается. Управляемое разрушение наномостиков происходит под действием некоторых белков, таких как инсулин, пепсин, лизоцим, а также других соединений. Эта схема обеспечивает локальное терапевтическое действие лекарства, что чрезвычайно важно для практической медицины. Предложенная конструкция может стать фактически основой медицинского наноробота, транспортирующего биологически активные соединения в клетки.

4.7.2. Биодатчики. Наноструктуры на основе нуклеиновых кислот могут служить чувствительными элементами оптических сенсорных устройств, реагирующих на присутствие биологически активных соединений. Для этого в наномостик встраивают своеобразную «мину-ловушку» – соединение, которое разрушается при контакте с анализируемым веществом. Наномостик и вся наноконструкция разрушаются, падает аномальная оптическая активность. В определенных условиях по величине этого показателя можно измерять концентрацию химического или биологически активного соединения, разрушающего наномостик.

4.7.3. Оптические фильтры. Существует возможность введения наноструктур с управляемыми физико-химическими свойствами в состав полимерной пленки без нарушения их аномальных оптических свойств. Это открывает возможность для применения таких полимерных матриц в фотонике в качестве оптических фильтров с регулируемыми оптическими параметрами.

Стратегия наноконструирования с использованием частиц жидкокристаллических дисперсий, безусловно, очень перспективна. Для создания наномостиков можно использовать самые разные химические или биологические соединения и их комплексы. Поверхность молекул ДНК и РНК можно модифицировать, регулируя их реакционную способность. Это открывает путь для создания новых типов чувствительных элементов и других наноструктур на основе нуклеиновых кислот, которые найдут применение в самых разнообразных областях науки и техники.

Вопросы для повторения:

1. Каковы принципиальные отличия методов генетической инженерии от методов селекции?
2. В каком порядке выполняют генно-инженерные работы?
3. Охарактеризуйте основные способы получения трансгенов.
4. Что представляют собой векторы (векторные конструкции) и для чего их используют?
5. Как происходит гибридизация чужеродных ДНК?
6. Какие структуры могут использоваться в качестве мишеней для переноса чужеродных генов?
7. Укажите основные методы внедрения чужеродной ДНК в клетки.
8. В чем сущность метода бомбардирования микрочастицами?
9. Как используются бионанотехнологии в медицине?
10. В чем сущность генного таргетинга?
11. Для чего применяют методы генетической инженерии в сельском хозяйстве?
12. Назовите свойства биологических макромолекул, позволяющие использовать их при создании наноконструкций.
13. Опишите способ создания наноконструкций на основе нуклеиновых кислот, предложенный Н. Симаном.
14. В чем заключается стратегия «все сразу» в создании наноконструкций ДНК?
15. Назовите возможные области применения наноконструкций на основе нуклеиновых кислот.

Глава 5. Нанобиотехнологии надмолекулярного (субклеточного) уровня организации живых систем

5.1. Структурная организация плазматической мембраны (плазмалеммы)

Дискретной единицей надмолекулярного (субклеточного) уровня являются биологические мембраны, части органоидов и органоиды. Мембранные системы обладают сложным составом и строением. В изучении функционирования мембранных систем и выяснении механизмов регуляции процессов, протекающих в мембранах, особенно результативным стало исследование ультраструктуры плазматической мембраны (плазмалеммы).

Плазматическая мембрана (плазмалемма, цитолемма) – это поверхностная структура (рис. 23), ограничивающая клетку снаружи, что обусловли-

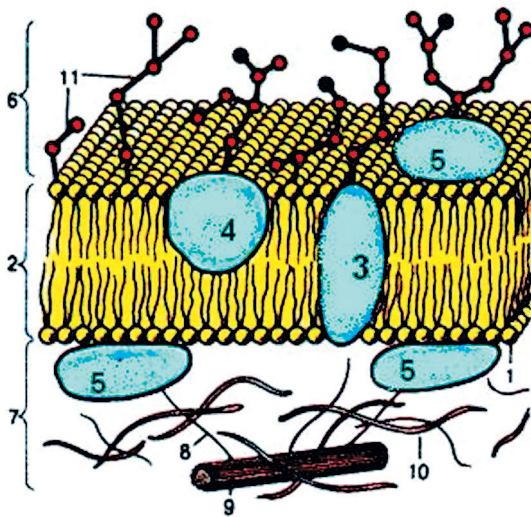


Рис. 23. Схема строения клеточной мембраны (плазмалеммы):

- | | |
|-----------------------------|---|
| 1 – молекула липида; | 7 – субмембранный слой; |
| 2 – липидный бислой; | 8 – актиновые микрофиламенты; |
| 3 – интегральные белки; | 9 – микротрубочки; |
| 4 – полуинтегральные белки; | 10 – промежуточные филаменты; |
| 5 – периферические белки; | 11 – углеводные части молекул гликопротеинов и гликолипидов |
| 6 – гликокаликс; | |

вает ее непосредственную связь с внеклеточной средой, а следовательно, со всеми веществами и стимулами, воздействующими на клетку.

Плазматическая мембрана образована в основном белками и липидами в количественном соотношении примерно 1:1. Согласно жидкостно-мозаичной модели С. Зингера и Г. Николсона, основу мембраны составляет билипидный слой (липидный бислой), который представлен главным образом фосфолипидами, состоящими из гидрофильной (полярной) головки и гидрофобного (неполярного) хвоста. Гидрофобные цепи обращены внутрь, а гидрофильные головки – наружу.

5.2. Типы мембранных белков (интегральные, полуинтегральные, периферические)

Мембранные белки удерживаются в липидном бислое за счет гидрофобных взаимодействий с молекулами фосфолипидов. Они обеспечивают специфические свойства мембраны и играют различную биологическую роль (переносчиков, ферментов и структурных молекул). По своему расположению относительно липидного бислоя мембранные белки разделяются на две разновидности: периферические и интегральные. Периферические белки связаны электростатическими взаимодействиями с полярными головками липидных молекул. Основную роль в организации мембраны играют интегральные глобулярные белки, которые погружены в мембрану либо полностью (собственно интегральные белки), либо частично (полуинтегральные белки). Часть белков (трансмембранные) пронизывают всю мембрану. Белковые молекулы мозаично распределены в липидном бислое и могут перемещаться в его толще.

Углеводы плазматической мембраны находятся в соединении с белками (гликопротеины) и липидами (гликолипиды). Углеводные компоненты мембран представляют собой олиго- или полисахаридные структуры, образующие на поверхности клеточных мембран основу гликокаликса. Их функции связаны с контролем за межклеточным взаимодействием, поддержанием иммунного статуса клетки, обеспечением стабильности белковых молекул в мембранах.

5.3. Функции плазмалеммы: барьерная, рецепторная, транспортная

Функции плазмалеммы определяются ее пограничным положением на границе цитоплазмы клетки и внеклеточной (внешней) среды:

- барьерная функция – заключается в механическом отграничении цитоплазмы от среды, окружающей клетку;
- функция транспорта веществ и частиц (селективный, регулируемый, пассивный и активный транспорт) – обеспечивает связь клетки с внешней средой;
- рецепторная функция – состоит в распознавании данной клеткой других клеток и межклеточного вещества благодаря наличию на поверхности плазмалеммы специфических рецепторов к сигнальным молекулам (гормонам, медиаторам и др.).

5.4. Понятие об элементарной биологической мембране

Широкое распространение структур, подобных плазматической мембране в клетке, и универсальность их строения послужили основанием для введения понятия «элементарная биологическая мембрана». Согласно современным представлениям, все биологические мембраны устроены сходным образом: основу мембраны составляет двойной молекулярный слой липидов (липидный бислой), по обе стороны и в толще которого находятся белки.

Основные компоненты клетки подразделяют на мембранные и немембранные органеллы или органоиды (постоянные части клетки, имеющие определенное строение и выполняющие специфические функции). К мембранным органеллам относят цитоплазматическую сеть (эндоплазматический ретикулум), пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи), митохондрии, лизосомы, пероксисомы. К немембранным относятся те органоиды, которые не имеют собственной замкнутой мембраны: рибосомы (полирибосомы), клеточный центр, элементы цитоскелета: микротрубочки и фибриллярные структуры.

5.5. Нанобиотехнологии для направленного транспорта веществ

При некоторых патологических состояниях для коррекции возникших нарушений возникает необходимость доставки внутрь клетки определенных веществ. Важнейшими проблемами в этом могут рассматриваться: направленная доставка лекарств внутрь клетки при онкологических заболеваниях; доставка или замещение ферментов, которые вызывают нарушения обмена веществ; доставка молекул ДНК для исправления генетических мутаций; стабилизация протеинов для увеличения времени их жизни;

создание биосенсоров, способных отображать состояние отдельной клетки; детоксикация клеток и удаление из них вредных веществ. Разрешение данных проблем возможно только с помощью нанобиотехнологий.

5.5.1. Белково-липидные нанотрубки. Одним из важнейших достижений нанобиотехнологий является создание управляемых бionанотрубок, позволяющих доставлять необходимые вещества через плазматическую мембрану в определенные участки клетки. Они представляют собой **белково-липидные структуры**, сделанные из белка микротрубочек – тубулина, покрытого липидным бислоем. Последний, в свою очередь, также покрыт снаружи кольцами или спиралями из белка тубулина (*рис. 24*).

Контролируя относительное количество липидов и белков, можно переключаться между двумя состояниями нанотрубок: либо с открытыми концами, либо с концами, закрытыми жировыми шапочками. Это позволяет управлять инкапсуляцией и освобождением химических препаратов и лекарств.

Наблюдая взаимодействие между микротрубочками (отрицательно заряженными полыми цилиндрами нанометрового размера, формируемыми клеточным цитоскелетом) и положительно заряженными липидными мембранами, ученые обнаружили, что в определенных условиях белково-липидные нанотрубки формируются спонтанно. При манипуляции электрическим зарядом липидного бислоя мембран и микротрубочек клетки

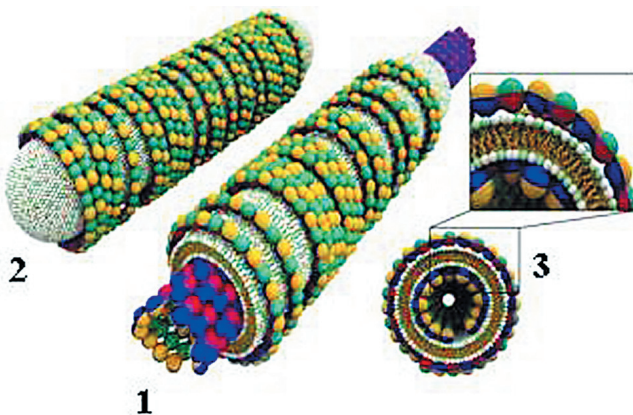


Рис. 24. Схема белково-липидных нанотрубок:

- 1 – нанотрубка с открытыми концами;
- 2 – нанотрубка с закрытыми посредством жировых шапочек концами;
- 3 – горизонтальная проекция нанотрубки и ее увеличенный фрагмент

можно создавать открытые или закрытые бионанотрубки или нанокапсулы, что позволит ими управлять. В будущем, возможно, будут найдены способы конструирования нанотрубок таким образом, чтобы в их внутреннюю полость можно было помещать лекарства или гены для доставки в определенные участки организма.

5.5.2. Открытие наноконтейнеров в живых клетках. В 1986 году под руководством биохимика Леонарда Рома из Калифорнийского университета в живых клетках были открыты **наноконтейнеры**. Исследование наноконтейнеров натолкнуло ученых на мысль об использовании этих природных нанокапсул в нанотехнологиях, так как они являются идеальными контейнерами для доставки лекарств, молекул ДНК и РНК. Наноконтейнеры представляют собой полые веретенообразные капсулы из белковых молекул. Фактически наноконтейнеры – это пустая оболочка, которая должна что-то содержать. Установлено, что для образования наноконтейнеров в клетке должны быть определенная цепочка РНК и набор белковых молекул. Научившись искусственно создавать наноконтейнеры, ученые смогут помещать в их полость любой груз, а после снабжения их поверхности специфическими маркерами отправлять его в строго определенные участки клетки.

Наноконтейнеры – превосходный вариант для направленного транспорта медикаментов и фрагментов ДНК, так как они без препятствий проникают через клеточную мембрану, не подвергаясь атаке со стороны иммунной системы человека, которая воспринимает их как «своих». По образному выражению Рома, нанокапсулы – «...это своего рода Троянские кони в медицине: организм считает их своими, в то время как внутри они содержат грузы, которые специально доставляются внутрь его органов». Первый шаг в «приручении» наноконтейнеров ученые уже сделали. Они обнаружили последовательность из 100 аминокислот, которая, подобно ключу, открывает внешнюю оболочку нанокапсулы, образуя в ней «погрузочное отверстие».

5.5.3. Наноконтейнеры для транспорта веществ на основе биологических мембран. Мембранные нанобиотехнологии представляют интерес и для решения проблем регулируемого введения в организм лекарственных веществ. Обычный способ применения лекарств – инъекции или таблетки – резко увеличивает их концентрацию не только в больном, но и в здоровых органах, что часто вызывает в организме нежелательные побочные

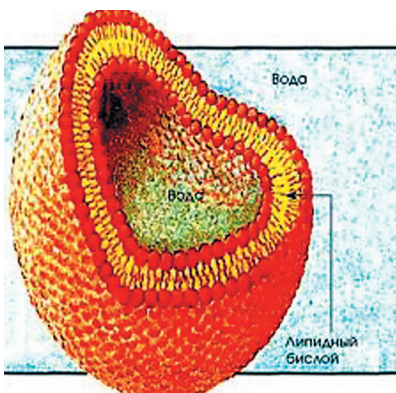


Рис. 25. Строение липосомы

эффекты. В связи с этим заслуживают внимания лекарства, покрытые мембранным слоем. При этом скорость поступления лекарств в орган регулируется толщиной мембраны и остается всегда постоянной.

Многие лекарственные средства нового поколения доставляются к клеткам-мишеням с помощью особых наночастиц – липосом. Липосомы – это везикулы (пузырьки), образующиеся из фосфолипидов и предназначенные для направленного транспорта веществ (рис. 25). Мембрана липосом

состоит не только из обычных фосфолипидов, но и особых липидов, способствующих слиянию с мембраной клетки-мишени и определяющих нетоксичность структуры. Внутри липосомы находится водный раствор и содержится лекарственное вещество или, например, молекула ДНК в случае генной терапии (рис. 26).

Вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных разрушению в биологических жидкостях. Еще одно важное преимущество

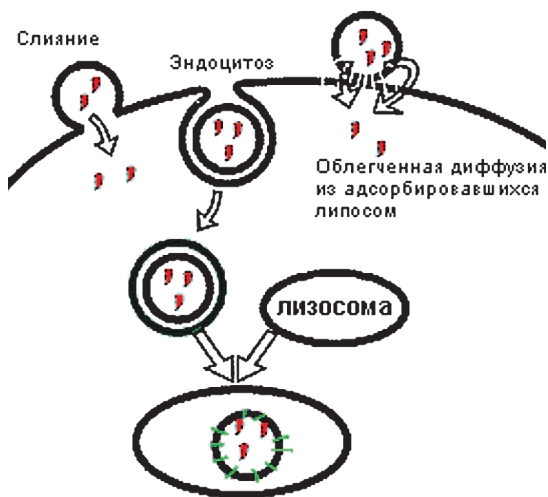


Рис. 26. Способы проникновения содержимого липосом в клетку

наночастиц как лекарственной формы – постепенное высвобождение заключенного в них лекарственного вещества, что увеличивает время его действия.

Размер липосом обычно больше диаметра пор капилляров, поэтому объем их распределения ограничивается участком введения. При внутривенном введении липосомы не выходят за пределы кровотока и плохо проникают в органы и ткани. С другой стороны, это же свойство может служить основой для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в опухоли и крупные очаги воспаления. Капилляры, снабжающие кровью эти области, как правило, сильно перфорированы, поэтому липосомы легко проникают через расширенные поры и накапливаются в ткани. Это явление получило название пассивного нацеливания (рис. 27).

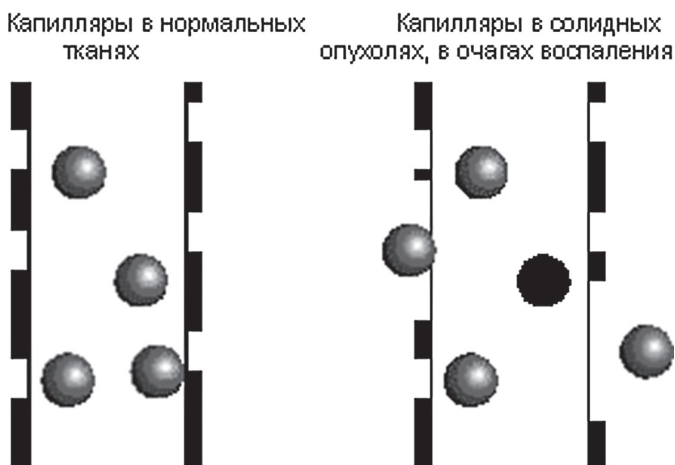


Рис. 27. Проникновение липосом через поры капилляров в области воспаления

Основной недостаток липосом как лекарственной формы – относительная небольшая стабильность при хранении. Этого недостатка лишены полимерные наночастицы, имеющие практически те же области возможного применения. Но, в отличие от липосом, полимерные наночастицы состоят из менее безопасного материала.

Другим вариантом доставки веществ на основе биологических мембран являются так называемые наносомы, которые представляют собой мельчайшие сферы, состоящие из липидов. Однако, в отличие от липосом, они не имеют внутреннего водного резервуара и отделены от внешней водной среды монослойной липидной мембраной.

5.6. Использование искусственных мембран в качестве биофильтров

Изучение принципов организации и функционирования биологических мембран позволило ученым создать мембранные материалы, обеспечивающие эффективность разделения веществ. Они обладают максимальной проницаемостью, селективностью и стабильностью функциональных характеристик – основных свойств биомембран. В частности, получены структуры с порами, снабженные так называемыми «умными» полимерами – наносенсорами, обеспечивающие разделение и очистку веществ на уровне молекул и наночастиц (рис. 28). Подобные полимерные материалы и устройства могут быть с успехом использованы для создания органов, выполняющих роль биологических фильтров, например, «искусственной печени» или «искусственной почки». Это позволит в перспективе уменьшить зависимость больных от острого дефицита донорских органов.

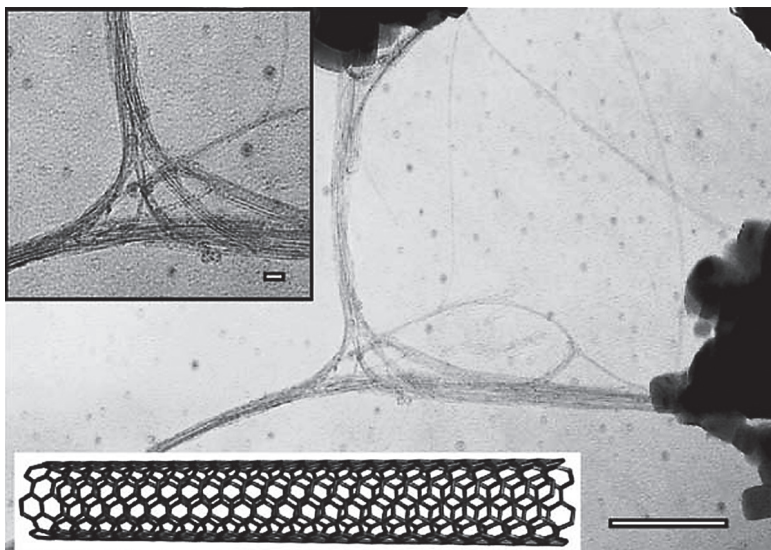


Рис. 28. Однослойные углеродные нанотрубки, применяющиеся в очистке сточных вод

Искусственные мембраны, создаваемые как аналоги биомембранам, могут применяться для фильтрации и очистки жидкостей организма от вредных веществ и вирусов, а также для выделения и очистки биологически активных веществ.

Таким образом, исследования фундаментальных механизмов функционирования биомембран и принципов структурообразования мембранных систем заняли особое место в развивающейся нанобиологии. Небольшой перечень приведенных примеров убедительно доказывает перспективность развития и эффективность практического применения наномембранных технологий.

Вопросы для повторения:

1. Охарактеризуйте макромолекулярный уровень организации живого.
2. Что такое элементарная биологическая мембрана?
3. Опишите структурную организацию плазмалеммы.
4. Укажите основные функции плазмалеммы.
5. Какие выделяют белки в плазмалемме, какова роль этих белков?
6. Дайте определение понятиям «клеточные органоиды», «мембранные органоиды» и «немембранные органоиды».
7. Назовите возможные области применения искусственных мембран.
8. Что собой представляют белково-липидные нанотрубки?
9. Каковы перспективы использования белково-липидных нанотрубок для внутриклеточной доставки лекарств?
10. Что представляют собой наноконтейнеры? Какова область их применения?
11. На каких свойствах биомембран основано их использование для очистки биологических жидкостей?
12. Что такое липосомы и наносомы?
13. Каковы особенности строения липосом и наносом?

Глава 6. Фибриллярные структуры биологических тканей, естественные и искусственные нановолокна

6.1. Макромолекулы, образующие фибриллярные (волоконистые) структуры в клетках и тканях живого организма: особенности структуры и функции

Среди макромолекул живых организмов первое место по количеству и значению в жизнедеятельности клетки занимают белки. Они присутствуют во всех типах клеток и тканей. В организме человека обнаружено более 5 млн типов белковых молекул, отличающихся по своему строению друг от друга и от белковых молекул других организмов. В зависимости от формы и некоторых физических свойств белки могут быть разделены на два класса: глобулярные и фибриллярные. В глобулярных белках одна или большее число полипептидных цепей свернуты в плотную компактную структуру сферической (глобулярной) формы. Глобулярные белки растворимы в воде и легко диффундируют. Фибриллярные белки представляют собой нерастворимые в воде длинные нитевидные молекулы, полипептидные цепи которых вытянуты вдоль одной оси. Большинство фибриллярных белков выполняет структурные или защитные функции. Типичные фибриллярные белки образуют цитоскелет клетки.

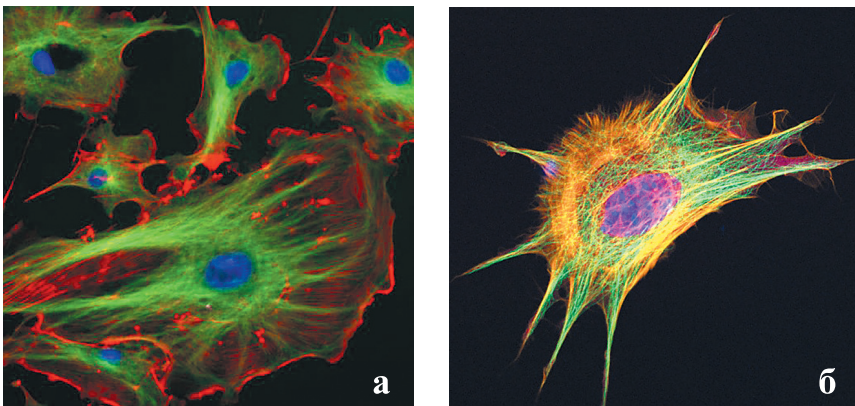


Рис. 29. Цитоскелет эукариот: а) актиновые микрофиламенты окрашены в красный, микротрубочки – в зеленый, ядра клеток – в голубой цвет; б) актин окрашен в желтый цвет, микротрубочки – в зеленый, клеточное ядро – в розовый цвет

6.2. Цитоскелет клетки как система нановолокон

Цитоскелет клетки представлен нитевидными неветвящимися белковыми комплексами – филаментами (тонкими нитями). Существует три системы филаментов живых систем, различающихся по химическому составу, ультраструктуре и функциональным свойствам: 1) микрофиламенты – тонкие нити диаметром около 8 нм, состоящие в основном из белка актина; 2) микротрубочки, имеющие диаметр 25 нм и образованные в основном белком тубулином; 3) промежуточные филаменты – нитчатые структуры диаметром около 10 нм (рис. 29).

К общим свойствам элементов цитоскелета можно отнести то, что эти белковые неветвящиеся фибриллярные полимеры нестабильны и способны к полимеризации и деполимеризации. Такая нестабильность может приводить к некоторым вариантам клеточной подвижности, например, к изменению формы клетки.

6.3. Микрофиламенты: строение, роль в клетке, актин и другие белки микрофиламентов

Микрофиламенты – тонкие белковые нити диаметром 5-8 нм, встречающиеся практически во всех типах клеток. Они могут располагаться в цитоплазме пучками, сетевидными слоями или поодиночке. Основным белком микрофиламентов является актин. В клетке актин существует в двух формах: мономерной (глобулярный актин, G-актин) и полимеризованной (фибриллярный актин, F-актин). Фибриллы F-актина диаметром 8 нм представляют собой спиральную ленту. При достаточной концентрации G-актин начинает самопроизвольно полимеризоваться. Если концентрация G-актина будет недостаточной, то образовавшиеся фибриллы F-актина начинают разбираться. Из этого следует, что актиновые микрофи-

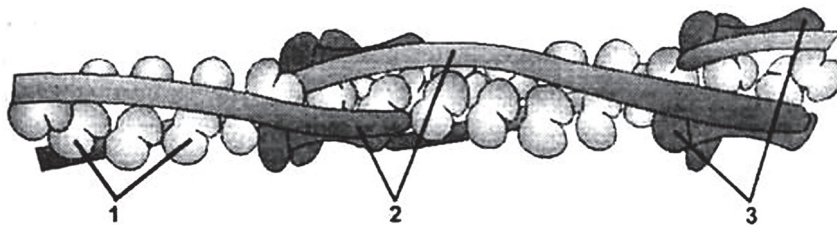


Рис. 30. Актиновый микрофиламент: 1 – актин; 2 – тропомиозин; 3 – тропонины

ламенты представляют собой очень динамичные структуры, которые могут возникать и расти или же, наоборот, разбираться и исчезать в зависимости от наличия глобулярного актина. Кроме актина, в состав микрофиламентов могут входить миозин, тропомиозин, а также несколько десятков актинсвязывающих белков (рис. 30).

Основными функциями микрофиламентов являются: обеспечение определенной жесткости и упругости клетки, изменение консистенции цитоплазмы, участие в эндоцитозе и экзоцитозе, обеспечение подвижности немышечных клеток (например, нейтрофилов и макрофагов), участие в сокращении мышечных клеток и волокон и др.

6.4. Микротрубочки: состав, строение, биологическая роль

Микротрубочки представляют собой полые цилиндрические образования диаметром 24-25 нм и длиной до нескольких микрометров. Стенка микротрубочек толщиной 5 нм состоит из спиралевидно уложенных протофиламентов – нитей тубулина диаметром 5 нм. Микротрубочки формируют лабильную систему, в которой поддерживается динамическое равновесие между их сборкой и распадом (рис. 31). В образовании микротрубочек путем самосборки участвуют мелкие сферические тель-

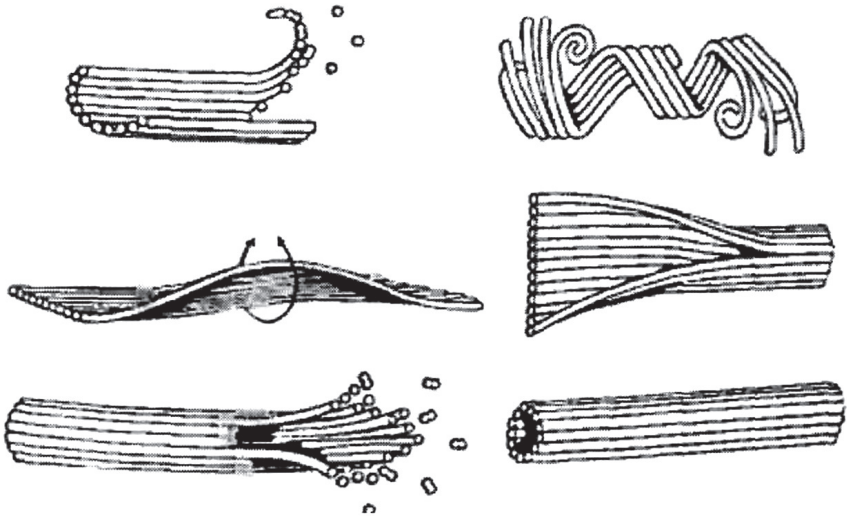


Рис. 31. Стадии самосборки микротрубочек

ца – сателлиты (центры организации микротрубочек), содержащиеся в клеточном центре и в базальных тельцах ресничек, а также в центромерах хромосом. Разрушение микротрубочек приводит к изменению формы клетки. При этом нарушаются структура клетки и распределение в ней органоидов. В клетке микротрубочки могут располагаться: в виде отдельных элементов; в пучках, в которых они связаны друг с другом поперечными мостиками (отростки нейронов); в составе дублетов (реснички и жгутики) и триплетов (центриоли и базальные тельца). Основными функциями микротрубочек являются: поддержание формы и полярности клетки; обеспечение упорядоченности расположения компонентов клетки; участие в образовании центриолей, ресничек, жгутиков; участие во внутриклеточном транспорте и др.

6.5. Создание аналогов биологических ресничек методами нанотехнологий

Реснички, покрывающие внутренние поверхности некоторых органов, могут послужить моделью для создания искусственных наноструктур. Так, группе ученых (США) удалось сформировать гибкие железные наностержни, похожие на биологические реснички, а также смоделировать с их помощью процесс самоочищения воздухоносных путей. Созданные «нанореснички» соответствуют по размерам биологическим ресничкам (диаметр около 200 нм, длина 10 мкм). Под действием переменного магнитного поля исследователи наблюдали процесс согласованного биения «наноресничек», помещенных в жидкий полимер, имитирующий слизь (рис. 32).

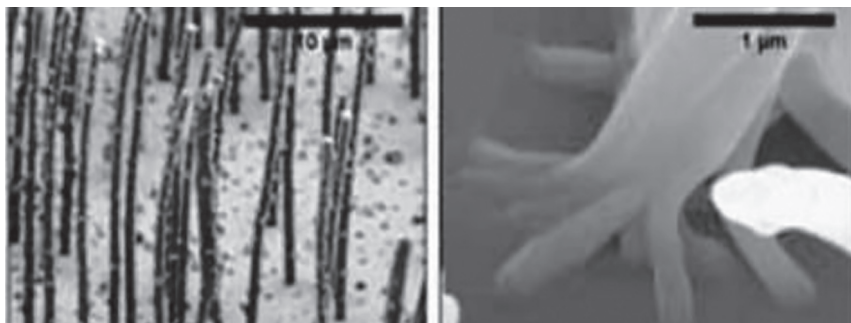


Рис. 32. Гибкие железные наностержни, имитирующие биологические реснички

В такой системе «слизь» могла передвигаться, и, как показали компьютерные модели, система оказалась близкой к своему биологическому аналогу – мерцательному эпителию трахеи и бронхов (рис. 33). Таким образом, с помощью разработанной системы возможно моделирование биологических процессов, происходящих в организме. Принципы движения ресничек могут быть использованы также для эффективного смешивания вязких жидкостей.

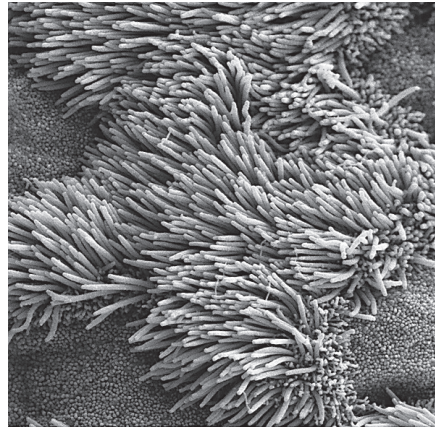


Рис. 33. Мерцательный эпителий трахеи

6.6. Промежуточные филаменты

Промежуточные филаменты представляют собой сплетенные белковыми нитями канатики толщиной около 10 нм. Они локализуются главным образом в околядерной зоне клетки и в пучках фибрилл, отходящих к периферии и располагающихся под плазматической мембраной. Промежуточные филаменты наиболее часто встречаются в клетках, подвергающихся механическим воздействиям: клетки эпидермиса, нервные отростки, гладкие и исчерченные мышечные клетки и волокна. В состав промежуточных филаментов входит несколько типов родственных белков (изобелков).

Основными функциями промежуточных филаментов являются структурная и опорная, а также функция распределения органелл в определенных участках клетки. Все белки промежуточных филаментов обладают сходной аминокислотной последовательностью фибриллярной молекулы, закрученной в правостороннюю спираль (α -спираль). Остов полипептидной цепи, закручиваясь в спираль, фиксируется водородными связями, расположенными параллельно оси спирали. В силу этого α -спираль имеет плотно упакованную структуру, не имеющую внутреннего канала и непроницаемую даже для молекул воды. Наличие протяженных α -спиральных участков позволяет двум молекулам образовывать двойную спираль, что приводит к образованию палочковидного димера. Два димера, объединяясь, образуют короткий протофиламент – тетрамер диаметром около 3 нм.

Такие протофиламенты могут объединяться в более толстые и длинные фибриллы и в конечном итоге образуют полный промежуточный филамент, состоящий из 8 продольных протофиламентов.

6.7. Фибриллярные белки соединительных тканей.

Свойства, распространение и образование в живых тканях коллагеновых и эластических волокон

Коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу коллагеновых волокон соединительной ткани (кость, сухожилие, хрящ, связки) и обеспечивающий ее прочность (рис. 34). Коллаген широко распространен у позвоночных животных, составляя у высших позвоночных около 1/3 количества всех белков. Молекулы коллагена состоят из трех полипептидных цепей, образующих спирализованную структуру диаметром 1-1,5 нм (тропоколлаген), ковалентно свя-



Рис. 34. Коллагеновые волокна

занные молекулы которого образуют коллагеновые волокна толщиной несколько микрометров. Прочные на разрыв коллагеновые волокна выполняют в основном механическую (опорную) функцию.

Фибриллярный белок эластин является основным компонентом эластических волокон соединительной ткани, придающим ей упругость. Эластические волокна отличаются от коллагеновых меньшим диаметром и высокой эластичностью. Они способны растягиваться в 1,5 раза, после чего возвращаются в исходное состояние. Это свойство определяет функциональное значение эластических волокон в соединительной ткани: стабилизацию ее структуры после различного рода механических воздействий. Эластические волокна, в отличие от коллагеновых, состоят из двух компонентов: аморфного эластина и нитевидных фибрилл. Микрофибриллярный компонент образован трубчатыми структурами диаметром 11 нм. Микрофибриллы состоят из сложного белка гликопротеида, отличного от эластина и коллагена.

6.8. Биоволокна на основе полисахаридов

Если наиболее распространенными внутриклеточными биополимерами являются белки, то самыми распространенными внеклеточными биополимерами являются полисахариды.

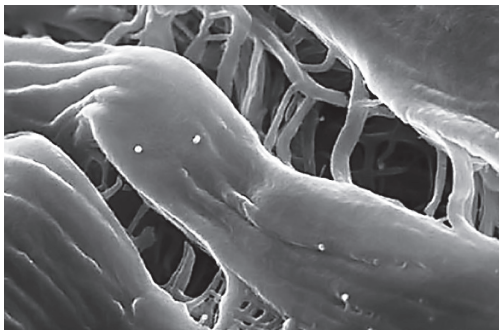


Рис. 35. Волокна целлюлозы

Мономерами полисахаридов служат сотни и тысячи моносахаридных остатков (чаще всего гексоз). Среди последних наиболее распространена целлюлоза – основной структурный компонент клеточной стенки растений. Структура целлюлозы отвечает ее биологической задаче. Линейные молекулы целлюлозы, состоящие из глюкозы, собраны в пучки, которые, в свою очередь, объединяются в фибриллы диаметром 1,5-4 нм. Целлюлоза обеспечивает прочность клеточной стенки. Микрофибриллы целлюлозы эластичны и по прочности на разрыв сходны со сталью (*рис. 35*).

полимерами являются полисахариды. Мономерами полисахаридов служат сотни и тысячи моносахаридных остатков (чаще всего гексоз). Среди последних наиболее распространена целлюлоза – основной структурный компонент клеточной стенки растений. Структура целлюлозы отвечает ее биологической задаче.

6.9. Методы создания искусственных нановолокон

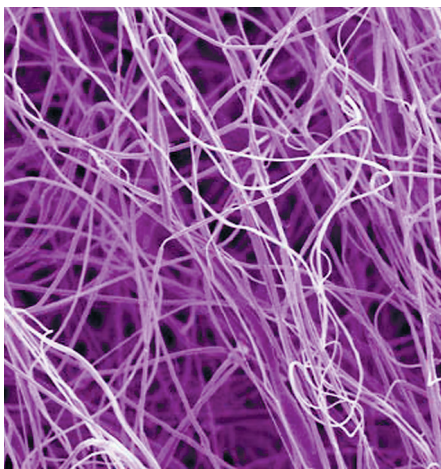


Рис. 36. Искусственные нановолокна

Для создания полимерных нановолокон, содержащих внутри живые клетки и предназначенных для повышения способности тканей к регенерации, применяют метод электроспиннинга, осуществляемый с помощью электрически заряженной иглы. Метод позволяет производить тончайшие полимерные нановолокна, внутри которых содержатся живые, способные к пролиферации и дифференцировке клетки (*рис. 36*).

Ученые из Лондонского университета разработали метод соз-

дания с помощью электроспиннинга волокон из применяемого в медицине полидиметилсилоксана, толщина которых соответствует диаметру заключенных в них клеток. Для этого использовалась система «игла в игле», в которой по внутренней игле поступали взвешенные в среде живые нервные клетки, а по внешней – полидиметилсилоксан, представляющий собой очень густой, не проводящий электричества полимер. Приложение электрического поля напряжением около 9,5 кВ позволяло вытягивать каплю полимера в тончайшую нить. Клетки, содержащиеся внутри полученных волокон и подвергавшиеся воздействию электрического поля, не теряли своих свойств и сохраняли жизнеспособность в течение шести дней после проведения эксперимента. Данная разработка представляет интерес для тканевой инженерии и регенеративной медицины. Использование различных полимеров позволит создавать волокна, различающиеся по прочности и долговечности. Возможно, в будущем такие нановолокна будут применяться в качестве шовного материала в хирургии.

Недостатком метода электроспиннинга является вероятность повреждения клеток электротоком. В связи с этим представляет интерес метод создания нановолокон с помощью давления. Данную технологию можно использовать в создании искусственных каркасных конструкций для регенерации органов и точечной доставки лекарств. Для создания волокон из гладкомышечных клеток аорты кроликов авторы этого метода использовали приспособление, оснащенное тремя концентрическими иглами. Первая (внутренняя) игла высвобождает клетки, вторая – обволакивающий их полимер, а третья (внешняя) обеспечивает необходимое давление. Медленно выделяя клетки, обволакиваемые движущимся с более высокой скоростью полимером, и прикладывая давление, в два раза превышающее атмосферное, исследователи получили длинное тончайшее волокно. При этом толщина получаемых волокон регулируется величиной прикладываемого давления. Используемый уровень давления не оказывал никаких отрицательных воздействий на клетки.

В отличие от метода электроспиннинга, новый подход, к сожалению, не позволяет создавать волокна толщиной в одну клетку. Электрическое поле воздействует на входящие в состав клеток заряженные молекулы, что, при условии равномерного распределения клеток в среде, выстраивает их в одну линию. Прикладываемое давление, напротив, приводит к появлению кластеров клеток. Возможно, эту проблему удастся решить путем изменения характеристик клеточной суспензии. В настоящее время с целью получения данных о безопасности полученных клеточных волокон тести-

руется генная активность входящих в их состав клеток, а также анализируются возможности создания нановолокон из стволовых клеток. Последние могут быть использованы для восстановления практически любых тканей организма.

6.10. Применение искусственных нановолокон в биологии и медицине

Принципы самосборки волокон биологических тканей широко используются в нанобиотехнологии. Копирование уже известных, изученных макромолекул и их функций для создания искусственных наноструктур и комплексов представляет собой новое направление в нанобиотехнологии – биомиметику. К настоящему времени уже изготовлены наноматериалы, имитирующие естественную костную ткань. Так, ученые из Северо-Западного университета (США) использовали трехмерную самосборку волокон диаметром около 8 нм, имитирующих естественные волокна коллагена. В последующем их подвергли минерализации с образованием нанокристаллов гидроксиапатита, ориентированных вдоль волокон. К полученному материалу хорошо прикреплялись костные клетки собственного организма. Это позволило рекомендовать такой материал в качестве «клея» для костной ткани.

Значительный интерес представляет также разработка материалов, которые, наоборот, не позволяют клеткам прикрепляться к поверхности субстрата. Одним из возможных аспектов применения таких материалов может стать изготовление биореакторов для выращивания стволовых клеток. Стволовая клетка, прикрепившись к поверхности, стремится дифференцироваться, образуя те или иные специализированные клетки. Наноматериалы с наноразмерной структурой поверхности позволяют управлять процессами пролиферации и дифференциации стволовых клеток. Интенсивно продолжающиеся разработки в этом направлении представляются достаточно перспективными для нанобиотехнологий ближайших десятилетий.

Вопросы для повторения:

1. Определите понятие «макромолекула живой клетки». Приведите примеры макромолекул.
2. Приведите классификацию белков в зависимости от формы белковой молекулы.

3. Охарактеризуйте цитоскелет клетки. Перечислите его основные компоненты.
4. Что представляют собой микрофиламенты клетки?
5. Опишите строение микротрубочек.
6. Как происходит сборка и разрушение микротрубочек?
7. Каковы перспективы использования искусственных «наноресничек»?
8. В каких клетках встречаются белки группы промежуточных филаментов?
9. Приведите сравнительную характеристику коллагеновых и эластических волокон соединительной ткани.
10. Определите понятие «полисахариды». Приведите примеры биоволокон, имеющих полисахаридную природу.
11. Что такое биомиметика?
12. Каковы основные методы создания искусственных нановолокон?
13. Назовите основные направления нанобиотехнологии в области создания искусственных нановолокон.
14. Каковы перспективы применения искусственных нановолокон?
15. Каковы возможности технологического моделирования самосборки искусственных волокон биологических тканей?

Глава 7. Неклеточные и прокариотические формы жизни в наноконструкциях и нанобиотехнологиях

7.1. Общая характеристика прокариотических организмов

Прокариотические (доядерные) организмы находят все более широкое применение в различных сферах нанобиологии. Прокариоты – самые примитивные клеточные организмы, оставшиеся в течение 2 млрд лет единственной формой жизни на Земле. К настоящему времени описано около 3000 видов прокариот, представленных одноклеточными, колониальными и нитчатыми формами.

Прокариотические клетки на порядок мельче эукариотических (их диаметр колеблется в пределах 0,5-5 мкм, редко достигая 10 мкм). У них не развиты внутриклеточные мембранные системы, а следовательно, отсутствуют оформленные органеллы. Прокариоты лишены пластид, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматической сети и центриолей, присутствующих у эукариот. Более мелкие, чем у эукариот, рибосомы располагаются в цитоплазме свободно. Цитоплазма ограничена наружной цитоплазматической мембраной, внутренняя складка которой (мезосома) выполняет функции митохондрий. Наружная мембрана образует ряд складок внутри цитоплазмы, которые увеличивают поверхность прикрепления ферментов и пространственно разделяют ферментативные реакции. С мембраной связаны также биосинтез клеточной стенки и слизистой капсулы, выделение ферментов, деление и спорообразование.

В прокариотических клетках отсутствует морфологически выраженное ядро. Вместо него присутствует аналог – нуклеоид – структура, состоящая из одной гигантской кольцевой молекулы ДНК, белков и РНК. Молекула ДНК находится непосредственно в цитоплазме. Она закреплена на мембране с помощью специальных белковых нитей. Общее содержание ДНК в прокариотической клетке намного меньше, чем в эукариотической. Большинство генов уникальны, повторяются обычно только гены, кодирующие тРНК и рРНК. Половой процесс у прокариот неизвестен, митоз и мейоз отсутствуют. Размножаются они делением клеток надвое в результате образования поперечной перегородки, чему предшествует удвоение (репликация) молекулы ДНК. Образовавшиеся две молекулы ДНК расходятся, увлекаемые растущей клеточной мембраной, которая выполняет ту же функцию, что и ахроматиновое веретено у эукариот.

Клеточная стенка у прокариот жесткая, но вместе с тем эластичная и достаточно гибкая. В составе клеточных стенок нет целлюлозы и хитина, характерных для растений и грибов. Опорный каркас стенок образован муреином (веществом, близким к целлюлозе). На муреиновом каркасе располагаются молекулы липидов и белков. Жесткая клеточная стенка позволяет клеткам сохранять постоянную форму.

Прокариоты отличаются от эукариот также и физиологически: окислительные процессы у многих ограничены брожением, некоторые прокариотические организмы обладают способностью фиксировать атмосферный азот.

Прокариоты представлены одним царством – царством Бактерий, или Дробянок.

7.2. Использование бактерий в нанотехнологиях

7.2.1. Внутриклеточная доставка лекарств. Исследованиями ученых показано, что бактерии, обладающие естественной способностью проникать в живые клетки, являются идеальными транспортными средствами для направленной доставки лекарств внутрь клетки определенного органа. Особенно ценным это представляется для генной терапии, где необходимо доставлять фрагменты ДНК по назначению, не повреждая при этом здоровую клетку. После того как гены попадают в клеточное ядро, оно начинает вырабатывать специфические белки, корректируя, таким образом, генетическое заболевание.

С этой целью на поверхность бактерии с помощью специальных молекул-линкеров помещают наночастицы размером от 40 до 200 нм, предварительно связанные с отрезками ДНК. Было установлено, что на одной бактерии можно разместить до нескольких сотен наночастиц, расширив, таким образом, количество и «типы» доставляемых грузов. Так, например, если совместить диагностический груз с

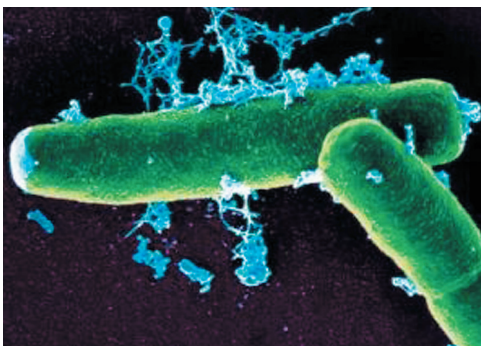


Рис. 37. Бактерии, на поверхности которых с помощью наночастиц закреплен «полезный» груз

лечебным, то в процессе терапии у врача появится возможность для детального наблюдения за участком органа, в который доставлено лекарство (рис. 37).

Доставка груза по назначению происходит в тот момент, когда бактерия проникает внутрь клетки в специальной капсуле-везикуле, образованной клеточной мембраной. Через некоторое время бактерия растворяет мембранную стенку везикулы, и наночастицы с ДНК или лекарством оказываются в цитоплазме клетки.

Эффективность метода ученые продемонстрировали на экспериментах *in vitro*, поместив бактерии в культуру раковых клеток человека. К поверхности бактерий предварительно были прикреплены фрагменты ДНК, кодирующие флуоресцентный белок. Проникновение этих фрагментов в ядра раковых клеток вызывало свечение последних зеленым светом, вследствие чего их можно было видеть под микроскопом. В дальнейшем ученые планируют создание более сложных наноструктур на основе бактерий, например, наносенсоров и других биологических детекторов.

7.2.2. Перспектива использования бактерий как источника энергии.

В исследованиях некоторых ученых было установлено, что у бактерий *Shewanella*, перерабатывающих токсичные растворы в безобидные вещества, в процессе жизнедеятельности могла развиваться ситуация дисбаланса, сопровождающаяся недостатком кислорода и возникновением лишнего электронов.

Снижая в среде концентрацию необходимых веществ, ученые заставили микроорганизмы «работать» в тяжелых условиях. При этом на поверхности бактерий появлялись

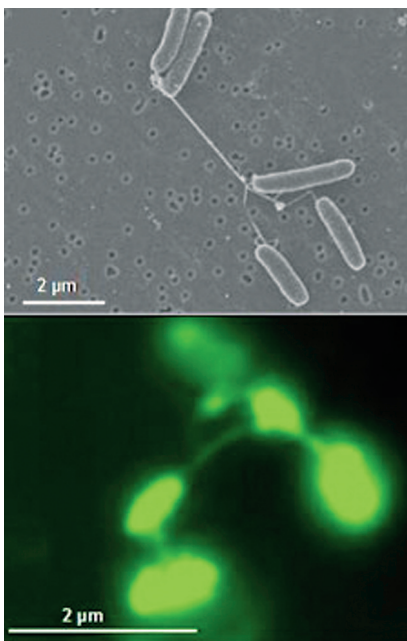


Рис. 38. Бактерии *Shewanella* собираются в электрическую цепь. Вверху приведено фото, сделанное посредством сканирующего электронного микроскопа. Внизу – снимок, выполненный с помощью флуоресцентного микроскопа

шпы, позволяющие дотянуться если не до кислорода, то до ближайшей бактерии, имеющей доступ к кислороду (*рис. 38*). При крайнем недостатке питательных веществ шпы превращались в тонкие длинные жгуты, которые должны были обеспечить больше возможностей для устранения возникшего дисбаланса. Эти неожиданно возникающие органы исследователи оправданно назвали нанонитами. Их толщина составляла от 10 до 150 нанометров, а длина достигала порой десятков микрометров в зависимости от вида бактерий. Особый интерес вызвал тот факт, что, получая нужное «питание», бактерии могли освобождаться от лишних электронов, способных перемещаться по этим «нанопроводам». Если конец нанонити дотягивался до положительного иона, то появлялась разность потенциалов, обуславливающая движение электронов к ионам. Таким образом, возникал электрический ток. Чем более «трудными» были условия для бактерий, тем длиннее становились жгутики и большее количество бактерий объединялось в своеобразное электрическое сообщество. Члены такого сообщества обменивались ресурсами по живой и очень разветвленной электрической сети. Предполагают, что подобные бактерии могут в будущем использоваться в качестве источника энергии.

7.3. Нанобактерии в системе живой природы

Финским ученым Олави Кайандером, сотрудником факультета биохимии университета в городе Куопио, описаны микроорганизмы чрезвычайно малых размеров, которые он назвал нанобактериями (*рис. 39*). По

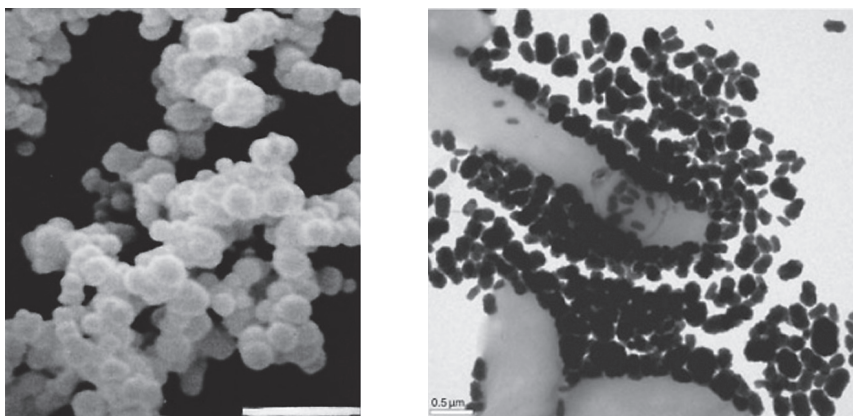


Рис. 39. Нанобактерии (белая шкала в правом нижнем углу равна 100 нм)

мнению ученого, эти микроорганизмы могут проникать в тело человека и вызывать тяжелые поражения различных органов. Линейные размеры нанобактерий лежат в диапазоне от 20 до 150 нанометров. Таким образом, они существенно меньше, чем все изученные к настоящему времени бактерии, споры грибов или клетки любых тканей многоклеточных организмов. С помощью электронной микроскопии были выявлены упорядоченные структуры, внешне напоминающие колонии необычайно мелких бактерий сферической формы. Поскольку загадочные структуры обладали способностью, хоть и очень медленно, размножаться, ученые полагают, что имеют дело с новой формой жизни. Критики этой точки зрения указывают на то, что нанобактерии слишком малы и в них физически не смогут разместиться молекулы и структуры, без которых невозможны обмен веществ и размножение.

В начале 90-х годов XX века мнение финского ученого О. Кайандера получило палеонтологическое подтверждение. При изучении минеральных отложений горячих источников в окрестностях Рима геологом Робертом Фолком из университета штата Техас (США) были обнаружены и рассмотрены под электронным микроскопом подобные структуры. Позднее австралийскими геологами на поверхности образцов песчаника, добытых с глубины 3,5 км ниже уровня морского дна у западного побережья континента, были обнаружены миниатюрные узловатые нити длиной от 20 до 128 нанометров, внешне напоминающие мицелий (нити грибницы). По аналогии с микробами, австралийские исследователи назвали их «нанобами» (рис. 40).

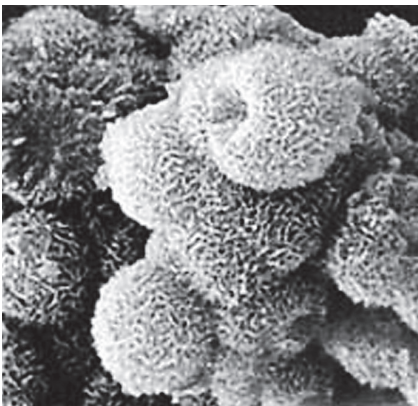


Рис. 40. Колонии нанобов, образующие части почечного камня

Поскольку их размер настолько мал, что в них вряд ли найдется место и для десятка молекул ДНК, не говоря уже про остальные элементы живой клетки, было предположено, что нанобы отличаются от всех прочих организмов не только размерами, но и особенностями функционирования. Можно допустить, что они образуют колонии, чтобы совместно обрести жизнеспособность, или их гены распределены таким образом, что нанобы могут размножаться, лишь объединив-

шись в группы. Однако вопрос остается открытым, и единой точки зрения пока не существует.

Дискуссии по поводу того, что же представляют собой структуры, обнаруженные Кайандером, в настоящее время продолжаются. Тем не менее тот факт, что нанобы способны размножаться, позволяет отнести их, согласно современной концепции определения живых существ Тролланда-Мюллера, к живым организмам.

По мнению О. Кайандера и других ученых, нанобактерии опасны и способны являться причиной различных заболеваний, вызывая гибель клеток головного мозга, почек и других органов.

7.4. Особенности строения и функционирования вирусов как представителей неклеточной формы жизни

Яркими представителями наномира являются вирусы. Вирусы – простейшая неклеточная форма жизни на Земле, находящаяся на границе между неживой и живой природой. У вирусов отсутствует такое проявление жизни, как обмен веществ и энергии. Способность к размножению и связанные с ней наследственность и изменчивость они приобретают лишь при попадании в живую клетку. Вирусы стали известны науке в 1892 году, когда Д.И. Ивановский впервые опубликовал результаты исследований мозаичной болезни табака. Через 7 лет голландский микробиолог М. Бейерник ввел термин «вирус» в научный обиход.

Вирусы распространены в природе повсеместно, поражая все группы живых организмов. Они являются возбудителями самых разнообразных болезней человека: гриппа, оспы, полиомиелита, бешенства, энцефалита, кори, свинки, злокачественных опухолей, СПИДа (синдрома приобретенного иммунодефицита).

Величина вирусов колеблется от 20 до 100 нм, реже до 300 нм (вирус оспы). Большинство из них можно увидеть только

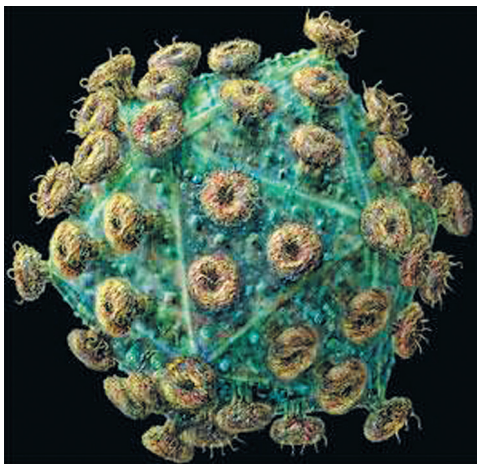


Рис. 41. Вирус иммунодефицита человека

в электронный микроскоп (рис. 41). Устроены вирусы очень просто. Они состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белковой оболочки. Нуклеиновая кислота является носителем наследственной информации, белки защищают ее и обеспечивают ферментацию процессов. Оболочка вируса (капсид) построена из одинаковых белковых субъединиц (капсомеров) и может иметь палочковидную, сферическую формы, а также форму многогранника (каждая грань которого состоит из нескольких субъединиц). Число белковых субъединиц капсида может быть различно: у некоторых бактериофагов – 12, у вируса табачной мозаики – 2200.

Многие вирусы растений, а также вирус полиомиелита способны образовывать кристаллы, состоящие из миллионов элементарных вирусных частиц. В таком состоянии вирус очень устойчив к внешним воздействиям. Кристаллы вирусов можно растворять и вновь осаждать. Вирус при этом не уничтожается.

Вирусы являются внутриклеточными паразитами, способными развиваться и размножаться только внутри живых клеток. В свободном состоянии вирусы не проявляют свойства живого и лишь сохраняют свою жизнеспособность. Способы проникновения вирусов в клетки живых организмов разнообразны. Проникновение вируса в растительную клетку, защищенную прочной клеточной стенкой, происходит в местах ее механических повреждений, наносимых вредителями. В клетки животных, защищенных лишь плазмалеммой и поэтому более уязвимых, вирусы проникают путем эндоцитоза.

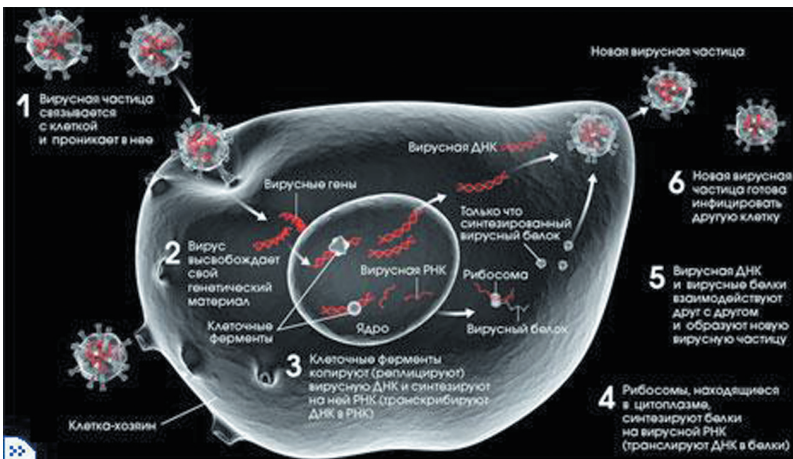


Рис. 42. Жизненный цикл ДНК-содержащего вируса

После проникновения внутрь клетки-хозяина белковая оболочка вируса разрушается, и в клетке остается только вирусная нуклеиновая кислота. Она включается в обмен веществ клетки-хозяина, направляя всю ее деятельность на производство вирусной нуклеиновой кислоты и вирусных белков. Если вирусной нуклеиновой кислотой является ДНК, то она «размножается» путем редупликации, т.е. самоудвоения, и параллельно служит матрицей для синтеза соответствующих молекул информационной РНК, которые, поступая в рибосомы клетки-хозяина, обеспечивают синтез белков оболочки вируса (рис. 42).

Затем происходит «самосборка» белковых оболочек вокруг вирусной нуклеиновой кислоты. В результате в одной клетке образуется множество (иногда тысячи) вирусных частиц. У вирусов, не содержащих ДНК, роль передачи наследственной информации выполняет РНК. Выход вирусных частиц из клетки может сопровождаться ее лизисом (разрушением) или происходить путем экзоцитоза. В последнем случае после нескольких циклов размножения вируса клетка погибает. У вируса гриппа за 30 часов проходит 5-6 циклов с выходом более 100 вирусных частиц после каждого цикла. Частицы растительных вирусов в определенных условиях могут не выходить из клетки, а накапливаться в ней, образуя кристаллы.

Вирусы, поражающие бактерии, называются бактериофагами (рис. 43). Все фаги имеют многогранную призматическую головку и хвост. Диаметр головки 60-95 нм, длина хвоста – 250 нм.

Головка состоит из белковой оболочки и заключенной в ней ДНК или РНК. Хвост – полый стержень, окруженный чехлом из белков. На конце него расположена пластинка с шипами и нитями, обеспечивающими выбор клетки хозяина и прикрепление на ней. Здесь чехол хвоста сокращается, стержень прокалывает клеточную стенку, и нуклеиновая кислота впрыскивается в клетку-хозяина. Бактериофаг «работает» как живой шприц однократного действия. На поверхности клеток

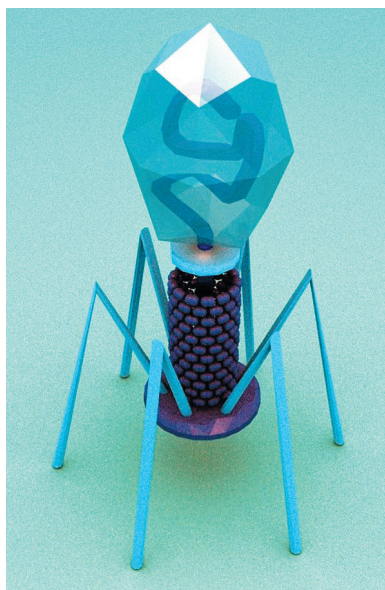


Рис. 43. Бактериофаг Т4

остаются пустые фаговые оболочки. После того как произойдут «размножение» нуклеиновой кислоты и синтез фаговых белков, образуются новые фаговые частицы, бактериальная оболочка растворяется и фаги выходят во внешнюю среду.

Вирусы – классический объект нанобиологии: их изучение привело к пониманию тонкой структуры гена, расшифровке генетического кода, выяснению механизмов наследственности и изменчивости.

7.5. Вирусы в борьбе против раковых заболеваний

Каждый вирус является возбудителем определенного инфекционного заболевания отчасти потому, что распознает на клеточной поверхности специфические структуры – рецепторы, которые у разных типов клеток неодинаковы. Такая избирательность привлекла внимание онкологов. Если бы ею обладали препараты, используемые в химиотерапии опухолей, то удалось бы избежать многих побочных эффектов, приносящих страдания больным.

Сегодня ученые работают над созданием генетически модифицированных вирусов, которые действовали бы как высокоточное самонаводящееся оружие, поражая исключительно раковые клетки и оставляя незатронутыми здоровые клетки. Вирусотерапия – это новое направление в лечении онкологических заболеваний, основанное на применении вирусов, избирательно инфицирующих и уничтожающих раковые клетки. Чаще всего для этой цели используют аденовирусы. При этом создают «искусственный вирус», в геном которого встраивают ген (промотор), позволяющий вирусной ДНК размножаться только в раковых клетках. Миллионы дочерних вирусных частиц, образующихся в раковой клетке, в итоге буквально разрывают ее на части и инфицируют другие раковые клетки. Нормальные клетки тоже инфицируются, но вирус там не размножается и никакого вреда им не причиняет.

Наряду с этим вирусы, используемые в вирусотерапии, способны не только физически уничтожать раковые клетки, разрывая их на части, но и доставлять в клетки гены, повышающие их чувствительность к обычным химиотерапевтическим препаратам.

Опухолеспецифичные вирусные частицы можно пометить или флуоресцирующими красителями, или радиоизотопами. При попадании их в организм они связываются с опухолевыми клетками, делая последние доступными для обнаружения.

7.6. Нанотехнологии на основе вирусов

Исследователи Массачусетского технологического института провели оригинальный эксперимент: молекулу ДНК со случайной последовательностью нуклеотидов, кодирующих различные белки, включили в состав ДНК бактериофага в таком участке, чтобы белки на ДНК-доноре синтезировались на поверхности вируса. Колония таких бактериофагов была помещена в среду, к которой исследователи хотели осуществить адгезию белков. После того как поверхность питательной среды была промыта, на ней остались только те вирусы, поверхность которых содержала адгезивные к субстрату белки. Отобранные вирусы поместили в новую среду и добились роста их колонии. Таким способом можно создавать белки, которые будут соединяться с различными материалами, образуя новые структуры (рис. 44). Исследователи надеются создать «библиотеку» вирусов, производящих белки, адгезивные к золоту, платине, серебру, оксиду цинка, арсениду галлия и др. Вирус размножается, образуя при этом длинные нити, покрытые металлом. Последние, несомненно, найдут применение в нанoeлектронике и наносистемах.

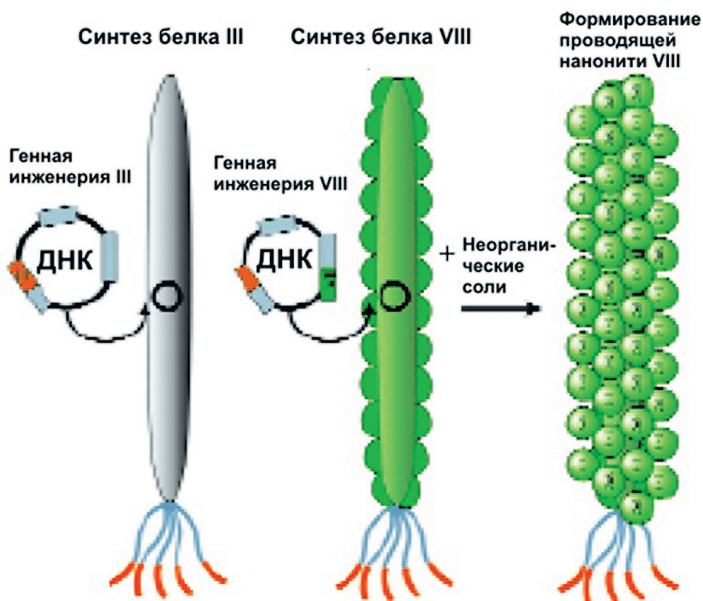


Рис. 44. Механизм формирования проводящей нанонити

7.7. «Искусственные вирусы» в коррекции наследственных аномалий

Многие наследственные заболевания человека вызваны различными генными мутациями. К их числу относятся гемофилия, дальтонизм, фенилкетонурия и др. Учеными установлено, что ретровирусы могут быть использованы для лечения некоторых наследственных заболеваний человека. При этом с помощью методов генетической инженерии в геном вируса вводятся гены человека, нарушение работы которых в организме больного привело к развитию определенной болезни. Такие искусственные ретровирусы способны встраивать свои гены в геном клетки-хозяина, где они функционируют неограниченно долго, восполняя дефицит продуктов дефектных генов организма-хозяина.

Вопросы для повторения:

1. Каковы основные отличительные особенности строения и функционирования прокариотической клетки?
2. Как осуществляется размножение бактерий?
3. На каких свойствах бактерий может быть основано их использование для внутриклеточной доставки лекарств?
4. Какова перспектива использования бактерий как источника энергии в нанотехнологиях?
5. Каков общий план строения вирусов?
6. Почему считают, что вирусы являются «мостиком» между живой и неживой природой?
7. Как происходит размножение вирусов?
8. Опишите характерные черты строения бактериофага.
9. На чем основано использование вирусов для лечения наследственных заболеваний?
10. Как можно использовать вирусы в лечении раковых заболеваний?
11. Какие нанотехнологии на основе вирусов вам известны?
12. Можно ли назвать вирусы представителями наномира?

Глава 8. Нанобиореакторы как устройства для изучения и производства ферментов

8.1. Структурно-функциональные особенности ферментов как биологических катализаторов

Все реакции в живой клетке протекают при умеренной температуре, нормальном давлении и нейтральной среде. При отсутствии ферментов реакции синтеза и распада протекают в таких условиях очень медленно. Катализаторы белковой природы – ферменты значительно ускоряют биохимические реакции, не изменяя их общий результат. Действие ферментов отличается высокой специфичностью: фермент катализирует только одну реакцию или действует на один тип связи.

Специфичность фермента во многом определяется его активным центром. Активный центр – участок фермента, в котором происходит катализ за счет тесного (многоточечного) контакта между молекулами фермента и специфического вещества – субстрата. Активным центром выступает или функциональная группа, или отдельная аминокислота. Чаще всего для каталитического действия необходимо несколько аминокислотных остатков (в среднем от 3 до 12), расположенных в определенном порядке (рис. 45).

Активный центр также может формироваться металлами, витаминами и другими соединениями небелковой природы – коферментами, связанными с ферментом. При этом форма и химическое строение активного центра таковы, что с ним могут связываться только определенные субстраты в силу их соответствия друг другу. Роль остальных аминокислотных остатков в крупной молекуле фермента состоит в том, чтобы обеспечить его молекуле соответствующую глобулярную форму, которая нужна для эффективной работы активного центра.

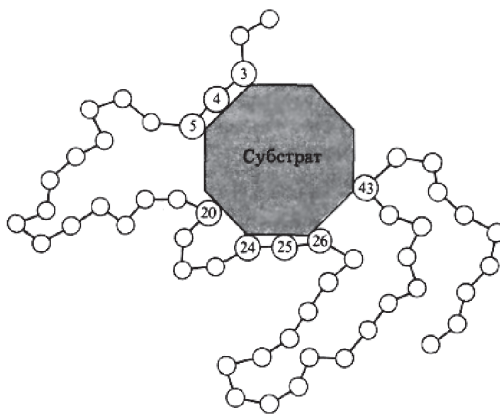


Рис. 45. Схема фермент-субстратного комплекса: субстрат присоединяется к ферменту в активном центре последнего

Кроме того, вокруг крупной молекулы фермента возникает сильное электрическое поле. В таком поле становится возможной ориентация молекул субстрата и приобретение ими асимметричной формы. Это приводит к ослаблению химических связей, и катализируемая реакция происходит с меньшей начальной затратой энергии, а следовательно, и с большей скоростью. Например, одна молекула фермента каталазы может расщепить за 1 минуту более 5 миллионов молекул пероксида водорода (H_2O_2).

У некоторых ферментов в присутствии субстрата конфигурация активного центра претерпевает изменения, т.е. фермент ориентирует свои функциональные группы таким образом, чтобы обеспечить наибольшую каталитическую активность. Молекулы субстрата, присоединяясь к ферменту, тоже в определенных пределах изменяют свою конфигурацию для увеличения реакционной способности функциональных групп центра. Фермент-субстратный комплекс после химической реакции распадается с образованием конечных продуктов и свободного фермента. Освободившийся при этом активный центр может связывать новые молекулы субстрата. Известно около двух тысяч ферментов, большая часть из которых локализована в определенных клеточных структурах (ядро, митохондрии, пластиды, лизосомы и др.), где и осуществляется их функция.

8.2. Применение ферментов

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток. В отличие от химических катализаторов, ферменты нетоксичны, функционируют в мягких условиях, используют доступное сырье (в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения. По объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков и находят все более широкое применение в текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, медицинской, химической промышленности. Ферменты разных классов используют для разрушения и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду. Ферменты применяются в медицине. Так, протеолитические ферменты (амилаза, липаза) используются при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, печени и поджелудочной железы. В последние годы показана эффективность применения протеиназ в лечении злокачественных новообразований. Протеолитические ферменты (плазмин и др.) используются для растворения тромбов в кровеносных сосудах.

Коллагеназа применяется для рассасывания рубцовых образований, а эластаза – для задержки развития атеросклероза. Ферменты используются в диагностических целях, например, для выявления инфаркта миокарда или заболеваний печени.

8.3. Микроорганизмы как наиболее распространенные биореакторы ферментов

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют те природные объекты, в которых содержание необходимого фермента составляет не менее 1%. Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растения на определенной фазе их развития (проросшие семена злаковых и бобовых, клеточный сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). В связи с этим особого внимания заслуживают микроорганизмы, которые являются практически неограниченным источником ферментов (рис. 46). При этом методами селекции, мутагенеза, геной инженерии можно усиливать природную способность микроорганизмов к ускорению протекания биологических процессов, в десятки и сотни раз повышая их продуктивность.

Устройства, в которых осуществляются биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов,

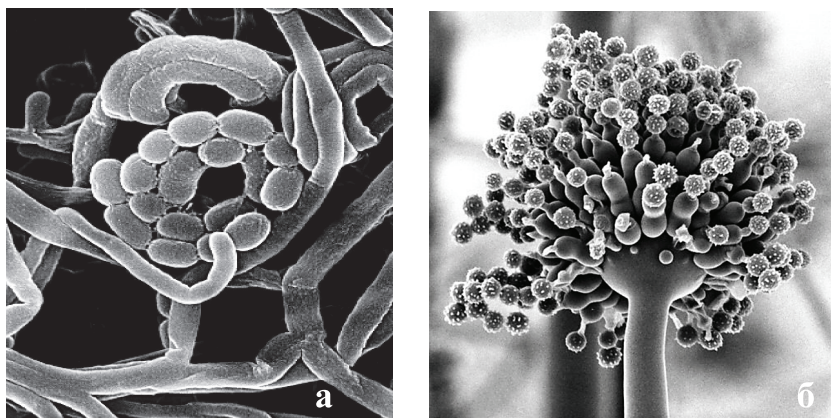


Рис. 46. Сканирующие электронные микрофотографии микроорганизмов, используемых в биотехнологических производствах:
Streptomyces sp. (а), *Aspergillus* sp. (б)

называют биореакторами (или ферментерами). Часто термин «биореактор» относят к сосуду, в котором растут микроорганизмы. С другой стороны, биореакторами, своеобразными «биологическими фабриками» по производству белковых препаратов, могут выступать отдельные микроорганизмы или растения.

8.4. Ферменты, синтезируемые бактериальной клеткой

Ферменты микроорганизмов по своей структуре, свойствам, функциям не отличаются от ферментов других живых существ. Однако одни бактериальные ферменты образуются постоянно и независимо от состава питательной среды, а другие появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия. Первые называются конститутивными ферментами (например, ферменты гликолиза), вторые относятся к адаптивным, или индуцибельным ферментам. Конститутивные ферменты всегда присутствуют в клетке, их синтез осуществляется с постоянной скоростью. Такие ферменты составляют меньшую часть ферментов микроорганизмов.

Большинство ферментов бактериальной клетки относится к адаптивным. Эти ферменты синтезируются в клетке под воздействием каких-либо веществ (индукторов), чаще всего субстрата данного фермента. При отсутствии этих веществ гены, контролирующие синтез фермента, находятся в заблокированном состоянии, а фермент содержится лишь в следовых количествах. Следовательно, путем изменения состава питательной среды можно регулировать продукционную активность определенных промышленных штаммов микроорганизмов.

8.5. Использование микроорганизмов для получения наночастиц

Наряду с ферментами с помощью методов биотехнологии получают аминокислоты, витамины, органические кислоты (уксусную, лимонную), антибиотики, вакцины, сыворотки. Естественные биореакторы (микроорганизмы) могут быть использованы для получения различных наночастиц (магнитных, квантовых точек). Например, клетки магнетотактильных бактерий могут синтезировать частицы магнетита (Fe_3O_4), при этом размеры наночастиц зависят от условий культивирования бактерий (рис. 47). Важно и то, что такая «продукция» бактериальных клеток окружена мембраной, поэтому частицы магнетита можно легко выделять из раствора. К настоящему времени уже определены последовательности генов магнетотак-

тильной бактерии, ответственных за синтез наночастиц. Следовательно, используя методы геной инженерии, можно направленно изменять параметры получаемых наночастиц. Полученные таким образом наночастицы могут найти применение в самых разных областях: например, в диагностике с использованием иммунохимии, в системах разделения клеток (клеточной сепарации), выделения нуклеиновых кислот, в контроле за адресной доставкой лекарств.

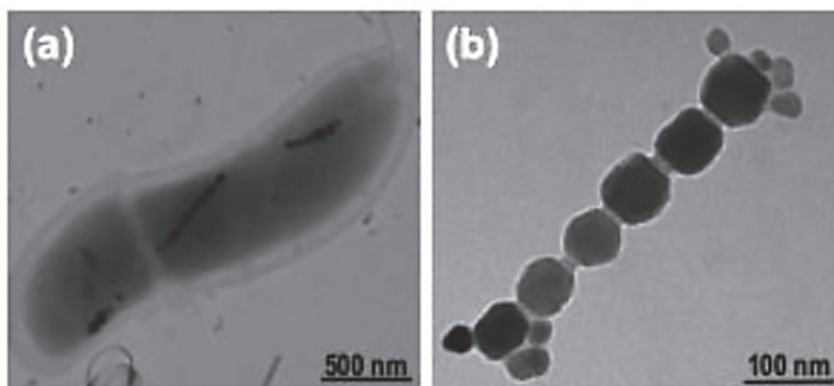


Рис. 47. *Magnetospirillum magneticum* с цепочками магнитосом внутри (а); нанокристаллы магнетита, соединенные фосфолипидной мембраной (б)

Некоторые микроорганизмы, помещенные в раствор солей золота, способны действовать как химический восстановитель, превращая внутри своих клеток ионы золота в наночастицы металла диаметром от 5 до 15 нм (рис. 48). Получать ранее частицы в таком узком диапазоне размеров биологическими методами не удавалось. С помощью данного метода

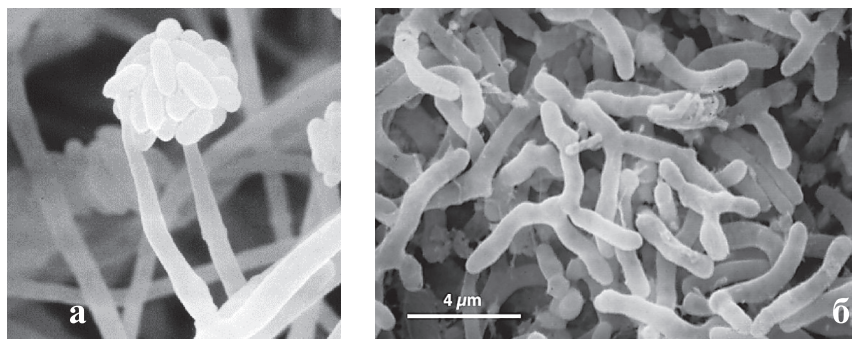


Рис. 48. Микроорганизмы-нанобиореакторы: *Verticillium* sp. (а), *Rhodococcus* sp. (б)

можно получить наночастицы серебра, а также сплавов золота и серебра, которые находят широкое применение в различных нанотехнологических производствах.

Вопросы для повторения:

1. Определите понятие «ферменты». Назовите основные свойства ферментов.
2. Чем обусловлена специфичность действия ферментов?
3. Охарактеризуйте активный центр фермента.
4. Опишите процесс образования фермент-субстратного комплекса.
5. Какова роль аминокислотных остатков, не входящих в состав активного центра, во взаимодействии фермента с субстратом?
6. Перечислите основные области применения ферментов. Приведите их примеры.
7. Назовите основные источники ферментов.
8. Каковы преимущества микроорганизмов как естественных биореакторов?
9. Какие группы ферментов можно выделить в зависимости от механизма их образования в клетке?
10. Приведите примеры веществ, получаемых с помощью микроорганизмов.

Глава 9. Нанобиотехнологии в иммунологии

9.1. Нанобиотехнологии в иммунологии: проблемы и перспективы

Изучение фундаментальных молекулярно-генетических и клеточных механизмов жизнедеятельности является основой для разработки современных методов диагностики и лечения заболеваний, создания новых лекарственных средств. В настоящее время выявлены гены, ответственные за развитие дефектов иммунной системы, что позволяет разрабатывать принципиально новые системы генодиагностики и генотипирования. На основе нанотехнологий создаются и успешно применяются в клинической практике иммуномодуляторы и вакцины, современные высокоточные средства диагностики и терапии. Разрабатываются новейшие противоаллергические препараты – аллерготропины, вакцины для профилактики туберкулеза, гепатита В, вируса папилломы, а также особо опасных инфекций – лептоспироза, туляремии, бруцеллеза и др. Успешно проходят клинические испытания первой отечественной анти-ВИЧ/СПИД вакцины.

Развитие нанобиотехнологий открыло перспективы создания препаратов направленного действия (таргентных препаратов), мишенью которых являются белки, участвующие в канцерогенезе. Разработан и внедряется в медицинскую практику ряд препаратов на основе моноклональных антител.

Перспективной в иммунотерапии рассматривается вакциноterapia с использованием дендритных клеток, являющихся наиболее мощными антиген-представляющими клетками. Отрабатываются условия слияния опухолевых и дендритных клеток.

Актуальной проблемой иммунологии продолжает оставаться создание лекарственных форм с высокой избирательностью противоопухолевого действия. В последние годы предпринимаются попытки разработать системы направленной доставки препарата в виде иммунолипосом, позволяющих программировать время нахождения препарата в кровотоке и его накопление в опухоли.

9.2. Диагностика иммуноглобулинов, получение и применение моноклональных антител

Несмотря на огромное разнообразие методов диагностики вирусных инфекций, проблема быстрой и высокочувствительной диагностики сохраняет

актуальность. В ее решении достаточно перспективным представляется использование атомно-силовой микроскопии, позволяющей за небольшое время получить изображение поверхности образца с разрешением в несколько нанометров.

Атомно-силовая микроскопия дает возможность избирательного определения иммуноглобулинов без дополнительных стадий обработки, поскольку комплексы определяются по различиям в форме и размерах иммуноглобулинов (рис. 49, 50). Подобное определение применимо для антигенов, молекулярная масса которых не превышает размеры антител, например, для вирусных белков.

Важным критерием эффективности диагностики является возможность проведения не только качественной оценки, но и количественного анализа. Специфичность, или способность определять компонент в сложных многокомпонентных биологических образцах, в которых содержание данного

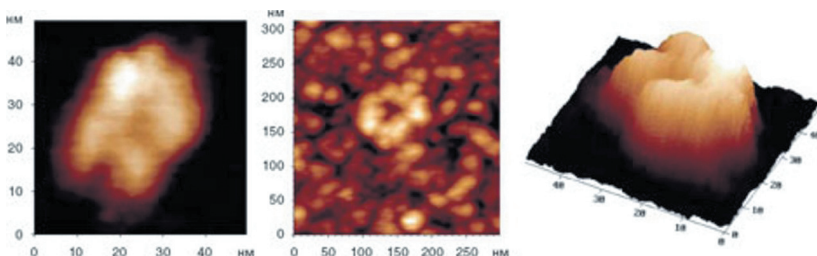


Рис. 49. Изображения иммуноглобулинов IgM в свободном состоянии (слева) и в виде иммунных комплексов (в центре), полученные с помощью атомно-силового микроскопа, справа – трехмерная реконструкция изолированной молекулы иммуноглобулина

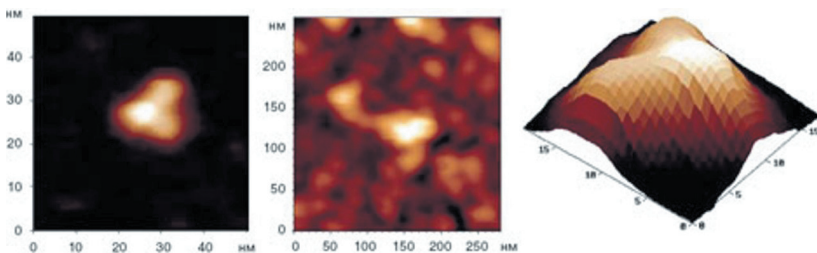


Рис. 50. Изображения иммуноглобулинов IgG в свободном состоянии (слева) и в состоянии иммунных комплексов (в центре), полученные с помощью атомно-силового микроскопа, справа – трехмерная реконструкция изолированной молекулы иммуноглобулина

компонента может быть чрезвычайно низко, также является важнейшей характеристикой диагностической системы.

Моноклональные антитела представляют собой комплекс из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей. При производстве лекарств на основе моноклональных антител используются антитела лабораторных мышей. Модификацию молекул производят, заменяя белок аминокислотными последовательностями, копирующими антитела человека. Этим достигается снижение потенциально опасных побочных эффектов, часто возникающих при лечении антителами, из-за того, что иммунная система больного воспринимает моноклональные антитела как чужеродные вещества.

Получение моноклональных антител осуществляется в 4 этапа:

1. *Иммунизация.* Исследователи вводят молекулу-мишень в организм лабораторной мыши. В-лимфоциты иммунной системы мыши производят антитела, распознающие этот антиген (рис. 51).

2. *Слияние, отбор и тиражирование.* Слиянием В-лимфоцитов (голубого цвета) с раковыми клетками миеломы (оранжевого цвета) получают гибридомы (фиолетового цвета), способные к бесконечному делению (рис. 52).

3. *Получение антител.* Культура клеток выделяет антитела, которые затем очищают и проверяют (рис. 53).

4. *Гуманизация.* Генные инженеры могут заменить участки мышинового антитела сегментами человеческого антитела (золотистого цвета) или же могут также разрезать антитела, создавая фрагменты различного размера (рис. 54).

Моноклональные антитела используют для создания иммуномагнитного фильтра

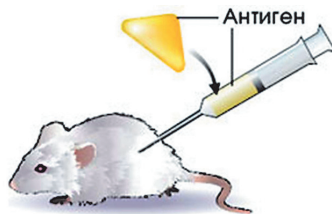


Рис. 51. Иммунизация

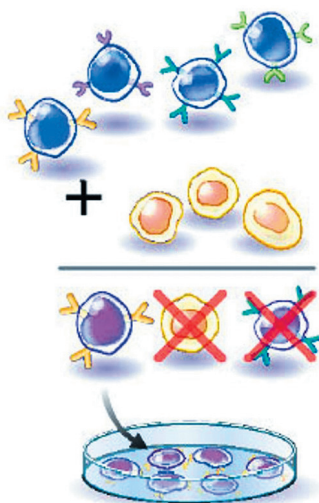


Рис. 52. Слияние, отбор и тиражирование



Рис. 53. Получение антител



Рис. 54. Гуманизация

(сорбента). Сущность метода состоит в том, что привязанные к ферромагнитным микрочастицам моноклональные антитела, находясь в магнитном поле, могут высокоспецифично извлекать клетки, например, из костного мозга или из опухоли. Затем иммуномагнитный сорбент отделяют, оставляя только извлеченные клетки. С помощью такого сорбента можно связывать и удалять клетки (например, злокачественные) или получать из костного мозга здоровые клетки – родоначальники кроветворения. Последние могут использоваться для введения этому же больному в случае повреждения кроветворения.

Применение моноклональных антител у онкологических больных – эффективный и относительно безопасный метод. Разработка новых моноклональных антител и совершенствование схем терапии злокачественных опухолей с их помощью является одним из наиболее перспективных направлений в онкологии.

9.3. Перспективы создания иммунобиопрепаратов нового поколения

Одной из основных задач современной биологии и медицины является более успешная борьба с продолжающими ускоряться по планете раковыми заболеваниями. Исследования в этой области, естественно, требуют в первую очередь изучения и понимания механизмов биохимических процессов на уровне генов и белковых молекул. Применение вводимых в организм даже простейших биодатчиков (в сочетании с веществами, способными к распознаванию молекул) могло бы, например, способствовать диагностике раковых заболеваний на самой ранней стадии развития, что очень важно для успеха лечебного процесса.

С другой стороны, известно, что многие опасные болезни (в том числе рак, сахарный диабет и т.д.) обусловлены наследственными (генетическими) дефектами. Сейчас уже очевидно, что в достаточно короткое время будут созданы и усовершенствованы так называемые ДНК-чипы, позволяющие легко осуществлять анализ генетической информации, присущей отдельному человеку, и проводить лечебный курс, соответствующий генетическому типу конкретного пациента. Анализ генетической информации позволит создавать препараты с «узконаправленным» точечным эффектом. Тем самым возникает возможность создания иммунологии нового поколения, основанной на индивидуальном подходе к пациенту.

9.4. Наноэмульсии в борьбе с инфекционными заболеваниями

Благодаря нанотехнологиям появилась возможность создать назальную вакцину на масляной основе, защищающую от различных инфекционных заболеваний, в том числе и от вируса иммунодефицита человека. Исследователи из Университета Мичигана (США) сообщили о создании наноэмульсии на основе соевого масла, состоящей из капель детергента размерами до 400 нанометров (рис. 55). Наноэмульсия содержит микробные или вирусные белки, вызывающие иммунный ответ. При этом повреждаются только поверхностные ткани человека.

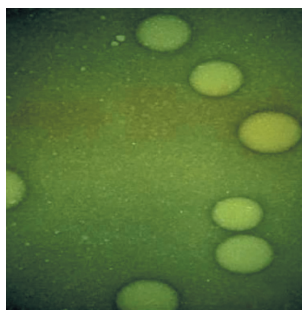


Рис. 55. Нанокapли эмульсии под микроскопом, размер – 200 нм

Вопросы для повторения:

1. Каковы преимущества таргентных препаратов?
2. На чем основан принцип работы атомно-силового микроскопа?
3. Что собой представляют иммуноглобулины?
4. Перечислите критерии диагностики иммуноглобулинов.
5. Каковы особенности строения моноклональных антител?
6. Охарактеризуйте этапы получения моноклональных антител.
7. Каковы перспективы создания на основе нанобиотехнологий иммунобиопрепаратов нового поколения?
8. Что представляют собой наноэмульсии, применяемые в борьбе с инфекционными болезнями?

Глава 10. Наночастицы в антропогенных экосистемах. Биологическая безопасность наноконструкций и нанотехнологий

10.1. Основные типы антропогенных экосистем, их отличие от естественных экосистем

Человек, находившийся на длительном отрезке своего исторического развития в непосредственной зависимости от природы, превратился в важнейший фактор природы – антропогенный. Наряду с естественными возникли и сформировались антропогенные экосистемы. Антропогенные экосистемы отличаются от естественных тем, что доминирующим экологическим фактором в них являются сообщества людей и продукты их производственной и общественной деятельности. В антропогенных экосистемах созданная сообществами людей искусственная среда преобладает над естественной.

К основным типам антропогенных экосистем относятся агробиоценозы и промышленные экосистемы. Агробиоценозы – это экосистемы, созданные человеком для получения сельскохозяйственной продукции. В отличие от естественных экосистем, агробиоценозы характеризуются обедненным видовым составом, систематическим выносом элементов минерального питания с урожаем и необходимостью внесения удобрений, благоприятными условиями для размножения вредителей и необходимостью применения средств защиты растений, необходимостью уничтожения сорняков, нарушением самовоспроизведения и саморегуляции.

10.2. Достижения сельскохозяйственной биотехнологии

В настоящее время развитие агропромышленного комплекса непосредственно связано с внедрением и все более широким применением биотехнологических методов, в первую очередь методов клеточной и генетической инженерии. Сформировалось особое направление биотехнологии – сельскохозяйственная биотехнология. В селекции и растениеводстве основные исследования направлены на создание новых сельскохозяйственных растений, обладающих устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью. Генно-инженерные методы позволяют создавать новые формы растений гораздо быстрее, чем

классические методы селекции. Кроме того, появляется возможность целенаправленного изменения генотипа.

В ведущих биотехнологических центрах и лабораториях США, Японии, Германии, Голландии и других стран получены устойчивые формы растений: хлопчатника – к хлопковой совке (рис. 56), картофеля – к колорадскому жуку и фитофторе, пшеницы – к засолению и т.д. Важными направлениями биотехнологии в животноводстве являются получение трансгенных животных, отличающихся устойчивостью к инфекционным заболеваниям, и разработка технологий стимулирования роста и повышения продуктивности животных.



Рис. 56. Получение трансгенных растений хлопка.

Почвенные бактерии *Bacillus thuringiensis* синтезируют специфический белок (bt-токсин), ядовитый для насекомых. Ген, ответственный за его синтез, удалось выделить и внести в геном многих видов сельскохозяйственных растений (например, хлопчатника). Трансгенные растения оказались устойчивыми к личинкам большого числа видов насекомых

10.3. Понятие об экологической биотехнологии, ее задачи.

Биодеградация ксенобиотиков

Промышленные экосистемы, формирующиеся на территории промышленных комплексов и городов, характеризуются следующими особенностями: высоким уровнем загрязненности (физические, химические и биологические загрязнения), высокой зависимостью от внешних источников энергии, исключительной обедненностью видового разнообразия, неблагоприятным влиянием на смежные экосистемы.

Решение проблем окружающей среды, возникающих в антропогенных экосистемах, таких как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений, составляет предмет экологической биотехнологии. В настоящее время выделен ряд микроорганизмов, способных к деградации ксенобиотиков (неприродных, синтетических химических веществ) – гербицидов, пестицидов, хладагентов, растворителей. Однако широкое применение

биодegradации (разрушения загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов) в большинстве случаев ограничено, так как:

- ни один из природных микроорганизмов не может разрушать все органические соединения;
- некоторые органические соединения в высокой концентрации подавляют функционирование или рост деградирующих их микроорганизмов;
- большинство очагов загрязнения содержит смесь химикатов, и микроорганизм, способный разрушить один или несколько ее компонентов, может инактивироваться другими компонентами;
- многие неполярные соединения адсорбируются частицами почвы и становятся менее доступными для микроорганизмов;
- биодegradация органических соединений часто происходит достаточно медленно.

Часть этих проблем решают биотехнологии, создавая с помощью генетических манипуляций рекомбинантные микроорганизмы, способные к деградации нескольких соединений. Отличие новых нанобиотехнологий от традиционных заключается в том, что наночастицы являются универсальным реагентом, способным нейтрализовать большое количество вредных веществ, в то время как обычно для каждого отдельно взятого токсина используется свой нейтрализатор (определенный штамм микроорганизмов). Предложено, в частности, использовать наночастицы железа для очистки почв от разного рода токсичных веществ. Нейтрализация происходит в результате окисления железа в грунтовых водах и образования нерастворимых комплексов с такими токсичными веществами, как соединения свинца, никеля, ртути и даже тяжелых радиоактивных элементов. После образования нерастворимых комплексов миграция в грунтовых водах соединений токсинов с железом затрудняется, и во многих случаях пробы воды становятся чище. Учитывая тот факт, что большинство микроорганизмов, полученных путем генной модификации, являются мезофильными (хорошо растут и размножаются при 20-40°C), а температура воды в загрязненных водоемах лежит в диапазоне от 0 до 20°C, наночастицы железа имеют несомненное преимущество, проявляя высокую реакционную способность в любых температурных условиях.

10.4. Особенности влияния наночастиц на живые организмы

Наночастицы (частицы вещества размером 1-100 нм) обладают уникальными физическими, химическими, механическими свойствами. Размеры

наночастиц обычно меньше размеров живых клеток, что обуславливает их высокую проникающую и реакционную способность. Такие частицы легко проникают через тканево-кровенной (гистогематический) барьер, занимающий ведущее место в гомеостатических приспособительных механизмах живого организма, призванных защитить органы и ткани от чужеродных веществ и регулировать постоянство состава тканевой межклеточной жидкости. Это качество может быть использовано для создания методов доставки лекарств в ткани и органы. С другой стороны, малые размеры и высокая проникающая способность могут представлять и заметную опасность для человека.

Новые наноматериалы и нанотехнологии имеют существенно отличающиеся токсикологические и экотоксикологические свойства, что определяет необходимость выявления и оценки связанных с ними экологических и биологических рисков. Опасность наночастиц может быть обусловлена: чрезвычайно большим отношением площади их поверхности к объему; высокой реакционной способностью наноструктур; способностью их аккумуляции в окружающей среде и пищевых цепях; возможностью проникновения в печень, мозг, легкие и другие органы человека. Установлены факты связывания и переноса наночастицами некоторых особо опасных продуктов горения. В ряде эпидемиологических исследований получены доказа-

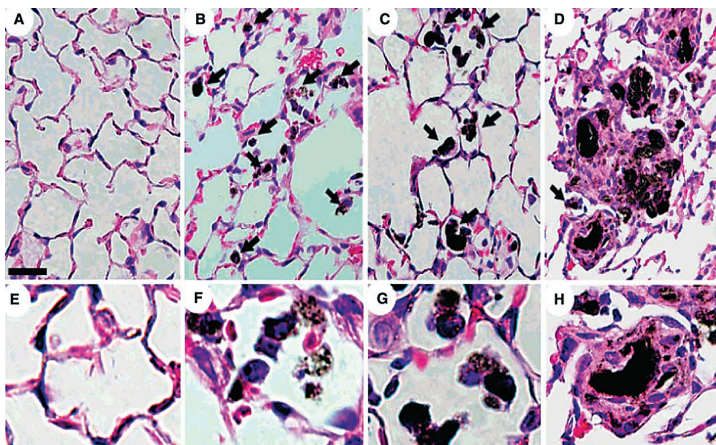


Рис. 57. Воздействие однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ) на органы дыхания: А-Е – легкие интактных животных; В-Ф – спустя 3 дня после однократного введения ОУНТ; С-Н – спустя 2 недели после введения ОУНТ. Формируются крупные скопления ОУНТ, образуются местные очаги воспаления и гранулемы легких

тельства влияния твердых пылевых частиц на здоровье человека: воздействие таких частиц увеличивало риск сердечно-сосудистых и ряда других заболеваний (рис. 57).

10.5. Наноструктуры на основе углерода: фуллерены, одно- и многослойные нанотрубки

Среди значительного разнообразия наночастиц и наноматериалов особое место занимают конструкции из атомов углерода. Это обусловлено его способностью образовывать огромное количество разнообразных соединений, а также высокой прочностью связи между атомами углерода.

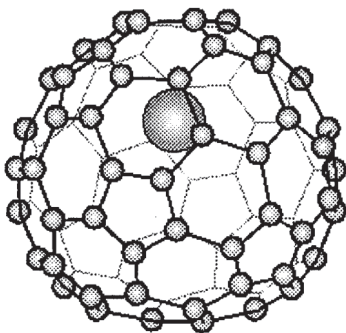


Рис. 58. Молекула эндофуллере-на: внутри молекулы фуллере-на размещен один или несколько неуглеродных атомов

Примерами углеродных молекул, которые могут послужить прототипами нанотехнологических компонентов, являются фуллерены (рис. 58). Фуллерен – это новая аллотропная форма углерода (наряду с алмазом, графитом, карбином), которую сначала предсказали теоретически, а затем открыли в природе. Главная особенность фуллеренов – их каркасная форма: они представляют замкнутые, полые внутри сферы, стенка которых образована правильными пяти- и шестиугольниками. Уникальные свойства фуллеренов обусловлены их высокой реакционной спо-

собностью за счет большого количества свободных валентностей углерода. Самая известная из углеродных каркасных структур – фуллерен, состоящий из 60 атомов углерода. Проведены доклинические испытания средств на основе фуллереновых наносфер C60 с упорядоченно расположенными на их поверхности химическими группами. Эти группы могут быть подобраны таким образом, чтобы связываться с заранее выбранными биологическими мишенями.

Спектр возможных применений фуллеренов чрезвычайно широк. Он включает борьбу с такими вирусными заболеваниями, как грипп и ВИЧ, онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями, остеопорозом, заболеваниями сосудов. Например, наносфера может содержать внутри атом радиоактивного элемента, а на поверхности – группы, позволяющие ей прикрепиться к раковой клетке. В Институте экспериментальной

медицины (Санкт-Петербург) использовали аддукт фуллерена с поливинилпирролидоном (ПВП). Это соединение хорошо растворимо в воде, а полости в его структуре близки по размерам к молекулам С60. Полости легко заполняются молекулами фуллерена, в результате чего образуется водорастворимый аддукт с высокой противовирусной активностью. Поскольку сам ПВП не обладает противовирусным действием, вся активность приписывается содержащимся в аддукте молекулам С60. Его эффективная доза значительно ниже соответствующего показателя для ремантадина, традиционно используемого в борьбе с вирусом гриппа. В отличие от ремантадина, который наиболее эффективен в ранний период заражения, аддукт С60/ПВП обладает устойчивым действием в течение всего цикла размножения вируса. Другая отличительная особенность сконструированного препарата – его эффективность против вируса гриппа А- и В-типа, в то время как ремантадин действует только на первый тип вируса. Наносферы могут использоваться также и в диагностике, например, как рентгеноконтрастное вещество. Последнее прикрепляется к поверхности определенных клеток и показывает их расположение в организме.

Из углерода можно получить молекулы и с большим количеством атомов. Например, молекула $C = 1\ 000\ 000$ может представлять собой однослойную трубку диаметром около нанометра и длиной в несколько десятков микрон (рис. 59). На поверхности трубки атомы углерода расположены в вершинах правильных шестиугольников. Концы трубки закрыты с помощью шести правильных пятиугольников. Основные направления использования углеродных нанотрубок в биологии связаны с их уникальными механическими и электрическими свойствами. Уже освоены технологии иммобилизации ферментов и даже ферментативных комплексов на внутренней и внешней стороне нанотрубки. Нанотрубки используются для обеспечения адресной доставки лекарственных соединений и макромолекул (белков, ДНК) к клеткам-мишеням.

Углеродные наноматериалы (УНМ) могут быть использованы в решении проблем охраны окружающей среды, например, в очистке сточных вод. Известно, что углеродные нанотрубки обладают уникальными сорбционными характеристиками, что связано, в первую очередь, с рекордно высокой удельной поверхностью (рис. 60). Кроме того, к поверхности нанотрубки могут быть

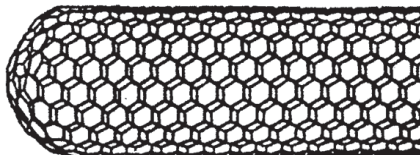


Рис. 59. Углеродная нанотрубка, закрытая с одного конца

присоединены различные молекулярные комплексы с повышенными сорбционными свойствами. Это обеспечивает удаление конкретных микрзагрязнений, очистку от примесей с очень низкой концентрацией, а также позволяет удалять неорганические примеси, эффективно сорбировать ионы тяжелых металлов. УНМ отличаются не только высокой сорбционной емкостью, но и быстрой кинетикой, возможностью использования в широком диапазоне рН.

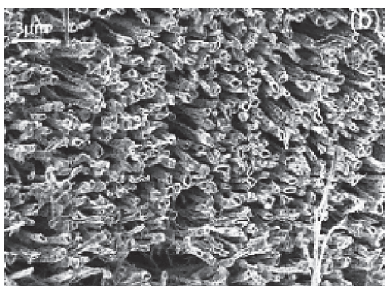


Рис. 60. Сканирующая электронная микрофотография углеродных нанотрубок

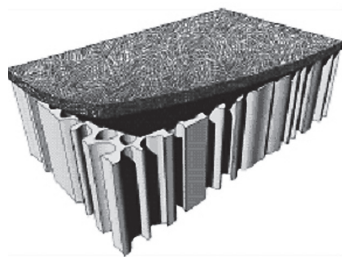


Рис. 61. Пример гибридного фильтра, состоящего из пористой керамической подложки и верхнего слоя из углеродных нанотрубок

Перспективным направлением является использование композитных нанофильтров. Композиты, использующие уникальные свойства УНМ (нанотрубок, фуллеренов), отличаются высокой противомикробной активностью и термостабильностью (рис. 61).

10.6. Влияние наночастиц углерода, фуллеренов и углеродных нанотрубок на свертываемость крови

Определенный интерес представляет воздействие углеродных наночастиц, присутствующих в выхлопах двигателей внутреннего сгорания, а также искусственно синтезированных фуллеренов и нанотрубок на свертываемость крови человека и лабораторных животных. Наночастицы легко проникают через легкие в кровь, взаимодействуют с тромбоцитами и, стремясь к агрегации друг с другом, повышают свертываемость крови. Группой исследователей из США проведено сравнение влияния твердых частиц типичных загрязнителей урбанизированных территорий, смешанных углеродных наночастиц, фуллеренов, однослойных и многослойных углеродных нанотрубок на оседание тромбоцитов человека и тромбообразование у лабораторных животных. В обоих экспериментах наибольшим

негативным эффектом обладали смешанные углеродные наночастицы, провоцирующие максимальную агрегацию тромбоцитов человека и значительную закупорку сонной артерии у лабораторных животных. По интенсивности воздействия однослойные углеродные нанотрубки занимали второе место, многослойные нанотрубки – третье, образец городского воздуха – четвертое место. Молекулы фуллеренов C₆₀ оказались исключением: они не вызывали агрегации тромбоцитов человека и оказывали незначительное влияние на тромбогенез сонной артерии у животных. Последнее указывает на преимущества фуллеренов в создании фармацевтических наноприборов для целенаправленной доставки лекарств, а также в разработке систем диагностики.

10.7. Нанобиотехнологии в контроле качества пищевых продуктов

Проблема биобезопасности жизнедеятельности человека во многом связана с тем, что как в природе, так и в производстве различных необходимых человеку и обществу веществ (продукты питания, средства лечения, гигиены и др.) нередко встречаются опасные для здоровья соединения. Во всех странах мира разработаны и применяются различные методы контроля за технологическими процессами и качеством вновь вовлеченных в сферу использования человеком новых биологических объектов и веществ. В центре внимания находятся их токсичность, аллергенность и общая безопасность для здоровья людей и состояния окружающей среды.

Развитие генной инженерии привело к возможности создания генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов. Модификация генетических структур затрагивает главные механизмы формирования важнейших универсальных свойств живых организмов (наследственность, изменчивость). Последствия такого вмешательства не всегда могут быть точно и своевременно выявлены и спрогнозированы. При переносе генов может происходить дестабилизация генома. Причем не только за счет обогащения его новыми генами или мутагенного эффекта вставки, но и, возможно, в силу индуцирования эндогенных систем активации «молчащих» генов. Все это дает основание считать теоретически возможным возникновение при трансгенозе генотипов, опасных для здоровья и жизни человека. Риск получения таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных и синтетических генов для получения трансгенных растений, животных, микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами.

В то же время доказана стабильная биобезопасность биоинженерии, которая обусловлена:

– разработкой и постоянным применением эффективных методов мониторинга за качеством получаемых трансгенных организмов и прежде всего за составом и свойствами белковых компонентов вновь созданных генотипов; это позволяет заблаговременно выявлять опасные для человека и окружающей среды генотипы и не допускать их выпуска из лаборатории для использования в производстве и продовольственном обороте;

– отбором известных, проверенных природных генов и их регуляторных генетических структур и созданием на их основе векторов, обеспечивающих получение трансгенов с заданными свойствами.

Вопросы для повторения:

1. Определите понятие «антропогенные экосистемы».
2. Опишите особенности агроценозов и промышленных экосистем.
3. Назовите основные направления сельскохозяйственной и экологической биотехнологии.
4. Охарактеризуйте преимущества и недостатки биодegradации.
5. Приведите примеры нанобиотехнологических методов очистки почв и водоемов.
6. Дайте определение понятию «наночастицы».
7. Опишите возможности воздействия наночастиц на живые организмы.
8. Назовите возможные области применения наночастиц в биологии и медицине.
9. Существует ли риск применения наночастиц и наноматериалов для окружающей среды и здоровья человека?
10. Назовите основные наноструктуры на основе углерода.
11. Охарактеризуйте фуллерены как новую аллотропную форму углерода.
12. Каковы перспективы использования углеродных наноматериалов в биологии и медицине?
13. Опишите возможный механизм влияния углеродных наноматериалов на свертываемость крови.
14. В чем сущность проблемы безопасности биотехнологических исследований?

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов А.Р. Нанотехнологии в медицине и биологии / А.Р. Антонов, Ю.И. Складнов // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины». 11-12 окт. 2007 г., СибГУ (режим доступа <http://www.sibupk.nsk.su/new/05/sem/2007/1>).
2. Антонов В.Ф. Биофизика мембран / В.Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 6. – С. 4-12.
3. Артюхов И.В. Применение нанотехнологий в медицине / И.В. Артюхов, В.Н. Кеменов, С.Б. Нестеров // XIII Международная студенческая школа-семинар «Новые информационные технологии». – М.: МГИЭМ, 2005 (режим доступа <http://nit.miem.edu.ru/2005/plenar/6>).
4. Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века / В.С. Баранов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 3. – С. 63-68.
5. Барсуков Л.И. Как собрать мембрану (солюбилизация и реконструкция мембран) / Л.И. Барсуков // Соросовский образовательный журнал. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 10-16.
6. Белая книга по нанотехнологиям / под ред. В.И. Аржанцева и др. – М.: Изд-во ЛКИ, 2008. – 344 с.
7. Березов Т.Т. Применение ферментов в медицине / Т.Т. Березов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 3. – С. 23-27.
8. Биотехнология / под ред. А.А. Баева. – М.: Наука, 1984.
9. Болдырев А.А. Матриксная функция мембран / А.А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 7. – С. 2-7.
10. Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств / Г.К. Будников // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 12. – С. 26-32.
11. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. 3. Клетка единая, но делимая / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 8. – С. 18-23.
12. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. I. Живые нити / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 2. – С. 36-43.
13. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. II. Цитоскелет, способный чувствовать и помнить / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 4. – С. 4-10.

14. Васильев Ю.М. Клетка как чудо архитектуры. Ч. 4. Натяжения цитоскелета контролируют архитектуру клетки и тканей / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 6. – С. 2-7.
15. Васильев Ю.М. Клетка как чудо архитектуры. Ч. 5. Клетка перестраивает архитектуру / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 11. – С. 2-6.
16. Верма А.М. Генотерапия / А.М. Верма // В мире науки. – 1991. – № 1. – С. 26-34.
17. Гассер И.С. Трансгенные культурные растения / И.С. Гассер, Р.Т. Фрейли // В мире науки. – 1992. – № 8. – С. 24-30.
18. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений / Ю.Ю. Глеба // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 6. – С. 3-8.
19. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
20. Говорун В.М. «Системный подход» к живому / В.М. Говорун (режим доступа: <http://nanosvit.com/publ/15-1-0-113>).
21. Грин Н. Биология: в 3 т.: пер. с англ. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор; под ред. Р. Сопера. – М.: Мир, 1996.
22. Дементьев А.А. Взаимодействие полиэлектролитов с мембранными структурами: ЭПР-исследование / А.А. Дементьев, А.А. Рахнянская, Г.Б. Хомутов // Рос. хим. ж. (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева). – 2007. – Т. LI, № 1. – С. 136-142.
23. Дубяга В.П. Нанотехнологии и мембраны (обзор) // В.П. Дубяга, И.Б. Бесфамильный // Критические технологии. Мембраны. – 1999. – № 1. – С. 11-16.
24. Евдокимов Ю.М. Нуклеиновые кислоты, жидкие кристаллы и секреты наноконструирования / Ю.М. Евдокимов // Наука и жизнь. – 2005. – № 4 (режим доступа <http://www.nkj.ru/archive/articles/604>).
25. Евдокимов Ю.М. Пространственно упорядоченные формы ДНК и ее комплексов – основа для создания наноконструкций для медицины и биотехнологии / Ю.М. Евдокимов // Российские нанотехнологии. – 2006. – № 1-2. – С. 256-264 (режим доступа <http://www.nanorf.ru>).
26. Евтушенков А.Н. Введение в биотехнологию: курс лекций / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Мн.: БГУ, 2002. – 105 с.
27. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 208 с.

28. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2006. – 479 с.
29. Зеленин А.В. Генная терапия: этические аспекты и проблемы генетической безопасности / А.В. Зеленин // Генетика. – 1999. – Т. 35. – С. 1605-1612.
30. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология / П. Зенгбуш. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 367 с.
31. Иванов В.И. Как работают ферменты / В.И. Иванов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 9. – С. 25-32.
32. Клячко Н.Л. Биологическая подвижность и полимеризация актина / Н.Л. Клячко // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 10. – С. 5-9.
33. Коничев А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2005. – 400 с.
34. Корочкин Л.И. Клонирование животных / Л.И. Корочкин // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 4. – С. 10-16.
35. Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине / И.С. Кулаев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 23-31.
36. Лещинская И.Б. Генетическая инженерия / И.Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 1. – С. 32-39.
37. Лещинская И.Б. Современная промышленная микробиология / И.Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. – 2004. – № 4. – С. 14-18.
38. Лось А.Д. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов / А.Д. Лось // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 9. – С. 14-22.
39. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды / Л.А. Лутова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 10. – С. 10-17.
40. Льюин Б. Гены / Б. Льюин. – М.: Мир, 1987.
41. Нанотехнологии. Азбука для всех / под ред. акад. Ю.Д. Третьякова. – М.: Физматлит, 2008. – 368 с.
42. Сассон А. Биотехнология / А. Сассон. – М.: Мир, 1987.
43. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха [и др.]; под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа, 2003. – 469 с.
44. Семенова М.Л. Зачем нужны трансгенные животные / М.Л. Семенова // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 4. – С. 13-20.

45. Симан Н. Нанотехнология и двойная спираль / Н. Симан // В мире науки. – 2004. – № 9 (режим доступа <http://www.sciam.ru/2004/9/nano>).
46. Сыч В.Ф. Общая биология: учебник для высшей школы / В.Ф. Сыч. – М.: Академический Проект, 2007. – 330 с.
47. Сыч В.Ф. Структурно-функциональная организация эукариотической клетки / В.Ф. Сыч, Н.А. Цыганова, Г.В. Абдулкин. – Ульяновск: УлГУ, 2006. – 84 с.
48. Фаворова О.О. Лечение генами – фантастика или реальность? / О.О. Фаворова // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 21-27.
49. Харрис П. Углеродные нанотрубы и родственные структуры. Новые материалы XXI века: пер. с англ. / П. Харрис; под ред. и с дополнением Л.А. Чернозатонского. – М.: Техносфера, 2003. – 336 с.
50. Хартманн У. Очарование нанотехнологии: пер. с нем. / У. Хартманн. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 173 с.
51. Чернов Н.Н. Ферменты в клетке и пробирке / Н.Н. Чернов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 5. – С. 28-34.
52. Чизмадзе Ю.М. Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин / Ю.М. Чизмадзе // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 2. – С. 12-17.
53. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
54. Экологическая биотехнология / К.Ф. Форстер [и др.]; под ред. К.Ф. Форстера, Д.А. Дж. Вейза; пер. с англ. В.А. Дымшица; под ред. А.И. Гинака. – Л.: Химия, 1990. – 384 с.
55. Arumuganathar S. Living scaffolds (specialized and unspecialized) for regenerative and therapeutic medicine / S. Arumuganathar, S.N. Jayasinghe // *Biomacromolecules*. – 2008. – Mar; 9 (3). – P. 759-766.
56. Magnetically actuated nanorod arrays as biomimetic cilia / B.A. Evans, A.R. Shields, R.L. Carroll, S. Washburn, M.R. Falvo, R. Superfine // *Nano Lett.* – 2007. – May; 7 (5). – P. 1428-1434.
57. Pressure-assisted cell spinning: a direct protocol for spinning biologically viable cell-bearing fibres and scaffolds / S. Arumuganathar, S. Irvine, J.R. McEwan, S.N. Jayasinghe // *Biomed Mater.* – 2007. – Dec; 2 (4). – P. 211-219.

Интернет-сайты

<http://www.nanonewsnet.ru/> – Сайт о нанотехнологиях в России

<http://www.nanojournal.ru/> – Российский электронный наножурнал

<http://www.nanorf.ru/> – Журнал «Российские нанотехнологии»

<http://www.nanoportal.ru/> – Информационно-аналитический портал по нанотехнологиям и наноматериалам Росатома

<http://www.nanometer.ru/> – Сайт нанотехнологического общества «Нанометр»

<http://www.rusnanotekh.ru/> – Государственная корпорация «Российская корпорация нанотехнологий»

<http://www.cbio.ru/> – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология»

<http://www.edu.ru/> – Российское образование. Федеральный образовательный портал

Учебное издание

**Сыч В.Ф., Дрождина Е.П., Курносова Н.А., Цыганова Н.А.,
Столбовская О.В., Слесарев С.М., Санжапова А.Ф.**

ВВЕДЕНИЕ В НАНОТЕХНОЛОГИИ

**Модуль «Биология»
Элективный курс**

Учебное пособие
для 10-11 классов
средней общеобразовательной школы

Оригинал-макет подготовлен *А.В. Мачкасовой*
Редактор *Г.И. Петрова*
Оформление обложки *Н.В. Пеньковой*

Подписано в печать 21.10.08.
Формат 60х84/16. Усл. печ. л. 5,8.
Тираж 300 экз. Заказ № 93/06-20-10
Цифровая офсетная печать

Оригинал-макет подготовлен в Издательском центре
Ульяновского государственного университета
432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42

Отпечатано в типографии ООО «Колор-Принт»
432063, Россия, г. Ульяновск, ул. Ленина, 75