

## ПРЕДИСЛОВИЕ

*Как пользоваться этим сборником?*

*– Как хорошей энциклопедией, то есть читать с любого места и в любом количестве.*

Сборник состоит из 7 разделов:

1. Химия и наука о материалах
2. Физика наносистем, наноустройства, наноинженерия, альтернативная энергетика
3. Математика и моделирование наноустройств
4. Бионанотехнологии и медицина
5. Конструкционные материалы
6. Викторины, тесты, угадки.
7. Начинающие в нано, игры, творческие задания

В каждом разделе задачи представлены в хронологической последовательности, начиная с 2007 года. Уровень сложности каждой задачи можно оценить не только по ее длине, но и по числу баллов, которое за нее можно было получить на олимпиаде. Кроме баллов указана и категория участников – школьники, студенты, научные сотрудники и т.д. На эту запись мы советуем не обращать особого внимания, так как в задачах для студентов есть много интересных вопросов и для школьников, и наоборот. Не огорчайтесь, если многие задачи покажутся вам сложными. Это только на первый взгляд. Учтите, что основная часть материала была предложена для заочного тура, продолжительность которого иногда достигала месяца. Это давало возможность познакомиться с литературой, покопаться в интернете, посоветоваться с друзьями и учителями. Мы рекомендуем Вам почаще обращаться к сайту [www.nanometer.ru](http://www.nanometer.ru), где можно найти ответы или подсказки ко многим из поставленных вопросов.

Если вы все же не решили задачу полностью, но хотите узнать, в чем там дело, то в конце каждого задания можно найти авторское решение, из которого вы получите ответы на те вопросы, которые остались непонятными. Разумеется, авторское решение не обязано быть единственно возможным, и если вы придумали другое, поделитесь с нами через указанный выше сайт и мы расскажем о вашем решении всем людям, заинтересованным в нанотехнологиях.

Желаем вам приятного чтения и увлекательного интеллектуального труда!

## ОГЛАВЛЕНИЕ

УСЛОВИЯ.....	7
Здоровье дорожке (2008, школьники, разминка) .....	7
Липосомы - фосфолипидные наносистемы для доставки лекарственных соединений и вакцин (2008, школьники, нанобиотехнологии) .....	8
Наноконтакты с живым миром (2008, биология / медицина) .....	13
Бионанопроволока (2008, биология / медицина).....	14
Нановесы (2008, биология / медицина).....	17
Нанодоктор (2008, биология / медицина) .....	18
Обращенные мицеллы – ферментативные нанореакторы (2008, биология / медицина) .....	21
Квантовоточечная раскраска (2008, биология / медицина).....	26
Биологическая нанобатарейка (2009, биология) .....	27
Киборги (2009, биология).....	30
Нанотоксикология (2009, биология).....	31
Напечатанный хомо сапиенс (2009, биология).....	32
Вечная молодость (2009, биология) .....	33
Микроманипулятор (2009, биология).....	34
Микроэнергогенераторы (2009, биология) .....	35
Франкенштейн (2009, биология).....	36
Опять и снова о нанороботах (2009, простые задачи) .....	37
Искусственный глаз (2009, наноинженерия) .....	38
Исследование био-нано-конъюгатов (2009, нанобиотехнология).....	40
A new biosensor for cancer (2009, нанобиотехнология).....	43
Оболочки (2009, нанобиотехнология).....	44
Гигантское комбинационное рассеяние (2009, нанобиотехнология).....	46
Клеточное лежбище (2009, нанобиотехнология) .....	47
Нанотрубочки (2009, нанобиотехнология) .....	48
Protein unfolding (2009, нанобиотехнология).....	49
Пурпурное озеро (2009, нанобиотехнология).....	50
Химера (2010, школьники, биология) .....	51
Куда идешь, путешественник? (2010, школьники, биология) .....	52
Наномашинки (2010, школьники, биология).....	53
Солнечное утро (2010, школьники, биология) .....	54
Маленький и еще меньше (2010, школьники, биология) .....	56

Чеширский кот (2010, школьники, биология) .....	57
Рыбки (2010, школьники, биология) .....	58
Мембрана (2010, школьники, биология).....	59
Штучка (2010, школьники, биология).....	60
Анализ (2010, школьники, биология, повышенной сложности) .....	61
Зеленая слизь (2010, школьники, биология, повышенной сложности) .....	62
Наноконструктор из ДНК (2010, школьники, химия, повышенной сложности) .....	64
Искусственные мышцы (2010, школьники, химия, повышенной сложности).....	66
Супергерои (2010, нанобиотехнологии и медицина).....	68
Магнитные микросферы (2010, нанобиотехнологии и медицина).....	70
Нанодиагностика (2010, нанобиотехнологии и медицина).....	72
Миграция энергии (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	73
Наногеометрия (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	74
Нановизуализация (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	75
Наномедицина – фокус на акромегалию (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	77
Нанотоксичность (2010, нанобиотехнологии и медицина).....	78
Доставка (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	80
Нанокapsулы для доставки лекарств» (2010, нанобиотехнологии и медицина, повышенной сложности) .....	82
Все о ГэКаэР (2010, нанобиотехнологии и медицина, повышенной сложности).....	84
Пептидные нанотрубки (2010, нанохимия и функциональные наноматериалы).....	86
Голливуд спешит на помощь (2010, задачи для начинающих) .....	88
Нанолечение замедленного действия (2010, задачи для начинающих).....	89
Цитотоксичность наноматериалов (2010, школьники, региональный тур).....	91
Очный тур (2010, школьники, биология).....	92
Очный тур (2011, школьники, биология).....	98
<b>РЕШЕНИЯ</b> .....	108
Здоровье дорожке (2008, школьники, разминка) .....	108
Липосомы - фосфолипидные наносистемы для доставки лекарственных соединений и вакцин (2008, школьники, нанобиотехнологии) .....	112
Наноконтакты с живым миром (2008, биология / медицина) .....	120
Бионанопроволока (2008, биология / медицина).....	138
Нановесы (2008, биология / медицина) .....	151
Нанодоктор (2008, биология / медицина) .....	157

Обращенные мицеллы – ферментативные нанореакторы (2008, биология / медицина)	187
Квантовоточечная раскраска (2008, биология / медицина)	197
Биологическая нанобатарейка (2009, биология)	209
Киборги (2009, биология)	212
Нанотоксикология (2009, биология)	216
Напечатанный хомо сапиенс (2009, биология)	220
Микроманипулятор (2009, биология)	222
Микроэнергогенераторы (2009, биология)	224
Франкенштейн (2009, биология)	225
Опять и снова о нанороботах (2009, простые задачи)	228
Искусственный глаз (2009, наноинженерия)	230
Исследование био-нано-конъюгатов (2009, нанобиотехнология)	232
A new biosensor for cancer (2009, нанобиотехнология)	237
Оболочки (2009, нанобиотехнология)	240
Гигантское комбинационное рассеяние (2009, нанобиотехнология)	248
Клеточное лежбище (2009, нанобиотехнология)	251
Нанотрубочки (2009, нанобиотехнология)	252
Protein unfolding (2009, нанобиотехнология)	253
Химера (2010, школьники, биология)	255
Куда идешь, путешественник? (2010, школьники, биология)	258
Наномашинки (2010, школьники, биология)	260
Солнечное утро (2010, школьники, биология)	261
Маленький и еще меньше (2010, школьники, биология)	263
Чеширский кот (2010, школьники, биология)	264
Рыбки (2010, школьники, биология)	266
Мембрана (2010, школьники, биология)	268
Штучка (2010, школьники, биология)	270
Анализ (2010, школьники, биология, повышенной сложности)	272
Зеленая слизь (2010, школьники, биология, повышенной сложности)	273
Наноконструктор из ДНК (2010, школьники, химия, повышенной сложности)	277
Искусственные мышцы (2010, школьники, химия, повышенной сложности)	280
Супергерои (2010, нанобиотехнологии и медицина)	283
Нанодиагностика (2010, нанобиотехнологии и медицина)	286
Миграция энергии (2010, нанобиотехнологии и медицина)	289

Наногеометрия (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	290
Нановизуализация (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	292
Наномедицина – фокус на акромегалию (2010, нанобиотехнологии и медицина) .....	294
Нанотоксичность (2010, нанобиотехнологии и медицина).....	296
Нанокапсулы для доставки лекарств» (2010, нанобиотехнологии и медицина, повышенной сложности) .....	298
Пептидные нанотрубки (2010, нанохимия и функциональные наноматериалы).....	302
Нанолечение замедленного действия (2010, задачи для начинающих).....	306

## УСЛОВИЯ

### Здоровье дорожке (2008, школьники, разминка)

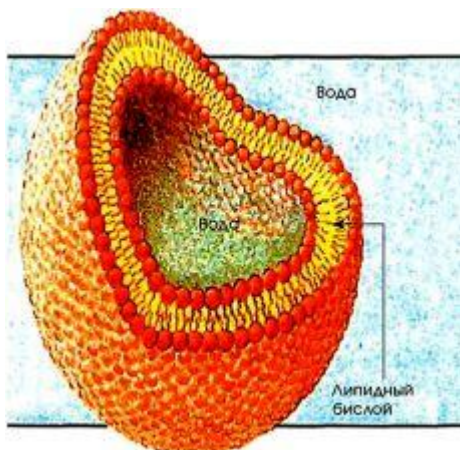
В ряде марок сигарет стали применять «наночилтры».

1. Что это такое? (1 балл)
2. Спасут ли они курильщика от рака легких и прочих неприятностей, и почему? (2 балла)

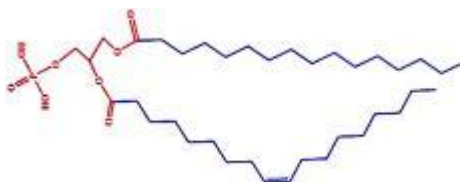
Спасет ли «наночилтр» тонкой очистки воды от:

3. бактерий, (1 балл)
4. вирусов (1 балл),
5. тяжелых и радиоактивных металлов (объясните Ваш ответ)? (2 балла)

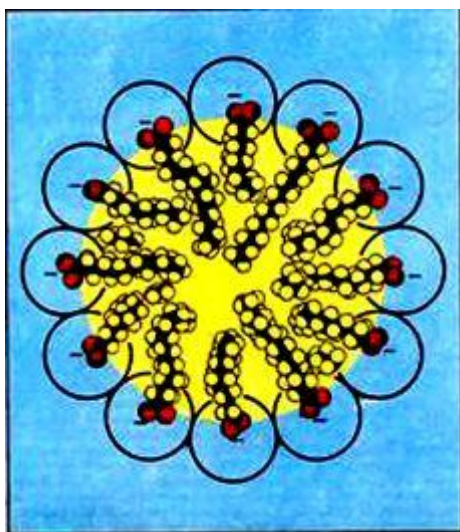
**Липосомы - фосфолипидные наносистемы для доставки лекарственных соединений и вакцин (2008, школьники, нанобиотехнологии)**



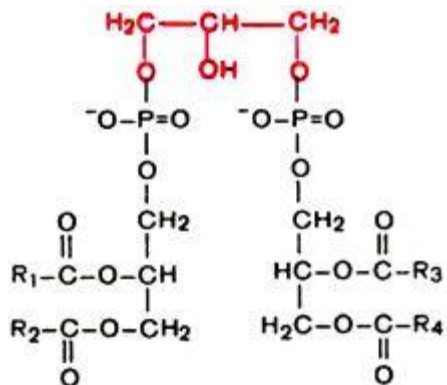
*Рис. 1. Строение фосфолипидной липосомы*



*Рис. 2. Строение одного из глицерофосфолипидов – фосфатидовой кислоты*



*Рис. 3. Строение мицеллы*



*Рис. 4. Структура кардиолипина*

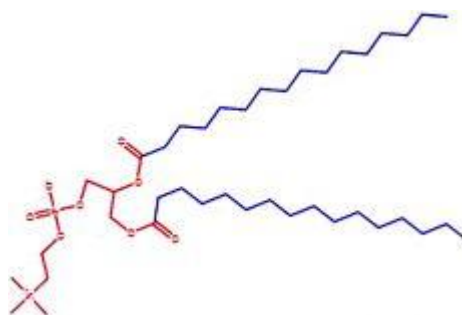


Рис. 5. (а) Химическая структура фосфатидилхолина

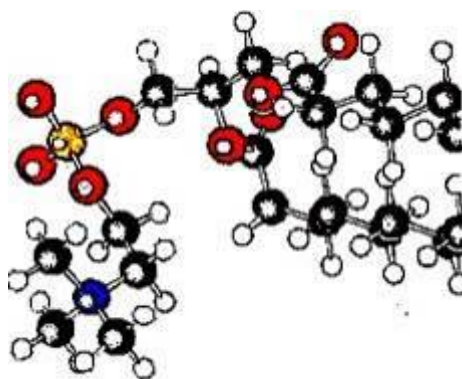


Рис. 5. (б) пространственная структура «головы» фосфатидилхолина

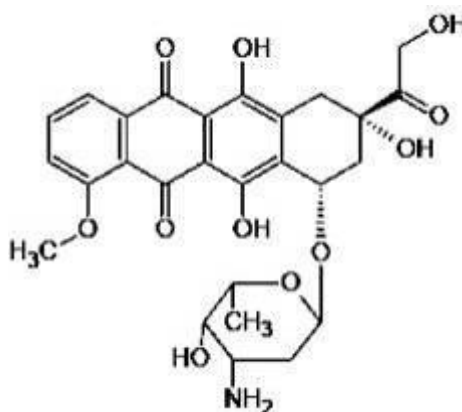


Рис. 6. Химическая структура доксорубина

Многие лекарственные средства нового поколения снабжены системами доставки, обеспечивающими постепенное поступление лекарственных веществ в определенные органы и клетки-мишени, а также улучшение фармакологических свойств препарата. Много внимания уделяется **фосфолипидным наночастицам–липосомам** – как переносчикам лекарственных средств, **эффективность** действия которых обеспечивается не только их биологическими свойствами, но и **наноразмерами**.

Липосому можно представить себе как сферу с толстой стенкой (рис. 1), внутри и снаружи которой находится водный раствор. Диаметр «одностенных» липосом составляет обычно от 20 до нескольких сотен нанометров. Стенка липосомы представляет собой так называемый **липидный бислои**, состоящий чаще всего из фосфолипидов (сложных эфиров глицерина или сфингозина, фосфорной кислоты и жирных кислот).



Глицерофосфолипиды являются обязательным компонентом большинства мембран животных, растительных и бактериальных клеток. В молекуле фосфолипида можно выделить две большие части – растворимую в воде гидрофильную «голову» и нерастворимый в воде гидрофобный «хвост» (на рис. 2 выделены красным и синим цветом соответственно). Мембраны, состоящие только из фосфолипидов, будут сильно неполярными и гидрофобными внутри «стенки» и полярными на внешней и внутренней сторонах «стенки».

1. Сколько энергии требуется для поддержания структуры липидного бислоя, состоящего из фосфатидовой кислоты? Объясните свое предположение. (3 балла)

Все молекулы липидов, у которых есть гидрофильная голова и гидрофобный хвост, могут образовать в водной среде два различных типа структур – липосомы (рис. 1) или мицеллы (рис. 3). Тип получающейся структуры зависит от соотношения размеров «головы» и «хвоста» – если «голова» по диаметру больше, чем «хвост», то образуются мицеллы, а если «голова» и «хвост» сравнимы, или даже «хвост» толще «головы», то формируются липосомы.

2. Какие структуры (мицеллы или липосомы) будут формировать в водном окружении: (2 балла)

а) поверхностно активное вещество додецилсульфат натрия  $C_{12}H_{25}SO_3Na$

б) фосфолипид кардиолипин (рис. 4)?

3. Оцените с точностью  $\pm 0.3$  нм толщину липидного бислоя, состоящего из фосфатидилхолина (1,2-дипальмитоил-sn-глицерофосфохолина) (рис. 5) с учетом длины связи  $CH_2-CH_2$   $1.53 \text{ \AA}$  и валентного угла  $110^\circ$  (линейный размер «головы» можно принять равным  $8 \text{ \AA}$ ). Приведите свои расчеты. (2 балла)

Известно, что липидный бислой – это подвижная текучая структура, в которой происходит броуновское движение молекул липидов. Современные методы исследования позволяют следить за движением единичных молекул липидов в бислое.

4. Допустим, вам удалось «пометить» одну молекулу липида и вы следите за ней с помощью специального микроскопа. Какое перемещение этой молекулы липида в липидном бислое будет происходить часто, а какое редко?

а) вдоль одного из монослоев

б) из одного монослоя в другой?

Объясните, почему. (2 балла)

Липиды обладают разнообразным строением, и глицерофосфолипиды – лишь один из примеров. В состав гидрофильной головы могут входить другие спирты (не только глицерин), остаток фосфорной кислоты может быть этерифицирован различными

соединениями, в некоторых липидах вообще нет фосфорной кислоты. Поэтому в зависимости от строения гидрофильная голова липида может быть заряжена положительно или отрицательно, а также незаряжена.

5. Из каких липидов (положительно заряженных, отрицательно заряженных или неионных) должна состоять липосома, чтобы лучше связывать во внутренней области

а) ДНК

б) небольшой белок инсулин, растворенный в буфере: (i) с рН 4.5 или (ii) рН 7.0.

Изоэлектрическая точка инсулина (значение рН раствора, при котором общий заряд молекулы равен нулю) равна 5.4 (2 балла).

6. Зачем нужны липосомы при доставке в клетку таких веществ, как ДНК и белки, а также лекарств, например доксорубин (противораковый препарат, рис. 6)?

Варианты ответов:

а) токсичное вещество

б) легко разрушается в организме ферментами

в) узнается системой выведения и быстро выводится из организма

г) вызывает иммунный ответ

д) вызывает аллергию

е) не проникает в клетки из-за большого размера

ж) не проникает в клетки, потому что имеет заряд

з) не растворяется в воде

Для каждого вещества приведите подходящие варианты ответов (их может быть больше одного). (2 балла)

7. Предложите 2 метода изучения размеров липосомных частиц. (2 балла)

Время пребывания обычных липосом в кровотоке невелико (от нескольких минут до нескольких часов). На липосомах легко сорбируются белки плазмы крови, после чего липосомы "заглатываются" макрофагами, которые их разрушают и выводят из организма. Решение проблемы преодоления естественных барьеров для липосом в организме оказалось довольно неожиданным и достаточно простым. Известно, что в состав липосомы могут входить разные липиды. Выяснилось, что клетки, вылавливающие липосомы из крови, можно обмануть, сделав поверхность липосом сильно гидрофильной и как бы недоступной, можно даже сказать невидимой, с помощью добавки липидов, к «голове» которых присоединен гидрофильный полимер (массой от 1000 до 6000 а.е.м.) довольно простого состава. В результате время жизни липосом в кровотоке превысило двое суток. Необычные свойства таких липосом и их высокая терапевтическая

эффективность настолько поразили исследователей, что эти липосомы получили образное название "липосомы-невидимки" (stealth liposomes) аналогично известному самолету-невидимке "стелс", который не удастся обнаружить с помощью радарных устройств.

8. Какие молекулы должны входить в состав липидного бислоя лекарственных липосом (*1 балл*), чтобы

а) их не замечала система выведения

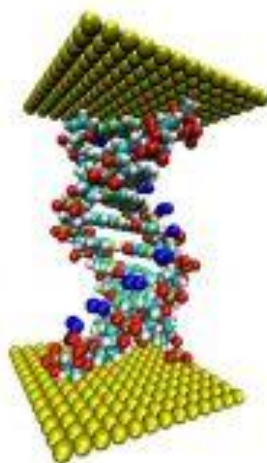
б) они направлялись в определенный тип клеток

в) они сливались с клеточной мембраной? Что у них должно быть внутри? (*1 балл*)

### **Наноконтакты с живым миром (2008, биология / медицина)**

В последнее время много говорят о наномедицине, нанотоксикологии, нанопатологии. Все эти области науки (или явления), тем не менее, все еще подлежат глубокому и тщательному анализу (в том числе и для того, чтобы не вызвать необоснованных нанофобий). В этой задаче необходимо ответить на ряд вопросов, которые связаны с процессами взаимодействия наночастиц с живыми клетками, что может привести как к положительным, так и отрицательным последствиям, и что еще долго предстоит исследовать биологам, медикам, биохимикам и нарождающимся российским «бионанотехнологам».

1. Может ли фуллерен ( $C_{60}$ ) (диаметр – 0.7 нм) или углеродная нанотрубка (диаметр – 0.4 нм, длина 10 нм) проникнуть в клетку (тканей млекопитающих) через калиевые каналы? Обоснуйте свой ответ. (2 балла)
2. Какой приблизительный минимальный размер может быть у сфер (капсул) из следующих биомакромолекул: фосфолипидов (~1 кДа), мономера инсулина (5.5 кДа), сывороточного альбумина (67 кДа), коллагена (300 кДа) и целлюлозы (500 – 2000 кДа). (2 балла) Какими физическими и химическими свойствами будут обладать эти наночастицы? (2 балла) Какие из этих наночастиц можно использовать для доставки лекарственных веществ? (2 балла) Каким образом можно связать лекарственные вещества с перечисленными наночастицами? (2 балла)
3. Каковы возможные механизмы проникновения в клетку (ткани млекопитающих) и утилизации наночастиц (от 10 до 100 нм) в клетках млекопитающих? (5 баллов)
4. Предположите механизм, с помощью которого НАД-зависимая гидрогеназа сможет восстанавливать  $НАД^+$  и синтезировать газообразный водород посредством связанной с ней полупроводниковой наночастицы CdS или  $TiO_2$ ? (3 балла)



Что-то отдаленно похожее на объект обсуждения задачи...

Таблица из задачи

Фермент	Результат воздействия на ДНК
ДНК-рестриктаза	Разрезание ДНК-цепочки с образованием «липких» одноцепочечных концов (булджованных структур) концов
ДНК-лигаза	Ковалентное сшивание концов в ДНК-цепочку
ДНК-полимераза	1) наращивание комплементарной ДНК-цепки по одноцепочечной ДНК в направлении 5'→3', начиная с некоторого «липкого» присоединяемого олигонуклеотида (прайма) 2) гидролиз фосфоэфирной связи в неспаренных участках ДНК с 3'-конца или гидролиз фосфоэфирной связи в одной цепи спаренного участка ДНК, начиная с 3'-конца
Деганцарь/экзонуклеаза	1) удаление нуклеотидов одновременно с 2-х концов двуцепочечной ДНК. 2) разрушение одноцепочечных участков ДНК

Вполне вероятно, что разрабатываемые наноустройства будут иметь наноразмерные электронные компоненты. В таком случае не обойтись без тонких проводящих контактов между ними – нанопроволок. Один из подходов к их созданию – из арсенала молекулярной биологии, основан на идее использования в качестве проводника молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Напомним основные сведения о ДНК. Это органический полимер, составленный из 4 типов нуклеотидных мономеров – монофосфорных эфиров соединений азотистых оснований с 2-дезоксид-рибозой. Нуклеотиды связаны в цепь фосфодиэфирной связью, соединяющей 5'-фосфат одного нуклеотида и 3'-гидрофильную группу дезоксирибозы следующего. По этой причине возникает полярность ДНК-цепи: на 5'-конце находится фосфатная группа, а на 3'-конце - ОН-группа, соединенная с 3'-атомом углерода дезоксирибозы. Различные азотистые основания дают начало следующим нуклеотидам: (дезокс)аденозин(фосфату) - А, (дезокс)тимидин(фосфату) - Т,

(дезоксигуанозин(фосфату) – Г, (дезоксидитидин(фосфату) – Ц. Нуклеотиды пар А-Т и Г-Ц комплементарны друг другу, т.е. именно между ними образуются наиболее прочные водородные связи, две между А и Т, три между Г и Ц. Комплементарное взаимодействие приводит к тому, что в большинстве случаев нативная ДНК присутствует в виде правозакрученной двойной спирали из комплементарных друг другу антипараллельных (антиполярных) нуклеотидных цепей (В-форма).

Что же может служить источником достаточно длинных нитей ДНК? Один из уже применяемых вариантов предполагает использование ДНК бактериофага (вируса)  $\lambda$ , инфицирующего кишечную палочку *E.coli*. Двухцепочечная ДНК  $\lambda$ -фага составлена из 48502 пар нуклеотидов (п.н.) с одноцепочечными комплементарными «липкими» концами длиной по 12 п.н.

1. а) Какова длина молекулы ДНК  $\lambda$ -фага в мкм? (1 балл)
- б) Обсудите перспективы использования в качестве ДНК-источника сельскохозяйственных растительных культур, скажем, семейства бобовых. (2 балла)

Применение ДНК как проводника предполагает возможность соединять с ее помощью участки схем нанoeлектроники.

2. а) Какую форму принимает вирусная ДНК в растворе или цитоплазме *E.coli*? (1 балл)
- б) Предложите способ «выпрямления» ДНК и ее иммобилизации на поверхности стекла. Указание: используйте возможность функционализации стеклянной поверхности. (2 балла)

В идеале ДНК-провод должен соединять любые удаленные друг от друга участки нанoeлектронной схемы, т.е. мы должны научиться получать ДНК-цепи различной длины. Традиционно для гибридизации (изменения нуклеотидного состава) ДНК применяют методы генной инженерии. Ниже перечислены некоторые характерные ферменты, используемые в генной инженерии, и результат их воздействия на ДНК.

Фермент; Результат воздействия на ДНК

ДНК-рестриктаза; Разрезание ДНК-спирали с образованием «липких» одноцепочечных или двухцепочечных «тупых» концов

ДНК-лигаза; Ковалентное связывание нуклеотидов в ДНК-цепочку

ДНК-полимераза; 1) наращивание комплементарной ДНК-цепи на одноцепочечной ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ , начиная с некоторого специально присоединенного олигонуклеотида (праймера)

2) гидролиз фосфодиэфирной связи в неспаренных участках ДНК с 3'-конца, или гидролиз фосфодиэфирной связи в одной цепи спаренного участка ДНК, начиная с 5'-конца.

Дезоксирибонуклеаза; 1) удаление нуклеотидов одновременно с 2-х концов двухцепочечной ДНК, 2) разрушение одноцепочечных участков ДНК

3. а) Предложите схему увеличения длины ДНК с использованием методов генной инженерии или без использования таковых. (3 балла)

б) Рассмотрите влияние таких факторов, как концентрация ДНК, температура и pH раствора на выход длинных молекул в вашей схеме. (2 балла)

К сожалению, проводимость ДНК крайне низка. Для улучшения электропроводности необходимо «металлизировать» молекулу, т.е. осадить на ДНК-цепь наночастицы металла. Этот процесс выглядит следующим образом: вначале ДНК обрабатывают раствором соли соответствующего металла, а затем добавляют сильный восстановитель, как правило, на основе боргидридов (например,  $\text{Na}[\text{BH}_4]$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$ ). Известно, что в случае солей некоторых металлов (Pd, Pt) удается покрыть ДНК-спираль слоем наночастиц металла с размером менее 5 нм, в то время, как в случае других металлов (например, Cu) получить металлизированную ДНК-проволоку подобным способом крайне сложно.

4. а) Опишите химические процессы, происходящие при взаимодействии препарата цисплатина (цис-диамминдихлороплатины (II) –  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ) с ДНК и последующим восстановлением боргидридом натрия. (3 балла)

б) В чем причина неуспеха осаждения меди на ДНК подобным способом? (2 балла)

в) А как все же получить медную ДНК-нанопроволоку? (2 балла)

## Нановесы (2008, биология / медицина)

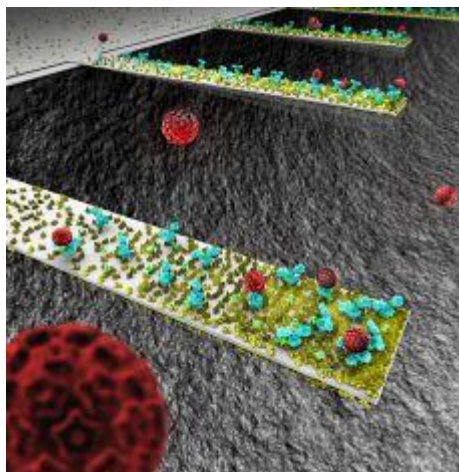


Рис.1. Захват весами-кантилеверами биологических объектов (схема)

Недавно учеными из Университета Пэрдью (США), была разработана технология формирования биосенсоров, использующих принцип нановесов на основе кремниевых кантилеверов (гибких консолей сверхмалых размеров), покрытых антителами для детектирования биологических объектов, экспонирующих специфичные для данных антител антигены. Суть работы устройства, как и других аналогичных типов нановесов, заключалась в изменении резонансной частоты колебания кантилевера при связывании нанесенными на кантилевер антителами специфичного антигена. Размеры такого кантилевера составляют всего  $2000 \times 300 \times 50$  мкм, что позволяет размещать десятки или даже сотни подобных сенсоров, идентифицирующих различные биомолекулы по массе на одном микрочипе. Дальнейшее совершенствование технологии заключалось в создании поверхностного слоя пористого кремния на одной из сторон кантилевера, что позволило увеличить эффективную площадь рабочей поверхности до  $0,1 \text{ м}^2$ .

1. Оцените возможности обнаружения белка с молекулярной массой 1000 кДа с помощью предложенной модели нановесов, а также сравните пределы обнаружений и диапазоны измерений «исходной» и усовершенствованной модели, если площадь, занимаемая одним антигеном, составляет  $50 \text{ нм}^2$ . (5 баллов)
2. Введите необходимые Вам для расчета допущения сами. Предложите способы дальнейшего улучшения конструкции нановесов для детектирования биомолекул. (3 балла)
3. Опишите метод формирования таких кантилеверов. (2 балла)



## **Нанодоктор (2008, биология / медицина)**

Вы - медицинский нанотехнолог. В Вашу лабораторию направляют больного с подозрением на рак желудка. **Необходимо:**

### Уточнить диагноз:

1. Определить локализацию опухоли, ее размер
2. Степень ее кровоснабжения
3. Выявить метастазы, их размеры и степень кровоснабжения

### Провести комплексное лечение с использованием:

1. Высокотоксичных для организма химиопрепаратов
2. Быстро разрушающихся в организме биопрепаратов и клеток:
  - 1.1 провести энзимотерапию
  - 1.2 провести иммунотерапию
  - 1.3 провести генную терапию
  - 1.4 провести клеточную терапию
3. Физических методов лечения:
  - 1.1 точечной гипертермии
  - 1.2 точечной фотодинамической терапии

### В лаборатории имеются:

#### 1) Различные типы наночастиц:

- наночастицы оксида железа
- квантовые точки
- полимерные наночастицы
- наночастицы золота, интенсивно поглощающие и рассеивающие свет
- дендримеры

#### 2) Нанопористые полупроницаемые микрочастицы

#### 3) Высокотоксичные химиопрепараты

#### 4) Быстро разрушающиеся биопрепараты:

- онколитические ферменты
- моноклональные антитела
- антисмысловые олигонуклеотиды
- плазмиды (внехромосомные ДНК), кодирующие онколитические гены
- клетки, выделяющие онколитические вещества

#### 5) Фотосенсибилизаторы (фототоксичные вещества, при воздействии света вызывающие образование активных форм кислорода)

#### 6) Внутрижелудочный зонд с видеокамерой и источником света

## 7) Магнитно-резонансный томограф

1. Для ранней диагностики и успешного лечения, составьте из всех имеющихся элементов 3 рациональные многофункциональные наносомальные платформы и, для переубеждения приехавшей с больным бригады хирургов, порывающихся все вырезать, и химиотерапевтов с капельницами наготове, подробно опишите принцип их действия, дополнив схематическими рисунками. (25 баллов)

(Подсказка - используйте принцип троянского коня)

Впервые в мире вылечив больного со злокачественной опухолью без хирургического вмешательства, вы потрясли научный и ненаучный мир.

2. В качестве эксперта по наносомальной диагностике и терапии, вас приглашают на закрытое заседание Совета директоров фармацевтической корпорации-гиганта.

Вы должны четко ответить на следующие вопросы:

- 1) Что, эти ваши наночастицы, транспортирующие вещества, не распознаются в организме как инородные тела и не разрушаются? (3 балла)
- 2) Почему наносомальная диагностика и терапия эффективней традиционных? (2 балла)
  - 2.1 Почему создание наносомальных форм существующих лекарств дешевле синтеза новых препаратов? (2 балла)
- 3) С какой стати нам отказываться от сверхприбыли продаж существующих препаратов? (2 балла)
- 4) Почему существующие патенты не защитят наши препараты? (1 балл)

Едва вы успели отдышаться от зловонного дыма сигар акул фармбизнеса и отойти от их перекрестных вопросов, как вас снова вызывают. Но уже в кардиореанимацию.

«Ну и денек», - думаете вы по приезду.

Вас встречает консилиум именитых кардиохирургов и не менее именитых адвокатов.

"Наш клиент требует самого совершенного лечения", - с ходу заявляет вам один из адвокатов. "И немедленно" - требовательно добавляет второй.

"Что, какой клиент?" - неудомаеваете вы и после разъяснений громко рассмеиваетесь.

Оказывается, самый толстый воротила фарминдустрии, прикинув после вашего вопроса что к чему в новом мире нанотехнологий, скулив все сигары в офисе, попал в реанимацию с инфарктом.

Введя в вас в курс дела, кардиохирурги и адвокаты продолжили громко спорить. Хирурги предлагают провести такому дорогому пациенту клеточную терапию для восстановления поврежденного сердца, а также ТЕНировать забитые холестерином сосуды бизнесмена.

"Ваша терапия стволовыми клетками неэффективна, а стенты опять забиваются через пять лет!" - возражают подкованные адвокаты. "Наш клиент не пожалеет никаких денег, будьте уверены. Что у вас есть новенького?"

Вы предлагаете:

- 1) Ввести стволовые клетки, но **на нановолокнистой матрице**
- 2) Установить стенты, но с **нанопористым покрытием и датчиками давления**
3. Объясните корифеям кардиохирургии и опытным адвокатам от медицины:
  - 1) Почему нановолокнистые матрицы повышают эффективность клеточной терапии? (2 балла)
  - 2) Каким образом нанопористые стенты предотвращают повторное забивание стентированных сосудов? (2 балла)
  - 3) Как работают датчики давления в ваших стентах? (2 балла)

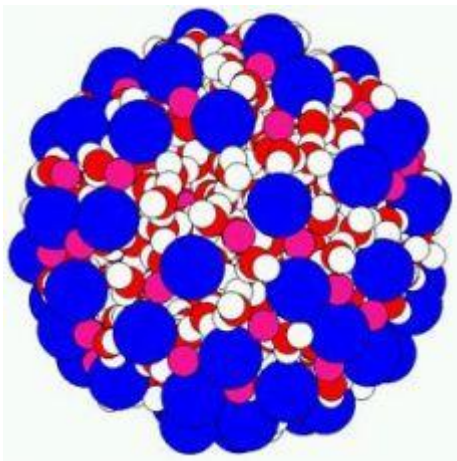


Рис. 1. Обращенная мицелла.

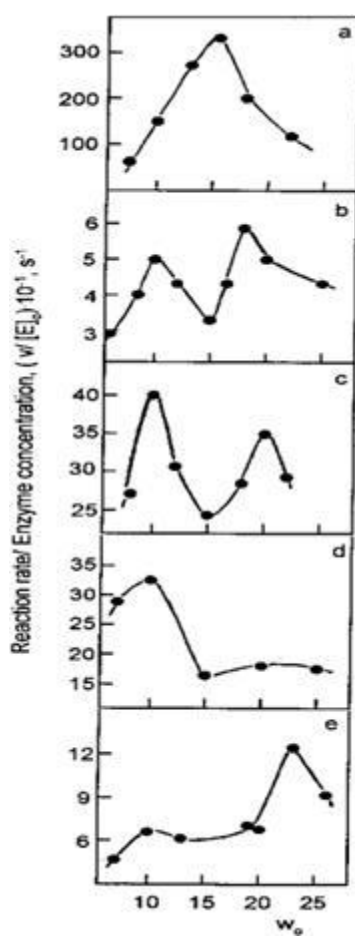


Рис. 2. Типы зависимости каталитической активности ферментов от степени гидратации обращенных мицелл.



*Диаграмма состояния вода-масло-ПАВ*

В последние годы все большее применение как среда для ферментативных реакций находят системы гидратированных обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в неполярных органических растворителях. Обращенные мицеллы можно рассматривать как реакторы нанометрового размера, в каждом из которых на одну мицеллу приходится одна молекула фермента.

1. Приведите схематически строение обращенной мицеллы, обозначая полярную голову ПАВ кружочком, а неполярный «хвост» волнистой линией. (1 балл)

Системы с органическими растворителями находят широкое применение для проведения реакций, которые невозможно осуществить в воде в силу неблагоприятного положения равновесия. Примером может служить синтез дипептидов, состоящих из остатков аминокислот с неполярными боковыми группами. Такой синтез может быть проведен с высоким выходом в двухфазных системах «вода – несмешивающийся с водой органический растворитель», однако для этого могут потребоваться недели и даже месяцы.

2. Из приведенных ниже вариантов ответа выберите один, который отражает главную причину столь низкой скорости ферментативной реакции в двухфазной системе. (1 балл)

- А) Недостаточно высокая температура реакционной среды
- Б) Низкая растворимость аминокислот в среде
- В) Высокая растворимость дипептида в неполярном растворителе
- Г) Низкая скорость массопереноса через поверхность раздела фаз
- Д) Инактивация фермента в процессе реакции
- Е) Частичное распределение органического растворителя в воду.

3. Из дипептидов Ala-Ala, Val-Val, Ile-Ile выберите тот, для которого выход при ферментативном синтезе из соответствующих аминокислот в двухфазной системе окажется наибольшим. (2 балла)

Переход от двухфазных систем к нанореакторам - обращенным мицеллам - позволяет существенно повысить скорость ферментативных реакций.

Было установлено, что ферменты проявляют максимальную каталитическую активность, когда их размеры (диаметр для глобулярного фермента и большая ось для эллиптического фермента) совпадают с диаметром внутренней полости обращенной мицеллы (см. примеры на рис. 2).

Размер мицеллы можно контролировать, изменяя соотношение ПАВ и воды в системе. Обычно для этих целей варьируют содержание воды в системе, поддерживая концентрацию ПАВ постоянной. Соответствующий параметр называется степенью гидратации мицеллы ( $w_0$ ) и задается как отношение молярных концентраций воды и ПАВ в системе:

$$w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] \quad (1)$$

Радиус мицеллы ( $R_m$ , Ангстремы) связан со степенью гидратации следующим соотношением:

$$R_m = 1,64 w_0 \quad (2)$$

4. Рассчитайте оптимальную степень гидратации для:

А) тетрамера, построенного из одинаковых сферических субъединиц фермента (диаметр = 10 нм), при планарной укладке субъединиц (все субъединицы касаются двух и только двух соседних субъединиц); (2 балла)

Б) тримера, построенного из одинаковых сферических субъединиц фермента (диаметр = 10 нм), если каждая из субъединиц касается двух соседей; (2 балла)

В) димера, построенного из двух одинаковых эллиптических субъединиц (длины осей = 8 и 12 нм), расположенных таким образом, что субъединицы упакованы наиболее плотно. (2 балла)

Ферменты имеют различную поверхность, которая определяет их локализацию в мицелле. Гидрофильные ферменты (I) локализуются во внутренней водной полости мицеллы; ферменты, содержащие длинноцепочечные неполярные заместители (II) могут встраиваться в слой поверхностно-активного вещества, а ферменты с протяженными гидрофобными областями на поверхности (III) даже могут частично вступать в контакт с неполярными растворителем.

5. В систему обращенных мицелл, построенных из анионного ПАВ внесли некоторое количество:

А) неионного ПАВ;

Б) мочевины;

В) маннита

Для каждого из веществ А)-В) укажите, на какой преимущественно тип ферментов (I, II или III) оно будет оказывать наибольшее влияние и почему (2 балла).

Многие лекарственные средства являются ферментами. Зачастую их надо доставить внутрь клетки, для чего необходимо преодолеть плазматическую мембрану. Обратные мицеллы оказались очень удобной тест-системой на мембранотропность ферментов. Индивидуальные мицеллы находятся в постоянном хаотическом движении и сталкиваются друг с другом. При этом поверхностно-активные ферменты (II) на некоторое время теряют оптимальное окружение из молекул ПАВ, что снижает их каталитическую активность, а ферменты типа I к таким столкновениям нечувствительны. Чем чаще происходят столкновения мицелл, тем более выражен процесс снижения каталитической активности ферментами типа II и тем ниже измеряемая скорость ферментативной реакции. В первом приближении значение каталитической константы ферментативной реакции обратно пропорционально степени гидратации обратных мицелл.

б. А. Изобразите схематически зависимость величины, обратной каталитической константе, для фермента типа II от концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации и укажите на графике предельно максимальное значение каталитической константы. (2 балла)

Б. Сколько мицелл и сколько молекул фермента будет присутствовать в такой идеальной системе (в которой фермент типа II будет проявлять наивысшую каталитическую активность). (2 балла)

В связи с возможностью включения одной молекулы фермента в один «нанореактор» системы обратных мицелл весьма привлекательны для стабилизации ферментов путем введения дополнительных сшивок функциональных групп, присутствующих на поверхности белка. Для этих целей используются бифункциональные реагенты. Если такой процесс происходит в гомогенной системе, существует опасность возникновения межбелковых сшивок, а в системе обратных мицелл такая побочная реакция просто невозможна.

7. Для введения сшивок часто используют глутаровый диальдегид. Исходя из предположения, что на поверхности некоторого фермента присутствуют боковые группы всех гидрофильных аминокислот:

А) укажите, остатки каких аминокислот являются наиболее вероятной мишенью для взаимодействия с глутаровым диальдегидом; (1 балл)

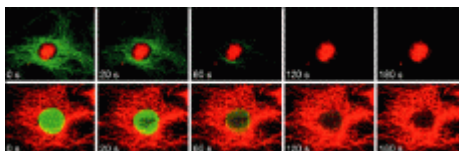
Б) запишите уравнения соответствующих реакций. (2 балла)

Обычно степень заполнения мицелл ферментом составляет порядка 1 % (то есть из 100 мицелл только одна содержит фермент, а остальные мицеллы – пустые). Это позволяет делить олигомерные белки на субъединицы в мягких условиях, просто снижая степень гидратации мицелл (то есть размер мицелл при этом уменьшается и в какой-то момент субъединицы «расходятся» по разным мицеллам).

8. Изобразите схематически график зависимости скорости ферментативной реакции от степени гидратации (в широком диапазоне степеней гидратации) для гетеродимерного фермента, обе субъединицы которого являются сферическими (диаметры субъединиц 7,4 и 12,8 нм) и также проявляют каталитическую активность, поясните Ваш график. (3 балла)



## Квантовоточечная раскраска (2008, биология / медицина)



*Рисунок к задаче.*

Ниже в сравнении показана фотостабильность полупроводниковых квантовых точек и традиционного флуоресцентного красителя Alexa 488, используемых для анализа биологических объектов. В то время как сигнал от метки Alexa 488 быстро затухает и перестает быть детектируемым уже после пары минут, сигнал от квантовых точек QD630 не изменяется на протяжении всего трехминутного периода наблюдения.

1. Какие части клетки маркированы квантовыми точками? (2 балла) Почему возникает свечение квантовых точек? (2 балла)
2. Предложите экспериментальную установку для получения квантовых точек и переносу их для маркировки в части клетки, показанных на рисунке внизу, объяснив, почему Вы все сделали именно так. (5 баллов) Это просто клеточная культура, а не живой пациент или лабораторное животное! У Вас полная свобода действий – Вы можете выбрать материал для квантовых точек, метод получения, метод конъюгации с биомолекулами, однако объясните на каждом шаге Ваш выбор.
3. Каким образом Вы могли бы использовать два типа квантовых точек (например, с различными размерами) для одновременной маркировки различных «мишеней» в клетке? (3 балла)
4. Почему это будет возможно, если квантовые точки просто имеют различный размер? (1 балл)
5. Почему такую маркировку нескольких «мишеней» сразу нельзя произвести с использованием обычных флуоресцентных красителей? (1 балл)

## Биологическая нанобатарея (2009, биология)

Фотосинтез – это процесс преобразования световой энергии Солнца в химическую энергию тканей фотосинтезирующих организмов. Источником углерода для построения молекул органических соединений служит углекислота атмосферы.

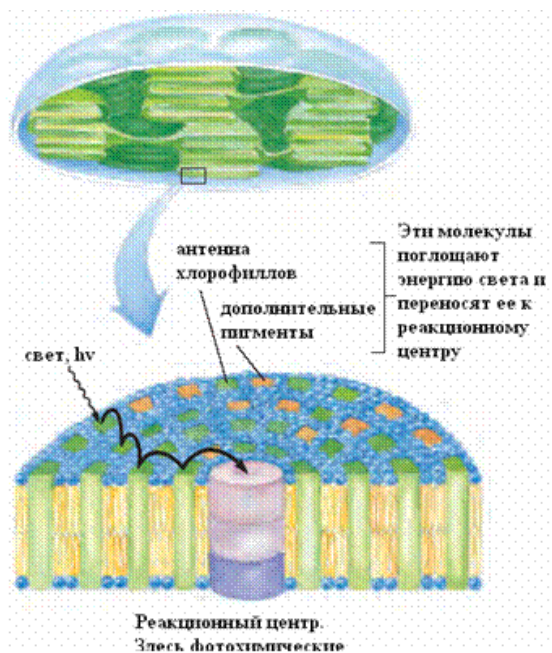
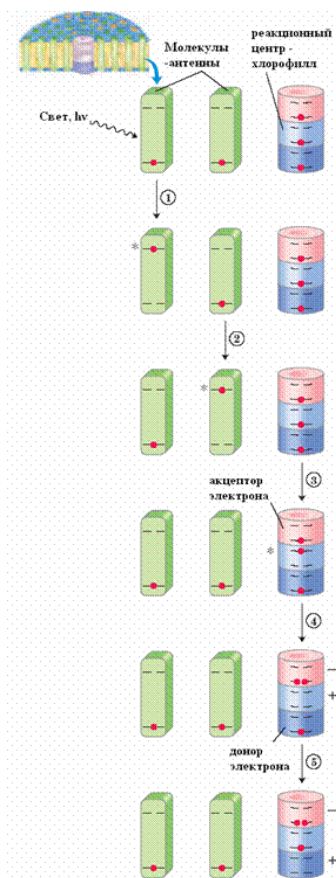


Рис.1. Организация фотосистемы в мембране



*Рис.2. Общая схема превращения энергии порожденного фотона в разделение зарядов на реакционном центре*

1. Запишите суммарное уравнение химических реакций, протекающих при фотосинтезе. (2 балла)
2. а) В какой области спектра (укажите диапазон длин волн в нанометрах) поглощают свет молекулы хлорофилла, если мы их видим зелеными? (1 балл)  
б) Оцените энергию поглощенного хлорофиллом моля квантов света в джоулях (приведите расчеты). (3 балла)

Несмотря на простое суммарное уравнение, механизм фотосинтеза невероятно сложен. Весь процесс фотосинтеза может быть разделен на две стадии: световую и темновую.

В первичной (световой) энергия поглощенных квантов света ( $h\nu$ ) используется в окислительно-восстановительной реакции для разрыва химических связей восстановителя (в случае высших растений для фотолиза воды), и часть энергии, в конечном счете, запасается в новых химических связях. В последующей (темновой) стадии фотосинтеза запасенная энергия используется в другой окислительно-восстановительной реакции для восстановления углекислоты до сахаров.

3. Объясните, почему природе пришлось организовать две системы фотосинтеза, ФС1 и ФС2? (3 балла)
4. Суммарное увеличение свободной энергии при фотосинтезе у растений составляет примерно 120 ккал/моль кислорода. Каждый поглощенный фотон теоретически может привести к переносу одного электрона.

Сколько квантов поглощенного хлорофиллом света нужно затратить на образование молекулы кислорода, если максимальная эффективность преобразования энергии красного света – около 50%? (2 балла)

Разберем световую стадию фотосинтеза подробнее. Первичные процессы фотосинтеза (ППФ) включают несколько этапов:

I. поглощение света хлорофиллом и миграцию энергии поглощенных квантов к реакционным центрам (РЦ) фотосистем (рис.1)

Весь комплекс ППФ осуществляется во внутренних мембранах хлоропластов, содержащих хлорофилл. Для эффективного поглощения энергии квантов света молекулы хлорофилла сгруппированы по несколько сотен, образуя специальные «антенные» комплексы. Мембраны состоят из двух слоев молекул липидов (липидный бислой), в которые включены фотосинтетические белковые комплексы. В антенных комплексах

происходит миграция энергии поглощенных квантов света к РЦ с небольшими энергетическими потерями, от больших энергий к меньшим.

Расположите хлорофиллы разных типов в порядке приближения к реакционному центру от места поглощения кванта света (в нижнем индексе указаны длины волн света в максимуме поглощения у данного типа хлорофилла):

5. а) Chl<sub>680</sub> б) Chl<sub>570</sub> в) Chl<sub>620</sub> г) Chl<sub>520</sub> . Объясните. (3 балла)

II. фотохимическое разделение зарядов.

После того, как энергия поглощенного кванта света передана на предпоследнюю молекулу-хромофор, происходят следующие события (рис. 2). Поглощенный свет придает дополнительную энергию молекуле (1). При этом один из электронов переходит в возбужденное состояние, на более высокий энергетический уровень (обозначен звездочкой).

Энергия возбужденного электрона хлорофилла передается на электрон соседней молекулы за счет резонансного переноса энергии (2).

Молекула, находящаяся рядом с РЦ, передает ему энергию, приводящую к возбуждению одного из электронов в РЦ (3).

РЦ состоит из нескольких сопряженных молекул, одна из которых является акцептором электронов (красного цвета), а другая (синего цвета) – донором электронов; донор и акцептор отделены друг от друга в пространстве и находятся на разных сторонах мембраны. Возбужденный электрон РЦ переходит к молекуле-акцептору (4). Образующийся в РЦ дефицит электрона восполняется переносом электрона от донора (5).

Таким образом, энергия поглощенного фотона вызвала разделение зарядов в РЦ, то есть получилась батарейка. С учетом ее размера – нанобатарейка.

6. Каков заряд нанобатарейки в кулонах? (4 балла) Рассчитайте разность потенциалов на ее концах считая, что толщина мембраны составляет 5 нм, диэлектрическая проницаемость белка равна 3.

### **Киборги (2009, биология)**

Извечная мечта многих членов технократического общества – быстрая замена или даже улучшение «природных» человеческих органов – частей тела. Очень спорный вопрос, но... соединение электроники и живых клеток все равно является одним из наиболее интересных направлений нанотехнологий, биотехнологий, биофизики и медицины и с точки зрения фундаментальных исследований, и практической значимости полученных результатов.

1. Может ли полупроводниковый транзистор принимать сигналы от нервной клетки? *(1 балл)*
2. Может ли нервная клетка принимать сигналы от электронной микросхемы? *(1 балл)*
3. Может ли нервная клетка обмениваться сигналами с электродами микрометровых и нанометровых размеров электронных устройств? *(1 балл)* Обоснуйте свои ответы.
4. Из каких материалов должны быть изготовлены электроды, контактирующие с нервными клетками? *(2 балла)*
5. Каково преимущество наноматериалов при изготовлении таких электродов? *(1 балл)*
6. Каков механизм передачи сигналов между нервной клеткой и транзистором (или электродом), если это возможно? *(2 балла)*
7. Какими характеристиками должен обладать транзистор, чтобы была возможна передача сигналов между ним и нервной клеткой? *(2 балла)*
8. Какие характеристики должны иметь сигналы от электронного устройства, чтобы нервная клетка могла их воспринять? *(3 балла)*
9. Какие факторы могут препятствовать передаче сигналов между нервной клеткой и транзистором (или электродом)? *(2 балла)*
10. Можно ли ввести электрод нанометровых размеров в клетку, не повредив ее? Предложите свой способ введения. *(3 балла)*

## **Нанотоксикология (2009, биология)**

Человечество с самого начала своего возникновения живет среди наночастиц, которые присутствуют в окружающей среде, в продуктах питания и т.д. Наши клетки содержат большое количество молекулярных машин – органелл клеток, наши кости построены из наночастиц гидроксилатапата... Тем не менее, с увеличением объемов промышленного производства концентрация и «ассортимент» наночастиц вокруг нас все больше и больше увеличивается и остро начинает вставать вопрос о безопасности наноматериалов и нанообъектов.

1. Предположите, какие физико-химические свойства наноматериалов являются наиболее важными при оценке их токсичности для человека? Обоснуйте свой ответ. *(до 5 баллов)*
2. Каков механизм повреждения культивируемых *in vitro* живых клеток млекопитающих следующими техногенными наночастицами: а) оксида железа (III) *(2 балла)*, б) диоксида кремния *(1 балл)*, в) золота *(2 балла)*, г) диоксида титана *(2 балла)*, д) оксида алюминия *(1 балл)* (все наночастицы имеют примерно одинаковый размер: 20-40 нм). В каких условиях возможно повреждение клеток этими наночастицами. *(до 5 баллов)*
3. Перечислите возможные пути попадания в организм человека наночастиц, используемых в промышленности и медицине? *(до 5 баллов)*
4. При каком из этих путей попадания в организм, например, техногенных наночастиц диоксида кремния, они наиболее токсичны для человека? *(2 балла)*
5. В каких органах аккумулируются наночастицы при их внутривенном введении лабораторным мышам? *(до 5 баллов)*

## **Напечатанный хомо сапиенс (2009, биология)**

В последние несколько лет активно разрабатывается технология печати биологических тканей. Принцип печати биологических тканей простой: наращивание клеточной ткани слой за слоем при помощи принтера, напоминающего по устройству обычный. С помощью этой технологии биотехнологи уже создали функциональные ткани. В экспериментах используется трёхмерный биопринтер, заправляемый «живыми чернилами», представляющими собой конгломераты живых клеток. Биопринтер по командам компьютера выстраивает нужную "конструкцию" органа слой за слоем. В перспективе при применении биопринтеров, созданных с использованием нанотехнологий, такая методика позволит печатать отдельные клетки и клеточные структуры.

1. Что может использовать такой принтер в качестве «бумаги»? Зачем нужна такая «бумага» для создания искусственного органа? (1 балл)
2. Каким образом должны повести себя клетки, нанесенные на «бумагу» при помощи подобного принтера, чтобы произошло формирование искусственного органа? (2 балла)
3. Если подобный принтер (печатающий конгломератами клеток) напечатает хотя бы объемный фрагмент почки, что будет препятствовать нормальному функционированию почечных тканей? Как можно преодолеть эти препятствия? (2 балла)
4. Как Вы думаете, возможно ли получение следующего результата:  
фрагмент ткани, напечатанный смесью различных клеток сердца, через несколько суток культивирования начинает синхронно сокращаться? (1 балл) Опишите физиологические механизмы поведения клеток, которые способствуют или препятствуют «самостоятельному» формированию функционирующей ткани. (3 балла)

### **Вечная молодость (2009, биология)**

Вечная молодость – мечта многих. В МГУ им.М.В.Ломоносова, как и во многих других исследовательских организациях, делаются попытки найти чудодейственные рецепты избавления от болезней и преждевременной старости. Несмотря на всю фантастичность этой затеи, она реалистична и в ряде случаев имеет фундаментальное научное обоснование. Так, например, большого успеха удалось добиться после открытия так называемых «ионов Скулачева».

1. Что это такое (*1 балл*) и каков предполагаемый механизм их действия? (*3 балла*)
2. Почему в медицинских целях (продление активного периода жизни, лечение офтальмологических и других заболеваний) достаточно использования очень разбавленных растворов? (*2 балла*)
3. Можно ли «ионы Скулачева» отнести к нанобъектам? (*1 балл*)
4. Приведите еще хотя бы один пример «продления молодости» с помощью нанотехнологий. (*1 балл*)



### **Микроманипулятор (2009, биология)**

Микроскопическое устройство (не путать с нанороботами!), способное захватывать скопление клеток, а затем переносить в другое место, создали инженеры из университета Джона Хопкинса в Балтиморе. В отдалённой перспективе такая способность новинки может привести к прорыву в хирургии: через миниатюрный надрез медики смогут отправить в кровеносные сосуды, сердце или мозг пациента подобные устройства с тем, чтобы провести операцию на самых мелких сосудах изнутри. Манипулятор, похожий по форме на краба (он составлен из шести пальцев, по три сочленения в каждом), может перемещаться внутри кровотока при помощи внешнего магнита, хотя пока учёные испытывали устройство только в пробирках. Сочленения этого микрозахвата активируются изменением температуры или при химическом воздействии. Никелевые тело и лапки микрокраба покрыты золотом. А вот сочленения лапок сделаны из трехслойной тонкой пленки меди, хрома и специального полимера. Механические характеристики этой пленки таковы, что в нормальном состоянии она держит лапки согнутыми, а для того, чтобы ее выпрямить, необходимо это тонкопленочное металлическое сухожилие растянуть. В растянутом состоянии ее удерживает полимер. При нагреве до 40°C полимерная пленка растягивается, ослабляя крепление. В этот момент щипцы сжимаются и захватывают кусочек ткани. В перспективе исследователи предполагают значительно уменьшить размеры этого устройства.

1. Какими размерами должен обладать подобный микроманипулятор, чтобы беспрепятственно циркулировать по большому кругу кровообращения? Чтобы захватить отдельно: а) лимфоцит, б) эритроцит, в) вирус гриппа, г) антитело, д) молекулу альбумина? (2 балла)
2. Какие процессы могут происходить при длительном пребывании подобного устройства в кровяном русле? Могут ли они принести вред организму? (2 балла)
3. Что может препятствовать функционированию подобного устройства в кровеносных сосудах? (2 балла)
4. Как можно усовершенствовать это устройство для повышения его функциональности? (3 балла)

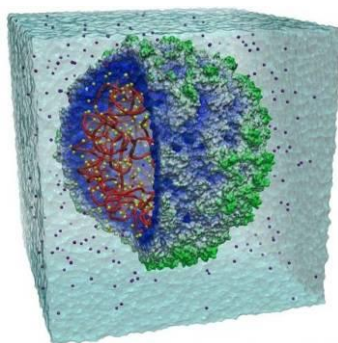
### **Микроэнергогенераторы (2009, биология)**

Серьезной проблемой наномедицины является снабжение электроэнергией уже применяющихся или активно разрабатываемых имплантируемых электрических медицинских изделий: электростимуляторов, диагностических устройств, устройств контролируемой подачи лекарственных препаратов, искусственных органов. Для этих целей конструируются автономные имплантируемые микроэлектрогенераторы, созданные в том числе с использованием нанотехнологий.

1. За счет каких процессов в организме подобные микроэлектрогенераторы могут вырабатывать электроэнергию? *(до 5 баллов)*
2. В какие области в организме будет целесообразнее всего имплантировать подобные устройства (в зависимости от механизма генерации электроэнергии этим устройством)? *(до 5 баллов)*
3. Какой максимальной мощностью могут обладать такие микроэлектрогенераторы? *(3 балла)*
4. Какие проблемы могут возникнуть при длительной эксплуатации подобных устройств? Могут ли подобные устройства неблагоприятным образом воздействовать на организм человека? *(2 балла)*

## Франкенштейн (2009, биология)

Создание полностью искусственных организмов с появлением нанобиотехнологий уже перестает быть фантастикой. Огромный прогресс в коммерческой биотехнологии, многократное удешевление и ускорение синтеза "на заказ" генетических конструкций и белков значительным образом способствует развитию этого направления. Отдельный интерес представляют вирусы, которые не только могут быть весьма болезнетворными, но и использоваться практически, например, при доставке лекарств и т.д.



*Реконструкция строения вируса...*

1. Что такое вирус и каков его типичный размер? (2 балла)
2. Можно ли создать искусственный вирус, например, искусственный вирус полиомиелита, генетический материал которого был бы составлен из химически синтезированных нуклеотидов или олигонуклеотидов? (2 балла)
3. Если ввести этот искусственный вирус лабораторным животным, сможет ли он вызывать полиомиелит? (2 балла)
4. Какие методы лучше использовать для создания других компонентов вирусной частицы (вируса полиомиелита) за исключением нуклеиновых кислот: генетической инженерии или химического синтеза? (1 балл)
5. Опишите схему создания этих компонентов для следующих вирусов: а) вируса полиомиелита, (2 балла) б) вируса герпеса, (2 балла) в) ВИЧ. (2 балла)
6. Как Вы думаете, искусственный геном каких организмов создать проще – ВИЧ или бактерии *Mycoplasma genitalium*? Обоснуйте свой ответ. (3 балла)

### **Опять и снова о нанороботах (2009, простые задачи)**

В знаменитом фантастическом телесериале «Звездный путь» («Star trek») существуют борги – высокотехнологичная псевдо-раса киборгов (кибернетических существ). У боргов нет индивидуумов, все киборги объединены в единый «Коллектив» с одной целью: достижение «совершенства». Любые встреченные боргами гуманоиды или технологии при первой же возможности ассимилируются – преобразуются в дрона с внедрением кибернетических компонентов в органическое тело. При этом в кровь жертвы впрыскиваются нанозонды, которые прикрепляются непосредственно к органам и клеткам тела и начинают их изменять посредством изменения ДНК. Процесс идет достаточно быстро. В результате некоторые части тела удаляются и заменяются кибернетическими приспособлениями. Как только процесс ассимиляции закончен, дрон боргов начинает использовать все разнообразие технологических компонентов, что увеличивает его возможности. Согласно идее создателей сериала, нанозонды представляют собой микроскопические устройства, способные влиять на функции клеток. Нанозонды могут быть использованы как в медицинских целях, так и, напротив, в качестве биологического оружия.

Представьте себе, что на съемки очередного эпизода сериала “Звездный путь” Вас пригласили в качестве научного консультанта, с целью сделать фильм лучше соответствующим научной картине мира, т.е. более правдоподобным.

1. Как бы Вы описали ключевые принципы строения и функционирования нанозондов с учетом современных научных представлений о нанотехнологиях? (5 баллов)

## Искусственный глаз (2009, наноинженерия)

Одним из наиболее перспективных направлений в наномедицине и наноинженерии является интеграция электрических имплантатов с нервной системой для лечения слепоты или создания искусственного глаза. Принципиальная схема искусственного глаза такова: (см. схему 1)

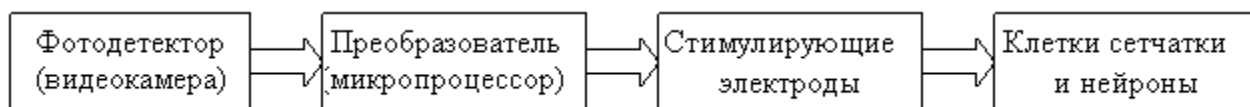


Схема 1

Фотодетектор преобразует свет в электрический сигнал. Преобразователь кодирует полученный электрический сигнал в такую последовательность импульсов, которая может быть воспринята нейронами и передана далее в нервные центры. Электроды стимулируют нейроны, вызывая потенциалы действия и дальнейшую передачу информации в нервные центры. Существующие образцы искусственного глаза достаточно громоздки, поэтому в настоящее время ведутся интенсивные разработки с целью миниатюризации этого устройства с использованием нанотехнологий.

1. Каково строение сетчатки глаза человека? (2 балла) Из каких клеток состоит сетчатка, и каким образом они располагаются? (2 балла) Где могут располагаться стимулирующие электроды искусственного глаза, и с какими клетками они могут контактировать? (2 балла) Какие клетки сетчатки повреждаются в первую очередь при пигментной дистрофии, макулодистрофии или тапето-ретиальной дистрофии сетчатки глаза? (1 балл)
2. В какие еще ткани, органы или части органов человека можно имплантировать стимулирующие электроды с целью обеспечения зрительного восприятия? (по 1 баллу за каждую область имплантации)
3. Возможно ли функционирование искусственного глаза хотя бы в минимальной степени, в случае: а) повреждения зрительного нерва, (1 балл) б) полном отсутствии глаза, (1 балл) в) повреждении зрительной коры мозга? (1 балл) Обоснуйте свой ответ.
4. Какие наноматериалы могут применяться для изготовления стимулирующих электродов? Каковы их возможные преимущества и недостатки? (2 балла)
5. Как Вы думаете, какова разрешающая способность существующих в настоящее время образцов искусственного глаза? (1 балл) Какова теоретически достижимая разрешающая способность искусственного глаза (созданного по описанной выше схеме)? (3 балла)

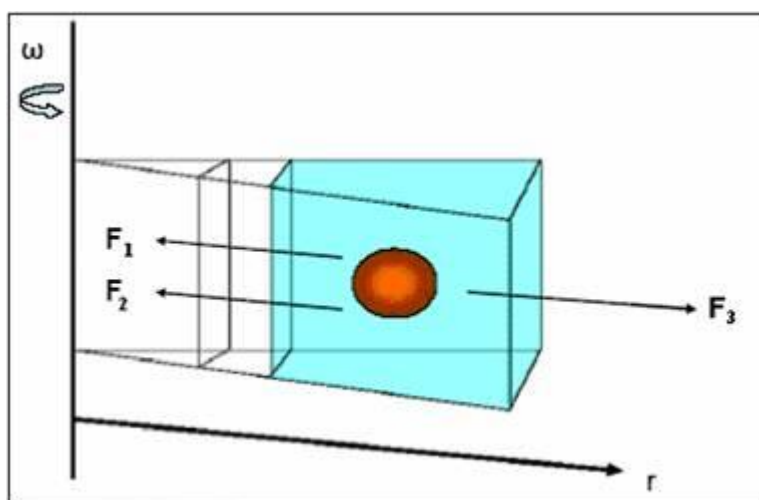
- б. Какие проблемы могут возникнуть при эксплуатации искусственного глаза? (2 балла) Каковы возможные ограничения и преимущества искусственного глаза (созданного по описанной выше схеме) по сравнению с глазом человека? (2 балла)

## Исследование био-нано-конъюгатов (2009, нанобиотехнология)

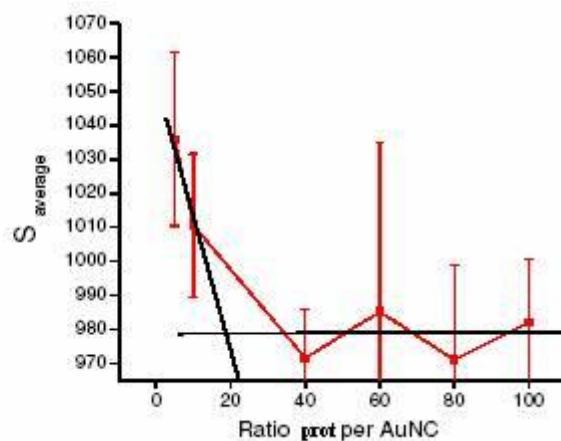
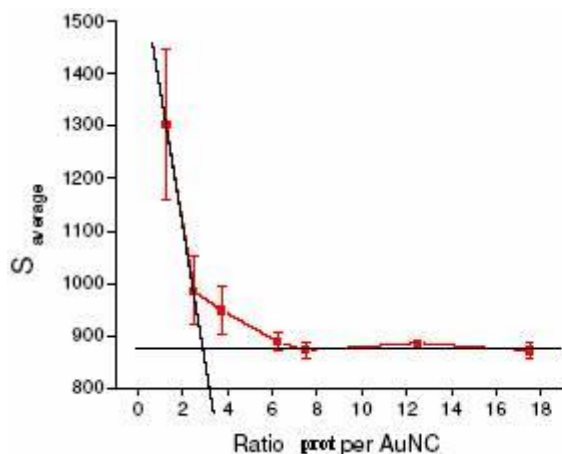
Ряд научных групп во всем мире занимается изучением био-нано-конъюгатов, что может дать положительные результаты при практической реализации ряда бионанотехнологических подходов. При этом часто возникает задача найти метод, способный разделять и анализировать взаимодействия белков и наночастиц золота, которые уже традиционно используются для проведения экспериментов в области наномедицины, биологии, в фундаментальных исследованиях

1. (Почему именно золото? (1 балл) Согласно определению, конъюгаты состоят из наночастиц, которые связаны с одной или несколькими активными биомолекулами, позволяющими наночастицам эффективно взаимодействовать с биологическими системами. Конъюгаты нанокристаллов золота и антител уже используются для многих целей, от введения биологических меток до методов детекции ДНК. Хотя эти частицы и имеют невероятный успех в био-нано мире, новые данные о взаимодействиях белок-частица позволят значительно лучше понять возможности этих конъюгатов.

С помощью метода аналитического ультрацентрифугирования ученым удалось провести количественный анализ взаимодействий белок-нанокристалл. Путем слежения за стехиометрическими кривыми для двух белков были точно предсказаны уровни насыщения связывания по белку. Так, исследователи изучали такие белки, как иммуноглобулин G (IgG) и миоглобин (Mb), обычно присутствующие в крови человека.



*Основной принцип аналитического ультрацентрифугирования.*



Copyright©2005 American Chemical Society

2. Какие еще методы исследования взаимодействия наночастиц с биологическими молекулами Вы знаете (перечислите хотя бы два метода)? Укажите, почему они не могут эффективно использоваться в данном случае. (3 балла)
3. Основные результаты были интерпретированы с использованием уравнения Сведберга. Из этого уравнения можно получить коэффициент седиментации, являющийся мерой того, как быстро частица может двигаться через раствор. Назовите силы, действующие на частицу при центрифугировании ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ). (1 балл) Какая из них зависит а) от вязкости среды, б) от скорости вращения ротора? (1 балл)
4. Какие параметры системы нужно знать, чтобы вычислить коэффициент седиментации наночастицы? (1 балл) Как рассчитать константу седиментации  $S_{20,w}$ , если опыт проводился а) в воде б) в какой-то другой среде? (1 балл) Укажите, какие величины в Ваших формулах нужно знать? Предложите схему экспериментального определения константы седиментации. (1 балл)

Добавление молекул белка к наночастице изменяет гидродинамические свойства частицы, уменьшая константу седиментации.

5. Укажите минимум 2 фактора, влияющие на скорость движения нанокристалла золота с «прилипшими» к нему молекулами белка. (1 балл)

На рисунке приведены экспериментальные кривые зависимости константы седиментации от соотношения молекула белка/нанокристалл золота.

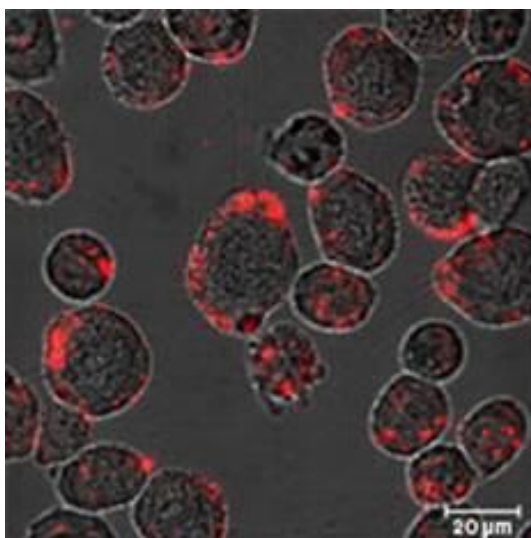
6. Какой из графиков (см. рис. 2) соответствует IgG, а какой миоглобину? Почему? (2 балла) Предложите метод определения количества белка, связавшегося с наночастицами. (1 балл)
7. Рассчитайте полное время оседания смеси всех частиц (нанокристаллов золота, наноконъюгатов с миоглобином и наноконъюгатов с IgG) в разбавленном буфере



для ультрацентрифуги, если для него известно: значение расстояния от оси вращения до мениска жидкости в пробирке  $r_{\min} = 6,6$  см, расстояние от оси вращения до конца пробирки  $r_{\max} = 15,2$  см, а число оборотов составило 50 000 грт. Приведите свои расчеты. (2 балла)

### **A new biosensor for cancer (2009, нанобиотехнология)**

A new biosensor for cancer consists of fluorescent quantum dots (core-shell CdSe/ZnS nanoparticles) with smaller gold nanoparticles covalently attached via a short (10-15 amino acid) peptide. This sensor utilizes the fact that certain types of cancer cells express unique proteases not present in normal cells. In a typical experiment, cells obtained from a biopsy are treated by a suspension of these nanoparticles and fluorescence of quantum dots is monitored. Observation of fluorescence indicates presence of cancer (Fig. 1), while in normal cells fluorescence is not observed.



*Fig. 1*

1. Explain the principle of work of this biosensor. (2 балла)
2. Why fluorescence is not observed in the case of normal cells? (2 балла)
3. Explain why uncoated CdSe quantum dots cannot be used instead of core-shell CdSe/ZnS quantum dots. (1 балл)
4. What can you tell about amino acid sequence of the peptide used for the attachment of Au nanoparticles to core-shell CdSe/ZnS quantum dots? (1 балл)
5. Describe a detailed synthetic route to prepare the nanodevices described above. You can use any commercially available reagents (for uncommon reagent, please provide the name of the supplier and verifiable catalog number). (2 балла)
6. Researchers decided to use the system described above to monitor the progression of metastasis for a squamous cell carcinoma in a mouse model. What modifications should be done to the sensor so that it could be used for this in vivo study? (1 балл)
7. Would you recommend in vivo use of this biosensor in human patients? Provide your arguments. (2 балла)

## **Оболочки (2009, нанобиотехнология)**

Известно, что фосфолипиды, являющиеся основными компонентами клеточных мембран, способны самопроизвольно образовывать в воде замкнутые мембранные оболочки. Эти оболочки захватывают в себя часть окружающего водного раствора, а образующая их фосфолипидная мембрана обладает свойствами полупроницаемого барьера, легко пропускающего воду, но препятствующего диффузии растворенных в ней веществ. Такие оболочки получили название липосом (от греч. «липос» – жир и «сома» – тельце или частица). Липосомы обладают рядом характеристик, которые подразделяются на физические, химические и биологические.

Физические характеристики липосом:

- Форма липосом и морфология поверхности
- Средний диаметр липосом и распределение по размерам
- Поверхностный заряд
- Поверхностный электрический потенциал
- Количество липидных бислоев
- Устойчивость двойного слоя липидов
- Эффективность инкапсулирования (процент невключившегося препарата/процент

включения)

- Высвобождение препарата *in vitro*

Химические характеристики липосом:

- Концентрация фосфолипидов
- Концентрация холестерина
- Перекисное окисление фосфолипидов
- Гидролиз фосфолипидов, самоокисление холестерина
- Осмолярность

Биологические характеристики липосом:

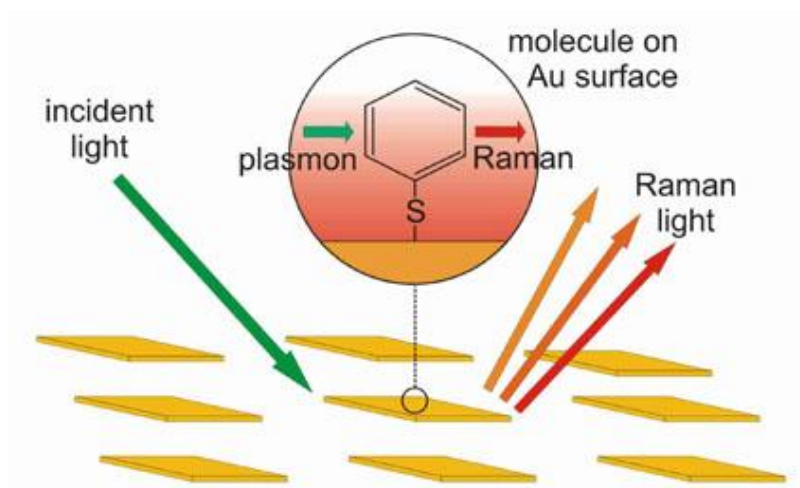
- Стерильность
- Пирогенность
- Токсичность

1. Как устроены липосомы? (1 балл)
2. Известно, что в состав липосом входят холестерин, лецитин и полиэтиленгликоль. Какие свойства придают эти компоненты липосоме? (1 балл)
3. Приведите свою классификацию липосом и укажите, какие из них являются наноструктурами, аргументируйте свой ответ. (2 балла)

4. Исходя из перечисленных характеристик липосом, предложите возможные методы или приборы для их определения и дайте обоснование выбора того или иного метода. (2 балла)
5. Для каждого из перечисленных препаратов подберите наиболее подходящий метод (методы) загрузки в липосомы, объясните свой выбор: (2 балла за все)
  1. доксорубицин
  2. ибупрофен
  3. индометацин
  4. циклоспорин
  5. пилокарпин
  6. винкристин
  7. пироксикам
  8. тимолол
  9. дофамин
  10. ципрофлоксацин
  11. эпинефрин
  12. хинин
  13. кодеин
  14. лидокаин
  15. налидиксовая кислота
6. Каким образом липосомы используются в био(нано)технологии (2 балла)?

### Гигантское комбинационное рассеяние (2009, нанобиотехнология)

В спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, surface enhanced Raman spectroscopy, SERS) для усиления сигнала от исследуемого объекта используют коллоидные растворы наночастиц (НЧ) серебра или золота. Диаметр частиц варьирует от 10 до 200 нм и их поверхность несет заряд. Вашими исследуемыми объектами являются эритроциты, дендритные клетки, нейроны, миелиновые нервные волокна, макрофаги, нейтрофиллы, фибробласты и простейшее амеба *Entamoeba dispar*.



*Один из примеров SERS*

1. Напишите, в цитоплазму каких клеток наночастицы будут проникать самопроизвольно и сравните эффективность проникновения частиц в разные типы клеток. (3 балла)
2. Предложите способы, при помощи которых можно вызвать проникновение частиц в цитоплазму клеток. (2 балла)
3. Для регистрации сигнала SERS необходимо получить препарат живых клеток, на поверхности которых адсорбировано максимальное количество наночастиц. Предложите методы адсорбции наночастиц на поверхности клеток. (2 балла)

### **Клеточное лежбище (2009, нанобиотехнология)**

Известно, что одна из основных проблем в работе с культурами клеток – это создание оптимальных подложек, соответствующих естественному окружению клеток как по химическому составу, так и по наноструктуре. Представьте, что Вы можете создать поверхность с любыми характеристиками.

1. Напишите общие требования (*3 балла*) к подложкам для (а) длительного выращивания клеточных культур; (б) иммобилизации клеток для кратковременных исследований и (в) изучения клеточной подвижности.
2. Какие материалы для изготовления подложки и какую наноструктуру поверхности можно использовать для усиления интенсивности флуоресценции окрашенных клеток или интенсивности комбинационного рассеяния? (*2 балла*)
3. Какой должна быть поверхность имплантантов, чтобы обеспечить ее биосовместимость? (*2 балла*)

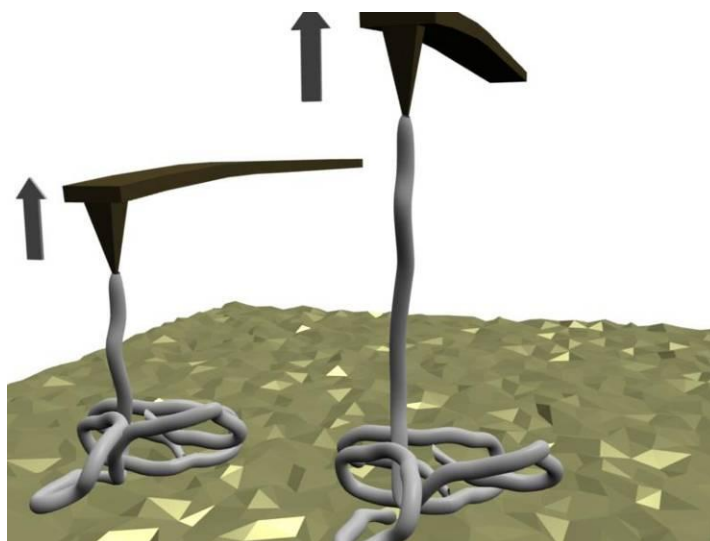
### **Нанотрубочки (2009, нанобиотехнология)**

Несколько лет назад в нервной системе были открыты так называемые туннелирующие нанотрубочки – длинные цилиндрические структуры-выросты плазматической мембраны нейронов и глиальных клеток, посредством которых нейрон или глиальная клетка соединяются с соседней клеткой. При помощи этих нанотрубочек цитоплазмы соседних клеток оказываются соединенными друг с другом. Средний диаметр нанотрубочек – 80 нм.

1. Перечислите вещества, органоиды и структуры, которыми нейроны и глиальные клетки могут обмениваться друг с другом при помощи нанотрубочек. Ответ обоснуйте. *(2 балла)*
2. Перечислите возможные функции нанотрубочек и их значение в межклеточной сигнализации. *(3 балла)*

## Protein unfolding (2009, нанобиотехнология)

Scientists envision many functions transferred to the molecular machines instead of man-made devices in the future. In order to create molecular machine mechanical stability of the protein complex has to be well understood.

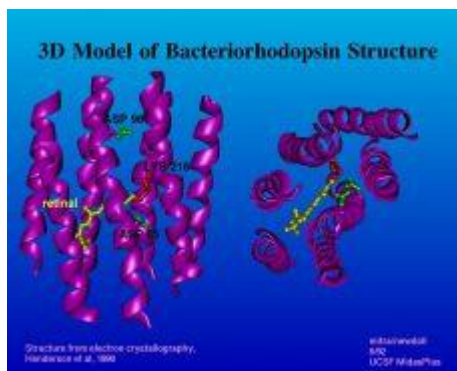


*Схема (очень приблизительная) процесса.*

1. Considering small size of the proteins (what is the range of sizes of the tertiary structure of proteins? *(1 балл)* atomic force microscope seems to be good tool for studies of the mechanical properties of the proteins, specifically unfolding.
2. The size of the proteins implies that unfolding force will be quite small as well (what is the range of unfolding forces for different proteins? *(2 балла)*)
3. The standard experiment for measuring protein unfolding is approaching surface with adsorbed proteins with microscope tip, until tip touches the surface, then pull the tip off the surface (please draw schematically force curve as function of tip displacement in experiment described above, consider two cases: molecule/no molecule between tip and the surface. Please describe physical processes happening at each step. *(4 балла)*)
4. As an experimentalist in this project you have to work with small displacements and small forces, what internal standard you would use to calibrate your system (please list several types of proteins you would use. *(2 балла)*)



## Пурпурное озеро (2009, нанобиотехнология)



### *Структура бактериородопсина*

Белок бактериородопсин уникален во многих отношениях (каких, например? **1 балл**) и представляет собой достаточно сложную «молекулярную машину», использование которой с практической точки зрения выглядит весьма заманчиво. Именно поэтому к нему все чаще присматриваются нанотехнологи, собирающиеся добиться – таки создания прототипов устройств, где бы этот белок практически применялся.

1. Предложите конструкцию солнечной батареи на основе бактериородопсина и объясните, как она будет работать. (5 баллов)
2. Какие еще, в том числе неорганические, материалы, Вы будете использовать для создания батареи и почему. (2 балла)
3. Как можно добиться сопряжения бактериородопсина и неорганических наночастиц для их совместного функционирования в солнечной батарее, к чему полезному может привести это сопряжение. (4 балла)
4. Какова будет спектральная чувствительность такой батареи? (2 балла)
5. Опишите другие практические применения бактериородопсина и его конъюгатов с наночастицами. (2 балла)
6. Как может осуществляться запись информации в устройствах, содержащих бактериородопсин? (2 балла)
7. Можно ли сделать сенсоры на основе бактериородопсина и неорганических наночастиц? (2 балла)

## Химера (2010, школьники, биология)

*«Ты уходишь от погонь  
Сквозь кордоны, сквозь огонь  
Свет в глазах, рычаг в ладонь  
Но цель твоя – химера.*

Предположим, что это не фрагмент песни известной группы, а иносказательный девиз молекулярных биотехнологов. Рассмотрим и прокомментируем его подробнее.

“Ты уходишь от погонь

Сквозь кордоны, сквозь огонь”

Это означает, что необходимо преодолеть иммунную защиту организма, не убив его при этом.

1. Опишите основные механизмы иммунитета против чужеродных белков и способы защиты от иммунной системы генно-инженерного белка. (5 баллов)

“Свет в глазах, рычаг в ладонь”

2. Опишите технику получения простых и сложных белков, начиная от выделения нужного гена и заканчивая селекцией культуры. (3 балла)

“Но цель твоя – химера.”

3. Кто такая химера? (0,5 балла)
4. Что такое химера в понятиях рекомбинантного белка? (0,5 балла)
5. Являются ли химерами следующие структуры (по 0,5 балла)
  - Свиной инсулин (для человека)
  - Конъюгат антитела и квантовой точки.
  - Генно-инженерный белок с Нус-тагом
  - Пэгилированный белок
  - Мутантные белки с заменой буквы в ДНК
  - Мутантные белки сдвигом рамки считывания ДНК.
  - Белки с изотопно-мечеными аминокислотами.
  - Гликопротеины

### **Куда идешь, путешественник? (2010, школьники, биология)**

Известно, что стволовые клетки на ранних стадиях развития организма, а также клетки определенных типов во “взрослом” организме обладают подвижностью и способны перемещаться на значительные расстояния... и даже мигрировать по всему организму. Визуализация мигрирующих клеток имеет большое значение в биомедицинских исследованиях, однако во многих случаях подобные эксперименты затруднены из-за отсутствия подходящего “маркера” для мигрирующей клетки. Например, флуоресцентные зонды и любые прижизненные красители быстро обесцвечиваются и вытекают из клеток, а также оказывают фототоксическое действие. Таким образом, актуальной задачей является поиск веществ и материалов-маркеров, позволяющих оценивать передвижения клеток.

1. Клетки каких типов во “взрослом” организме способны к перемещениям на большие расстояния? (1 балл)
2. Для чего организму нужна миграция клеток (поясните для всех типов клеток, которые Вы перечислили в первой части вопроса). (1 балл)
3. При помощи каких наноматериалов можно исследовать миграцию клеток в эмбрионах, клеточных культурах, срезах тканей и целом организме и какие методы исследования при этом можно использовать (5 баллов)? Каким требованиям должны удовлетворять предложенные наноматериалы? (2 балла)
4. Для решения каких фундаментальных или прикладных медицинских задач Вы бы использовали предложенные Вами способы исследования миграций клеток? (2 балла)

### **Наномашинки (2010, школьники, биология)**

В 2005м году впервые была синтезирована наноструктура, получившая название «паносар» («нано машина») (Rice University Professor James Tour\_group). Структура обладает H-образным «шасси» и 4 «колесами» из фуллерена, однако данная структура лишена двигателя.

1. Представьте проект *биологического или нанотехнологического* двигателя для паносар. (3 балла) Обоснуйте Ваши идеи. (2 балла)

Примечание: обязательно примите во внимание размеры наноавтомобиля и то, что Вам необходимо весьма реалистично и обосновано соединить в единое целое «шасси» и мотор (отвлеченные рассуждения не слишком Вам помогут решить задачу).

### **Солнечное утро (2010, школьники, биология)**

Однажды чудесным солнечным днем с юным биологом Петей приключилась совершенно невероятная история... Все началось с того, что он внезапно оказался на лодке в море, на голове его красовалась кепка. Осмотревшись, он заметил, что в лодке находился еще один мальчик в точно такой же кепке. Скоро ребята начали различать береговую линию и силуэт очень высокой горы. К берегу кроме них направлялось множество других лодок, они выстраивались в очередь у входа в крытую пристань. Перед входом в пристань путешественникам пришлось немного подождать, поскольку светилась табличка «Только 2 лодки могут войти». Когда ворота снова открылись, лодке Пети и еще одной лодке с двумя мальчиками удалось попасть внутрь, где их встретили 4 работника пристани. Всех попросили покинуть свои лодки и сдать кепки. Работники пристани соединили 2 лодки вместе и отправили их в боковую дверь, а ребят по очереди посадили в вагончик. Когда Петя ехал в вагончике, он не поверил своим глазам, заметив, что из двери пристани... вылетели 2 соединенные вместе лодки (катамаран?!!)! Через некоторое время вагончик подъехал к подножью горы и остановился. На станции Петю встретил сопровождающий и посадил его в стеклянную кабину. Вдруг синие и красные вспышки света осветили кабину Пети, и в следующее мгновение он оказался на вершине горы. Было очень скользко, а ветер дул с такой силой, что устоять на ногах было практически невозможно. Под порывами сильнейшего ветра на глазах у Пети кого-то сдуло вниз, и в небе появилась яркая красная вспышка. Петя с трудом удерживался на горе, но тут на помощь пришел спасатель и помог ему добраться до небольшого домика. Когда мальчик немного отдохнул, спасатель отвел его в гараж, где стоял двухместный снегоход, а сам отправился спасать следующего попавшего на вершину горы. Обоих ребят спасатель посадил в снегоход и, указав им дорогу, надел на них кепки, точно такие же как в начале приключения. На снегоходе мальчики спустились к воротам горнолыжного парка. На удивление ребят, кепки сами слетели с их голов и куда-то унеслись. В парке было 2 пути, которые вели в разные стороны: саночная трасса и горнолыжный спуск. Петя выбрал спуск на горных лыжах, а его попутчик захотел прокатиться на санках. Проехав всю трассу, Петя подъехал к выходу из парка. Там был привязан медный конь, мальчик вскочил на коня и тот понес его, будто знал дорогу. И действительно, конь привез Петю на станцию к подножью другой высокой горы...

1. О каком известном природном процессе идет речь? (1 балл)
2. Какая часть этого процесса описана в задаче? (1 балл)
3. Поясните все происходящие события и назовите природные аналоги участвующих героев. (4 балла)

4. Приведите примеры возможного использования описанного процесса в нанотехнологиях. (4 балла)

**Маленький и еще меньше (2010, школьники, биология)**

Живые организмы имеют самые различные размеры, формы. В этом – удивительное разнообразие и великая сила жизни и Природы....

1. А какие Вам известны самые маленькие живые организмы и какой у них размер? (1 балл)
2. Какие факторы ограничивают дальнейшее уменьшение размеров? (1 балл)
3. Какие особенные эффекты проявляются при малых размерах живых организмов? (2 балла)
4. Какие методы могут быть использованы для того, чтобы можно было увидеть эти организмы? (2 балла)

## Чеширский кот (2010, школьники, биология)

*От улыбки станет всем светлей,  
И слону и даже маленькой улитке ☺*

Нанотехнология и ДНК. Это словосочетание открывает широкий простор для создания молекулярных конструкций, от самых простых до невероятно сложных. Базовый принцип этого метода – комплиментарность цепей ДНК и возможность их самосборки в строго упорядоченные структуры.

1. Что такое комплиментарность? Какое правило её предсказало и что из неё следует? (2 балла) Сила связывания между разными азотистыми основаниями (далее воспользуемся молекулярно-биотехнологическим жаргоном и назовём их **буквами**) различна меч.
2. Какие основания связываются «крепче»? Почему? (1 балл) Для создания ДНК конструкций обязательно используют пару специально подобранных праймеров (синтетических цепочек ДНК) или природные гены. Опишите принципы конструирования и предложите структуру праймеров для самосборки “улыбки Чеширского кота” на полных 32 зуба (буквы) и с высунутым “языком”.



3. Считайте, что на “язык” необходимо 10 букв. (10 баллов)
4. Остальные пропорции рассчитывайте исходя из масштабов. Как называется этот “язык” в молекулярной биологии? (1 балл)
5. Можно ли собрать точно эту улыбку из одного праймера? Если да, то укажите структуру, если нет, то укажите причину (1 балл)



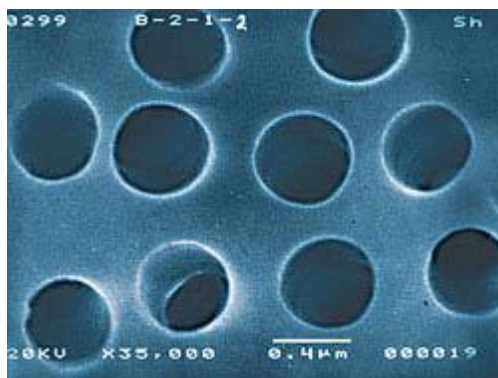
### Рыбки (2010, школьники, биология)

На фотографии представлены рыбки, которые при облучении аквариума «ультрафиолетом» светятся в зеленой области спектра.



1. Назовите соединение, которое придает рыбкам зеленое свечение? (1 балл)
2. Почему это соединение светится при облучении его ультрафиолетом? (2 балла)
3. Как осуществляется синтез этого соединения и как его вводят рыбкам? (3 балла)
4. С помощью какого нанобиотехнологического метода можно придать рыбкам это зеленое свечение? (2 балла)

## Мембрана (2010, школьники, биология)

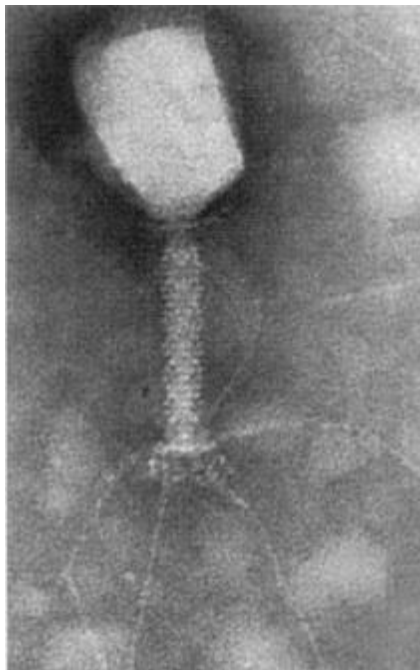


*Трековая мембрана (растровая электронная микроскопия, ув. около 35000 раз).*

1. Можно ли с помощью фильтрации плазмы крови при помощи трековых мембран полностью очистить плазму крови инфекционного больного от бактерий или вирусов без изменения ее макромолекулярного состава? (1 балл)
2. Какой минимальный диаметр должны иметь поры трековых мембран в этих случаях? (1 балл)
3. Обоснуйте свой ответ. (2 балла)
4. Может ли использование антибиотиков при лечении инфекционного больного повлиять на выбор трековых мембран с большим или меньшим диаметром пор для фильтрации плазмы крови с целью ее очистки от бактерий? (2 балла)

**Штучка (2010, школьники, биология)**

1. Назовите нанобиообъект, представленный на фотографии и приведите схему его строения. (2 балла)



2. Относится ли он к объектам нанотехнологии и почему? (1 балл)
3. Можно ли эти объекты использовать в качестве лекарственных средств и если да, то каких заболеваний? (2 балла)
4. Каковы преимущества и недостатки этих объектов перед химически синтезируемыми лекарственными веществами как терапевтических средств? (2 балла)

**Анализ (2010, школьники, биология, повышенной сложности)**

Поддержание нормальной жизнедеятельности клеток во многом зависит от структуры цитоскелета и функционирования моторных белков, отвечающих за транспорт органоидов по микротрубочкам.

1. Какие спектральные и микроскопические методы и какие наноматериалы можно использовать для исследования свойств различных элементов цитоскелета и для изучения движения моторных белков? (4 балла)
2. Для решения каких исследовательских задач Вы бы использовали предложенные Вами подходы? (2 балла)

Одни из самых известных нанообъектов - углеродные нанотрубки - обладают рядом интересных свойств. В том числе: характерные полосы спектров комбинационного рассеяния нанотрубок характеризуют их диаметр и наличие дефектов структуры; нанотрубки имеют выраженное двойное лучепреломление, поглощение и испускание ими света также хорошо ориентировано.

3. Как эти свойства можно использовать для исследования клеток и клеточных культур и каким образом? (5 баллов)

### **Зеленая слизь (2010, школьники, биология, повышенной сложности)**

При сезонной вспышке заболеваний немалую роль играют вирусные инфекции.

1. Опишите жизненный цикл вируса. (2 балла)

Как правило, они быстро распространяются воздушно-капельным путём. Защитой от заражения может служить марлевая повязка, но её защитный ресурс невелик. Значительно больше ресурс респираторов, особенно специальных моделей. Ещё больше ресурс противогаза, однако непрерывное ношение противогаза более 2-3 часов очень затруднительно. Полную, длительную и достаточно комфортную защиту обеспечивают скафандры с принудительной подкачкой очищенного воздуха. Как правило, для подкачки используется небольшой компрессор и система воздушных фильтров.

2. Опишите, какой пористости должны быть фильтры для надёжной защиты от вирусных частиц. (1 балл)

3. Предложите, как из обычной одежды и препаратов бытовой химии можно сделать скафандр высшей биологической защиты (предположим, что система очистки воздуха имеется). (2 балла)

Помимо внешней защиты можно применять и внутреннюю. На вирусы не действуют антибиотики, бессильны и бактерицидные препараты на основе серебра. Тем не менее, вирусы не являются неуязвимыми

4. Опишите основные способы (как реальные, так и гипотетические) борьбы с вирусным заражением. (5 баллов)

Предположим, что вирусное заражение всё-таки произошло. Атакованная клетка работает по вирусной ДНК 30 минут, после чего распадается, высвобождая 20 новых вирусных частиц.

5. Определите, какова должна быть частота заражения новых клеток, чтобы вирус:

- стремительно развивался
- перешёл в хроническую форму
- заболевание угасло.

Для решения предположить, что частица вируса существует в крови одни сутки. (3 балла)

Не меньшую опасность вирусы представляют для бактериальных клеток. Попадание даже одной частицы вируса может быстро уничтожить культуру. Предположим, что в культуральную жидкость объёмом 1 л и концентрацией  $10^6$  клеток/мл попала одна частица. Время, проходящее от заражения клетки до выхода новых частиц, равно 1 час. При распаде клетки выходит 50 частиц, эффективность заражения которыми составляет 20%.

6. Рассчитайте время полного уничтожения культуры. (2 балла)

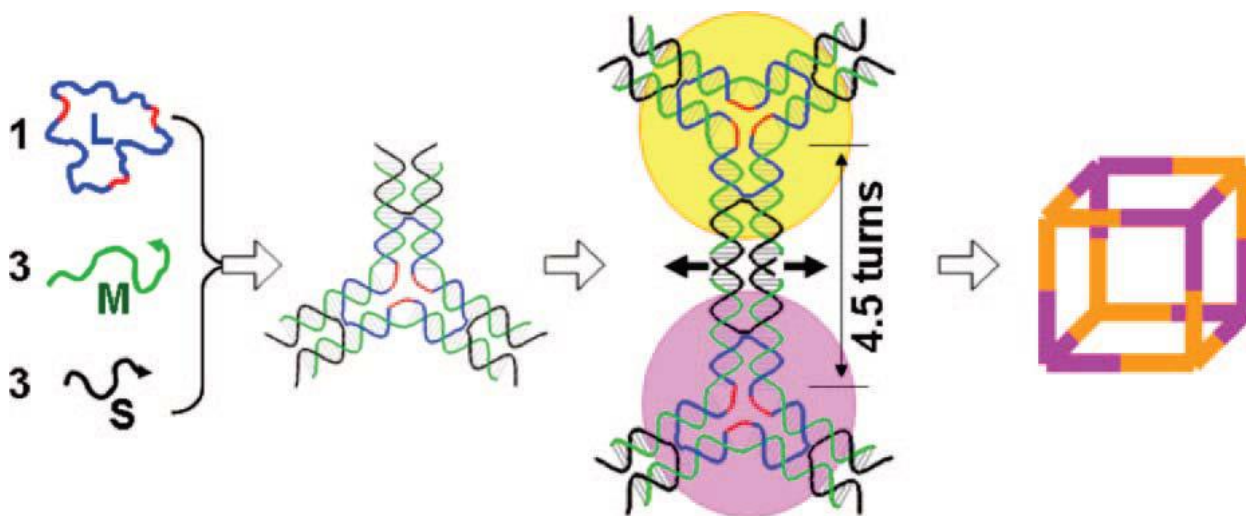
7. Поможет ли против вирусов выращивание клеток на плотных средах типа агара? (1 бал)

## Наноконструктор из ДНК (2010, школьники, химия, повышенной сложности)

Узнавание комплементарными цепями ДНК друг друга позволяет создавать различные трехмерные конструкции в нанометровом диапазоне. Для получения таких конструкций сначала синтезируются олигонуклеотиды, которые потом, при смешивании в растворе, сами собираются в трехмерную структуру заданной архитектуры.

**Самосборка** (англ. Self-assembly) - это термин для описания процессов, в результате которых неорганизованные системы благодаря специфическому, местному взаимодействию компонентов систем, приходят к упорядоченному состоянию.

1. Каковы физико-химические причины процессов самосборки? (2 балла)



В одном из университетов штата Индиана был придуман кубик из нескольких цепей ДНК. Нуклеотидная последовательность центрального элемента **L**, обозначенного синим с красными неспаренными участками (петли длиной 5 нуклеотидов):

5'-Agg CAC CAT CgT Agg TTT TTCT TgC CAg gCA CCA TCg TA<sub>g</sub> GTT TTT CTT gCC Agg CAC CAT CgT Agg TTT TTC TTg CC -3';

Нуклеотидная последовательность цепи **M**, обозначенной зеленым цветом:

5'-ACT ATg CAA CCT gCC Tgg CAA gCC TAC gAT ggA CAC ggT AAC g -3';

Нуклеотидная последовательность цепи **S**, обозначенной черным цветом:

5'-CgC gCg TTA CCg TgT ggT TgC ATA gTC ATg -3'.

2. Каково должно быть молярное отношение цепей L:M:S, чтобы они образовали куб? (1 балл)
3. Определите и обозначьте участки цепей **M** и **S**, которые образуют двойную спираль. Примите во внимание, что во взаимодействиях принимают участие только классические Уотсон-Криковские пары. Сколько оснований цепи **S** участвуют в образовании двойной спирали? (4 балла)

4. Рассчитайте суммарную энергию образования этих двуспиральных участков, если известно, что изменение свободной энергии при образовании пары оснований составляет 1,8 ккал/моль? Какова величина силы в Ньютонах, которую необходимо затратить для расплетания (разделения на отдельные цепи) этих двуспиральных участков? Примите, что длина одного основания составляет 0,33 нм. (3 балла)
5. Рассчитайте длину ребра этого куба, предполагая, что ДНК находится в стандартной В-конформации, то есть ее диаметр составляет в среднем 2 нм, а на одну пару оснований приходится 0,33 нм и в один оборот спирали входит 10 пар нуклеотидов. (2 балла)
6. Какой будет гидродинамический радиус куба, измеренный методом DLS (этот метод позволяет измерять радиус частиц, считая их сферическими)? (2 балла)
7. Посчитайте изменение расстояния между концами цепи М, которое произошло при образовании наноконструкции из полностью вытянутого олигонуклеотида, если в одноцепочечной ДНК на один нуклеотид приходится 0,43 нм. (2 балла)
8. Предложите другие пространственные фигуры, которые можно сложить из ДНК-наноконструктора. (2 балла)



### Искусственные мышцы (2010, школьники, химия, повышенной сложности)

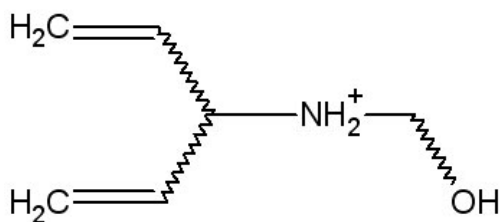
Важнейшая проблема современной технологии (и нанотехнологии, в том числе) – создание искусственных устройств, подражающих действию мышечных волокон, но превосходящих их по физическим свойствам или простоте управления. Ключевой элемент искусственной мышцы – материал, способный резко изменять свои размеры под действием внешних воздействий.

1. Рассчитайте (это будет интересно для сравнения с искусственными мышцами) относительное изменение длины метрового отрезка железной проволоки с диаметром 0.1 мм при изменении температуры от 0 до 50°C. Необходимые справочные данные найдите самостоятельно? (2 балла)

Основной недостаток большинства материалов, изменяющих свои геометрические размеры под действием внешних факторов – в изотропности таких изменений. Искусственные мышцы должны быть способны резко изменять свою длину, по возможности мало изменяя размеры по другим измерениям. Перспективными материалами являются полимеры, чья способность к волокнообразованию происходит от цепного строения (анизотропных) макромолекул. Большой интерес в последнее время привлекают полимеры на основе ротаксанов (что это за класс соединений? 1 балл).

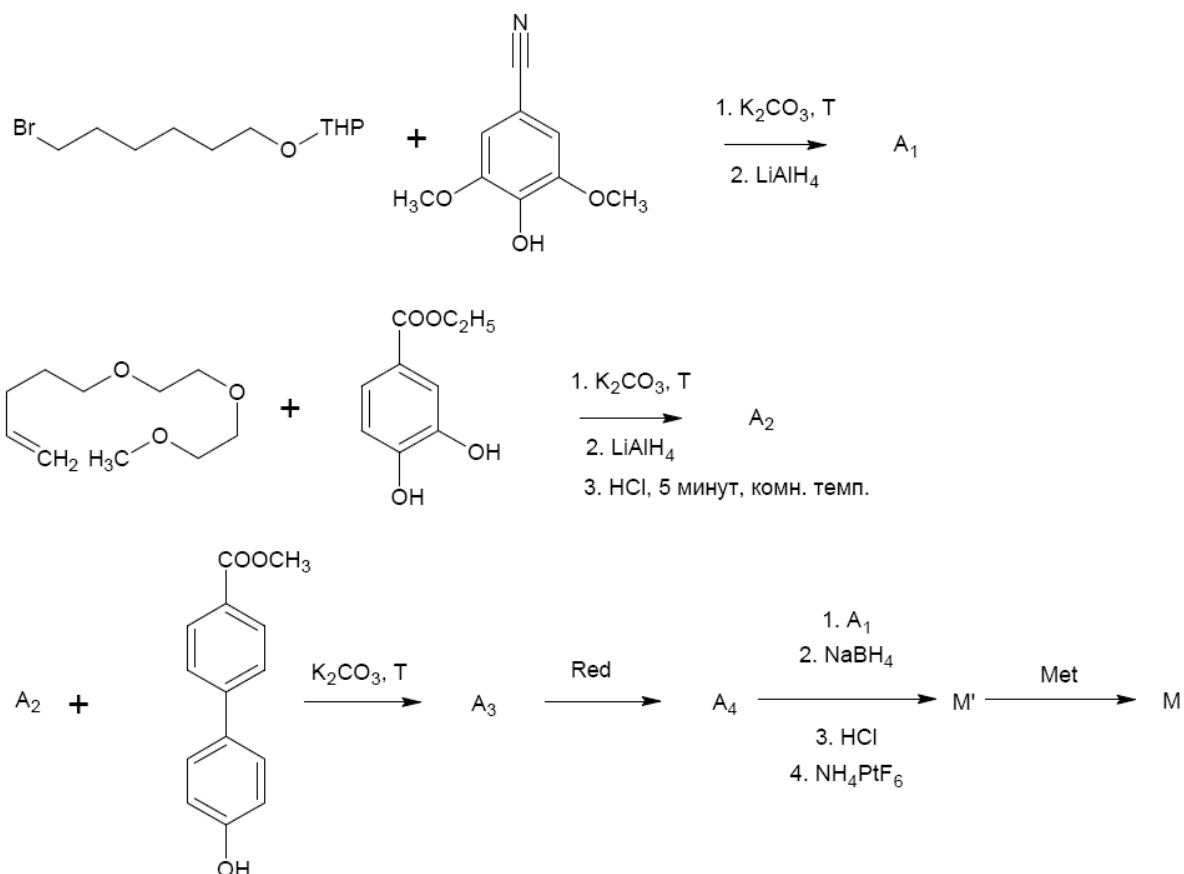
Синтез одной из подобных молекул описан ниже. Вначале синтезируется мономер М. При рассмотрении схемы учтите, что:

- ТНР – защитная группа, снимаемая в кислой среде
- в структуре  $A_2$  имеется ароматическое кольцо и две кратные связи углерод-углерод
- Red – реагент, позволяющий мягко восстановить сложноэфирную группу до альдегидной
- Met – катализатор реакции метатезиса
- схематически структуру предмономера  $M'$  можно представить как



где волнистыми линиями показаны гибкие структурные фрагменты, а прямыми – жесткие. При ответе на дальнейшие вопросы можно использовать именно такое схематическое представление.

- Мономер  $M$  построен из двух идентичных фрагментов, не связанных ковалентными связями.



2. Определите структуры соединений  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_4$ ,  $M'$ ,  $M$ . (4 балла)
3. Мономер  $M$  реагирует на изменение pH раствора, меняя свою конформацию. Схематически изобразите структуру  $M$  в кислой и щелочной средах. (1 балл)

Мономер  $M$  содержит гидроксильные группы, по которым происходит его конденсация в полимерную цепочку. Ее размеры сильно зависят от pH окружающей среды, а значит, волокна, изготовленные из такого полимера, будут при изменении реакции среды удлиняться или укорачиваться, преобразуя химическую энергию в механическую.

4. Будет ли полимерная цепочка укорачиваться или удлиняться при подкислении окружающего раствора, начиная от pH 10? (1 балл)
5. Оцените относительное удлинение полимерной цепочки, исходя из структуры мономера  $M$ . (2 балла)

### **Супергерои (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

В романе российского писателя – фантаста Лукьяненко “Геном” описано массовое применение генно-инженерных технологий для изменения человека. Генетически модифицированные люди приобретают комплекс качеств, идеально приспособляющий их для определённой профессии: пилоты, например, легко выдерживают большие перегрузки, с точностью до сантиметра определяют расстояния и скорость, могут прыгать с большой высоты без повреждений; бойцы обладают молниеносной реакцией и большой силой, жизненно важные органы дополнительно защищены скелетом и сдвинуты с привычных мест.

До таких высот современная наука ещё не дошла. Тем не менее, вводить определённые коррективы в геном бактерий, растений и животных она уже умеет. Это применяется для получения трансгенных микроорганизмов, растений и животных. Трансгенные организмы вырабатывают функциональные белки, антитела, ферменты и многие другие продукты биотехнологии, которые прочно вошли в нашу жизнь.

1. Модификация генома сводится, как правило, к появлению способности к синтезу определённого белка или, реже, вещества небелковой природы (что сложнее: синтезировать белок или иное вещество? Почему?) (2 балла)

Наиболее востребованными и безопасными в настоящее время считаются белки для диагностики заболеваний иммунохимическими методами. При этом стоит задача повысить чувствительность анализа, отсеять мешающие вещества и провести анализ максимально быстро. Весьма перспективным считается применение диагностики на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR-диагностика)

2. Опишите условия возникновения эффекта поверхностного плазмонного резонанса и его проявление. (2 балла)

Для проведения анализа на поверхность чипа иммобилизуется специальный белок, селективный к определяемому веществу. Белок получают методами генной инженерии, модифицируя геном микроорганизмов.

3. Ниже приведёна РНК человека. Расшифруйте, какую аминокислотную последовательность она кодирует: (3 балла)

Начало AAG GAC UCC AGA UCA AUG GGC ACA CCC UGG UUG CCC UAU UUU GGA GCU GCC UGG GUG UAG CAA CUC UUG CCC AUA AAA AAA AAA конец

4. Вам, как талантливому исследователю, поставлена задача модифицировать данную аминокислотную последовательность для иммобилизации на поверхность чипа SPR. Рабочая часть чипа состоит из золота. Известно, что специфический участок

расположен на конце аминокислотной последовательности. Опишите схему превращений и последовательность приёмов, которыми Вы воспользуетесь для решения этой задачи. (4 балла)

Существуют методы повышения чувствительности метода SPR, основанные на эффекте сверхфокусировки поверхностных плазмон-поляритонов (СППП).

5. Опишите, какими свойствами должна обладать поверхность чипа для реализации СППП. (2 балла)
6. Предложите способ получения подобной поверхности и опишите, какие преимуществами данный метод может обладать. (3 балла).

## **Магнитные микросферы (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

Магнитная сепарация широко используется в биологии, фармакологии, в научно-практической работе врачей-клиницистов и исследователей в различных областях медицины. Микросферы используют для диагностики иммунодефицитных состояний, изоляции клеток и костного мозга по поверхностным маркерам, для выделения ДНК, бактерий, антигенов. Возможность проведения иммунных реакций с использованием иммуноактивных веществ (антител, антигенов), иммобилизованных на магниточувствительных микроносителях, позволяет не только осуществить выделение требуемых субпопуляций клеток без использования сложного и дорогостоящего оборудования, но и дает возможность разработать экспресс-методы диагностики ряда заболеваний, предусматривающие возможности протекания иммунных реакций.

Выделение стволовых клеток из костного мозга и крови при помощи композитных магниточувствительных материалов - одна из важных задач современной медицины, так как решение этой проблемы может иметь приложение в современной онкологии и гематологии при трансплантации стволовых клеток. В лечебных целях иммуномагнитная сепарация клеток начала широко использоваться в клиниках для выделения CD34+ - позитивных клеток с целью последующего воспроизведения костного мозга у больных различными видами лейкозов, раком молочной железы с метастазами, раком желудка, распространённым или ограниченным мелкоклеточным раком лёгких, круглоклеточной или недифференцированной саркомой, метастатической нейробластомой, при аплазиях костного мозга и в случае тотального облучения. Источником стволовых клеток является периферическая кровь. Выделение их из крови имеет ряд преимуществ: процесс выделения менее инвазивен, не требует анестезии и стволовые клетки можно пересаживать при лейкозе абсолютно не леченному реципиенту с высокой вероятностью восстановления гемопоэза. Использование для трансплантации стволовых клеток, полученных из периферической крови, приводит к более быстрой приживляемости и сокращению сроков госпитализации по сравнению с автотрансплантацией костного мозга.

1. Каково возможное строение магнитоуполненных микросфер, применяемых в описанных выше случаях, и состав их оболочки, поясните? Какие магнитные материалы могут быть использованы и почему? (2 балла)
2. Сформулируйте преимущества и недостатки магнитных меток и магнитометрического анализа. (2 балла)
3. Перечислите основные требования, которые должны предъявляться к магнитным носителям для иммуномагнитометрического анализа. (3 балла)

4. Предложите общую схему получения магнитоуполненных микросфер (2 балла) и конкретизируйте ее для нескольких видов магнитных материалов и микросфер. (по 1 баллу за каждый пример)
5. Сравните свойства предложенных вами типов магнитоуполненных микросфер и оцените возможность их применения для иммуномагнитометрического анализа. (2 балла)

## **Нанодиагностика (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

Успешное лечение заболеваний во многом зависит от того, на какой стадии патология была выявлена. Таким образом, развитие методов, позволяющих диагностировать патологии на ранних стадиях развития, является очень актуальной задачей медицины, биологии и нанотехнологий. Не менее важное направление био-медицинских исследований – это разработка методов, позволяющих в ходе хирургической операции по удалению злокачественных или поврежденных клеток различать здоровые и больные клетки.

Какие спектро- и микроскопические методы исследования и какие наноматериалы Вы бы предложили использовать...

1. Для увеличения чувствительности методов, выявляющих антитела или патологические / неспецифические белки в плазме крови или тканях, взятых биопсией. *(2 балла)*
2. Для чувствительного обнаружения патологических клеток в образце ткани, взятом при помощи биопсии или в клеточной культуре? *(2 балла)* Как Вы считаете, в каких именно свойствах клеток на ранних стадиях патологии следует искать отличия от здоровых клеток того же типа? *(2 балла)*
3. Для дискриминации нормальных и патологических клеток в органе при проведении операции по удалению поврежденных или раковых клеток? *(3 балла)*

### **Миграция энергии (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

Для изучения процессов миграции энергии ученые синтезировали гибридную структуру из флуоресцентных белков. В состав гибридной структуры в равных соотношениях входят зеленый и желтый флуоресцентные белки (GFP и YFP; максимумы поглощения 465 нм и 535 нм, соответственно, максимумы флуоресценции 480 и 550 нм, соответственно).

1. Как изменится спектр флуоресценции системы при введении в гибридную структуру квантовой точки с ядром из CdS и максимумом флуоресценции 460 нм или 530 нм при возбуждении светом с длиной волны 300 нм? (3 балла) Почему? Поясните Ваш ответ. (2 балла)



### **Наногеометрия (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

Объект, представленный на фотографии (слева – вид «спереди», справа – вид в разрезе), получен путем самопроизвольного «сворачивания» биомакромолекулы в растворе.

1. Какая это биомакромолекула? (1 балл)
2. Каков принцип формирования этой структуры из подобных биомакромолекул? (2 балла)
3. Какие особенности строения этой биомакромолекулы имеют решающее значение для формирования подобной структуры? (1 балл)
4. Назовите и опишите метод синтеза этой биомакромолекулы. (1 балл)
5. Для каких целей можно использовать подобные макромолекулярные наноструктуры? (1 балл)
6. Приведите принципиальную схему строения этой макромолекулы, благодаря которой возможно самопроизвольное «сворачивания» из нее в растворе представленного на фотографии объекта (2 балла {увеличено на 1 балл}).
7. Какие еще объекты можно создавать с помощью этой технологии? (1 балл)

## Нановизуализация (2010, нанобиотехнологии и медицина)

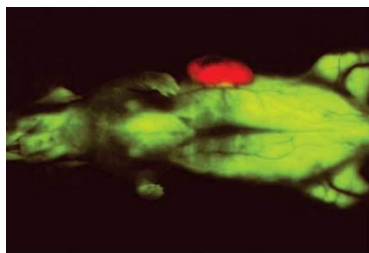


Рис. 1а

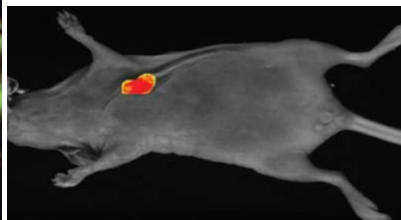


Рис. 1б

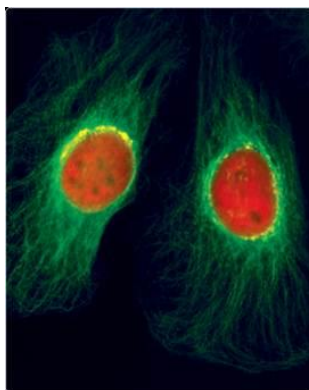


Рис. 2

На фотографиях (Рис. 1а, 1б) представлены два нанобиотехнологических метода визуализации опухоли молочной железы у мышей. В обоих случаях визуализация опухоли осуществляется при облучении животного светом с длиной волны 550-560 нм (а) и 670-690 нм (б), в результате чего опухоль начинает светиться в красной области спектра.

1. Назовите соединение, которое испускает свет в каждом случае? (1 балл)
2. Назовите метод, при помощи которого был осуществлен синтез этого соединения и укажите место его синтеза в каждом случае (2 балла {увеличено на 1 балл}).
3. Каким образом это соединение ввели в мышь в каждом случае? (1 балл)
4. Каким образом это соединение удалось доставить в опухоль молочной железы и локализовать в ней в каждом случае? (1 балл)
5. Каким образом и с использованием каких методов был смоделирован рак груди на мышах в каждом случае? (2 балла {увеличено на 1 балл})
6. Можно ли оба представленных метода визуализации опухоли использовать для диагностики опухолевых заболеваний и для каких еще целей можно использовать этот/эти метод(ы)? (1 балл {уменьшено на 1 балл})

На фотографии (Рис. 2) представлены культивируемые *in vitro* клетки линии HeLa, которые при облучении их светом с длиной волны 400 нм стали светиться в зеленой, желтой и красной областях спектра.

7. Какие соединения испускают свет? (1 балл)

8. Назовите структуры (органойды) клетки, испускающие свет. (1 балл)
9. Назовите биомакромолекулы, «помеченные» различными «цветами». (2 балла {увеличено на 1 балл}) Каким образом удалось различные структуры и биомакромолекулы клетки пометить различными «цветами»? (1 балл)
10. Какие биомакромолекулы ответственны за узнавание различных структур клетки? Каково собирательное название этих биомакромолекул? (1 балл)
11. Какие еще вы знаете биомакромолекулы, способные к специфичному «узнаванию» различных клеток и клеточных структур? (1 балл)
12. Укажите преимущества и недостатки каждой названной вами макромолекулы как молекулы, способной к специфичному «узнаванию» различных клеток и клеточных структур. (2 балла {увеличено на 1 балл})

### **Наномедицина – фокус на акромегалию (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

Акромегалия – редкое заболевание, связанное с нарушением функции передней доли гипофиза; сопровождается увеличением (расширением и утолщением) кистей, стоп, черепа, особенно его лицевой части. Вызывается выработкой чрезмерного количества соматотропного гормона.

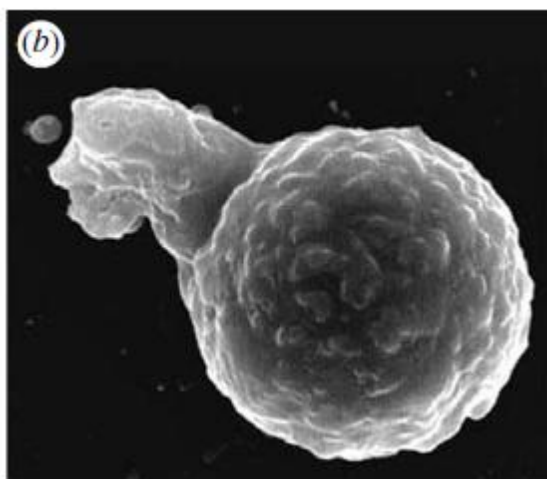
1. Укажите традиционные пути лечения данного заболевания без привлечения достижений наномедицины. *(1 балл)*
2. Гормон роста в плазме крови представлен в виде двух изоформ с молекулярными массами 20 (~10%) и 22 кДа (~90%). Оцените число аминокислотных остатков в наиболее распространенной изоформе гормона роста. *(2 балла)*
3. Укажите возможные механизмы образования двух изоформ гормона роста, если обе они кодируются одним геном. *(2 балла)*

Пегилирование (присоединение крупных фрагментов полиэтиленгликоля) к гормону роста является нанотехнологическим подходом к выработке новых лекарственных средств терапии акромегалии (в частности, препарат пегвисомант).

4. Определите число сайтов пегилирования в молекуле пегвисоманта, если молекулярная масса препарата близка к 1120 кДа, а степень полимеризации полиэтиленгликоля в каждом фрагменте составляет 5000. *(2 балла)*
5. В молекуле пегвисоманта фрагменты полиэтиленгликоля связываются со свободными аминогруппами белка, в частности с остатками аминокислоты X (число остатков в молекуле препарата равно четырем). Объясните несоответствие ответа полученного на предыдущий вопрос с числом остатков X в молекуле пегвисоманта. *(2 балла)* Определите X. *(1 балл)*
6. Укажите, какими биохимическими, физиологическими и клиническими преимуществами будет обладать пегвисомант перед препаратом естественного гормона роста? *(3 балла)*

## Нанотоксичность (2010, нанобиотехнологии и медицина)

Бурный рост нанотехнологий будет непременно сопряжен со все возрастающим воздействием наночастиц на человеческую популяцию. Поэтому необходимо понимать характер воздействия наноматериалов на организм человека для выработки стратегии предотвращения их токсического влияния на течение биохимических и физиологических процессов. В связи с этим на данный момент нанотоксикология является бурно развивающейся отраслью нанотехнологий.



*Захват макрофагом частицы титана размером 500 нм*

1. Укажите возможные пути поступления наноматериалов в человеческий организм. (2 балла)

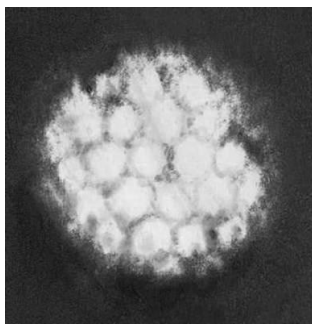
При исследовании пероральной токсичности частиц меди было выявлено, что значение показателя  $LD_{50}$  резко уменьшается при переходе от частиц микрометрового размера к наночастицам. Данный факт объясняется исследователями с позиций того, что частицы меньшего размера способны задерживаться слизистой желудка, оказывая опосредованное токсическое действие. В частности, одним из главных патологических проявлений являлось развитие метаболического алкалоза крови подопытных животных.

2. Объясните, механизм увеличения рН крови при пероральном приеме наночастиц меди, в том числе с указанием химических реакций. (3 балла)
3. Выяснено, что при уменьшении диаметра частиц меди с 17 мкм до 23,5 нм пероральная токсичность ( $LD_{50}$ ) составила 5000 и 413 мг/кг массы тела подопытного животного. Соотнесите  $LD_{50}$  указанных препаратов меди со шкалой токсичности Hodge-Sternier. (1 балл)
4. Рассчитайте значение  $LD_{50}$  для такой же линии животных в случае использования препарата частиц меди диаметром 80 нм. (2 балла)

В основе токсичности наночастиц серебра лежит интенсификация процессов перекисного окисления липидов. Это объясняется, в первую очередь, взаимодействием наночастиц серебра с остатками двух канонических аминокислот (X и Y) в составе ряда белков и пептидов. Мольные доли углерода, кислорода, азота и водорода в X и Y совпадают.

5. Определите аминокислоты X и Y (*2 балла*) и укажите, функционирование каких конкретных белков, содержащих остатки X и Y одновременно, нарушается наночастицами серебра. (*2 балла*)

## Доставка (2010, нанобиотехнологии и медицина)



*Рис. 1.*

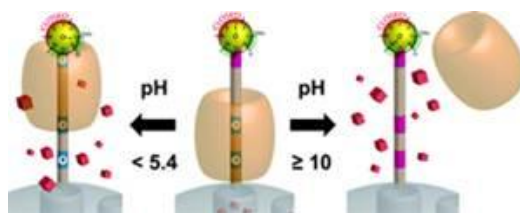
Одной из главных проблем направленной доставки лекарств с помощью наночастиц является слишком малое время их циркуляции в крови и быстрая аккумуляция в таких паренхимальных органах как печень, селезенка, почки и легкие. Ведь вероятность «узнавания» наночастицей клетки-мишени тем больше, чем дольше она путешествует по кровяному руслу в организме.

1. Как вы думаете, какова может быть максимальная продолжительность циркуляции в крови наночастиц? (1 балл)
2. Влияет ли размер наночастиц и микрочастиц на время их циркуляции в крови? ((1 балл)
3. Какие физико-химические свойства поверхности наночастиц могут влиять на продолжительность их циркуляции в крови? (1 балл)
4. Какие биологические свойства наночастиц могут влиять на продолжительность их циркуляции в кровяном русле? (1 балл)
5. Предложите способы модификации наночастиц с целью максимального увеличения времени их циркуляции в крови. (1 балл)
6. Можно ли создать наночастицы, которые бы проникали через гематоэнцефалический барьер, но не проникали через плацентарный барьер? (1 балл)
7. Можно ли создать наночастицы, которые бы проникали через плацентарный барьер, но не проникали через гематоэнцефалический барьер? (1 балл)
8. Предположите для доставки каких лекарственных веществ необходимо создание таких наночастиц. (1 балл)
9. На фотографии (рис. 1), сделанной с помощью просвечивающей электронной микроскопии, представлена наночастица вируса герпеса. Для доставки каких лекарственных и диагностических средств можно использовать этот вирус с целью лечения и диагностики опухолевых заболеваний? (1 балл)

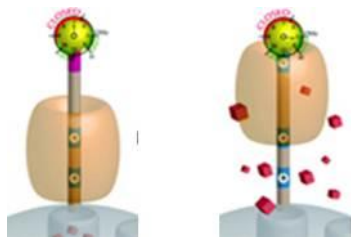
10. Для того, чтобы создать на основе этого вируса наночастицу для направленной доставки лекарственных и диагностических средств, каким образом необходимо искусственно изменить его ДНК, белковый капсид и липопротеидную оболочку? (2 балла)
11. Предположим, что у вас есть лекарственный препарат на основе наночастиц, несущих лекарственные вещества для лечения следующих заболеваний: язвенного колита, бронхиальной астмы или тубулоинтерстициального нефрита.
12. Как будет различаться процесс проникновения наночастиц в здоровые клетки кишечного эпителия, клетки легочного эпителия и клетки эпителия почечных канальцев при внутривенном введении этого препарата? (2 балла {увеличено на 1 балл}) Как упомянутые заболевания могут повлиять на процессы проникновения наночастиц в клетки этих типов? (1 балл)
13. Как упомянутые заболевания могут повлиять на процессы проникновения наночастиц в кровь при пероральном и ингаляционном введении этого препарата? (1 балл)
14. Для каких лекарственных веществ целесообразно использовать средства направленной доставки на основе наночастиц, а для каких нет? (1 балл)
15. Обоснуйте свой ответ на примерах: аспирин (ацетилсалициловая кислота), рифампицин, цисплатин, аминазин, натрия нитропруссид. (1 балл)
16. Путем изменения каких свойств наночастиц можно селективно направить их в определенный орган или ткань, не используя лиганды направленной доставки? (2 балла)
17. Можно ли путем изменения только диаметра наночастиц (например, из сополимера молочной и гликолевой кислот) направить их селективно в определенный орган или ткань? (1 балл)



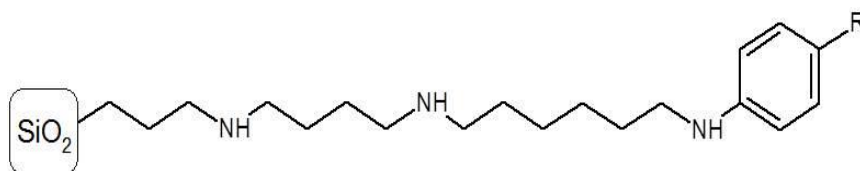
**Нанокapsулы для доставки лекарств» (2010, нанобиотехнологии и медицина, повышенной сложности)**



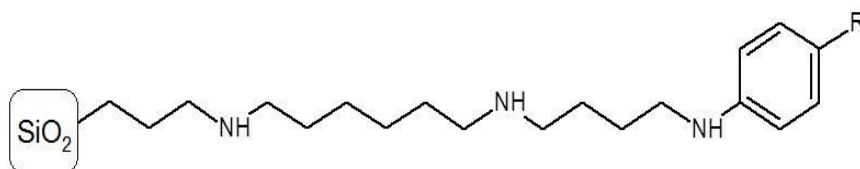
*Рис.1 - наноразмерное устройство, позволяющее высвободить модельное соединение в ответ на изменение рН окружающего раствора*



*Рис.2 - Наноклапан ("закрыто" и "открыто")*



*Рис. 3 - строение линейного аминоксодержащего фрагмента, на который насаживается подвижная часть клапана*



*Рис. 4 - при каких значениях рН клапан будет открыт и закрыт, если в качестве стержня использовать следующую структуру?*

Многие современные противораковые препараты высокотоксичны, поэтому необходима адресная доставка этих препаратов непосредственно в клетки опухоли; это позволяет избежать повреждения здоровых тканей и проявления побочных эффектов. Недавно было разработано элегантное наноразмерное устройство, позволяющее высвободить модельное соединение в ответ на изменение рН окружающего раствора (рис. 1). Лекарство загружается в мезопористые частицы оксида кремния (диаметр частицы около 130 нм). Поры на поверхности затем закрываются специальными наноклапанами, которые открываются и позволяют лекарству диффундировать наружу лишь при определенном значении рН. Сами частицы нецитотоксичны и легко поглощаются лизосомами клетки.

1. Мезопористые частицы оксида кремния получают основно-катализируемым золь-гель превращением тетраэтоксисилана в присутствии цетилтриметиламмоний бромида. Запишите уравнения протекающих при этом реакций. Кратко опишите функцию цетилтриметиламмоний бромида. (2 балла)

2. Оцените размер пор, образующихся в наночастице диоксида кремния. (1 балл)

Наноклапан представляет собой сложную ротаксаноподобную систему. На поверхность частицы оксида кремния прививается специальный линейный аминоксодержащий фрагмент, на который насаживается подвижная часть клапана – молекула циклического строения. При движении по линейному фрагменту эта молекула либо блокирует поры, располагаясь вблизи поверхности частицы, либо открывает их, перемещаясь на периферийную часть стержня (рис. 2). Линейный фрагмент имеет строение, представленное на рис. 3.

3. Схематически изобразите кривую кислотно-основного титрования модифицированных частиц диоксида кремния. (2 балла)

4. Брутто-формула подвижной части клапана –  $C_{36}H_{36}N_{24}O_{12}$ . Изобразите структурную формулу этой молекулы, приняв во внимание, что это циклический олигомер, все атомы кислорода и азота в котором магнитно эквивалентны, а в спектре CNMR имеется три сигнала. Сколько сигналов, и с каким соотношением интенсивностей будет наблюдаться в HNMR спектре этого соединения? (3 балла)

5. Переключение наноклапана между открытым и закрытым положениями происходит за счет образования и разрушения водородных связей между линейным «стержнем» и подвижным фрагментом. Принимая во внимание, что при  $pH < 4-5$  клапан открыт, при 4-5. Изобразите схемы образования водородных связей в системе наноклапана при  $pH < 4$  и при  $5 < pH < 10$ . (1 балл)

6. Укажите и аргументируйте, какая из приведенных выше границ ( $pH \approx 4-5$  или  $pH \approx 10-11$ ) будет изменяться при варьировании заместителя R в структуре стержня. (1 балл)

7. Предскажите, при каких значениях pH клапан будет открыт и закрыт, если в качестве стержня использовать структуру, приведенную на рис. 4. (1 балл)

### **Все о ГэЖаэР (2010, нанобиотехнологии и медицина, повышенной сложности)**

После открытия эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, англ. Surface-enhanced Raman scattering) и быстрого развития спектроскопии ГКР многие исследователи стали говорить о том, что в ближайшем будущем станет возможным изучение одиночных молекул в составе живых клеток. Тем не менее, применение спектроскопии ГКР для исследования изолированных макромолекул или молекул в составе живых клеток усложнено рядом особенностей метода ГКР, а именно:

1. Коэффициент усиления сигнала КР от исследуемых молекул не всегда повторяется от эксперимента к эксперименту при использовании коллоидных растворов, приготовленных по одному способу, но в разное время;
2. Коллоидные растворы золота или серебра, приготовленные различными способами, могут по-разному усиливать полосы спектра КР исследуемых молекул, в результате чего получаемые спектры ГКР одних и тех же молекул отличаются друг от друга.
3. Спектр ГКР молекулы, попадающей между несколькими наночастицами (так называемая “горячая точка” - hot spot) отличается от спектра ГКР той же самой молекулы, находящейся на поверхности только одной частицы;
4. Изменение ориентации молекулы относительно наночастицы может привести к изменению спектра ГКР.

Вопрос:

1. Чем объясняются перечисленные выше особенности спектроскопии ГКР? *(по 2 балла за правильный ответ на каждый пункт)*
2. Какие наночастицы по размерам и форме будут давать наибольшее усиление КР молекул и почему? *(2 балла)*
3. Как проверить, что приготовленные наночастицы будут усиливать сигнал КР исследуемых молекул при известной длине волны возбуждения? *(1 балл)*
4. Какие наночастицы, по Вашему мнению, лучше использовать при работе с живыми клетками? *(1 балл)*
5. Представьте, что исследуемые Вами клетки поглощают наночастицы и Вы зарегистрировали отличающиеся спектры ГКР от разных участков клетки. Опишите анализ полученных спектров ГКР. Как Вы докажете, что наблюдаемые отличия в спектрах ГКР связаны со свойствами клетки, а не являются артефактами, вызванными различной агрегацией наночастиц в разных участках клетки или разной ориентацией молекул относительно наночастиц? *(3 балла)*

Известно, что методическими ограничениями спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) в клеточной биологии, биофизике и биохимии являются низкие концентрации исследуемых молекул и/или клеток, а также возможное повреждающее действие лазера на объект. Таким образом, важной задачей становится использование методов, позволяющих исследовать свойства молекул, изолированных или находящихся в клетках, при низких концентрациях и неповреждающих мощностях лазеров. Вы задумали использовать SERS в биологическом эксперименте.

6. Укажите, какими характеристиками (элементарный состав, размер, форма, покрытие и т.д.) должны обладать наночастицы благородных металлов для того, чтобы можно было зарегистрировать сигнал SERS от основных компонентов живой клетки (белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот). При каких условиях можно получить максимальное усиление сигнала КР? *(3 балла)*
7. Вы получили коллоидный раствор наночастиц серебра или золота. Непосредственное добавление коллоидного раствора к клеткам или раствору исследуемых ферментов приведет к существенному изменению ионного состава среды и как следствие, вызовет изменение функционального состояния клеток и ферментов. Как можно избежать негативного действия коллоидного раствора на исследуемый объект без уменьшения усиления сигнала КР? *(2 балла)*
8. Вы получили нужные наночастицы и приступаете к исследованию. Ваш объект – культура клеток, обладающих активным эндоцитозом. Первая задача: на живых интактных клетках с применением полученных наночастиц исследовать конформацию и свойства порфирин-содержащих белков дыхательной цепи митохондрий в присутствии и отсутствии блокаторов дыхательной цепи. В Вашем распоряжении – КР-микроскоп с конфокальной системой и с характеристиками по Вашему выбору. Детально опишите постановку, условия и ход эксперимента, а также трактовку полученных результатов. *(2 балла)* Как определить, что при исследовании клетки остались живыми и их свойства не изменились? *(1 балл)*  
Вторая задача – с использованием оптимальных наночастиц наиболее широко охарактеризовать все процессы в клетках, индуцированные неким внешним воздействием. Опишите для обеих задач, какие наночастицы следует использовать. *(2 балла)*
9. Какие еще типы биосенсоров, содержащих наночастицы, можно сделать? *(2 балла)*

## Пептидные нанотрубки (2010, нанохимия и функциональные наноматериалы)

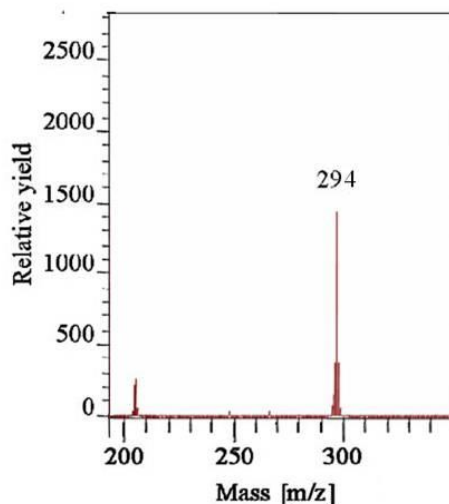


Рис.1. Масс-спектрометрический анализ веществ на поверхности.

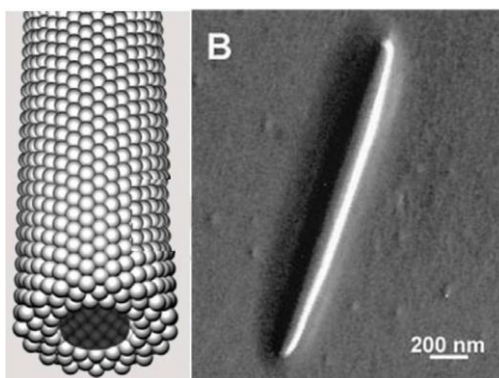


Рис.2. Пептидная нанотрубка

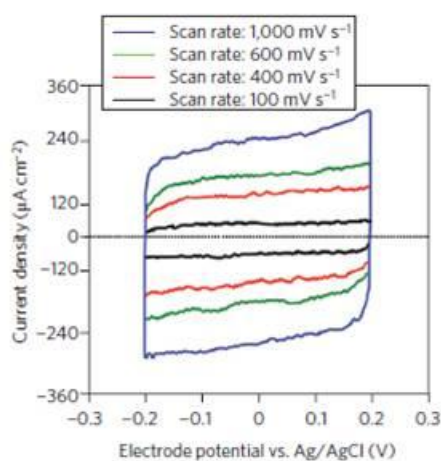


Рис.3. Циклическая вольтамперограмма, полученная на графитовом электроде, покрытом пептидными нанотрубками.

Интересным и весьма экзотическим аналогом известных всем углеродных нанотрубок являются пептидные нанотрубки, в том числе полученные методом осаждения из газовой

фазы и состоящие из ароматических дипептидов, например  $\text{NH}_2\text{-Phe-Phe-COOH}$  и  $\text{NH}_2\text{-Phe-Trp-COOH}$ .

1. Предложите схему химического синтеза дипептида  $\text{NH}_2\text{-Phe-Trp-COOH}$ . (3 балла)  
После нанесения на поверхность дипептида  $\text{NH}_2\text{-Phe-Phe-COOH}$  из газовой фазы, состав веществ на поверхности был проанализирован с помощью времяпролетной ионной масс-спектрометрии. Был получен следующий спектр (Рис.1).

2. Как Вы можете объяснить этот спектр? Изобразите схему изменений, произошедших с дипептидом. (2 балла)

При осаждении из газовой фазы произошла самоорганизация вещества, в результате чего получились нанотрубки (Рис. 2). Было показано, что внешний диаметр таких нанотрубок достигает 100-150 нм, а внутренний около 20 нм.

3. За счет каких типов взаимодействий произошел процесс самоорганизации в данном случае? Объясните ваше предположение с термодинамической точки зрения. (2 балла)

4. Предложите хотя бы один способ доказательства структуры полученных образований, а именно то, что были получены полые трубки с открытыми концами. (1 балл)

Пептидные нанотрубки обладают одним безусловным преимуществом – они являются биосовместимыми. Однако в живых системах они будут подвергаться деградации разными ферментами класса пептидаз.

5. Как можно изменить (модифицировать) пептидные нанотрубки для предотвращения их ферментативной деградации? (2 балла)

Графитовый электрод с рабочей поверхностью  $0,125 \text{ см}^2$  был покрыт пептидными нанотрубками, так что получился ультраконденсатор, и затем была для этого ультраконденсатора получена циклическая вольтамперограмма (рис. 3).

6. Оцените емкость двойного электрического слоя, получившегося при нанесении пептидных нанотрубок на графитовый электрод. (2 балла)

### **Голливуд спешит на помощь (2010, задачи для начинающих)**

Несмотря на растущее число новых методов и приборов, биологи по-прежнему остаются ограниченными в своих возможностях исследовать наномир сложных и взаимосвязанных процессов, протекающих в клетках. Единственным способом “перешагнуть” через ограничения методов является моделирование клеточных процессов и визуализация взаимодействующих макромолекул *in silico*. В ноябре 2009 года в журнале Nature появилось сообщение о том, что Голливуд будет помогать ученым в создании сложных биологических моделей, используя программное обеспечение Pixar, на котором, как известно, были нарисованы анимационные фильмы Шрек и Шрек-2 и 3.

1. Приведите примеры биологических объектов, которые можно отнести к категории нанообъектов. Аргументируйте свое мнение. (3 балла)
2. Какие анимационные фильмы – модели о наномире внутри клеток - создали бы Вы вместе с Голливудом? (1 балл)
3. Что нужно сделать, чтобы проверить созданную Вами модель на соответствие реальным процессам? (1 балл)
4. Как все это экспериментально увидеть? (2 балла)
5. Для ответов на какие научные вопросы Вы бы использовали созданную модель? (3 балла) Все ответы обоснуйте и приведите соответствующие примеры.

## Нанолечение замедленного действия (2010, задачи для начинающих)



### *Схематическое изображение пористой гранулы с лекарством*

Практически все современные лекарственные препараты очень быстро разносятся кровотоком по всем человеческим органам и лишь малая часть лекарства действительно попадает в очаг болезни, остальное просто выводится из организма. Как правило, медицинские препараты обладают побочными эффектами, поэтому их дозы строго ограничены, и, в итоге, в клетки, нуждающиеся в лекарстве, попадает лишь его малая часть. Чтобы решить эту проблему, ученые применили принципиально новый подход: они придумали направленную (или «векторную») доставку лекарств. Препарат помещают в контейнеры, которые соединены с белками, «узнающими» ту или иную группу клеток. Белки выступают в роли «пропуска», проводника – почтальона или «адреса» на почтовом конверте. В результате лекарство попадает именно туда, куда нужно, где выходит из своих капсул и за счет этого не отравляет другие органы.

1. Обеспечение выхода действующего вещества в строго определенный момент времени — одна из важнейших задач этого метода. Какие физические и химические механизмы (подходы) можно использовать для решения этой проблемы? (5 баллов)
2. Примером контейнера для доставки лекарств может служить небольшая гранула из пористого неорганического вещества, например, кремния. Поры гранулы будут заполнены лекарством и его диффузия в клетку будет проходить медленно. Какими свойствами должна обладать лекарственная жидкость-препарат с точки зрения решаемой задачи? Приведите примеры таких жидкостей. (2 балла)
3. Какие материалы для контейнеров Вы можете предложить; объясните Ваши предложения. (3 балла)
4. Оцените размер пор в пористой грануле (см. рисунок), при котором характерное время выхода лекарства равняется неделе. Размер гранулы – 200 нм, коэффициент



взаимной диффузии  $1.8 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с, коэффициент поверхностного натяжения на границе препарат-вода 120 мН/м, молярная масса препарата 62 г/моль. Плотность препарата считать равной плотности воды. (5 баллов)

### **Цитотоксичность наноматериалов (2010, школьники, региональный тур)**

В последнее время в связи с развитием нанотехнологий и расширением использования нанокompозитных материалов актуальным стала оценка воздействия этих наноматериалов на биологические объекты. Благодаря малым размерам частиц, из которых состоят наноматериалы, значительно увеличивается площадь поверхности вещества, что часто приводит к значительному изменению свойств наноматериалов по сравнению с материалами, произведенными из аналогичных веществ, но не являющихся наночастицами или не обладающими наноструктурой.

1. Каким образом наночастицы могут воздействовать на организм? *(1 балл)*
2. Укажите причины возможной токсичности наночастиц. *(2 балла)*
3. Где наночастицы могут накапливаться в организме? *(2 балла)*
4. Каким образом может осуществляться транспорт различных соединений – воды, ионов, низкомолекулярных органических соединений, лекарственных веществ, макромолекулярных комплексов, наночастиц – внутрь клетки? *(1 балл)*
5. На какие типы можно разделить механизмы переноса через мембрану? *(1 балл)*  
(выбирайте и потом описывайте наилучший вариант)
6. Как должны быть модифицированы молекулы или нанокomплексы, которые необходимо ввести внутрь клетки? *(2 балла)*

## Очный тур (2010, школьники, биология)

### Вариант 1. Вариативная часть по контролю общих знаний по биологии

*(если Вы решили не все задания – ничего страшного, главное – покажите, что Вы знаете основы биологии)*

1. Напишите кратко, какую роль играет биология в развитии нанотехнологий и приведите примеры и другие обоснования, подтверждающие Ваше мнение. *(3 балла)*
2. Прионы, вызывающие неизлечимые поражения центральной нервной системы, типа бешенства коров и др., являются *(1 балл)*:
  - 1) особыми вирусами
  - 2) бактериями
  - 3) простейшими паразитами
  - 4) белками
  - 5) эукариотами
  - 6) плазмидами
  - 7) липосомами
  - 8) пористыми неорганическими наночастицами

Отметьте **один** наиболее правильный из предложенных вариантов (и, чтобы это не было случайным угадыванием, поясните Ваш выбор).

3. К какой из следующих групп организмов относится эвглена зеленая *(1 балл)*:
  - 1) фотоавтотрофы
  - 2) хемоавтотрофы
  - 3) хемогетеротрофы
  - 4) миксотрофы

Отметьте **один** наиболее правильный из предложенных вариантов (и, чтобы это не было случайным угадыванием, поясните Ваш выбор).

4. За счет чего образуется металлический блеск хитинового панциря жуков (например, *Cetonia aurata*)? *(2 балла)*
5. Существует такое заболевание как серповидно-клеточная анемия, приводящая к сильным изменениям формы эритроцитов. За счет чего изменяется форма эритроцитов? Как это сказывается на их функциях? *(3 балла)*
6. Для совершения полезной работы бионанороботы (гипотетически) должны получать энергию. Может ли питание таких роботов в организме осуществляться за счет (а) энергии тепловых движений молекул, (б) АТФ и других макроэргических соединений, (в) поглощения квантов света, (г) ионных градиентов на

плазматических мембранах и мембранах органоидов клетки. Для каждого из пунктов: если да, то предложите структуру для питания роботов таким способом и ограничения, накладываемые на роботов в связи с таким типом получения энергии. Как еще можно решить вопрос энергообеспечения нанороботов? (*сложные задачи, 9 баллов*)

### Вариант 2. Вариативная часть по контролю общих знаний по биологии

(если Вы решили не все задания – ничего страшного, главное – покажите, что Вы знаете основы биологии)

1. Напишите кратко, какую роль играет биология в развитии нанотехнологий и приведите примеры и другие обоснования, подтверждающие Ваше мнение. (*3 балла*)
2. С демиелинизацией связано заболевание (*1 балл*):
  - 1) болезнь Паркинсона
  - 2) волчанка
  - 3) болезнь Хантингтона
  - 4) рассеянный склероз
  - 5) грипп
  - 6) ангина

Отметьте **один** наиболее правильный из предложенных вариантов (и, чтобы это не было случайным угадыванием, поясните Ваш выбор).

3. Какие из этих органоидов не содержат собственную ДНК (*1 балл*):
  - 1) митохондрии
  - 2) хлоропласты
  - 3) комплекс Гольджи
  - 4) ядро

Отметьте **один** наиболее правильный из предложенных вариантов (и, чтобы это не было случайным угадыванием, поясните Ваш выбор).

4. Почему у млекопитающих кровь красного цвета? У каких животных она другого цвета и почему? (*2 балла*)
5. Фермент, утилизирующий молекулярный азот у цианобактерий, работает в строго восстановительных условиях. Но цианобактерии сами выделяют O<sub>2</sub>. Какими способами они обеспечивают работу данного фермента? (*3 балла*)

6. Какими особенностями должен обладать наноробот, чтобы успешно выполнять свои функции в живом организме, обоснуйте Ваше мнение? *(сложные задачи, 7 баллов)*

Вариант 3. Вариативная часть по контролю общих знаний по биологии

(если Вы решили не все задания – ничего страшного, главное – покажите, что Вы знаете основы биологии)

1. Напишите кратко, какую роль играет биология в развитии наномедицины и приведите примеры и другие обоснования, подтверждающие Ваше мнение. *(3 балла)*
2. Эритроциты млекопитающих имеют форму двояковогнутого диска. Какие факторы не являются важными для ее существования (1 балл)?
- 1) Обтекаемая форма для быстрого передвижения в кровотоке
  - 2) Увеличенная площадь поверхности для быстрого обмена транспортируемых газов
  - 3) Возможность деформации в мелких капиллярах
  - 4) Наличие ямки для плотной упаковки большого числа эритроцитов
  - 5) Наличие соединений железа

Отметьте **один** наиболее правильный из предложенных вариантов (и, чтобы это не было случайным угадыванием, поясните Ваш выбор).

3. Для какой из групп прокариот можно привести пример многоклеточного организма *(1 балл)*:
- 1) археи
  - 2) грамположительные бактерии
  - 3) грамотрицательные бактерии
  - 4) цианобактерии

Отметьте **один** наиболее правильный из предложенных вариантов (и, чтобы это не было случайным угадыванием, поясните Ваш выбор).

4. Весной у многих листопадных растений первые листочки имеют красноватый оттенок. За счет чего он возникает и для чего это может быть нужно растениям? *(2 балла)*
5. Каким образом макрофаги и лимфоциты (Т-киллеры) узнают свою жертву? *(3 балла)* Узнают ли они наночастицы (ответ поясните)? *(1 балл)*

6. Вирусы – это природные «нанороботы». «Рабочий цикл» вирусов запрограммирован в их ДНК или РНК. Для правильной работы этого цикла нужно, чтобы определенные стадии включались в нужной последовательности. Каким образом это реализуется? Вы создаете искусственный наноробот на основе вируса. Перед Вами стоит задача отредактировать его программу так, чтобы он выполнял только нужные Вам функции. Какими методами Вы можете видоизменять и отлаживать программы такого наноробота? *(сложные задачи, 7 баллов)*

### Сложные задания

(если Вы решили не все задания – ничего страшного, главное – решать их на хорошем уровне, показывающем Ваши знания и эрудицию в биологии. Задания можно решать в любом порядке, а также частями, за все верные ответы по теме начисляются баллы)

1. Что представляет собой жгутик клетки про- и эукариотного организмов? Который из них можно уподобить молекулярному мотору и почему? *(7 баллов)*
2. Расположите в порядке увеличения размера основные «составляющие части» любой выбранной Вами клетки. Баллы определяются количеством перечисленных элементов, правильностью расположения диапазонов их размеров и сопутствующими необходимыми пояснениями. *(7 баллов)*
3. Коллоидные растворы наночастиц серебра планируют широко использовать в медицине. В настоящее время уже выпущено несколько лекарственных препаратов, содержащих коллоидное серебро. Перед клиническим использованием любого лекарства всегда проводят эксперименты *in vitro* и *in vivo*, чтобы оценить возможный токсический эффект препарата, время и пути его выведения из организма.

Представьте, что есть три препарата раствора коллоидного серебра: (1) спрей для орошения полости носа, (2) мазь для наружного применения и (3) раствор для внутривенного введения.

Опишите:

- 1) Каким образом наночастицы каждого из указанных препаратов будут выводиться из организма?
- 2) В каких клетках, тканях и органах может идти накопление наночастиц серебра, которые не были выведены из организма?
- 3) Предположите, для лечения/профилактики каких заболеваний может быть использован каждый препарат и оцените преимущества, недостатки и безопасность его использования.

(9 баллов)

4. Как Вы считаете, клетки врожденного или приобретенного иммунитета могут поглощать наночастицы серебра или золота, попавшие в организм? Аргументируйте Ваш ответ и опишите способы поглощения наночастиц иммунными клетками. (7 баллов)

5. Известно, что плазматическая мембрана живых клеток состоит из бислоя липидов и белков – интеральных, пронизывающих липидный бислой, и периферических – расположенных на внешней или внутренней поверхностях мембраны. Молекулы фосфолипидов, из которых состоит мембрана, могут отличаться по форме: иметь форму перевернутого конуса (большая полярная головка, маленький по площади гидрофобный хвост), цилиндра (полярная головка и гидрофобные хвосты равны по площади), и конуса (маленькая полярная головка, объемный гидрофобный хвост).

Кроме того, под мембраной расположен мембранный кортекс, или цитоскелет, образованный белками, участвующий в поддержании жесткости мембраны и образовании различных впячиваний и выпячиваний.

Какой состав должны иметь искусственные мембранные системы для формирования плоского бислоя и мембранных везикул с большой кривизной – липосом? В каком случае бислой формироваться не будет? Для изменения формы клетки и для образования пузырьков при экзо и эндоцитозе необходимо изменять кривизну мембраны – делать ее выпуклой или вогнутой. Какие механизмы могут лежать в основе образования участков мембраны с большой кривизной? (7 баллов)

6. Оцените возможности и перспективы использования (предложив работающую конструкцию) солнечных батарей из хлорофилла и/или бактериородопсина, сравнив с обычными солнечными элементами. Какие принципы лежат в основе действия таких элементов? (9 баллов)

7. Почему у растений существует две фотосистемы, а не одна? Баллы начисляются за корректное обоснование ответа и количество перечисленных особенностей и способов регуляции эффективности фотосинтеза. (7 баллов)

8. Рассмотрите возможность доставки лекарств в организме с помощью спор грибов, спор мха, цветочной пыльцы, вирусов, комплексов из ДНК или РНК, липосом, фуллеренов. Обоснуйте возможности использования этих объектов в наномедицине с учетом строения и функциональных возможностей как «контейнеров» лекарств, возможности «программируемой доставки» к заданным целям, токсичности и биodeградируемости. (7 баллов)

9. Что такое биосенсор? Дайте определение нанобиосенсора и приведите примеры возможного использования биосенсоров и нанобиосенсоров. (7 баллов)

10. ДНК – очень популярная система для молекулярного конструирования. Имея большую длину и нанометровую толщину, она находит применение в самых разных областях науки. Рассмотрим это на различных примерах.

Цепь ДНК построена на фосфодиэфирных связях. Предположите, как изменится устойчивость ДНК к действию кислот или щелочей при использовании вместо фосфора кремния и серы (соответствующие силикаты и сульфаты). Почему Природа избрала именно фосфор? (2 балла)

Как известно, генетический код сформирован 4 нуклеотидами, которые триплетно кодируют аминокислоты и сигналы синтеза (старт, стоп). Кодировка аминокислот вырождена, однако, это не мешает матушке - Природе. Предположим, что азотистых оснований в ДНК будет только три. Опишите механизмы репликации и трансляции в этом случае, считая, что для кодирования аминокислоты требуется по-прежнему 3 нуклеотида. (3 балла)

Ваша вторая цель – создать долговременную память на основе ДНК, которую предполагается использовать в вычислительной технике, основанной на двоичном коде. Предложите, как её можно описать, назначив смысловые значения байтов в двоичной системе. Предположите схемы с использованием трёх и четырёх разных азотистых оснований ДНК. (4 балла)

Считая размер (диаметр) клетки 10 мкм, а общее количество её генетического кода в 3 Гбаз ( $3 \cdot 10^9$  оснований) и учитывая, что генетическая информация хранится в виде ДНК, рассчитайте плотность записи информации (байт/мм<sup>2</sup>) если для записи используется троичная система (3 символа кодируют 1 байт) или четвертичная системы счисления. При считывании информация конвертируется в двоичную систему. (5 баллов)



## Очный тур (2011, школьники, биология)

### Вариативный блок простых задач

1. **Мозг, мозг...** Одно из перспективных направлений нейробиологии – использование стволовых нервных клеток для лечения травм и различных патологий мозга, связанных с гибелью нейронов. Эксперименты показывают, что подсаживание стволовых клеток в область поражения приводит к частичному замещению мертвых нейронов новыми, дифференцировавшимися из стволовых клеток. Однако существенным затруднением является то, что стволовые клетки плохо проникают в глубокие слои мозга и остаются преимущественно на поверхности, что снижает диапазон их возможного применения.

- 1) Как при помощи наноматериалов (укажите, каких и почему) можно улучшить проникновение стволовых клеток в глубокие слои мозга? (2 балла)
- 2) Как достичь направленности в движении стволовых клеток именно к поврежденным участкам? (2 балла)
- 3) Что помогает нейрональным стволовым клеткам “ползти” в нужные места? (2 балла)

2. **Катись, катись, «колобок»!** Научившись создавать структуры, похожие на клеточные органоиды, люди теперь стремятся ими управлять. Самые простые структуры – это везикулы, пустые или наполненные нужным компонентом.

- 1) В живых клетках везикулы передвигаются по элементам цитоскелета, а как заставить направленно передвигаться искусственные везикулы? (2 балла)
- 2) Предложите модель строения такой везикулы и поясните, каким образом можно управлять ее передвижением. (2 балла)
- 3) Как это можно использовать на практике? (2 балла)

3. **Визуализация раковых опухолей.** В последнее время одними из перспективных экспериментальных методов в биологии для ранней диагностики опухолей являются системы неинвазивной молекулярной визуализации.

- 1) Как вы думаете, какие оптические свойства биологической ткани в ближней инфракрасной области лежат в основе этого метода? (2 балла)

Для визуализации опухолей требуются стабильные, высокоспецифичные и чувствительные флуоресцентные зонды. Синтезируемые на основе наночастиц зонды могут преодолеть некоторые ограничения обычных органических красителей.

- 2) Опишите идеальный «нанотехнологический» биомаркер и его свойства для практической визуализации опухолевых тканей человека (2 балла).

- 3) Для *каких* медицинских методов визуализации *какие* контрастирующие агенты применяют уже сейчас или могут быть использованы в ближайшем будущем? (2 балла)
4. **Зеленые солнечные батареи.** Известно, что эффективность разделения заряда фотосинтетическими реакционными центрами близка к 100%. Высокий квантовый выход позволяет рассматривать их в качестве перспективных фотопреобразователей световой энергии в электрическую. Расчеты показывают, что при использовании таких природных «генераторов» коэффициент полезного действия фотопреобразователя может быть существенно выше, чем у лучших современных солнечных батарей.
- 1) Предложите модель солнечной батареи на основе фотосинтетических реакционных центров. (2 балла)
  - 2) Какие достоинства и недостатки могут быть у такого прибора? (2 балла)
  - 3) Какие современные наноматериалы могут быть использованы для создания и оптимизации таких солнечных батарей? (2 баллов)
5. **На расстоянии.** Оптические спектры, которые называются спектрами комбинационного рассеяния, могут «почувствовать» изменения конфигураций некоторых биомолекул в живой клетке без ее разрушения, то есть, например, через мембрану клетки, на расстоянии до 20 – 30 нм. Для этого необходимо использовать наночастицы серебра или золота, которые очень близко подходят к мембране.
- 1) Как Вы думаете, для каких клеток и почему такой метод диагностики будет точно приемлем, а для каких – нет? (2 балла)
  - 2) Для исследования каких клеточных компонентов и структур можно использовать этот метод и почему? (2 балла)
  - 3) Как можно расширить диапазон исследуемых клеточных структур с использованием данного метода? (2 балла)
6. **Радиоактивное поражение.** В медицине в ряде случаев используют диагностику с помощью радиоактивного изотопа технеция, в том числе - в перспективе – с использованием наночастиц и капсул, как носителей. Как известно, радиоактивность очень опасна для генетического аппарата клеток.
- 1) Будет ли в этом отношении радиоактивность опасна для красных и белых кровяных телец? Фагоцитов? Аксонов? Остеобластов? Стволовых клеток? (3 балла)
  - 2) Опишите кратко функции в организме перечисленных групп клеток. (3 балла)

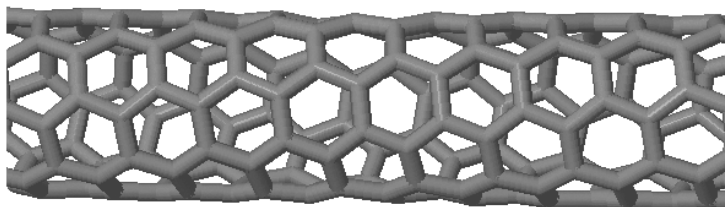
7. **Нанотоксикология.** К одному из наиболее распространенных опасений в отношении рисков наноматериалов для здоровья человека относится их способность проникать внутрь клеток (к их жизненно – важным органеллам). Каковы могут быть механизмы проникновения наночастиц в клетки в зависимости от их размера, формы, химического состава, заряда и какие процессы могут вызвать (запустить) такие наночастицы? *(6 баллов)*
8. **Аргирия.** При длительном поглощении человеком соединений серебра внутрь, в том числе наночастиц, может развиваться заболевание аргирия, при котором одним из ярких внешних признаков является резкое изменение цвета кожных покровов. Можете ли Вы объяснить причины изменения цвета? *(2 балла)*  
Оцените опасность этого заболевания и возможность поражения различных органов, а также вероятность того, что заболевание пройдет само собой при прекращении попадания соединений серебра в организм (предположите, за счет каких процессов организм мог бы «самоочиститься» от серебра). *(4 балла)*
9. **Вирусы.** Чем механизм проникновения дендримеров в клетку может быть похож на проникновение в клетку вирусов? *(4 балла)* Для чего это можно использовать на практике? *(2 балла)*
10. **Изменчивость формы.** Эритроциты млекопитающих - красные кровяные клетки – имеют форму двояковогнутого диска. Однако иногда они могут принимать и другую форму.
- 1) Почему большинство эритроцитов млекопитающих имеют форму двояковогнутого диска? *(1 балл)*
  - 2) Опишите, какие формы и в каких условиях (по каким причинам) принимают эритроциты? *(1 балл)*
  - 3) Какие еще клетки (в человеческом организме и вообще в природе) могут принимать различные формы и для чего они это делают (приведите примеры)? *(2 балла)*
  - 4) За счет каких клеточных структур обеспечивается изменение морфологии клеток? *(2 балла)*
11. **Нанороботы.** Представьте, что медиками и учеными созданы нанороботы, которые циркулируют в кровеносном русле и лимфе и способны проникать в ткани, где обнаруживают раковые клетки и их уничтожают.
- 1) Каким требованиям должны отвечать такие нанороботы? *(1 балл)*
  - 2) Предложите способы их «подзарядки» для обеспечения работы и выведения из организма после «выхода из строя». *(2 балла)*

- 3) Как проверить, накапливаются они или нет в каких-то тканях и органах и не обладают ли токсическим действием? (2 балла)
- 4) Как оценить эффективность их работы? (1 балл)

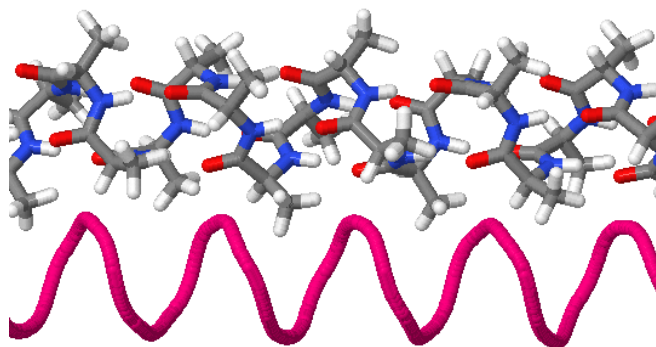
### Сложные задачи

1. **Нанообъекты в зазеркалье.** Хиральность – свойство объекта быть несовместимым со своим зеркальным отражением любой комбинацией поворотов и перемещений в трехмерном пространстве, как, например, правая и левая рука. Два таких зеркальных отражения молекулы называются энантиомерам. В органической химии хиральность обычно связана с асимметрично замещенным атомом углерода (4 различных заместителя), однако в наномире существуют и другие типы хиральности.

- 1) За счет чего возникает хиральность нанотрубок? (2 балла)






- 2) На рисунке приведена  $\alpha$ -спираль L-аланина. Опишите, каким будет ее энантиомер? Как изменится ответ, если в такой  $\alpha$ -спирали заменить L-аланин на глицин ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ )? (3 балла)



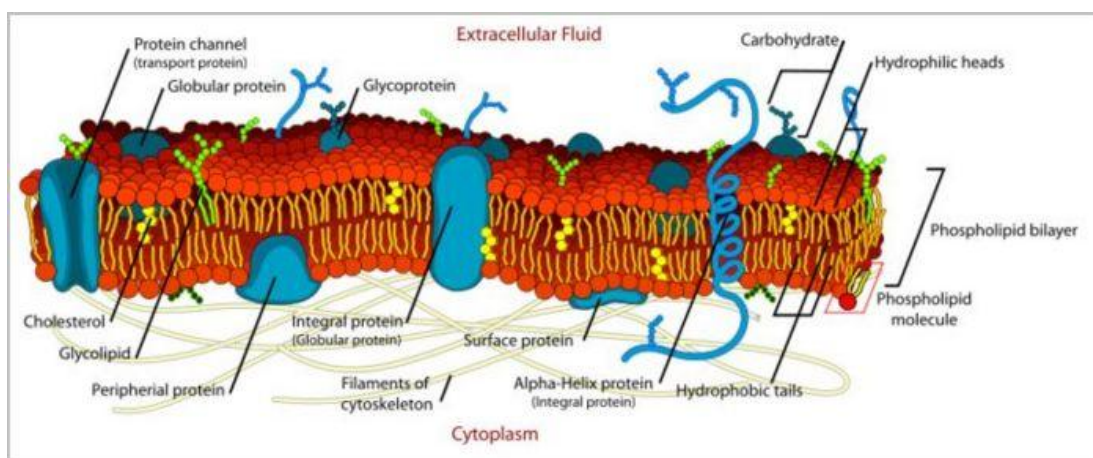
- 3) Могут ли энантиомеры из п. 1, 2 по-разному воздействовать на биологические объекты и почему? (2 балла) С какими тканями человеческого организма и как эти объекты будут в первую очередь взаимодействовать при пероральном, назальном, трансдермальном введении? (4 балла)

2. **Бислой.** Известно, что плазматическая мембрана живых клеток состоит из бислоя липидов и белков – интеральных, пронизывающих липидный бислой, и

периферических – расположенных на внешней или внутренней поверхностях мембраны. Молекулы фосфолипидов, из которых состоит мембрана, могут отличаться по форме: иметь форму перевернутого конуса (большая полярная головка, маленький по площади гидрофобный хвост), цилиндра (полярная головка и гидрофобные хвосты равны по площади), и конуса (маленькая полярная головка, объемных гидрофобный хвост).

Лизофосфолипиды		Перевернутый конус
Фосфатидилхолин Сфингомиелин Фосфатидилсерин Фосфатидилинозитол		Цилиндр
Фосфатидилэтаноламин Моногалактозилдиглицерид		Конус

Кроме того, под мембраной расположен мембранный кортекс, или цитоскелет, образованный белками.



- 1) Какой состав должны иметь искусственные мембранные системы для формирования плоского бислоя (2 балла) и мембранных везикул с большой кривизной – липосом? (2 балла) В каком случае бислои формироваться не будут? (2 балла)
- 2) Для изменения формы клетки и для образования пузырьков при экзо- и эндоцитозе необходимо изменять кривизну мембраны – делать ее выпуклой или вогнутой. Какие механизмы могут лежать в основе образования участков мембраны с большой кривизной? (3 балла)

3. **Токсины.** Основные симптомы многих заболеваний (дифтерия, коклюш, холера, ботулизм, столбняк) являются результатом действия токсинов, производимых (микро)организмами. Многие из самых сильных ядов принадлежат к бактериальным токсинам. Однако токсины, как правило, весьма лабильны (теряют токсические свойства, например, при нагревании). Действие токсинов может заключаться в разрушении клеток, нарушении их работы, изменении нормальной передачи сигналов.

- 1) Что представляют собой вырабатываемые бактериями токсины, приведите известные Вам примеры? (2 балла)
- 2) С какой целью они вырабатываются бактериями, если известно, что различные токсины нарушают работу клеток как в месте обитания бактерий, так и сравнительно далеко от него, а также могут действовать не только на животных? (2 балла)
- 3) Бактериальные токсины представляют собой довольно совершенное нанотехнологическое изобретение и состоят из нескольких частей. Как вы думаете, какую функцию выполняет каждая из них в человеческом организме? Где это может найти практическое применение? (3 балла)

Некоторая болезнь вызывается определенной бактерией, попадающей в организм человека с пищей. Данная бактерия поселяется в кишечнике и начинает вырабатывать токсин, попадающий в кровь и вызывающий отравление.

- 4) Приведите, по крайней мере, 3 общеизвестных примера использования нанообъектов для борьбы с такой болезнью. Предложите еще несколько способов лечения с использованием нанотехнологий. При этом укажите, на что направлено действие лекарства в каждом конкретном случае, и каким будет способ его введения. (3 балла)
- 5) В Вашем распоряжении есть выделенный токсин. Каким образом его надо использовать и как сделать "лекарство" для защиты от возможного отравления человека этим токсином в будущем, если это возможно? (2 балла)

Ботулотоксин – один из наиболее сильных ядов, вырабатывается бактерией рода клостридий в анаэробных условиях, и может накапливаться в некоторых продуктах питания, например в консервах и колбасах. Ключевой стадией молекулярного механизма токсического действия является «разрезание» критического для функционирования клетки белка SNAP25.

б) На какой (какие) тип (типы) клеток действуют самые сильные бактериальные токсины? (2 балла)

7) Процедура выявления бутулотоксина требует много времени и включает в себя опыты над животными. Придумайте и кратко опишите схему (использованные компоненты, как это работает) определения этого токсина с использованием нанотехнологий. При этом учтите, что, поскольку бактериальные токсины относятся к самым сильным ядам (смертельная доза составляет десятки нанограмм на килограмм), необходимо уметь детектировать крайне низкие концентрации токсина. (2 балла)

4. **На пути к искусственной клетке.** В 2010 году ученым удалось синтезировать искусственный геном и пересадить его в чужеродную бактерию, получив при этом полноценную «синтетическую клетку», управляемую только этим геномом. А пока научное сообщество обсуждает перспективы этого открытия, вспомним о других видах «искусственных клеток» - образованиях, выполняющих функции, присущие определенным клеткам организма.

Первые искусственные клетки нашли применение в процессе гемоперфузии – эффективной очистки крови от содержащихся в ней токсинов. Такие клетки представляют собой частицы активированного угля, заключенные в полимерную полупроницаемую оболочку толщиной около  $500\text{\AA}$ . Суммарная площадь поверхности таких капсул составляет около  $2\text{ м}^2$  (для аппарата объемом около 0.3 л).

1) Функции клеток какого органа выполняют в процессе гемоперфузии такие капсулы? (2 балла)

2) Кратко укажите преимущества описанной системы перед: а) классической установкой для гемодиализа (очистка осмосом через мембрану толщиной 5 мкм) и б) пропусканием крови через колонку, наполненную активированным углем, не инкапсулированным в полимерную оболочку. (3 балла)

Помимо сорбента, в полимерную капсулу могут заключаться ферменты, ферменные системы для осуществления каскадных реакций, целые клетки и даже группы клеток (включая стволовые – зародыши искусственных органов). Покрытые полупроницаемой мембраной, клетки получают необходимые для своей жизнедеятельности питательные вещества, но защищены от непосредственного контакта с иммунной системой организма, что снижает риск отторжения.

Согласно одному из методов инкапсулирования:

А) Микрокапли суспензии клеток в растворе альгината натрия (альгиновая кислота – полисахарид, содержащий карбоксильные группы) через тонкую иглу с большой скоростью подаются в осадительную ванну (раствор хлорида кальция).

Б) После промывания буферным раствором полученные частицы суспендируют в растворе альгината натрия и вновь подают в раствор хлорида кальция, но с меньшей скоростью и через иглу большего диаметра.

В) После этого частицы последовательно промывают буферным раствором, обрабатывают раствором поли-L-лизина, вновь промывают буферным раствором, обрабатывают раствором альгината натрия, а затем раствором цитрата натрия.

3) Изобразите схемы процессов, протекающих при образовании клеточной оболочки описанным методом (реакция альгината натрия с кальцием; реакция альгината с поли-L-лизином; реакция с участием цитрата натрия). Из какого материала состоит стенка капсулы после выполнения всех описанных процедур? (3 балла)

4) Если исключить из приведенного выше протокола стадию Б, механическая прочность стенок заметно снижается, а иммунный ответ организма на введение капсулированных клеток усиливается. Объясните эти явления. (2 балла)

5. **Зондирование клеточных мембран.** Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является мощным методом, позволяющим исследовать рельеф поверхности различных объектов, в том числе и живых клеток, с нанометровым разрешением. Однако поверхность живых клеток, находящихся в водной среде, не является жесткой, она достаточно упруга и при взаимодействии с зондом способна изгибаться. В современной атомно-силовой микроскопии имеются подходы, позволяющие измерять упругость мембраны.

1) Как при помощи АСМ можно измерить жесткость мембраны живых клеток? (2 балла)

2) Какие дополнительные факторы (помимо собственно упругости мембраны) могут оказывать влияние на результат измерения? (2 балла)

3) Как клетки могут изменять упругость (жесткость) своих мембран, для чего им это может быть нужно? (2 балла)

4) Какие другие (не связанные с АСМ) методы могут быть использованы для оценки жесткости мембраны живых клеток? (2 балла)

6. **Ихтиандр.** Мир океана пока недоступен для человека. Мы можем исследовать его с использованием скафандров и аквалангов, ребризеров и просто ныряя с



максимальной задержкой дыхания. Но этого недостаточно, ведь люди давно мечтали плавать, как рыбы. Этому посвящено много фантастических романов и научных изобретений.

Некоторые из подобных идей возможно реализовать уже в ближайшем будущем. Для увеличения времени пребывания под водой можно вшивать под кожу специальные биоматрицы, накапливающие кислород.

- 1) Предположите, какие свойства должны быть у материала такой матрицы и как ее можно было бы создать. (3 балла)

*Подсказка: Для решения необходимо описать, как происходит насыщение крови кислородом и вспомнить известные Вам кислородсвязывающие белки и другие среды - переносчики кислорода.*

- 2) Предположите, в какую часть тела лучше всего вшить подобные биоматрицы, каким условиям она (эта часть тела) должна отвечать. (2 балла)

Бывало, добровольцы дышали перфторированными углеводородами, переносящими кислород, водой, насыщенной кислородом под давлением, специальными газовыми смесями.

- 3) Опишите, какими свойствами должны обладать описанные типы переносчиков кислорода, чтобы при их использовании можно было “дышать” длительное время. (2 балла) Каковы существуют риски использования таких "сред для дыхания" в отношении здоровья человека и при каких заболеваниях (генетических или приобретенных) на такой риск можно пойти? (3 балла)

- 4) Какие «приспособления» существуют в активно работающих и потребляющих много энергии больших клетках (например, крупных нейронах и мышечных клетках), чтобы не возникало дефицита кислорода? (3 балла)



## РЕШЕНИЯ

### Здоровье дорожке (2008, школьники, разминка)

Кузнецов Сергей Сергеевич

1. Думаю, что нанофильтры – это фильтры, которые должны задерживать частицы наноразмеров. То есть частицы размером 1-100 нанометров. Например, это фильтры на основе углеродных нанотрубок. Углерод традиционно используется, как хороший сорбент. Углеродные нанотрубки имеют диаметр от нескольких нанометров до 100 нанометров. Или пористые наночастицы порошка алюминия, как в нанофилтре томских учёных, которые начали их производство.
2. Чтобы ответить на этот вопрос, нужно знать, что вызывает рак лёгких. В табачном дыме 4000 компонентов. В одной из статей я нашёл сообщение. Что установлена причина возникновения рака лёгких при курении. Причина эта связана с содержанием перекиси водорода в табачном дыму. Сможет ли нанотрубка размером несколько нанометров остановить молекулу  $H_2O_2$ , размер которой несколько ангстрем? Чисто механически не сможет. Но если молекулы перекиси водорода будут адсорбироваться на поверхности нанотрубок, то количество перекиси, попадающее в лёгкие курильщика уменьшится.

Позволю себе привести сообщение об исследованиях в Китае на этот счёт:

Китайские ученые в своих исследованиях использовали оксидированные УНТ (О-УНТ). О-УНТ оказались наиболее эффективными сорбентами никотина (до 0.56 мг/сигарета) и смолы (до 13 мг/сигарета). **Эффективность удаления никотина и смолы сорбентом О-УНТ составила 81,3%**, активированного угля – 60,6% и цеолита – 41,3%. И это несмотря на то, что их удельная поверхность гораздо меньше (151 м<sup>2</sup>/г), чем у цеолита (766 м<sup>2</sup>/г) или активированного угля (904 м<sup>2</sup>/г).

Изображения фрагментов фильтров с О-УНТ, полученные при помощи туннельного микроскопа до и после адсорбции, позволили объяснить причину такой эффективности углеродных нанотрубок (см. рисунок). Искривленные О-УНТ длиной от сотен нанометров до микрон образуют агрегированные поры, размер которых колеблется от 3 до 40 нм, то есть они подходят для сорбции всех типов молекул табачного дыма. Часть вредных веществ адсорбируется на внутренней поверхности стенок УНТ, многие соединения (главным образом, полициклические ароматические углеводороды) сорбируются или конденсируются на внешней поверхности. Цеолит же, имеющий размеры пор 0,74 нм, может эффективно сорбировать молекулы, имеющие размер 0,73 нм – нафталин, антрацен и некоторые другие, но практически не задерживает никотин, чей молекулярный размер

0,78 нм, и ряд других компонентов смолы с молекулярным размером более 0,9 нм. Размеры пор и удельная поверхность активированного угля больше, чем у цеолита, и, соответственно, эффективность удаления никотина и смолы выше, но, тем не менее, гораздо ниже, чем для О-УНТ.

Исходя из этого сообщения, действительно курильщики получают более щадящие их здоровье сигареты. Но вопрос-то скорее психологический. Если представить себе нанофильтр, который будет улавливать 100% никотина, то что тогда получает курильщик? Ведь никотин – это наркотик, к которому привык курильщик, к которому его тянет. Но нанофильтр отнимает у него его дозу. Тогда зачем такие сигареты курильщику? Он не будет их покупать. Это напоминает ситуацию с безалкогольными напитками.

Вывод: даже если нанофильтры защитят лёгкие от никотина и других ядов, курильщик станет курить с обычным фильтром.

3. Размеры бактерий – 0.5 – 5 мкм. Если нанофильтр представляет из себя поры размером 1-100 нанометров, то бактерии не пройдут. No Pasaran!

4. Размеры вирусов поменьше бактерий – от 20 до 300 нм. Если размер пор фильтры не превышает 20 нм, то вирусы тоже не пройдут. No Pasaran!

Эти выводы я делаю на основе механической фильтрации. Но существует ещё и физическая адсорбция, и хемосорбция. Тогда и большие поры смогут задерживать объекты, которые меньше их размером. Надо знать, что из себя представляет нанофильтр в каждом конкретном случае.

Ещё известно, что например графит может сорбировать атомы лёгких металлов, которые интеркалируются (вклиниваются) между слоями графита. В результате образуется связь, промежуточная между Ван-дер-Ваальсовой и химической.

5. Что касается, тяжёлых металлов и радиоактивных, то механически их вряд ли остановишь. Нанофильтр должен в этом случае осуществлять абсорбцию и хемосорбцию.

#### Козлякова Екатерина Сергеевна

Специалисты Института физических и химических исследований города Ланьчжоу (Китай) создали новый экспериментальный фильтр для сигарет. Он способен значительно уменьшить количество вредного для организма оксида углерода (СО), образующегося при неполном сгорании табака. Ученые приступили к работе над созданием фильтра два года тому назад, когда специалист Лу Гонсуань из института, входящего в состав Китайской академии наук, решил использовать в сигаретах принцип каталитического окисления СО

до CO<sub>2</sub>. Такая реакция проходит в присутствии катализаторов, содержащих благородные металлы, уже при комнатной температуре.

В ходе продолжительных исследований был подобран оптимальный состав катализатора, который помещен на кончике фильтра в виде нанометровой частички.

Применение каталитического фильтра позволяет на 26,9% сократить количество CO, поступающего в легкие курильщика, а значит заметно снизить токсичность сигаретного дыма. Но от никотина пока что нанофильтры не спасают.

Наночастицы серебра, внедрённые в специально разработанные фильтровальные картриджи, эффективно очищают воду на расстоянии. Таким образом, удалось не только избежать попадания серебра в организм человека и связанного с ним негативного влияния на здоровье, но и приобрести новые положительные свойства.

Кластеры серебра убивают самые стойкие и неистребимые бактерии: синегнойную палочку, стафилококк, и даже возбудителей гепатита А и В.

Водопроводная вода очищенная нанофильтром меняет свою структуру и восстанавливает свои природные качества, т.е. становится полезной и повышает иммунитет.

Одно из направлений по модной ныне нанотехнологической теме уже несколько лет развивается в Томском научном центре СО РАН под руководством директора Института физики прочности и материаловедения профессора Сергея Григорьевича Псахье. Разработка томских ученых - фильтры для питьевой воды, уже выходит на российский и зарубежный рынок. На матрице из полимерного микроволокна осаждают пористые наночастицы порошка алюминия. В результате получается материал, который абсолютно не пропускает ни бактерии, ни вирусы. Так что вода, пропущенная через нанофильтр, полностью обеззаражена и при этом сохраняет все необходимые микроэлементы. Принцип действия нанофильтра – в том, что он не только фильтрует, но и адсорбирует. На поверхности нановолокон возникает электрокинетический потенциал, за счет которого адсорбируются микробиологические загрязнения.

Нанопористые частицы, сделанные из стекла или натуральной диатомовой земли (кизельгура), будут иметь размеры от 5 до 50 миллионных долей метра. Различные покрытия позволят им селективно связывать различные типы металлов. Например, сульфидно-органические покрытия притягивают ртуть, а медно-органические - мышьяк и радиоактивные металлы.

### **Алешин Глеб Юрьевич**

1. Нанофильтр – фильтр, который пропускает молекулы строго определенного размера, т.е. не более чем определенного радиуса.

2. Обычные фильтры основаны же на различных скоростях прохождения молекул разных веществ. Наночитр не пропускает смолу, т.к. она является полимером. Но от частиц канцерогенов, которые по размеру сопоставимы с молекулой никотина, он не спасет.
3. Воду от бактерий он очистит, т.к. их размеры значительно больше размеров молекул
- 4-5. От вирусов и ионов тяжелых металлов он не спасет, т.к. их размеры достаточно малы.

## **Липосомы - фосфолипидные наносистемы для доставки лекарственных соединений и вакцин (2008, школьники, нанобиотехнологии)**

Авторское решение (доц. А.В.Бачева)

1. Нисколько, липидный бислой – самоорганизующаяся система, для поддержания структуры которой энергия не нужна.
2. Строение зависит от соотношения размеров гидрофильной полярной головы и гидрофобного неполярного хвоста. В воде легко дают мицеллы те липиды, которые имеют объемистую и/или заряженную полярную голову и сравнительно небольшие углеводородные цепи. К мицеллообразующим липидам относятся фосфолипиды, имеющие две углеводородные цепи небольшой длины.

В общем случае один «хвост» (один остаток жирной кислоты, одна длинная углеводородная цепь) – мицелла, а два хвоста – липосома (рис.1)

(а) додецилсульфат натрия образует мицеллы

(б) кардиолипин образует липосомы

3. толщина липидного бислоя, состоящего из 1,2-дипальмитоил-sn-глицерофосфохолина, составляет около 5 нм.
4.
  - а) перемещение молекул липидов в липидном бислое вдоль одного из слоев (латеральное) происходит часто.
  - б) перемещение молекул липидов из одного монослоя в другой (называется флип-флоп) происходит редко, так как требует прохождения гидрофильной «головы» через гидрофобный слой.
5.
  - а) ДНК заряжена отрицательно за счет фосфатных групп, поэтому лучше использовать положительно заряженные липиды.
  - б) При использовании буфера с кислым значением рН (4.5) , молекула инсулина будет заряжена положительно, и необходимо использовать отрицательно заряженные липиды. При использовании буфера с нейтральным значением рН (7.0) , молекула инсулина будет заряжена отрицательно, и необходимо использовать положительно заряженные липиды.
6. При доставке таких лекарств как ДНК липосомы нужны, поскольку
  - б) легко разрушается в организме ферментами
  - е) не проникает в клетки из-за большого размера
  - ж) не проникает в клетки, потому что имеет заряд

При доставке белков в организм липосомы нужны, потому что:

- б) легко разрушается в организме ферментами
- г) может вызывать иммунный ответ
- д) может вызывать аллергию
- е) не проникает в клетки из-за большого размера
- ж) не проникает в клетки, потому что имеет заряд

молекула доксорубицина

- а) токсична!
  - е) большая
  - з) довольно гидрофобная, плохо растворимая в воде и не проникающая сквозь клеточную мембрану.
7. светорассеяние, малоугловое рентгеновское рассеяние, нейтронное рассеяние
8. Например, фосфатидилэтаноламин (ФЭ), конъюгированный с ПЭГ (полимер с гибкой гидрофильной цепью) через сложноэфирную связь, гибкие молекулы ПЭГ создают в примембранной области избыточное осмотическое давление, поэтому белки не могут добраться до поверхности, и липосомы как бы становятся невидимыми для РЭС (ретикуло-эндотелиальная система, система выведения чужеродных молекул из организма). (рис. 2)

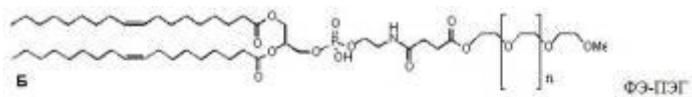
"Идеальная" конструкция липосомы для направленной доставки лекарственного вещества в клетку;

- 1) Липид, к которому присоединен полимер для стерической защиты от РЭС (например, ПЭГ);
- 2) "Молекулярный адрес" на полимерной ножке (в основном иммуноглобулины);
- 3) Белки слияния (например, гемагглютинин, любые агглютинины, лектины и вирусные белки слияния, хотя многие из них токсичны);
- 4) Лекарственное вещество (например, ДНК);

Дополнительно:

- 5) Липидные положительно заряженные частицы для компактизации ДНК;
  - 6) Мембранообразующие липиды (фосфатидилхолин);
  - 7) Липиды, дестабилизирующие мембрану (например, фосфатидилэтаноламин)
- липиды, стабилизирующие липосому – это холестерин





Идеальная конструкция липосомы для доставки лекарств

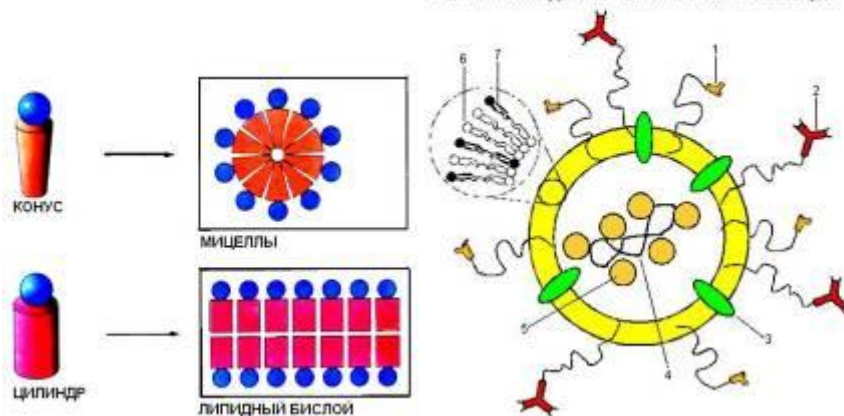
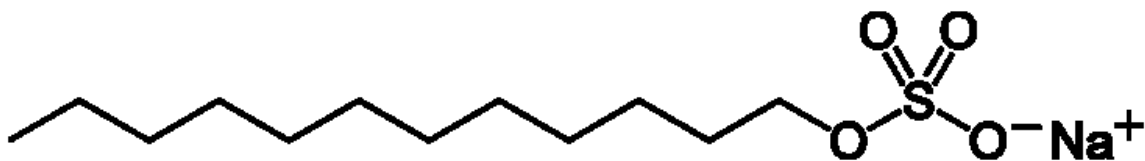
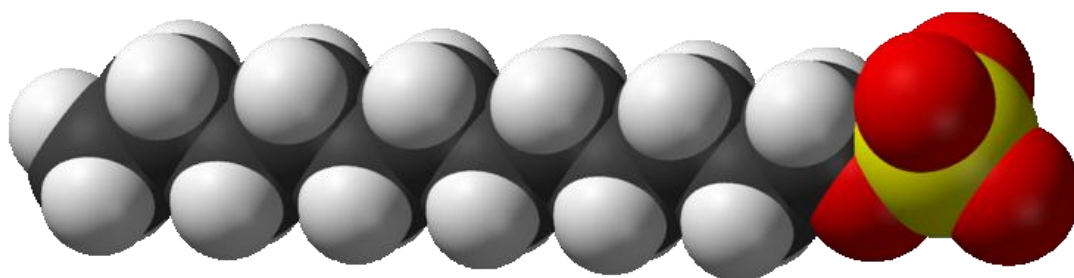


Рис.1.

Козлякова Екатерина Сергеевна

2.



а) На рисунке изображено строение додецилсульфата натрия (объемное и схематическое, изображения взяты с «Википедии», <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Dodecylsulfate-3D-vdW.png>). Явно видно, что хвост (серенький) по диаметру меньше, чем «голова» (красно-желтенькая), поэтому додецилсульфат натрия будет образовывать мицеллы. Подтверждение этому также есть на «Википедии»

б) Кардиолипин — родоначальник особой группы липидов. Он обладает интересной и необычной структурой, представляя собой двойной фосфолипид (дифосфатилглицерин),

имеющий четыре хвоста жирных кислот и два остатка ортофосфорной кислоты. Остатки жирных кислот гидрофобны (как и большинство органических веществ с углеводородными радикалами), поэтому они являются «хвостом» А вещества с ионной кристаллической решеткой (в данном случае – присутствует ион натрия), наоборот, гидрофильны, - это «голова».



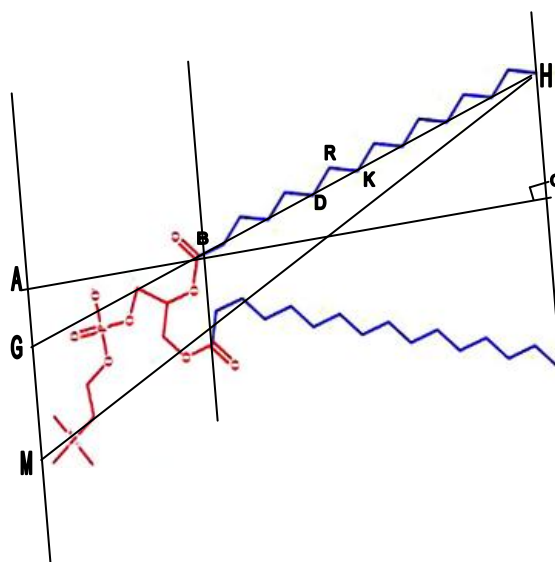
*Компьютерная модель кардиолипина в окружении других молекул.*

Если посмотреть на компьютерное изображение кардиолипина, то явно видно, что «хвосты» по диаметру намного больше, чем «голова». Поэтому фосфолипид кардиолипин будет образовывать липосомы.

3. На рисунке голова и хвост, а также «окончание молекулы» отделены почти вертикальными линиями. Отрезок AC перпендикулярен этим линиям (По крайней мере, он должен быть им перпендикулярен. Рисунок не совсем точный из-за особенностей Word или моего плохого знания о нем, потому что на распечатанном листе все получалось).

Наименьший линейный размер молекулы на рисунке – отрезок AC (т.к. перпендикуляр), наибольший – HM (т.к. он имеет наибольший угол отклонения от перпендикуляра. Примерно среднее значение будет иметь отрезок HG (он не является перпендикуляром и имеет меньший угол отклонения, чем HM).

Я не стала брать для определения линейных размеров молекулы отрезок, идущий вдоль «другого синего зигзага», поскольку он содержит меньшее число отрезочков (14), чем тот, у которого начало и конец – точки В и Н (15 отрезочков). Тогда этот «отрезок, идущий вдоль другого зигзага» меньше, чем HM, но все же отличен он перпендикуляра, поэтому тоже примерно равен отрезку HG.



Отрезок HG является суммой отрезков GB и BH. GB известно (линейный размер головы 8 ангстрем). Отрезок BH можно найти по другим имеющимся данным. Все отрезки DR, RK и т.д. в синих зигзагах равны, поскольку все они – условные обозначения связей  $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$  и, по условию, равны 1,53 ангстрем. Угол DRK, по условию равен  $110^\circ$ . Тогда найдем DK по теореме косинусов:

$$DK^2 = 2 * 1,53^2 - 2 * 1,53^2 * \cos 110^\circ$$

$DK \approx 2,5$  ангстрем.

Отрезок BH по рисунку состоит из 7 отрезков DK и одного, равного DR (или RK). Тогда

$$BH = 7 * 2,5 + 1,53 = 19,03 \text{ ангстрем}$$

Прибавим к нему размер головы и получается, что длина молекулы около 27,03 ангстрем.

Толщина липидного бислоя «состоит» из двух молекул фосфатидилхолина, поэтому, чтобы её найти, нужно «длину» молекулы умножить на два, получается, что

Толщина липидного бислоя около 54,06 ангстрем или 5,406 нм.

4. Конечно, вдоль одного из монослоев перемещение будет происходить чаще, поскольку, чтобы перейти в другой монослой молекуле нужно «перевернуться», а этому будут препятствовать силы притяжения воды и гидрофильной «головой», а также силы отталкивания гидрофобных «хвостов».

5.

а) Благодаря заряду фосфатных групп, ДНК имеет отрицательный заряд. Тогда, чтобы лучше связывать молекулы во внутренней области, липиды должны быть заряжены положительно. Но ДНК очень чувствительно к воздействию ионов и свободных радикалов. Поэтому, по моему мнению, несмотря на то, что ДНК фактически заряжено отрицательно, но липиды должны быть нейтральны, чтобы не разрушить структуру ДНК.

б) В первом случае, когда инсулин растворен в буфере с рН 4,5, т.е. это кислый раствор.

Т.к. изоэлектрическая точка инсулина (5,4) больше, чем рН раствора, то это значит, что в растворе содержится большее количество ионов водорода (положительно-заряженных), чем нужно для того, чтобы молекула была нейтральной. Т.е. общий заряд системы инсулин-буфер будет положительным. Тогда, чтобы лучше связывать инсулин, липосома должна состоять из липидов, заряженных отрицательно.

Во втором случае (рН раствора 7.0) – нейтральная среда. Т.к. изоэлектрическая точка инсулина меньше, чем рН буфера, то это значит, что в буфере НЕДОСТАТОК положительных ионов водорода, нужных, чтобы общий заряд молекулы был равен нулю. Тогда молекула относительно раствора отрицательна, а липиды должны быть заряжены положительно.

6. При доставке ДНК.

Варианты ответов:

Б) Например, фермент рестриктаза у бактерий разрезает чужеродное ДНК на две части.

Г) Поскольку при попадании чужеродного ДНК в организм (или вируса), иммунная система тут же начинает «защищаться» и уничтожает его. Хотя я знаю только об уничтожении вирусов клетками иммунной системы. Возможно, что к ДНК это не относится.

Е) ДНК действительно имеет довольно большой размер и массу по сравнению с другими органическими молекулами.

Ж) ДНК вроде бы имеет отрицательный заряд.

При доставке белков.

А) Некоторые белки являются токсичными (но не все). Сильнодействующие вещества ядов некоторых животных (змей, насекомых и пр.) и растений, например, являются белками.

В) Чужеродные белки являются токсичными и аллергенными для организма. Поэтому существуют специальные системы выведения, которые помогают организму «избавляться» от чужеродных белков.

Г) Белки отличаются видовой, тканевой и индивидуальной специфичностью, каждый белок при введении в организм теплокровного животного, в т. ч. и человека, вызывает образование антител. Так что если вводимый белок чужероден организму, то он вызовет сильную иммунную реакцию.

Д) Проникновение в организм чужеродных белков влечет развитие аллергических состояний.

З) По степени растворимости в воде белки бывают растворимыми (гидрофильные) и нерастворимыми (гидрофобные). К последним относятся большинство входящих в состав

биологических мембран интегральных мембранных белков, которые взаимодействуют с гидрофобными липидами мембраны. Поэтому на это вариант ответ двойкой.

При доставке доксорубина:

А) На «Википедии» (<http://ru.wikipedia.org/wiki/Доксорубин>) есть достаточно подтверждений в пользу этого варианта:

«Побочное действие доксорубина

Со стороны системы кроветворения: тромбоцитопения, лейкопения, анемия. Со стороны сердечно-сосудистой системы: кардиомиопатия, сердечная недостаточность, аритмии. Со стороны пищеварительной системы: стоматит, эзофагит, боли в животе; тошнота, рвота, диарея. Со стороны репродуктивной системы: азооспермия, аменорея. Аллергические реакции: крапивница, повышение температуры тела, анафилактикоидные реакции. Прочие: алоpecia, гиперурикемия, нефропатия. Местные реакции: при введении в вены малого диаметра или при повторном введении в одну и ту же вену - склерозирование сосуда; при экстравазации - некроз тканей.»

Г) На фоне применения доксорубина происходит угнетение формирования антител и усиление побочных реакций при введении живых вакцин, что обусловлено подавлением иммунитета. Я написала и этот вариант, но только для того, чтобы показать: доксорубин ПОДАВЛЯЕТ иммунную систему. Я не могу точно сказать: вызывает он иммунную реакцию или нет. Но хотя возникновение аллергических реакций говорит в пользу этого варианта.

Д) Аллергические реакции : крапивница, повышение температуры тела, анафилактикоидные реакции.

7. Размеры липосом определяют с помощью фотонной корреляционной спектроскопии, а также с помощью электронной микроскопии (негативное контрастирование).

8.

а) «Обмануть» систему выведения можно, сделав поверхность липосом сильно гидрофильной за счет ковалентно связанного синтетического полимера полиэтиленгликоля. Для этого также используются специальные модифицированные липиды, например, фосфатидилэтаноламин (ФЭ), конъюгированный с ПЭГ.

б) В качестве "молекулярного адреса" наиболее часто выбирают иммуноглобулины, имеющие соответствующие мишени на целевых клетках.

в) В липосому включают белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток, например, гемагглютинин вируса гриппа, диолеилфосфатидилэтаноламина.

Липосомы «научились» без вреда доставлять к нужным клеткам такие лекарства, которые при обычном введении отторгаются организмом, либо, что еще хуже, вызывают

сильнейшие аллергические реакции и обладают сильнейшим токсичным действием. Одним из таких лекарств, например, является доксорубин, который применяется при лечении некоторых форм рака.

## **Наноконтакты с живым миром (2008, биология / медицина)**

Макеева Екатерина Анатольевна

1. Размер поры калиевого канала составляет примерно 0,8 нм. Поэтому по размерам к нему подходят и фуллерен, и нанотрубка.

Однако попасть через него в клетку вряд ли смогут по многим причинам.

Пора канала имеет специфические группы белков, которые помогают иону калия пройти по ней. Фуллерен и нанотрубка (в отличие от иона калия) не имеют электрического заряда, имеют отличающиеся размеры и геометрию. Также они сильно гидрофобны, что делает невозможным те гидрофильные взаимодействия с белком, которые позволяют проходить иону калия.

2. Инсулин и альбумин – белки, являющиеся легко перемещающимися по организму веществами. Инсулин попадает в клетки по механизму рецептор-зависимого эндоцитоза, поэтому связанное с ним лекарство с большой долей вероятности может проникнуть в клетку.

Альбумин плазмы – белок специально созданный для образования комплексов и их дальнейшей транспортировки, модификация его лекарством может быть использована для транспортировки например гидрофобных лекарств в отдаленные ткани.

Для модификации белков используются функциональные группы аминокислот: аминогруппу (свободного N-конца или диаминокислот), тио-группу цистеина и гидроксильную группу серина. Используют обычно такие химические связи, которые могут быть разорваны в клетке под действием ферментов (эфирные, имидные, легковосстанавливающие дисульфитные мостики).

Для целлюлозы единственный простой способ «привязать» лекарство посредством образования эфирной связи с одной из гидроксильных групп.

У фосфолипидов не остается активных функциональных групп для модификации, их можно разве что использовать для транспорта лекарств в липосомах.

Не все указанные макромолекулы возможно упаковать в наночастицы.  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ,  $\Delta G < 0$  Поскольку повышение порядка уменьшает энтропию, то для прохождения процесса консервативной самоорганизации вблизи термодинамического равновесия необходимым условием является отрицательная величина  $\Delta H$ . Иными словами, такая самоорганизация происходит за счет образования разного рода связей.

Одну молекулу фосфолипида упаковать в наночастицу практически не возможно: у него нету сильновзаимодействующих групп в длинных цепях и углеводородные цепи будут представлять клубки. ( $\Delta H$  взаимодействия углеводородных цепей довольно маленькое, наглядный пример - алканы - легкокипящие вещества). Так же не каждый биополимер

упаковывается в плотные наночастицы, за счет энтропийного фактора в них тоже останется достаточно большая степень свободы.

Обычная «длинная» молекула за счет вращения вокруг связей примет форму клубка, размер которого определяется в курсе высокомолекулярных соединений, например из модели с фиксированным валентным углом:

$$L = \sqrt{n} * l * \sqrt{\frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta}}, \text{ где } n - \text{ число звеньев, } l - \text{ длина звена, } \theta - \text{ угол при вершине}$$

конуса, описываемого вращением. Оценив примерный размер неподвижных фрагментов, валентный угол их вращения друг относительно друга и их размер можно посчитать средние размеры клубка. Так можно прикинуть размеры клубка для «хвостов» фосфолипида и клубок, получившийся при вращении вокруг С-О-С связей фрагментов. (расчет не приводится, т.к. это весьма длительная процедура, и до конца не понятно, что именно это подразумевалось рассчитать).

3. Пути наночастицы в клетке зависят главным образом от размера частицы, гидрофобности и площади ее поверхности. Мелкие частицы более подвижны и легче проникают через клеточно-мембранные барьеры.

Сначала частица должна пройти путь через кровь к клетке. Если частица гидрофильна, то она с меньшими препятствиями его преодолевает, гидрофобные частицы могут связываться с транспортными белками крови.

Транспортные белки могут также «проносить» через мембрану достаточно крупные частицы, служить как для проникновения, так и выведения частиц из организма.

Биологические частицы состоят из фрагментов обычно поддающихся ферментативному распаду с последующей утилизацией в метаболизме клетки.

Пути утилизации зависят от природы наночастицы. Если частица биологического происхождения, то она может попасть в клетку по стандартным механизмам транспорта: через транспортные белки, через рецепторзависимый эндоцитоз (так может попасть в клетку и фуллерен).

Главное препятствие для наночастиц – клеточная мембрана, которая в силу своей структуры (двойного липидного слоя) непроницаема для большинства веществ. Организм устроен так, чтобы не пускать внутрь клетки через мембрану чужеродные частицы. Но для жизнедеятельности клетка должна обмениваться веществом с окружающим миром – и наночастицы могут попасть как в клетку так и выйти из клетки через эти процессы. Органическим биологическим частицам всегда легче попасть в клетку чем, к примеру, нанотрубкам или нанокластерам металлов, т.к. биочастицы имеют большее химическое



сходство с веществами используемыми в процессе жизнедеятельности организма, они вероятнее распознаются клеткой как «свои».

Второй способ введения и выведения – с помощью эндоцитоза и экзоцитоза. В захватываемом растворе (питоцитоз) могут содержаться наночастицы. Выводятся наночастицы могут через лизосомы или комплекс гольджи.

В метаболизме ксенобиотиков различают 3 фазы:

*1) модификация, создающая или освобождающая функциональные группы.*

Цитохром P-450, расположенный на мембране ЭПС – окисляет молекулы с образованием гидроксильных групп, переводя их в более активное химическое состояние. Легко должен модифицировать органические и даже некоторые небольшие неорганические наночастицы. Однако большинство неорганических частиц он не сможет модифицировать. В клетке существуют и другие модифицирующие ферменты, однако они способны только модифицировать специфические органические вещества, и проявляют крайне малую активность по отношению к неорганическим наночастицам.

Многие неорганические частицы могут окисляться активными формами кислорода.

*2) конъюгация - присоединение к функциональным группам дополнительных групп или молекул.*

На этом этапе происходит дальнейшая модификация наночастиц. Суть состоит в том, чтобы присоединив к частице органические молекулы повысить ее гидрофильность для транспорта из организма. Присоединяя специфические молекулы и белки клетка создает специфический органический «контейнер» для транспорта малорастворимых и неактивных частиц из организма. Одна из основных присоединяемых к наночастицам молекул на этой стадии – молекула металлотioneина, очень богатого SH группами (в меньшей степени – глутатион), которые, благодаря нуклеофильности, хорошим комплексообразующим свойствам и высокому сродству к тяжелым металлам, легко могут координироваться на поверхностях большинства неорганических наночастиц.

Многие наночастицы, обладающие большой поверхностной энергией, легко могут связываться и с другими транспортными белками.

*3) Связывание и выведение самих ксенобиотиков и их метаболитов из клетки, а затем из организма.*

Важным путем выведения из клетки гидрофобных веществ является их селективное удаление Р-гликопротеином, находящимся на мембране.

Поскольку все наночастицы имеют высокую массу ( $M > 300$ ), то в конечном итоге они выводятся из организма печенью, с желчью в кишечник.

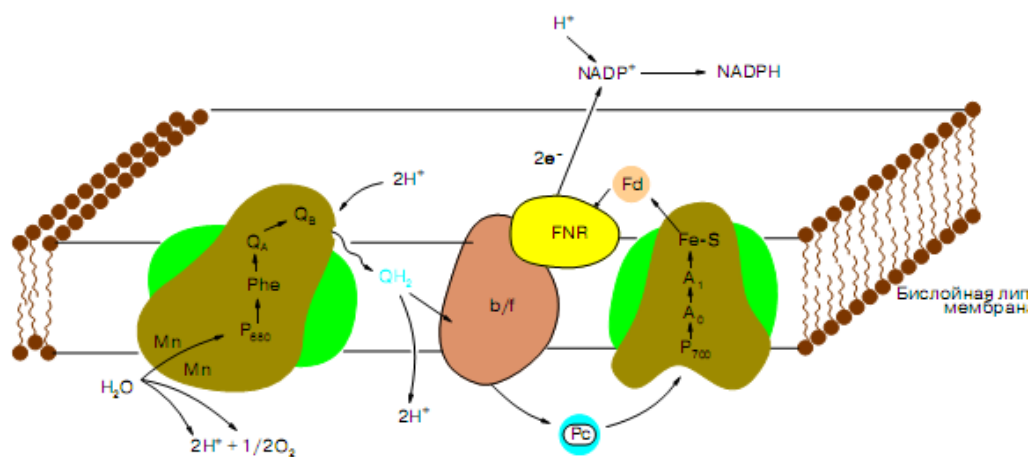
Однако некоторые неорганических наночастиц в клетках никак не изменяются (например фуллерены и нанотрубки), они либо выводятся экзоцитозом, либо остаются в клетке до конца ее жизни (например, проинтеркалировав с ДНК).

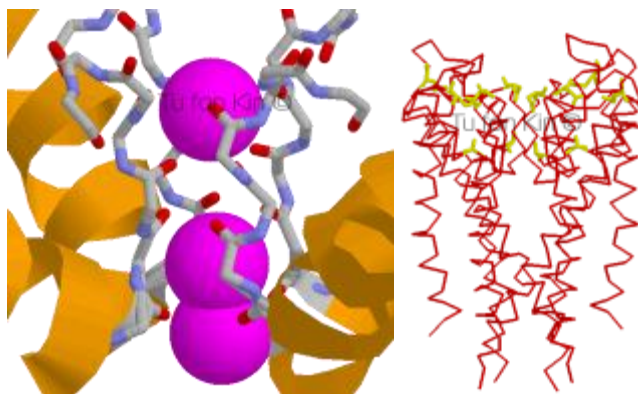
В утилизации широкого класса биологических наночастиц, например, антител и других антигенов принимают участие клетки иммунитета.

4. Наверно имеется в виду синтез кислорода: электроны с молекулы воды переходят НАД+ и образуется кислород.

Т.е. имеется в виду схема фотосинтеза, с заменой хлорофилла на полупроводниковую наночастицу. Скорее всего это не получится: слишком разные свойства у молекулы хлорофилла и неорганических наночастиц и слишком сложно устроена органическая система. Как известно, энергии одного кванта солнечного света не хватает для переноса электрона от молекулы воды. Поскольку участвуют сразу 2 фотосистемы, для аккумуляции энергии нескольких квантов. Простейший способ – заменить (в хлоропластах) все молекулы хлорофилла на наночастицы, с подобранными похожими свойствами (чтобы образующиеся фотоэлектроны обладали такой же энергией, как и молекула хлорофилла).

Другой вариант может состоять в фотопереносе электронов через барьер между двумя наночастицами, с последующей передачей электрона через вторичные акцепторы (различные виды хинонов) непосредственно ферменту. Для этого нужно соединить наночастицы (в мицеллярной «шубе») с такими свойствами, чтобы могло осуществляться фотовозбуждение первой и перенос электрона на вторую частицу (акцептор). Затем электрон посредством встроенного в мицеллу хинона переносится на прикрепленный к мицелле фермент. Пример – использование пары  $\text{TiO}_2 - \text{CdS}$  в фотовольтаическом преобразовании в солнечных батареях, возможном благодаря соотношению ширин запрещенных зон и взаимному расположению энергетических уровней.





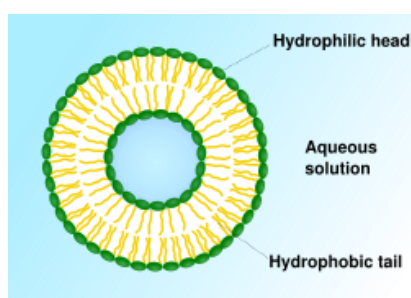
1. Калиевые каналы – самый распространенный тип ионных каналов, встречающийся в природе. Они делятся на 4 основных класса в зависимости от выполняемых функций, каждый класс – на подклассы. От класса к классу могут изменяться регуляторные части белковых цепей, однако в своей основе все калиевые каналы построены из 4 субъединиц (идентичных или различающихся), пронизывающих плазматическую мембрану петлями, и образующих на линии соприкосновения собственно калиевый канал. На входе в калиевый канал расположено большое количество отрицательно заряженных остатков аминокислот (Asp, Glu, отмечены желтым на рисунке), создающих благоприятный электрический потенциал для концентрирования положительных ионов. В самом канале по пять карбонильных групп пептидных связей от каждой субъединицы образуют «селективный фильтр» для двух катионов. Пространственное расположение этих групп таково, что они образуют две полости из атомов кислорода, точно соответствующих по размеру иону калия и имеющих ту же геометрию, что и первая сольватационная сфера иона калия в водном растворе (см. рис. На нем показаны красным атомы кислорода, фиолетовым – два атома калия и положение нижнего атома калия на выходе из канала). В канале одновременно находятся два иона калия, лишенных их сольватных оболочек. Электростатическое отталкивание между ними «подталкивает» внутренний ион калия к прохождению через канал. Вслед за «селективным фильтром» находится полость, в которой ионы калия обратно гидратируются и далее вольны делать в клетке все, что им заблагорассудится.

Ни меньшие по размеру ион натрия, ни большие ионы цезия не могут пройти через канал. Первые из-за того, что без сольватной оболочки не могут эффективно стабилизироваться «селективным фильтром» за счет меньшего размера, а частично дегидратированные просто не входят в него. Хорошо, про канал мы теперь знаем достаточно, чтобы ответить на вопросы задачи.

Исходя из размера дегидратированного иона калия, оценим размер полости ионного канала в 2.7 Å.

Таким образом, ни один из перечисленных нанобъектов не может проникнуть в клетку через калиевые каналы. Более того, изучение влияния их присутствия на проницаемость калиевых каналов (да, и такие исследования проводились: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/278/50/50212>) показывают, что и фуллерен, и одностенные нанотрубки являются ингибиторами ионных каналов.

2. Какой приблизительный минимальный размер может быть у сфер (капсул) из следующих биомакромолекул: фосфолипидов (~1 кДа), мономера инсулина (5.5 кДа), сывороточного альбумина (67 кДа), коллагена (300 кДа) и целлюлозы (500 – 2000 кДа).



Непонятное условие. Если во внутреннюю полость помещается всего одна молекула воды (то есть полости, считайте, нет) – это капсула или еще нет? А если 5, 10 молекул воды – это уже капсула? Для определенности будем считать капсулой сферу, в которую можно вместить хотя бы объект диаметром 1 нм. К тому же совершенно непонятно, как можно заставить молекулы, например, инсулина образовывать капсулы.

Начнем с фосфолипидов. Все зависит от того, что за капсула: прямая мицелла, обращенная мицелла, липосома. Несмотря на то, что наименьший размер имеют обращенные мицеллы (число ассоциации для них, как правило ниже, чем для прямых мицелл и варьируется в диапазоне 3-40), под капсулами из ПАВ будем понимать липосомы (см. рисунок) вследствие их высокой стабильности и низкой лабильности по сравнению с мицеллами. Примем, что липосома состоит из фосфатидилхолина с остатками стеариновой и олеиновой кислот. Толщина липидного бислоя в этом случае, определенная методом малоуглового рентгеновского рассеяния, равна 31 Å. Значит диаметр капсулы будет равен  $31 \times 2 + 10 = 72 \text{ Å}$  (7.2 нм).

Инсулин. Молекула инсулина представляет собой эллипсоид размерами  $1.1 \times 1.4 \times 2.3$  нм. «Капсулу» из инсулина можно получить, уложив 6 молекул в виде правильной тригональной бипирамиды (только что заставит их так сложиться?). Высота этой капсулы будет равна  $2.3 \times \sqrt{2} = 3.3$  нм. Кстати, гексамер инсулина (+  $2\text{Zn}^{2+}$ ) можно рассматривать в

качестве капсулы – между субъединицами, как показано рентгеноструктурными исследованиями, находятся слои неструктурированной воды. Размер гексамера  $5.5 \times 3.7$  нм.

BSA (HSA). Молекула бычьего (человеческого) сывороточного альбумина представляет собой эллипсоид размерами  $4 \times 4 \times 14$  нм. Минимальную «капсулу» из БСА можно также получить в виде правильной тригональной бипирамиды. Высота ее будет  $14 \times \sqrt{2} = 19.8$  нм.

Коллаген. Коллагеновая «молекула» представляет собой волокно диаметром 1.5 нм и длиной около 300 нм, составленное из трех правозакрученных белковых спиралей. Длина сегмента Куна для одиночного коллагенового волокна равна 16 нм, следовательно, минимальный диаметр сферы, которую можно построить из коллагена без существенных напряжений в его молекуле, равна 8 нм. «Клубок» из коллагенового волокна можно намотать так, чтобы ни в одном месте не было одновременно более 5-6 слоев, следовательно, внешний диаметр сферы будет равен  $8 + 6 \times 1.5 = 17$  нм.

Целлюлоза. Для оценки размера капсулы из целлюлозы используем другой подход. Будем считать, что капсула образована одной разветвленной молекулой целлюлозы, плотность капсулы равна плотности массивной целлюлозы,  $1520 \text{ кг/м}^3$ . Примем молекулярную массу этой макромолекулы равной 500 кДа. Тогда объем этой капсулы равен

$$V = \frac{m}{\rho} = \frac{5 \cdot 10^5 \text{ Да}}{6 \cdot 10^{26} \text{ Да/кг} \cdot 1520 \text{ кг/м}^3} = 5.5 \cdot 10^{-25} \text{ м}^3. \text{ Прибавим к этому объем внутренней}$$

полости диаметром 1 нм:  $V_n = \frac{1}{6} \pi d^3 = 5.2 \cdot 10^{-28} \text{ м}^3$ . Исходя из суммарного объема

$$\text{капсулы оценим ее диаметр: } d_{\text{капсулы}} = \sqrt[3]{\frac{6(V_u + V_n)}{\pi}} = 11.7 \text{ нм}.$$

Какими физическими и химическими свойствами будут обладать эти наночастицы?

Липосомы. Подвижные, нежесткие образования. При приложении внешней силы способны менять свою форму (становиться эллиптическими, например). Химические свойства липосом зависят от природы ПАВ, используемого для их получения. Для того же фосфатидилхолина будут характерны реакции, приводящие к отщеплению холинового фрагмента и фосфата при гидролизе в водных растворах с экстремальными значениями pH. При нейтральных pH стабильны.

Инсулин и BSA(HSA). Получить стабильные нанокapsулы из этих соединений можно только сшив молекулы, их составляющие, между собой, например глутаровым альдегидом. Иначе при контакте с водой (даже капиллярной) капсулы распадутся на отдельные субъединицы. Физические свойства – такие же, как и у большинства белков: порошок, хорошо растворимый в воде. Химические свойства так же абсолютно такие же,

как и большинства белков, не содержащих гликозидных остатков (наличие на поверхности амино- гидроксильных- и карбоксильных групп, денатурация при нагревании и экстремальных значениях pH, деградация под действием протеиназ и т.п.).

Коллаген. Исходя из того, что мы «смотали в клубок» волокно коллагена, данная капсула будет довольно жесткой. Для фиксации капсулы ее также было бы неплохо прошить глутаровым альдегидом. Химические свойства – такие же, как и у большинства структурных белков (см. инсулин и BSA). В силу жесткой структуры тройной суперспирали несколько более устойчивы к денатурированию при экстремальных значениях pH и нагревании.

Целлюлоза. Жесткая сферическая глобула, хорошо растворимая в воде за счет образования водородных связей. Химические свойства сходны с большинством полисахаридов: модификация OH-групп, окисление свободных  $-CH_2-OH$  групп в карбоксильные под действием разбавленной азотной кислоты, деградация при действии перманганата и тетраоксида осмия с образованием многочисленных карбонильных групп.

Какие из этих наночастиц можно использовать для доставки лекарственных веществ?

Липосомы, коллагеновые и целлюлозные капсулы. Наполнение всех трех типов капсул необходимо производить в процессе их получения, потому что высвобождение лекарственных форм будет происходить только одновременно с их биодegradацией. Для введения на поверхность капсул маркеров для адресной доставки лекарственных средств необходимо а) для липосом изначально позаботиться о наличии на поверхности нужных групп, добавив в фосфолипид длинноцепочечное соединение с нужной группой на конце, например биотином для нековалентного связывания или карбоксильной группой с последующей карбодиимидной пришивкой; б) на поверхности коллагеновой капсулы уже присутствуют спиртовые и в меньшей степени амино-группы, так что можно воспользоваться обычными методами получения конъюгатов. Целлюлозные капсулы можно использовать только для инкапсуляции лекарственных средств при пероральном введении, поскольку ферменты, требуемые для биодegradации целлюлозы, в кровотоке отсутствуют.

Каким образом можно связать лекарственные вещества с перечисленными наночастицами?

Не совсем понял вопрос. Мы же говорим про нанокapsулы? Значит лекарственные вещества должны находиться во внутренней полости этих капсул и освобождаться при их разрушении (биодegradации).

3. Каковы возможные механизмы проникновения в клетку (ткани млекопитающих) и утилизации наночастиц (от 10 до 100 нм) в клетках млекопитающих?

Пути проникновения в клетку – это в основном фагоцитоз. В ходе этого процесса образуется вогнутость на плазматической мембране клетки, которая, углубляясь, отделяется от мембраны, превращаясь в отделенную от цитоплазмы липидным бислоем вакуоль. Далее эта вакуоль сливается с лизосомой, содержащей различные ферменты для расщепления и деградации белковых, углеводных, липидных компонентов и ДНК до составных «кирпичиков» живого мира: аминокислот, жирных кислот, глицерина, моносахаридов и азотистых оснований. В лизосоме поддерживается необходимый для оптимальной работы ферментов низкий рН (около 4.8) за счет работы протоновых и хлоридных насосов в мембране лизосомы. Все, что удалось расщепить на составляющие «кирпичики», поступает в клетку, все остатки – выбрасываются наружу клетки путем слияния лизосомы с клеточной мембраной. Однако таким путем в клетку могут попадать и не только полезные низкомолекулярные вещества. Например, если пищеварительной вакуолью захвачено неорганическая волокнистая частица (асбест, углеродная нанотрубка и т.п.), ее сложно удержать в вакуоли (из-за большой длины) и в процессе движения клетки она может «проткнуть» мембрану и проникнуть в цитоплазму клетки. Также возможны случаи, когда за счет активного транспорта в клетку попадают модифицированные гидроксильными группами нанообъекты, «похожие» какой-то частью своей структуры на низкомолекулярные полезные вещества. Так, например, гидроксильные нанотрубки успешно минуют все препятствия и концентрируются в митохондриях клеток (видимо, вследствие схожести на стероидные соединения). Дальнейшая судьба таких чужеродных нанообъектов может сложиться двояко: либо в них все-таки опознают «чужаков», пометят убиквитиновыми хвостиками на уничтожение, они снова попадут в лизосому и будут выброшены из клетки вследствие невозможности переваривания, либо так и останутся в клетке, накапливаясь в соответствующем компартменте.

4. Предположите механизм, с помощью которого НАДН-зависимая гидрогеназа сможет восстанавливать НАД<sup>+</sup> и синтезировать газообразный водород посредством связанной с ней полупроводниковой наночастицы CdS или TiO<sub>2</sub>?

Насколько я понял вопрос, гидрогеназа должна осуществлять регенерацию восстановленной формы кофактора. А наночастица окислять NAD(P)H в NAD(P)<sup>+</sup>, давая при этом молекулярный водород. К сожалению, данная схема невозможна. Но есть другие варианты:

Если взять очень нетипичного представителя класса дегидрогеназ НАДН-восстанавливающую [Ni-Fe] гидрогеназу из *Ralstonia eutropha*, генноинженерно отрезать у нее гидрофобную часть, которая «заякоривает» ее в тиллакоидной мембране, получив

водорастворимую глобулу, опять же генноинженерно получить химерный белок, состоящий из этой дегидрогеназы и периферической субъединицы PsaE бактериальной фотосистемы I, затем обработать этим химерным белком препарат фотосинтетического комплекса I с удаленной периферической субъединицей PsaE, то мы получим по сути конъюгат этой гидрогеназы с бактериальной фотосистемой I. Такой конъюгат, будучи освещенным светом, начинает продуцировать молекулярный водород. Схема этой реакции в целом проста: фотосистема I играет роль антенны (входящий в ее состав хлорофилл), поглощая кванты излучения, при этом передает электрон на гидрогеназу, осуществляющую прямое восстановление протонов до молекулярного водорода. Дефицит электронов фотосистема I восполняет, отбирая электрон у воды, генерируя, таким образом, кислород. Правда, в этой системе не нашлось места NAD<sup>+</sup>.

Если по аналогии с полностью природной системой составить конъюгат, состоящий из [Ni-Fe] гидрогеназы из *Ralstonia eutropha* и полупроводниковой наночастицы, то (возможно) квантовая точка будет играть роль антенны, передавая электроны на молекулу фермента. А та, в свою очередь, будет восстанавливать протоны до молекулярного водорода. Чисто гипотетически нет никаких препятствий для реализации этой системы, все покажет эксперимент ☺

#### Харламова Марианна Вячеславовна

1. Мембрана животной клетки имеет около 5 нм толщины и состоит из двух слоев липидных молекул. Главное свойство мембраны – избирательная проницаемость. В мембрану встроены различные специальные протеины, которые можно разделить на пять классов: насосы, каналы, рецепторы, ферменты и структурные протеины. Каналы пропускают ионы выборочно и управляют их прохождением через мембрану. Некоторые каналы открываются или закрываются распространяющимся через мембрану электрическим потенциалом, тем самым обеспечивая быстрое и чувствительное средство изменения ионных градиентов. Другие типы каналов управляются химически, изменяя свою проницаемость при получении химических носителей. На концентрацию калия внутри клетки влияет наличие большого числа постоянно открытых калиевых каналов, т. е. протеиновых молекул, которые хорошо пропускают ионы калия в клетку, но препятствуют прохождению других ионов, например ионов натрия. Калиевые каналы активируются при повышении внутриклеточной концентрации кальция и деполяризации клеточной мембраны. Диаметр калиевых каналов составляет 0,5—0,7 нм. Поэтому на первый взгляд, сравнивая диаметры каналов и молекул фуллерена (C<sub>60</sub>) (диаметр – 0.7 нм) или



углеродных нанотрубок (диаметр – 0.4 нм, длина 10 нм) можно предположить, что инородные молекулы смогут проникнуть в клетку через калиевые каналы (у них сходный диаметр, они пройдут в канал). Но, зная механизм действия калиевых каналов и основное свойство мембраны - избирательная проницаемость - можно с уверенностью полагать, что чужеродные молекулы (фуллерены, углеродные нанотрубки, которые кроме всего прочего, соединения не ионные, а молекулярные) не смогут попасть в клетку через ионные (!!!) калиевые каналы. Однако стоит отметить, что фуллерены и углеродные нанотрубки могут проникнуть в клетку через билипидный слой мембраны.

Рассмотрим, как же действуют калиевые каналы. Для примера рассмотрим нервную клетку – нейрон. Градиент ионной концентрации в мембране клетки вырабатывает внутри клетки электрический потенциал -70 мВ относительно ее окружения. Чтобы возбудить клетку (стимулировать возникновения потенциала действия) синаптические входы должны уменьшить этот уровень до приблизительно -50 мВ. При этом потоки натрия и калия сразу направляются в обратную сторону; в течении миллисекунд внутренний потенциал клетки становится +50 мВ относительно внешнего окружения. Это изменение полярности быстро распространяется через клетку, заставляя нервный импульс распространится по всему аксону до его пресинаптических окончаний. Когда импульс достигнет окончания аксона, открываются управляемые напряжением кальциевые каналы. Это вызывает освобождение нейротрансмиттерных молекул в синаптическую щель и процесс распространяется на другие нейроны. После генерации потенциала действия клетка войдет в рефракторный период на несколько миллисекунд, в течении которого она восстановит свой первоначальный потенциал для подготовки к генерации следующего импульса. Рассмотрим этот потенциал более детально. Первоначальное получение нейротрансмиттерных молекул снижает внутренний потенциал клетки с -70 до -50 мВ. При этом зависимые от потенциала натриевые каналы открываются, позволяя натрию проникнуть в клетку. Это еще более уменьшает потенциал, увеличивая приток натрия в клетку, и создает самоусиливающийся процесс, который быстро распространяется в соседние области, изменяя локальный потенциал клетки с отрицательного до положительного. Через некоторое время после открытия натриевые каналы закрываются, а калиевые каналы открываются. Это создает усиленный поток ионов калия из клетки, что восстанавливает внутренний потенциал действия, который быстро распространяется по всей длине аксона подобно лавине. Натриевые и калиевые каналы реагируют на потенциал клетки и, следовательно, можно сказать, что они управляют напряжением.

Вот как работают калиевые каналы в тесной функциональной взаимосвязи с натриевыми каналами.

2.

### **Биомакромолекулы фосфолипидов:**

Размер: 25 до 10000 нм

Очень маленький размер фосфолипидных микрокапсул (липосом) позволяет им проникать в глубокие слои кожи. Фосфолипиды стенок липосом схожи по своему строению со строением клеточных мембран, что позволяет им встраиваться в мембраны клеток и улучшать их состояние. Маленький диаметр липосом позволяет им проникать внутрь клетки, где они медленно распадаются, отдавая биологически активные вещества клетке.

Их можно использовать для доставки лекарственных веществ.

Фосфолипиды – это белки. Основным свойством белков является возможность их связывания с различными веществами. У каждого белка имеются центры, состоящие из аминокислот, которые участвуют в связывании с другими веществами - белками, углеводами, липидами, нуклеиновыми кислотами. Именно за счет создания у первого и второго из связываемых веществ определенной аминокислотной последовательности, можно связать лекарство с фосфолипидом. Отметим, что вещества, которые присоединяются к белкам, называются лигандами (Например,  $O_2$  к гемоглобину).

### **Мономер инсулина**

Размер: минимум 120 нм

$M_r$  (инсулин) = 5700

Инсулин – белок, состоящий из двух полипептидных цепей, содержащих 21 и 30 аминокислотных остатков, - уже около 60 лет используется для лечения сахарного диабета. Инсулин – гормон. Учитывая факт абсолютного отсутствия собственного инсулина у больных сахарным диабетом 1 типа, необходимо таким образом назначить инсулиновые препараты, чтобы в совокупности они максимально имитировали физиологическую секрецию гормона у здорового человека. В связи с этим основные требования к инсулинотерапии при СД 1 типа сводятся к максимальной имитации эндогенной секреции инсулина у здорового человека. Для достижения этого используются человеческие генноинженерные препараты инсулина: комбинация пролонгированного инсулина (ПИ) в 2–х инъекциях и короткого инсулина (КИ) не менее 3–х инъекций. Рекомендуется отработать «базовую» дозу инсулина и проводить в дальнейшем ежедневный контроль дозы инсулина (по уровню гликемии) перед основными приемами пищи.

Инсулин – само по себе лекарственное вещество, использовать его для доставки других лекарственных веществ нет надобности.

### **Биомакромолекула сывороточного альбумина**

Бычий сывороточный альбумин (сокращённо **БСА**, англ. Bovine Serum Albumin, BSA) — белок плазмы крови крупного рогатого скота с молекулярной массой 64 000 Да, одноцепочечный, состоящий из 582 аминокислотных остатков, размер макромолекулы в среднем 1000 нм.

БСА применяется в качестве стандарта в различных методах количественного определения белков, в качестве стандарта молекулярной массы белков (маркера) в гель-хроматографии и электрофорезе белков в денатурированном состоянии, а также как стандартный антиген при определении изменения иммунного ответа под действием иммуномодуляторов или других факторов.

Старинные примитивные способы получения:

1. «В кровяную сыворотку (кровь, лишённую фибрина) наливают воды в количестве, превышающем по объёму в двадцать раз объём сыворотки, затем глобулин осаждают, осторожно прибавляя уксусной кислоты. Давши жидкости отстояться, ее фильтруют и фильтрат нейтрализуют содой, выпаривают при 40° и большую часть солей выделяют посредством диализа».

2. «Для технических целей его готовят, выпуская кровь прямо из животного в неглубокие цинковые чашки ёмкостью в несколько литров, в них ее оставляют в холодном месте, пока она не сгустится; должно тщательно стараться не взбалтывать свежеснятую кровь, поэтому место, где производится операция, следует выбирать поблизости от животного. Когда кровь свернется совершенно, ее переносят в такие же чаши с продырявленными днищами и режут кровяной сгусток на мелкие кусочки, чтобы дать возможность стечь сыворотке. Сыворотку собирают и досуха выпаривают при умеренной температуре, остаток называется альбумином. Следует избегать всякого сотрясения, так как при этом разрываются красные кровяные тельца и цвет продукта портится. Пять быков дают около 20 литров сыворотки и около 2 кг альбумина».

Сывороточный альбумин может связывать и переносить жирные кислоты и другие слабо растворимые соединения. Если в состав лекарственных препаратов входят перечисленные соединения, то сывороточный альбумин можно использовать для их переноса. При этом между веществом и альбумином возникает химическая связь.

### **Коллаген**

Коллаген — фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани животных сухожилие, кость, хрящ и обеспечивающий ее прочность.

Коллаген существует в нескольких формах. Основная структура всех типов коллагена является схожей. Коллагеновые волокна образуются путем агрегации микрофибрилл, имеют розовый цвет при окраске гематоксилином и эозином и голубой или зеленый при различных треххромных окрасках. Бюиомакромолекула коллаген крупная, размер ее несколько (5-6) микрон.

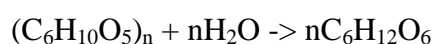
Продуктом денатурации коллагена является желатин. С точки зрения питания, коллаген и желатин являются белками низкого качества, так как они не содержат всех незаменимых аминокислот, необходимых человеку — это неполноценные белки. Производители основанных на коллагене пищевых добавок утверждают, что их продукты могут улучшить качество кожи и ногтей, а также здоровье суставов. Однако, общепризнанные научные исследования не нашли никаких доказательств в поддержку этих утверждений. Наличие у людей проблем в этих областях, с большей вероятностью, вызвано какими-то иными причинами, нежели нехваткой белков.

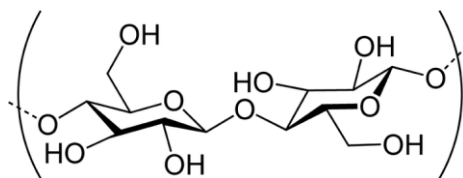
Инъекции коллагена и других подобных препаратов делают кожу более упругой и гладкой. Чтобы понять действие коллагена, обратимся для начала к естественным процессам, происходящим в коже. Кожа состоит из трёх слоёв: эпидермиса, дермы и подкожного слоя. Самый верхний слой, эпидермис, контролирует потерю влаги через поры. Без защитного барьера тело бы очень быстро обезвоживалось. Прямо под эпидермисом расположен второй слой - дерма. Дерма, содержащая также капилляры, нервные окончания и волосяные фолликулы, состоит в основном из белка, называемого коллагеном. Этот белок формирует волокна, составляющие основу ткани, и создаёт основу для роста капилляров и новых клеток. Таким образом, коллаген - опора кожи. Гиподермис, нижний слой кожи, состоит преимущественно из жира и соединительной ткани, через него проходят более крупные сосуды и нервные окончания. В нём также содержатся потовые железы и клетки, производящие коллаген. Гиподермис отвечает за сохранность тепла вашего тела и защиту внутренних органов.

Вместе с коллагеном в организм можно внедрять лекарственные препараты. Если коллаген ”приживается”, лекарственные препараты успешно поступают в кровь. Пришить лекарственные препараты к коллагену можно посредством соответствующих аминокислотных последовательностей у коллагена и лекарственного препарата.

### **Целлюлоза**

Полисахарид; главная составная часть клеточных оболочек растений. Размер биомолекулы несколько (минимум 1-2) микрон. Целлюлоза состоит из остатков молекул глюкозы, которая и образуется при кислотном гидролизе целлюлозы:





Серная кислота и йод, благодаря гидролизу, окрашивают целлюлозу в синий цвет. Один же йод — только в коричневый. Кроме целлюлозы, в состав клеточных оболочек входят еще несколько других углеводов, известных под общим именем гемицеллюлоз, извлекаемых из клеточных оболочек 1%-м раствором соляной или серной кислоты при нагревании.

Один из относящихся сюда углеводов — парагалактан, дающий при гидролизе галактозу. В клеточных оболочках имеются еще и другие гемицеллюлозы, дающие маннозу, арабинозу и ксилозу.

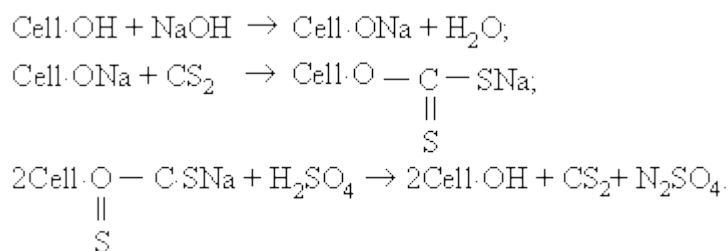
С возрастом многие клеточные оболочки перестают давать реакцию на целлюлозу, потому что одни подвергаются одревеснению, другие — опробковению и т. д.

Почти чистой клетчаткой является хлопок, который идет на изготовление ткани. Целлюлоза древесины дает бумагу. Целлюлозу и ее эфиры используют для получения искусственного волокна (вискозный, ацетатный, медно-аммиачный шёлк, искусственная шерсть), пластмасс, кино и фотоплёнок, лаков, бездымного пороха и т. д.

Целлюлоза - стойкое вещество, не разрушается при нагревании до 200 С. Не растворима в воде и слабых кислотах. Обладает прочностью, но эластична.

На основе целлюлозы получают вискозное волокно и целлофан.

Очищенная природная целлюлоза обрабатывается избытком концентрированного гидроксида натрия; после удаления избытка ее комки растирают и полученную массу выдерживают в тщательно контролируемых условиях. При таком «старении» уменьшается длина полимерных цепей, что способствует последующему растворению. Затем измельченную целлюлозу смешивают с дисульфидом углерода и образовавшийся ксантогенат растворяют в растворе едкого натра для получения «вискозы» – вязкого раствора. Когда вискоза попадает в водный раствор кислоты, из нее регенерируется целлюлоза. Упрощенные суммарные реакции таковы:



Вискозное волокно, получаемое выдавливанием вискозы через малые отверстия фильеры в раствор кислоты, широко применяется для изготовления одежды, драпировочных и обивочных тканей, а также в технике. Значительные количества вискозного волокна идут на технические ремни, ленты, фильтры и шинный корд.

Целлофан. Целлофан, получаемый выдавливанием вискозы в кислую ванну через фильеру с узкой щелью, проходит затем через ванны промывки, отбеливания и пластификации, пропускается через сушильные барабаны и сматывается в рулон. Поверхность целлофановой пленки почти всегда покрывают нитроцеллюлозой, смолой, каким-либо воском или лаком, чтобы уменьшить пропускание паров воды и обеспечить возможность термической герметизации, так как целлофан без покрытия не обладает свойством термопластичности. На современных производствах для этого используются полимерные покрытия поливинилиденхлоридного типа, поскольку они в меньшей степени влагопроницаемы и дают более прочное соединение при термогерметизации.

Целлофан широко применяется главным образом в тароупаковочном производстве как оберточный материал для галантерейных товаров, пищевых продуктов, табачных изделий, а также в качестве основы для самоклеющейся упаковочной ленты.

Целлюлоза в организме человека не переваривается. Вводить в человеческий организм лекарственные препараты вместе с целлюлозой нельзя.

3. Наиболее распространенное мнение, бытующее в научном сообществе, таково: наночастицы достаточно малы, для того чтобы проникать через мембраны клеток, но слишком велики, чтобы нарушать протекание нормальных клеточных процессов. Но чрезвычайно малые их размеры затрудняют удаление наночастиц из окружающей среды с помощью традиционных методов фильтрации. И сейчас уже не подлежит сомнению, что некоторые нанообъекты могут оказывать токсичное действие на клетки различных тканей.

Например, вдыхание наночастиц полистирола не только вызывает воспаление легочной ткани, но и провоцирует тромбоз кровеносных сосудов. Есть сведения, что углеродные наночастицы могут стать причиной расстройства сердечной деятельности и подавить активность иммунной системы. Опыты на аквариумных рыбах и собаках показали, что фуллерены - многоатомные шаровидные молекулы углерода поперечником в несколько нанометров - могут разрушать ткани мозга.

Наночастицы могут проникать сквозь клетки эпителия, распространяться по ходу отростков нервных клеток, кровеносных и лимфатических сосудов. При этом они избирательно накапливаются в разных типах клеток и в определенных клеточных структурах. Столь высокая проникающая способность не только делает наночастицы

ценнейшим лекарственным компонентом, но и повышает их потенциальную опасность для здоровья человека, отмечает ученый. Тем не менее, о влиянии наночастиц на человеческий организм пока известно довольно мало.

При вдыхании наночастицы благодаря диффузии эффективно распространяются во все отделы дыхательного тракта. Маленькие размеры облегчают поступление в клетки и перенос в систему кровообращения и лимфатическую систему, и наночастицы достигают таких потенциально чувствительных мишеней как костный мозг, лимфоузлы, селезенка и сердце.

Действительно, наночастицы могут легко проникать в клетку следующим образом. Они могут растворяться в липидах мембраны, а затем путем диффузии через липидные бислои попадать вовнутрь клетки.

4. Под действием УФ-излучения в полупроводниковых наночастицах происходит переход электрона из валентной зоны в зону проводимости, пара носителей заряда (электрон и дырка) могут выходить на поверхность наночастицы и участвовать в процессе восстановления НАД<sup>+</sup> и выделении водорода.

#### Смирнов Евгений Алексеевич

1. Диаметр иона калия ~0,28 нм, следовательно, диаметр калиевого канала составляет ~0,5- 0,7 нм. Таким образом, УНТ может проникнуть через такой канал, а фуллерен уже вряд ли.

2. Размер наночастиц будет зависеть не от массы молекул, а от их взаимного расположения в пространстве. Фосфолипиды ~ 2-5 нм, мономер инсулина ~ 6-8 нм, альбумин ~ 10-15 нм, коллаген ~ 50-70 нм, целлюлоза ~ 200-300 нм. Для доставки лекарственных средств можно использовать фосфолипиды, альбумин и коллаген. Целлюлоза имеет слишком большие молекулы, а инсулин может вызвать ответную реакцию организма. С наночастицами фосфолипидов с помощью фосфатной группы или углеводородного хвоста, инсулин, альбумин и коллаген – через образование пептидных связей, целлюлоза – использование гидроксильных групп.

3. Возможные пути проникновения: дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, кожа и обонятельные нервы. В саму клетку такие наночастицы могут проникать через мембрану или захватываться клеткой в виде вакуолей. Возможны пути утилизации: агрегация частиц до некоторых размеров в лизосомах и вывод естественным путём.

4. В наночастице сульфида кадмия или диоксида титана при облучении УФ возникает экситон. Если с двух противоположных концов от квантовой точки поставить проводник электронов и дырок, то можно разделить заряды. Следовательно, в среде, где

присутствует вода в некотором количестве, возможен следующий механизм: при попадании света в квантовый точку в ней возникает экситон. Электрон перемещается по ферменту, а дырка передаётся на связанную с поверхностью молекулу воды, от которой отщепляется протон и образуется радикал, который реагирует с непредельной органикой, взятой в качестве растворителя. Протон перемещается к молекуле НАД<sup>+</sup>, затем происходит ещё один цикл «разрядки» квантовой частицы и реакция, представленная на рисунке. Далее второй протон образует молекулу H<sub>2</sub> со связанным протоном НАДН



## Бионанопроволока (2008, биология / медицина)

Макеева Екатерина Анатольевна

1.

а) Необходимо найти следующие данные: расстояние между витками ДНК, среднее количество пар НК на один виток

$$\text{длина} = (\text{количество пар}) / (\text{количество пар в витке ДНК}) * (\text{длина витка ДНК})$$

$$L \approx 16 \text{ мкм}$$

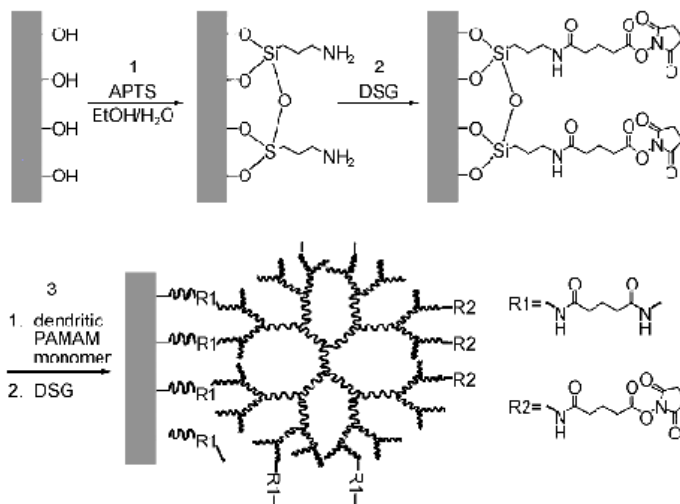
б) Из клеток растений возможно выделить ДНК. Но ДНК растений гораздо длиннее, чем ДНК фага (длина больше сантиметра), к тому же ДНК растений находится в ядре в скрученном состоянии. Непонятно, можно ли ее будет «развернуть», и даже если да, то не перекрутится ли она сама собой. ДНК будет разная по длине что тоже вызовет проблемы. Получить «клубок проволоки» из нее, возможно, и получится, но практическое значение это будет иметь небольшое. Можно попытаться «нарезать» ее ферментами на маленькие кусочки, но получится смесь из разных отрезков разной длины и разного состава, которую будет сложно иммобилизовать. С ДНК фага работать безусловно проще: карта генома известна, и можно легко оперировать с ДНК перечисленными ниже методами.

2.

а) В вирусе – линейная, но после попадания в клетку (инфицирования) приобретает циклическую форму за счет слипания липких концов.

б) Выпрямить можно при нагревании: за счет энтропийного фактора она должна разомкнуться (циклические формы всегда имеют меньше степени свободы).

Сначала необходимо модифицировать гидроксигруппы стеклянной поверхности бифункциональными силанали содержащими группы, к которым можно пришить комплиментарные липким концам цепочки ДНК, затем добавить ДНК фага и погреть (чтобы она разомкнулась и «прилипла» к комплиментарным концами к комплиментарным последовательностям, содержащимся на поверхности).

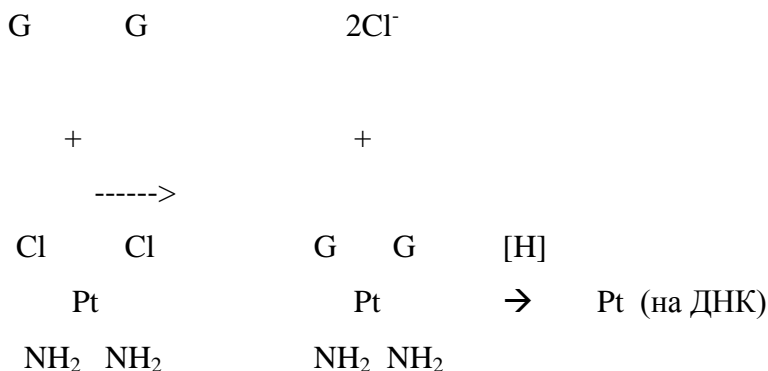


Для функционализации поверхности стекла может использоваться поли-L-лизин (реагирует с SiOH группами на поверхности), который при взаимодействии с раствором ДНК образует прочные комплексы за счет положительно заряженной второй аминогруппы и фосфатных остатков ДНК.

3.

4.

а) Сначала происходит образование комплекса (нуклеофильное замещение хлора в комплексах платины): платина связывает 2 спирали по азотам (близлежащие GG, у них наиболее близкое расстояния к необходимому для оптимальному расположению лигандов в квадрате координационной сферы платины), затем происходит обычное восстановление платины (или образования гидрида, на котором возможно еще восстановить металл)



б) С атомом меди не происходит такого нуклеофильного замещения в комплексах, как с атомами платины. Медь «держится» на ДНК за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными фосфатными группами, образуя такие ионные пары далеко не со всеми группами ДНК. Альтернатива состоит в проведении реакции с солью меди в растворителе, стабилизирующем такие ионные пары, например в ДМФА.

1.

а) В двухцепочечной В-спирали ДНК на каждую пару нуклеотидов приходится 0.33 нм длины. Следовательно, полная длина ДНК фага  $\lambda$  составляет 16 мкм.

б) Обсудите перспективы использования в качестве ДНК-источника сельскохозяйственных растительных культур, скажем, семейства бобовых.

Никаких перспектив. Ни у бобовых, ни у фага  $\lambda$ . ДНК получают из рыболовецких отходов – рыбьих молок (salmon sperm). Бобовые нужно еще надо вырастить, подкармливать, убрать с поля, для продуцирования фага  $\lambda$  (вернее E.coli) тоже нужны питательные среды, нужная температура и т.д. А рыбьи молоки – это отходы, выбрасываются за борт десятками, если не сотнями тонн в год. ДНК фага  $\lambda$  хороша для лабораторных исследований, как надежный источник ДНК определенной длины, но для промышленных производств рыба ДНК несомненно дешевле.

2.

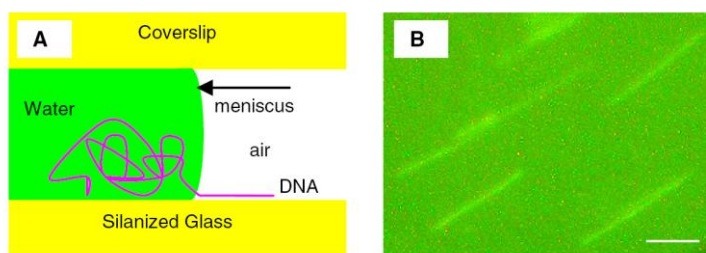
а) Очевидно, свернутую ☺. Иначе бы она просто не поместилась бы в клетку. Свернутое состояние ДНК в растворе обуславливается общим для всех (не беря в расчет совсем уж жесткие) линейных полимеров свойством образовывать в растворе статистические клубки. Энтропия, как-никак.

б) Предложите способ «выпрямления» ДНК и ее иммобилизации на поверхности стекла. Указание: используйте возможность функционализации стеклянной поверхности.

Вообще, двухцепочечная спираль ДНК – достаточно жесткая структура за счет отталкивания одноименно заряженных фосфатных групп. Длина сегмента Куна для нее равна 53 нм, следовательно, для коротких нанопроводов (соединения «по месту», менее 20 нм) дополнительно выпрямлять ДНК не понадобится.

Чаще всего для адсорбции ДНК на стекло или слюду поверхность предварительно покрывают положительно заряженным полимером, поли-L-лизином, или поли-арнитином, например, или силанизируют поверхность 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES) для создания положительных зарядов. Также в сорбционный буфер добавляют ионы  $Mg^{2+}$ . Тем не менее, в нашем случае так поступать нельзя. В AFM-исследованиях показано, что присутствие на поверхности положительно заряженных полимеров уменьшает жесткость цепи за счет компенсации зарядов фосфатных групп, а наличие ионов магния может приводить к появлению «изломов» цепи по той же причине. То есть адсорбировать-то мы адсорбируем, только еще более свернем полимер. Поэтому необходимо использовать на первый взгляд парадоксальный подход: покрывать поверхность сильным полианионом и иммобилизовать в «контрольных точках» прохождения провода ДНК-связывающие белки,

например ДНК-связывающий домен FokI эндонуклеазы или использовать химическую пришивку, например тем же иммобилизованным цисплатином.



Еще один оригинальный способ (да, я тоже нашел этот обзор ☺) основан на применении капиллярных сил. На предварительно силанизированную (таким образом, гидрофобизованную) поверхность стекла наносят ДНК из капли жидкости, зажатой между подложкой и покровным стеклом, как показано на рисунке. Один конец цепи химически пришивается к подложке, после чего каплю жидкости постепенно смещают. На правом рисунке представлено AFM-изображение иммобилизованных таким образом молекул ДНК. Присутствие ионов магния в данном случае увеличивает процент «выпрямленных» цепей.

Также можно растягивать молекулы ДНК, химически пришив один конец на подложку и приложив постоянное электрическое поле в нужном направлении. За счет явления электрофореза отрицательно заряженная молекула ДНК будет пытаться двигаться в направлении анода. Но поскольку она иммобилизована одним концом, то результатом будет ее выпрямление. Далее для закрепления необходимо пришить к подложке и второй конец молекулы.

3.

а) Предложите схему увеличения длины ДНК с использованием методов геной инженерии или без использования таковых.

Как уже было сказано, самым дешевым источником ДНК являются рыбы молока. Длина ДНК одной хромосомы составляет порядка нескольких десятков миллионов пар оснований, если только ее не порвали (в прямом смысле, например при перемешивании) в процессе выделения. Так что не вижу смысла дальнейшего наращивания длины ДНК. Нужно всего лишь раскусать эту разнородную ДНК различными рестриктазами (также можно делать «недорестрикт») и центрифугированием в градиенте NaCl выделить фрагменты необходимой молекулярной массы, т.е. длины. Тем не менее, раз задание есть, его надо решить ☺.

Проще всего эту проблему можно решить, используя фермент теломеразу, которая удлиняет 3'-конец ДНК, содержащий теломерные повторы одноцепочечной ДНК, составленной из таких же теломерных повторов.

Допустим, что у нас есть неизвестный, но однородный препарат ДНК (то есть все молекулы ДНК в нем идентичны), например ДНК фага  $\lambda$ . Допустим, что у нас его много, и мы можем провести все необходимые исследования.

Итак, берем аликвоту препарата, обрабатываем его различными рестриктазами по отдельности и вместе, разгоняем по молекулярным массам на фореze и составляем карту рестрикции нашей ДНК. Выбираем ту рестриктазу, для которой есть только 1 сайт рестрикции и он расположен как можно ближе к концу молекулы. Обрабатываем ей уже препаративное количество ДНК, центрифугируем в градиенте NaCl, выделяя высокомолекулярную фракцию, дефосфорилируем 3'-конец фосфатазой. К ДНК, теперь содержащей липкие концы, добавляем искусственно синтезированную пару комплементарных олигонуклеотидов, содержащих на 5' нужные нам липкие концы, на 3' – пять-шесть повторов TTAGGG. Сшиваем разрезы лигазой, опять проводим процедуру очистки ДНК. Это были приготовления ☺. Теперь добавляем теломеразу, свободные трифосфаты и спокойно контролируем длину целевой ДНК временем реакции. Далее нужно будет добавить праймер: 5'-(CCCTGG)<sub>4</sub>-3' и достроить вторую цепь на этом праймере при помощи ДНК-полимеразы. Ее нужно взять без 5'-3' экзонуклеазной активности и проводить реакцию достаточно долго, чтобы случайным образом присоединяющиеся праймеры, многократно инициировав полимеразную реакцию, достроили-таки нашу ДНК. Многочисленные разрезы затем сшиваем лигазой.

б) Рассмотрите влияние таких факторов, как концентрация ДНК, температура и pH раствора на выход длинных молекул в вашей схеме.

Уф... Даже не знаю, как ответить на этот вопрос. Единственный правильный ответ: сложно влияет. Универсального рецепта нет, на каждую перечисленную операцию есть набор эквивалентных протоколов, своего рода поваренная книга, содержащая по несколько рецептов, что и как можно проводить. Не удастся с одним рецептом – бери другой и пробуй. Знать все протоколы используемых операций невозможно, чаще всего в голове держат только наиболее часто используемые, остальные смотрят по мере надобности. Более того, мало кто знает, как же влияет тот или иной компонент, изменение тех или иных условий (и мало кто хочет проверять это на собственных образцах). В протоколе написано, что у большинства исследователей получается именно по этой схеме. Кстати, иногда условия протоколов могут даже противоречить друг другу ☺. В общем, сплошной инструментализм. Но эффективный. Через руки молекулярных биологов

проходит такое громадное количество разнородного материала, что кропотливо подбирать оптимальные условия было бы недопустимой тратой времени. Хорошим источником информации в рунете является раздел «Методы» сайта molbiol.ru, в англоязычной части сети – бывшие протоколы Humana Press, теперь расположенные на сайте springerprotocols.com.

Если используются коммерческие наборы для проведения, например, полимеразной реакции, то есть и коммерческий буфер от производителя, в котором эту реакцию нужно осуществлять, и протокол процесса. Состав буфера, как правило, не разглашается, но производитель гарантирует, что именно в нем при соблюдении всех описанных в протоколе условий вероятность успеха близка к 100%.

Несмотря на все вышесказанное, задача есть задача. И отвечать на вопрос надо. Рассмотрим влияние перечисленных факторов на процесс, например, лигирования («зашивания») ДНК. Известно, что для достижения наилучшего выхода целевой ДНК лучше всего использовать концентрации ДНК, не превышающие 10 мкг/мл. При более высоких концентрациях фермент начинает катализировать неспецифическое сшивание тупых концов, образование так называемых конкатамеров. Оптимум рН для каждого применяемого фермента свой, для большинства он лежит в области 7.5-8.2, следовательно, отклонения от этого оптимума вызовут снижение скорости реакции или при экстремальных значениях рН денатурацию фермента. Температуру советуют поддерживать 14-16°C с инкубацией ночь или (что менее предпочтительно) комнатной с инкубацией 0.5-3 часа. Вероятно, это связано с подвижностью несшитых цепей ДНК, потому что оптимум, например T4 ДНК-лигазы лежит выше этих температур. При использовании этого фермента, кстати, требуется обязательное присутствие 1мМ АТФ и ионов магния (АТФ является кофактором, магний – неотъемлемый спутник АТФ, образуя комплекс с трифосфатом, ориентирует нужным образом АТФ в активном центре фермента). Стоит отметить, что даже при соблюдении всех этих условий процесс может не пойти, в протоколах коммерческих наборов есть целые страницы причин, которые могут мешать, и способов их устранения.

4.

а) Опишите химические процессы, происходящие при взаимодействии препарата цисплатина (цис-диамминдихлороплатины (II) –  $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$  с ДНК и последующим восстановлением боргидридом натрия.

Цисплатин является активным электрофильным агентом, образующим мостик между двумя нитями ДНК или внутри одной нити. В водном растворе активная частица -  $[Pt(NH_3)_2(H_2O)Cl]$  или диакваформа. Они взаимодействуют с N7 аденина и гуанина с

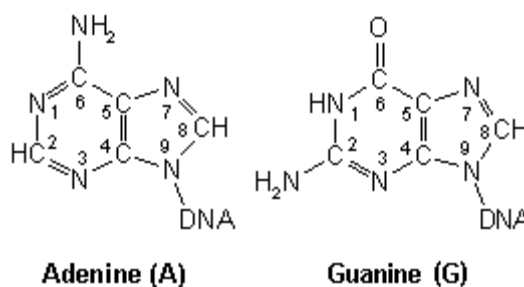
отщеплением воды. При избытке цисплатина вся ДНК оказывается сшита платиновыми мостиками. При последующем восстановлении  $\text{Na}[\text{BH}_4]$  платина восстанавливается до металла, формируя проводящие кластеры.

б) В чем причина неуспеха осаждения меди на ДНК подобным способом?

Во-первых, подобные комплексы меди вызывают появление разрывов в цепи ДНК за счет связывания с гидроксильными остатками дезоксирибозы с образованием хелатных комплексов. Но даже если использовать обычный нитрат меди, который ничего не рвет, а просто как и все положительные ионы, взаимодействует с фосфатными группами ДНК, восстановление боргидридом приведет к получению не металлической меди, а непонятно чего, в книжках по неорганике обычно называемого «гидридом меди». Именно в кавычках. Это соединение медленно разлагается водой. Если же взять менее активный восстановитель, например аскорбат в присутствии того же нитрата меди, то равномерно покрыть ДНК медными кластерами тоже не получается, вместо этого они осаждаются неспецифически на подложке. Используя высокую концентрацию ионов калия и натрия, можно существенно уменьшить неспецифический сигнал, но цельных медных нанопроводов все равно не получается. Видимо вследствие слишком редкой посадки ионов меди на ДНК.

в) А как все же получить медную ДНК-нанопроволоку?

А надо? ☺ Медь легко окисляется, золотые и платиновые нанопровода куда более стабильными. И еще раз придется самому себе сказать: раз вопрос есть, на него надо отвечать. Надо сначала активировать ДНК той же платиной, как описано в пункте **3а**, восстановить цисплатин, получив металлические зародыши на ДНК, а затем уже использовать аскорбат + нитрат меди.



Харламова Марианна Вячеславовна

1)

Длина одного нуклеотида равна 0,34 нм. Двухцепочечная ДНК  $\lambda$ -фага составлена из 48502 пар нуклеотидов (п.н.) с одноцепочечными комплементарными «липкими» концами длиной по 12 п.н. Тогда длина ДНК составляет  $48514 \cdot 0,34 = 16,5$  мкм.

Участок ДНК, на котором закодирована информация о каком-то одном белке, называется геном. Средняя длина ДНК, кодирующая один ген, обычно соответствует приблизительно 1000 пар нуклеотидов. На одной молекуле ДНК обычно располагается большое количество генов, а также последовательности, оказывающие влияние на их активность, и некодирующие последовательности, роль которых пока неясна. Растения имеют 35-40 тысяч генов, у человека их около 70 тысяч. Длина ДНК растений достаточно велика и может использоваться для создания на ее основе нанопроволок.

2.

Бактериофаг - вирус, поражающий клетки бактерий. Бактериофаг прикрепляется к оболочке бактерии своими отростками и с помощью ферментов растворяет ее. В клетки бактерии попадает ДНК бактериофага. Белковая оболочка вируса при этом остается снаружи, а его ДНК встраивается в ДНК бактерии. Зараженная бактериальная клетка вместо собственных ДНК и белков начинает синтезировать новые вирусы. В одной клетке, таким образом, появляются десятки и сотни бактериофагов, которые проникают в клетки других бактерий и поражают их. Вирусы вызывают ряд заболеваний у растений, грибов, животных и человека. Например, вирус табачной мозаики проникает в клетки листьев табака, разрушает хлорофилл, и лист становится пятнистым. Известны вирусные заболевания человека: оспа, грипп, корь, полиомиелит, бешенство и др.

При иммобилизации ДНК на поверхности стекла можно получить ДНК-биочипы. ДНК-биочипы различают в зависимости от материала подложки и метода иммобилизации фрагментов ДНК. Самым первым появился метод иммобилизации фрагментов ДНК в объеме небольших капель или блоков геля – этот метод был разработан в ИМБ РАН российскими учеными во главе с академиком А.Д. Мирзабековым, первые публикации об этом методе - это Lysov et al., 1988 и Khrapko et al., 1989.

Затем был предложен метод иммобилизации фрагментов ДНК на поверхности стекла или реже – полимера. Обычно это микроскопное стекло размером 25 мм x 76 мм.

Различают два основных типа таких ДНК-биочипов в зависимости от природы используемых фрагментов ДНК: для производства олигонуклеотидных биочипов используют химически синтезированные одноцепочечные олигонуклеотиды длиной 20-75 н.о.; а для кДНК-биочипов – двухцепочечные фрагменты ДНК из библиотек кДНК длиной 100-2500 н.о., размноженные в бактериальных клетках или с помощью ПЦР.

ДНК-биочипы с иммобилизацией фрагментов ДНК на твердой поверхности получили наибольшее применение в биологии и медицине.

Для независимого синтеза ДНК-зондов, среди которых выделяют двухцепочечные фрагменты ДНК и олигонуклеотиды, используются различные методы. Один из них –

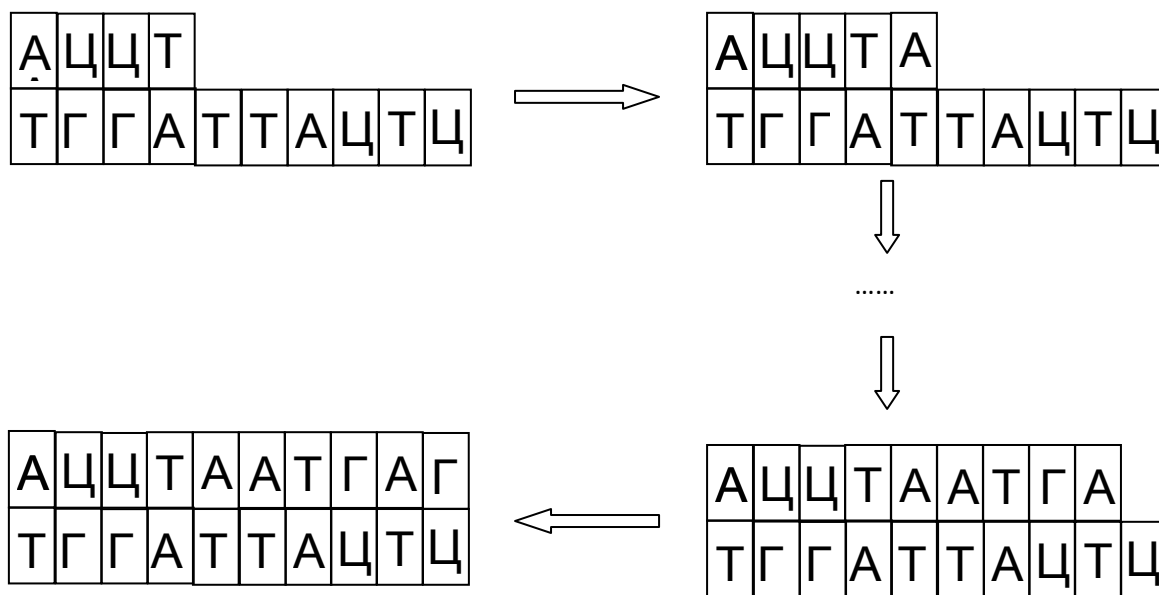


полимеразная цепная реакция – позволяет получить ген-специфичные ампликоны размером от нескольких сотен до нескольких тысяч пар оснований. Обычно, используя специфические праймеры, амплифицируют открытые рамки считывания, представляющие собой потенциальные белок-кодирующие последовательности. Оптимальная длина ампликонов для иммобилизации на ДНК-матрицах составляет 200-800 пар оснований, хотя фрагменты длиной до 1,3 тысяч пар оснований также используются. В таких матрицах каждый ДНК-зонд соответствует одному гену. Двухнитевые фрагменты ДНК наносятся на положительно заряженную поверхность ДНК-матриц. Для модификации поверхности матриц обычно используется полилизин (poly-L-lysine) или 3-аминопропил-триметоксисилан (APS). Иммобилизация фрагментов ДНК на поверхности матрицы осуществляется благодаря электростатическому взаимодействию отрицательно заряженного фосфатного остова нуклеиновой кислоты и положительно заряженной поверхности матрицы, а также за счет образования ковалентных связей между остатками тимина и аминоклуппами, расположенными на поверхности матрицы, при облучении ультрафиолетом. Среди преимуществ изготовленных таким образом матриц следует отметить высокую специфичность при гибридизации, высокую чувствительность и их низкую стоимость. В качестве альтернативы некоторые коммерческие поставщики предлагают большие коллекции 50-80-мерных олигонуклеотидов, синтезированных фосфорамидным методом. И в том, и в другом случае автоматическая локализация ДНК-зондов, находящихся в специальном буфере, на химически модифицированную поверхность матрицы осуществляется механическими роботами. Существуют две технологии нанесения: контактная и бесконтактная. Контактные роботы-принтеры наносят ДНК-зонды на поверхность матриц пинами различной формы, которые погружаются в раствор и переносят маленькие капельки специфических ДНК-зондов на поверхность матрицы. Размер локализованных таким образом ДНК-зондов составляет всего 150 мкм в диаметре. Бесконтактные принтеры используют технологию типа струйного принтера. Основное преимущество таких матриц – их стандартные размеры, что обеспечивает широкий выбор роботов-принтеров, оборудования для проведения гибридизации, лазерных сканеров и программного обеспечения для обработки результатов эксперимента. Исторически первым было изготовление ДНК-матрицы на предметном стекле, поэтому размер матриц 25x75 мм и толщина 1,0-1,2 мм не изменились. Однако плотность размещения ДНК-зондов на таких матрицах ниже по сравнению с матрицами Affymetrix – порядка 10 000-30 000 ДНК-зондов.

3.

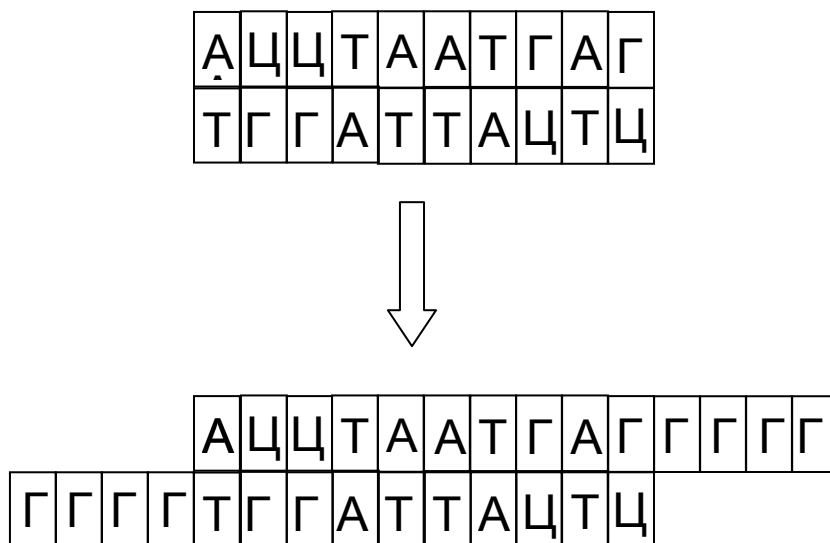
Схема увеличения длины ДНК:

1) Удлинение цепочки ДНК происходит при воздействии на исходную молекулу ферментов – полимераз (рисунок). Для работы полимеразы необходимо наличие: одноцепочечной матрицы, которая определяет цепочку добавляемых нуклеотидов по принципу комплементарности оснований; праймера – двухцепочечного участка, который присоединен к матрице, и к которому присоединяются свободные нуклеотиды; свободных нуклеотидов в растворе.



### Действие полимеразы

Существуют полимеразы, которым не требуются матрицы для удлинения цепочки ДНК. Например, терминальная трансфераза добавляет одинарные цепочки ДНК к обоим концам двухцепочечной молекулы (рисунок).



## Действие терминальной трансферазы

Вероятно, что при длине ДНК, получаемой по данному механизму, не зависит от изначальной концентрации ДНК, а зависит только от присутствия ферментов-полимераз. Оптимальной температурой этого процесса является 72°. При изменении температуры выход реакции уменьшается. Оптимальная рН среды для реакции - слабощелочная.

4.

С нуклеотидными основаниями ДДП (дихлородиамминплатина, синоним цисплатина, DDP) образует продукты вытеснения обоих атомов хлора из координационной сферы Pt. С пуриновыми нуклеотидами атом платины связывается не через экзоциклическую аминогруппу, как можно было бы предположить, а через гетероциклический атом азота N7, образуя комплексы состава  $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Guanine-N7})_2$  и  $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Guanine-N7})(\text{Adenine-N7})$ . Резкое преобладание первых (выявленное в конкурентных реакциях) объясняется образованием дополнительной водородной связи между протоном аминогруппы и экзоциклическим C6-кислородом гуанина. С цитозином связывание происходит через N3, с тиминном и урацилом в нейтральном растворе оно слабо. Ряд "предпочтений" можно построить следующим образом:  $\text{Guanine-N7} \gg \text{Adenine-N7} > \text{Adenine-N1} > \text{Cytidine-N3} \gg \text{Thymine \& Uracil}$ . Наличие фосфатной группы в 5'-положении фуранозного цикла ускоряет реакцию из-за образования водородных связей между кислородом фосфата и протонами амминных лигандов.

Взаимодействие цисплатина с одноцепочечными ДНК приводит к образованию локальных группировок GG-DDP, GXG-DDP, GA-DDP, в порядке уменьшения сродства. Цисплатин, таким образом, "сшивает" соседние основания одной цепи ДНК, причем структуры гуанин-ДДП-гуанин образуются даже "через один" нуклеотид (обозначен X). В двухцепочечной ДНК цисплатин образует аналогичные уже описанным сшивки. Рентгеноструктурные исследования показали, что форма двойной спирали при этом практически не искажается. Цис- и транс-дихлородиамминплатина во взаимодействиях с ДНК отличаются только количеством образуемых водородных связей. Причем, если первое вещество имеет противораковую активность, то второе вещество никакой противораковой активности не обнаруживает. Дальнейшее восстановление боргидридом натрия приводит к осаждению платины на ДНК, в результате получаем ДНК, покрытую наночастицами платины.

Подобным способом получить медную ДНК-проволоку не удастся, поскольку аналогичное медное соединение не будет образовывать локальные группировки с молекулой ДНК. Более того, по литературным данным, некоторые ионы металлов, среди которых медь, кадмий и ртуть, даже при малых концентрациях приводят к локальным

повреждениям ДНК: распаду двойной спирали, изменению ее формы и переходу к так называемому хугстиновскому спариванию с поворотом оснований на 180.

### Смирнов Евгений Алексеевич

1.

а) Длина молекулы ДНК равняется приблизительно 16 мкм (16,01358). Длина одной пары нуклеотидов – 0,33 нм, а общее количество п.н. – 48502+24.

б) Скорее всего, можно использовать ДНК различных вирусов, паразитирующих на данном виде растений.

2.

а) Обычно вирусная ДНК принимает форму кольца.

б) Если к стеклянной поверхности «приклеить» липкий конец, комплементарный тому, что образуется при действии на такую вирусную ДНК ДНК-рестриктазы. Однако возможен более простой способ. Так как ДНК-рестриктаза оставляет 3'-конец, на котором находится ОН группа, то можно связать эту группу с поверхностью стекла (например, с образованием полуацеталей).

3.

а) Возьмём вирусную кольцевую ДНК и добавим к ней ДНК-рестриктазу, затем добавим необходимые количества нуклеотидов и ДНК-полимеразу, а потом дезоксирибонуклеазу, которая оборвёт синтез ДНК-цепочки. Другой способ может заключаться в следующем: расщепление ДНК с помощью рестриктазы и связывание липких концов с помощью ДНК-лигазы.

б) Температура всегда влияет на синтез ДНК не самым лучшим образом, так как при не очень больших температурах происходит изменение структуры ДНК, рН так же может «убить» ДНК, поэтому следует поддерживать рН соответствующий внутриклеточному.

4.

а) Соединения платины координируются к фосфатным группам, далее при восстановлении атомы собираются сначала в кластеры, где их степень окисления постепенно уменьшается, а затем при полном восстановлении превращаются в наночастицы размером 5 нм, которые координированы к фосфатным группам и, при этом, покрыты оболочкой из аммиачных групп.

б) Комплексы меди (2+) несколько меньше по размерам, чем комплексы платины (2+), что связано с ионными радиусами соответствующих элементов ( $\text{Cu}^{2+}$  - 0,71,  $\text{Pt}^{2+}$  - 0,8 А). И соединения меди могут проникать во внутренние участки ДНК, разрушая её структуру, при этом медь может связываться с азотистыми основаниями. Вдобавок, при восстановлении

меди не происходит образование кластерных структур, что так же не способствует формированию наночастиц на поверхности ДНК.

в) Возможно получить такие структуры удастся при использовании соединений меди (1+) и её комплексов, тогда размер комплексов больше, а, следовательно, при обработке не будет происходить разрушения ДНК. А восстановление будет протекать более быстро, что приведёт к образованию наночастиц. Другой способ – осаждение уже готов наночастиц на поверхность ДНК. ДНК обрабатываются раствором, содержащим наночастицы меди, а затем смесь нагревается до небольших температур с целью создания условий для изменения координирующих агентов, тогда появляется возможность образования связей с кислородами фосфатной группы.

## Нановесы (2008, биология / медицина)

Макеева Екатерина Анатольевна

1. Возможно повышение коэффициента добротности кантилевера (например, проводя измерения в вакууме).

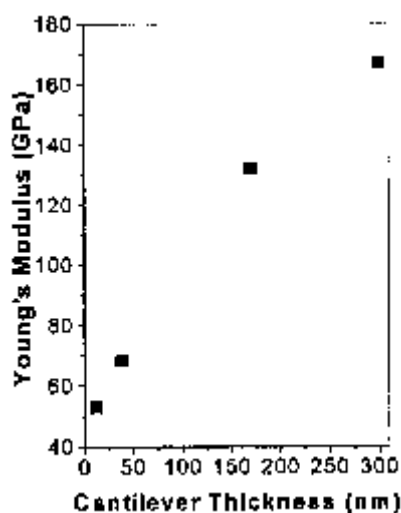
Изменение (оптимизация) размеров кантилевера. Классическая теория резонаторов предполагает, что при снижении размеров снижается масса кантилевера и масса слоя молекул на нем, что позволяет улучшать чувствительность.

Толщина слоя антител может быть сопоставима с толщиной кантилевера, таким образом, изменяются механические свойства.

Специальные покрытия поверхности, чтобы не «садился» мусор.

2. Предположения:

массой рецепторов пренебрегаем, модуль Юнга не зависит от нанесенных на поверхность рецепторов



Для 50 нм толщины модуль Юнга составляет 70 ГПа.

Считаем добротность = 20

Коэффициент жесткости кантилевера выражается через коэффициент модуль Юнга для кремния и размеры:

$$k = 0.25E wt^3/l^3$$

где E – модуль Юнга, w – ширина, t – толщина, l – длина.

Резонансная частота выражается по формуле осциллятора:

$$f_0 = 0.162 \cdot (E/\rho)^{0.5}$$

Частота кантилевера (тоже, что и  $\omega_0$ )

$$f_0 \approx 0.162(E/\rho)^{1/2} t/l^2$$

$\rho$  - плотность кремния  $2.33 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$

Если считать, что масса  $\Delta m$  белка расположилась вся на конце кантилевера, то сдвиг частоты будет

$$2\pi\Delta f_0 \approx (35Ewh^3)^{1/2} [(33m_c l^3)^{-1/2} - (33m_c l^3 + 140\Delta m l^3)^{-1/2}]$$

где  $m_c$  – масса кантилевера

Что в предположении  $\Delta m/m_c \ll 1$  приведет к:

$$\Delta f_0/\Delta m \approx 2.12f_0/m_c$$

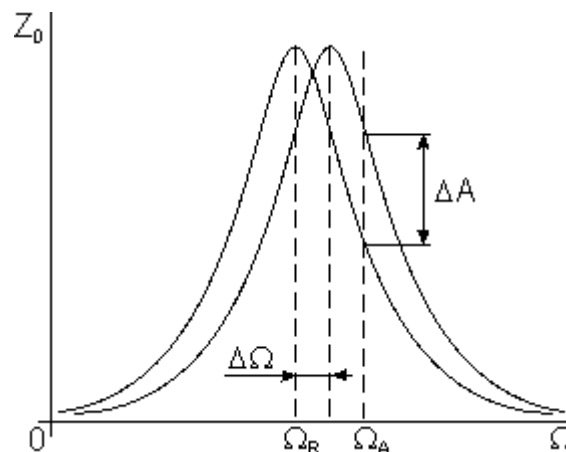
Таким образом, чем тоньше кантилевер, тем больше будет изменение резонансной частоты на единичный прирост массы. Однако, у толщины есть предел, так уже 12 нм кантилевер будет состоять из примерно 22 атомных слоев кремния (однако такие размеры приводят к еще удовлетворительным характеристикам добротности)

Повышение коэффициента добротности: от 5 на воздухе, до 10000 в высоком вакууме.

По литературным данным чувствительность кантилеверов составляет примерно  $0,5 \omega_0/mc$

Смещение резонансной частоты:

$$\Delta\Omega \approx -\frac{\omega_0}{2k} F'_{ts}$$



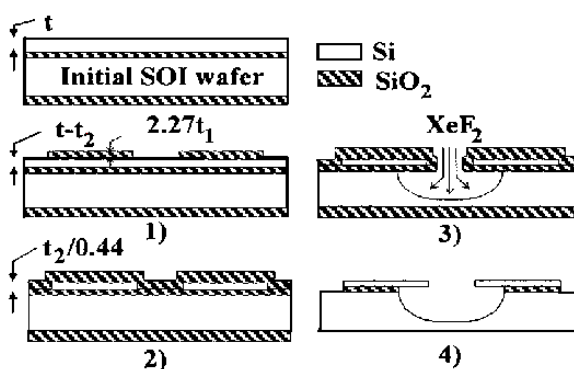
$$\Delta A \approx \Delta\Omega \frac{dZ_0}{d\Omega}(\Omega_A) \approx -\left(\frac{2Z_{\max}Q}{3\sqrt{3}k}\right) F'_{ts}$$

По критерию Релея (на самом деле слишком жесткий):

$$\Delta A = 0,5 Z_{\max}$$

The Young's modulus for ultrathin silicon cantilever beams used in these calculations was 70 GPa (19), and the density of silicon used was  $2.33 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$  (20). By using these values, one may then estimate the minimum detectable frequency shifts (see supporting information).

3. На подложке делают слой  $\text{SiO}_2$  с нанесенным на нее монокристаллическим кремнием. Затем слой кремния окисляют кислородом, чтобы сверху вырос слой  $\text{SiO}_2$  (толщина кремневого слоя уменьшается на контролируемую величину  $t_1$ ). «Заготовки» будущих кантилеверов наносятся с помощью фотолитографии.  $\text{SiO}_2$  вне «заготовок» кантилеверов стравливается HF (на кремний HF не действует, заготовки закрыты маской). Затем проводится второе, сухое, окисление, в результате которого происходит полное окисление слоя кремния в «незакрытых» маской зонах. Затем вытравливают небольшое окошко и с помощью  $\text{XeF}_2$  вытравливают подложку ( $\text{SiO}_2$  с  $\text{XeF}_2$  не взаимодействует). Затем удаляют все защитные слои  $\text{SiO}_2$  и получают готовые кантилеверы.



#### Евтушенко Евгений Геннадиевич

Прежде всего, хочется отметить, что в задаче описан какой-то очень плохой нанодатчик. Длина балки составляет 2 мм! Это не то что микро-, а очень даже макробалка. И как уместить «десятки и даже сотни подобных сенсоров на одном микрочипе», для меня остается загадкой. Современные микрорезонаторы имеют размеры не более 50 мкм в длину, 1 мкм в ширину и 0.5 мкм в толщину. Вот таких действительно можно уместить на чипе много. К тому же для того, чтобы получить действительно высокие чувствительности по массе, необходимо изготовить как можно более легкий (а следовательно, миниатюрный) и гибкий нанорезонатор.

Кстати, я нашел статью, посвященную описываемым в задаче резонаторам. И использовались там действительно кантилеверы совсем крохотных размеров: длиной 3-5 мкм, шириной 1.5 мкм и толщиной всего в 20-30 нм. В ней обсуждаются эффекты, возникающие, когда толщина балки сравнима с толщиной адсорбируемого слоя и модуль Юнга кантилевера оказывается зависимым от свойств этого слоя.

1. Для решения поставленной задачи необходимо рассмотреть вынужденные колебания в жидкости гибкой балки с известными размерами и модулем упругости материала, что является нетривиальной задачей. Дело в том, что для такой системы



встает проблема не то что вычисления, а хотя бы оценки коэффициента гидродинамического сопротивления. Он уже не описывается простой общеизвестной формулой (закон Стокса,  $F = 6\pi r\eta \cdot v$ ) для сферического тела при ламинарном движении жидкости. Теоретический нижний предел детектируемой массы такого кантилевера ограничивается термическим шумом системы. Можно было бы провести вычисления для вакуума, то есть отсутствия сопротивления среды, но эти оценки нам никак не помогут. Добротность лучших кантилеверов в вакууме достигает 40000, а лучших кантилеверов в жидкости – всего 300. Разница в два порядка! А ведь ширина резонансного пика, определяющая чувствительность системы, связана с добротностью прямым соотношением  $\Delta\omega = \omega_0 Q$ , где  $\Delta\omega$  – полная ширина пика на 0.7 максимальной амплитуды. Единственное, что с уверенностью можно сказать в данной задаче, это то, что для усовершенствованной модели верхний предел обнаружения в  $\frac{0.1}{2 \cdot 10^{-3} \times 3 \cdot 10^{-4}} = 1.7 \cdot 10^5$  раз выше, чем для исходной.

2.

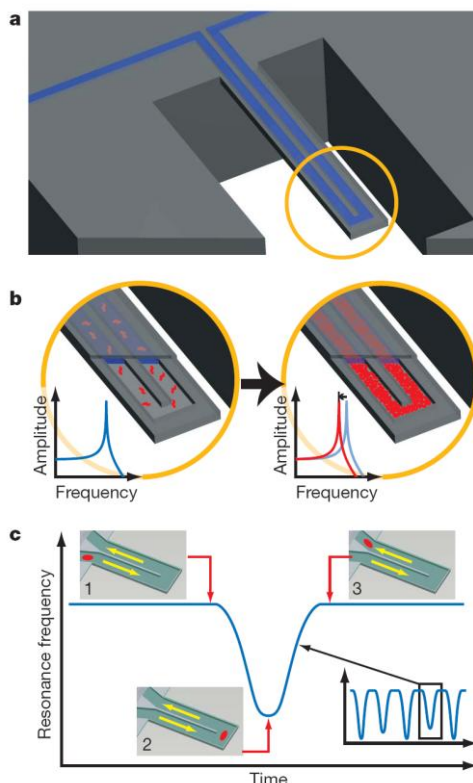
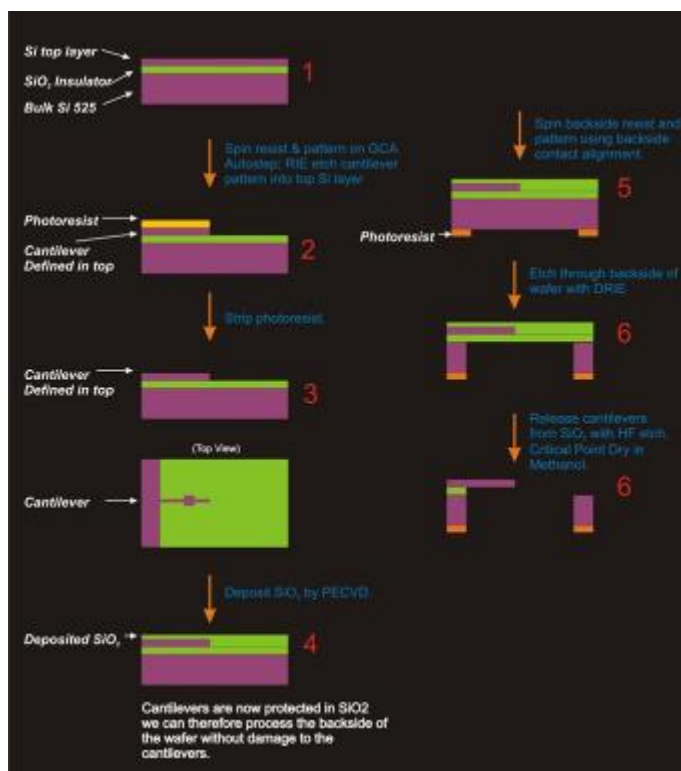


Рис. 1.

Как уже было сказано, колебания балки в жидкости сильно демпфированы из-за сопротивления среды. Не так давно был предложен принципиально иной подход к конструированию нанорезонаторных устройств для детектирования процессов

связывания антигена с антителом в реальном времени. Балка такого резонатора помещена в вакуум для достижения наименьшего сопротивления среды, а определяемый раствор проходит по каналу внутри нее (см. рис. 1). В процессе измерения происходит сканирование частоты колебаний каждые 300 мс для поиска положения резонанса. Добротность данного резонатора составляет 15000 и практически не зависит от того, воздух находится внутри канала или жидкость. Пока по этому направлению появилась только одна статья, и резонаторы далеки от совершенства, но мы с нетерпением ждем продолжения исследований. Тем не менее, уже для представленного прототипа с размерами  $200 \times 33 \times 7$  мкм и каналом  $8 \times 3$  (ширина  $\times$  высота) мкм чувствительность (в петле канала) составляет 300 аг (а теоретически оцененная, исходя из уровня термического шума в 1 аг), то есть позволяет детектировать единичные бактериальные клетки и даже единичные золотые наночастицы. В статье экспериментально подтверждена такая возможность. Следовательно, используя в таких устройствах принцип сэндвич анализа со вторыми антителами, мечеными наночастицами золота, можно уже на прототипе достигнуть уровня детектирования единичных молекул антигена любого размера (главное чтобы он имел хотя бы 2 антигенных детерминанты для осуществимости сэндвич-иммуноанализа).



Такие микрорезонаторы изготавливались из пластины кремния-на-изоляторе (SOI). Методом прямой лазерной литографии (direct laser lithography) и реактивного ионного травления (RIE) тонкого слоя кремния формировались каналы, затем верхний слой

кремния шлифовался для получения нужной высоты каналов. Последующим химическим травлением удалялся подлежащий слой оксида кремния, таким образом, высвобождая кремниевую пластину толщиной 3 мкм с вырезанными на ней каналами. Этот слой кремния переносился на отполированную пластину SOI и сверху закрывался еще одной тонкой пластиной кремния. Полученная стопка спекалась для скрепления. Дальнейшие процедуры ничем не отличаются от производства обычных кантилеверов (см. рисунок), кроме необходимости точного соответствия литографических масок, тем не менее, приведем их. На слой кремния опять наносится позитивный фоторезист, засвечивается по маске ультрафиолетом, удаляется засвеченный полимер, производится RIE до слоя оксида кремния, удаляются остатки фоторезиста, методом плазмохимического осаждения из газовой фазы (PECVD) наносится предохраняющий слой оксида кремния. Затем пластина переворачивается, на обратную сторону наносится позитивный фоторезист, проводится глубокое реактивное травление (DRIE) основного слоя кремния и, наконец, высвобождение балки путем мокрого травления в HF.

## Нанодоктор (2008, биология / медицина)

### Авторское решение

1. Из имеющихся элементов можно составить больше 3 многофункциональных наносомальных платформ для ранней диагностики и успешного лечения, при этом наиболее рациональными будут следующие 3 платформы:

#### 1) Наноносители – полимерные наночастицы(Рис.1)

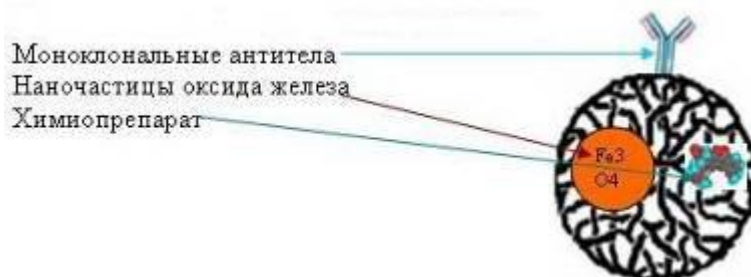


Рис.1.

#### *Векторы адресной доставки*

- Полимерные наночастицы размерами 60 -200 нм будут накапливаться в опухоли, т.к. сосуды ее кровоснабжающие имеют поры как раз такого диаметра, в отличие от нормальных сосудов с меньшими порами. Сосуды, питающие опухоль очень тонкие и высоковетвленные, что также будет способствовать накоплению наночастиц в зоне опухолевого роста.
- Моноклональные антитела необходимы для повышения специфичности транспорта высокотоксичных химиопрепаратов в мелкие метастазы и уменьшения побочных эффектов.

#### *Диагностический компонент*

Наночастицы оксида железа - биосовместимые суперпарамагнетики, усиливающие магнитный резонанс, что позволяет визуализировать при магнитно-резонансной томографии первичную опухоль и метастазы меньше 1 мм, а также сосуды, которые их кровоснабжают, выявляя новообразования на ранних стадиях.

#### *Лечебные компоненты:*

- Наночастицы оксида железа, нагревающиеся при создании переменного магнитного поля, разрушая опухолевые клетки и сосуды, кровоснабжающие опухоль и ее метастазы.
- Гипертермия, в свою очередь, повышает чувствительность выживших опухолевых клеток к химиопрепаратам.

#### 2) Наноносители – дендримеры (Рис. 2)

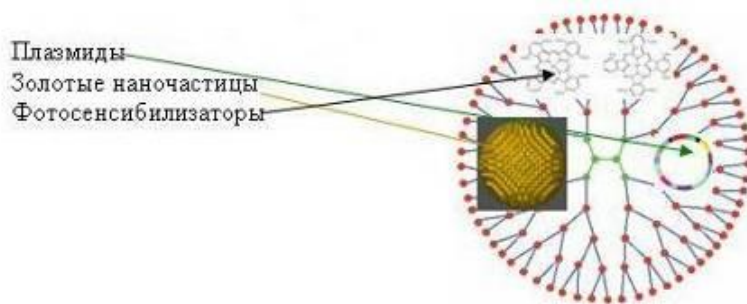


Рис.2.

#### *Вектор доставки*

Дендримеры – высокоразветвленные полимерные наночастицы, биомиметическое строение и размер которых способствует захвату опухолевыми клетками с повышенной потребностью в метаболитах и факторах роста.

#### *Диагностический компонент*

Золотые наночастицы – биосовместимы, интенсивно поглощают и рассеивают свет, что позволяет визуализировать поверхностно расположенные опухоли.

#### *Лечебные компоненты:*

- Плазмиды - внехромосомные ДНК, кодирующие онколитические гены, трансфицирующие опухолевые клетки до фотодиагностики и фототерапии с применением золотых наночастиц.
- Золотые наночастицы, нагревающиеся при воздействии сфокусированного источника света, разрушая опухолевые клетки и сосуды, кровоснабжающие опухоль и ее метастазы после трансфекции плазмидами.
- Фотосенсибилизаторы - фототоксичные вещества, при воздействии света вызывающие образование активных форм кислорода, разрушая опухолевые клетки после трансфекции плазмидами.

### **3) Микроносители - нанопористые микрочастицы (Рис.3)**

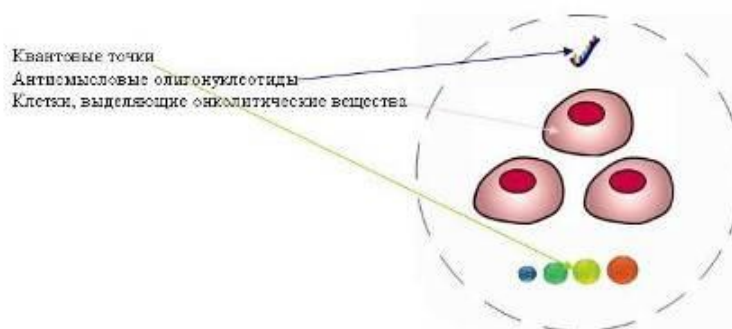


Рис.3.

#### *Вектор доставки*

Нанопористые микрочастицы размером до 1,5 мкм, защищают инкапсулированные клетки и вещества от иммунных клеток и антител, не проникающих через нанопоры, что позволяет в течение длительного времени (до 3 недель) высвободить заключенные вещества.

#### *Диагностический компонент*

Квантовые точки – полупроводниковые/проводниковые флюоресцирующие наночастицы, позволяющие визуализировать поверхностно расположенные опухоли.

#### *Лечебные компоненты:*

Антисмысловые олигонуклеотиды.

Клетки, выделяющие онколитические вещества.

#### **Замечания по решениям – типичные ошибки**

По условиям задачи требовалось из всех имеющихся элементов составить 3 рациональные многофункциональные наносомальные платформы, при этом подробно описав принцип их действия, дополнив схематическими рисунками.

При этом, для получения высокой оценки отнюдь не требовалось:

- описывать механизм действия биопрепаратов (это не медико-биологическая олимпиада);
- предлагать свои элементы и описывать механизм их действия;
- описывать методы получения наносомальных платформ.

Для удобства задача была сопровождена изображениями всех элементов, из которых можно было бы составить схематические рисунки наносомальных платформ, быстро расположив элементы. Ничего заново рисовать не требовалось.

Клиническая и экономическая рациональность использования представленных наносомальных платформ в медицине оценивалась по описанию (качественно, но не количественно) принципа их действия, а также правильности расположения элементов в схематических рисунках.

Адресность доставки заключается вовсе *не в местном введении* наносомальных платформ.

#### **2. Совет директоров**

1) Как и все инородные тела размерами менее 3 мкм, незащищенные (немодифицированные) наночастицы быстро захватываются фагоцитами с последующим разрешением вне зависимости от пути введения.

Однако, покрытие наночастиц поверхностно-активными веществами (биodeградируемыми полимерами) защищает их от фагоцитарной системы иммунитета, увеличивая время циркуляции наночастиц в крови до 10-16 часов.

2) По множеству причин:

- адресность (специфичность) доставки, позволяющая:
- повысить концентрацию диагностического/лечебного вещества в очаге желаемого воздействия, что увеличивает эффективность диагностики/лечения, что, в случае лечения, позволяет уменьшить его продолжительность.
- снизить концентрацию диагностического/лечебного вещества вне очага желаемого воздействия, что снижает возможность ложной диагностики и токсичность лечения, что, в свою очередь, позволяет увеличить его продолжительность.
- защита включенных в микро- и наноносители биопрепаратов и клеток от разрушения ферментами крови и иммунной системой;
- возможность комбинирования профилактики, диагностики и лечения.

3) Обратной стороной сверхприбыли фармацевтических корпораций от старых препаратов являются огромные государственные затраты здравоохранения на лечение и компенсацию их побочных эффектов.

В ближайшее время государственная политика развитых стран в области бионанотехнологий ускорит внедрение наносомальных веществ в клиническую практику, что постепенно вытеснит токсичные препараты.

Создание наносомальных форм уже созданных и изученных веществ гораздо дешевле поиска, синтеза и изучения новых веществ. Производство наносомальных форм для адресной доставки дешевле получения моноклональных антител.

4) Несмотря на использование запатентованных веществ, наносомальные формы представляют собой новые соединения с множеством компонентов и проявляющие новые свойства.

#### **Замечания по ответам – типичные ошибки**

1) Наноразмер отнюдь не делает наночастицы невидимыми в организме, где все происходит на молекулярном уровне. Неорганическая структура некоторых типов наночастиц не делает их ни биоинертными, ни, опять таки, невидимыми.

2) Для объяснения преимуществ наносомальной диагностики и терапии вовсе не обязательно полностью повторять первую часть задачи, касающуюся принципов действия различных многофункциональных наносомальных платформ. Необходимо четко выделить преимущества наносомальной диагностики и терапии вообще.

#### **Задача на качество, а не на количество.**

Создание наносомальных форм существующих лекарств дешевле синтеза новых препаратов вовсе не потому, что существующие вещества будут использоваться в меньших количествах в связи с адресностью доставки.

### **3. Кардиореанимация**

- 1) Нановолокнистая структура – биомиметическая матрица для деления и созревания стволовых клеток, не просто механический каркас, фиксирующий клетки и предотвращающий их вымывание из очага желаемого воздействия, но и управляемое микро- и наноокружение с возможностью добавления необходимых метаболитов и факторов роста.
- 2) Нанопористая поверхность механически предотвращает миграцию клеток по краям установленного стента, устраняя основную причину повторного забивания.
- 3) Микропьезоэлементы преобразуют механическое давление в электрические сигналы, воспринимаемые внешним портативным датчиком.

#### **Замечания по ответам – типичные ошибки**

- 2) Нанопористая поверхность предотвращает повторное забивание вовсе не за счет механического разрушения холестерина.
- 3) За предложенные, но пока фантастические проекты датчиков давления, оценка снижалась незначительно.

#### Макеева Екатерина Анатольевна

1. Наносомальная платформа – наночастица, включающая в себя набор всех необходимых функций диагностики/лечения.

Среди приведенных веществ есть 3 группы материалов, подходящих для доставки лекарств в раковую опухоль: полимерные наночастицы, дендримеры и нанопористые полупроницаемые микрочастицы. На их основе и сконструируем 3 наносомальные платформы.

Сразу стоит оговориться, что в задаче не предложено никаких способов для модификации наночастиц, а ведь это непростая задача, для которой достаточно просто смешать 2 вещества. Будем считать, что не вызовет дополнительных проблем: все используемые в платформе компоненты волшебным образом самоорганизуются и образуют наночастицу с предсказанными лечебными свойствами. Также будем полагать, что метод введения препарата в/в.

Универсальные компоненты всех платформ.

Использующиеся методы должны быть избирательными, то есть частицы должны концентрироваться в раковых клетках. Из предложенных материалов для этой цели подходят только моноклональные антитела (считаем, что у нас есть моноклональные антитела к белкам, выделяющимся на поверхности раковых клеток необходимого для нас типа). Поэтому моноклональные антитела необходимо «привязывать» к частицам всех 3-х платформ, иначе мы не сможем направить частицы именно в раковые клетки.



Также в частицах всех 3-х платформ должны содержаться вещества, которые можно будет легко обнаружить физическими методами (на томографе или по излучаемому при фотовозбуждении свету) для уточнения диагноза и контроля над распространением лекарства. Для этих целей подходят оксид железа (контраст на томографе), светящиеся в видимом диапазоне полупроводниковые КТ и наночастицы золота.

Если необходимо защитить наночастицу от действия иммунитета, то желательно покрыть поверхность частиц дендримерами, чтобы «скрыть» ее от атаки клетками иммунной системы. Макромолекула дендримера также хорошо подходит для контролируемого высвобождения лекарств и как невирусное средство доставки ДНК. Также желательно «привязать» на поверхности наночастиц проходящий сквозь клеточную мембрану белок, чтобы наночастица могла проникать в клетку с помощью рецепторов, вызывающих эндоцитоз больших молекул (троянский конь). Таким образом, улучшится время жизни этих частиц в организме, снизятся возможные побочные иммунные реакции, и ускорится проникновение частиц в клетку.

Поскольку необходимо также продиагностировать, есть ли у опухоли метастазы, то включим во все 3 платформы наночастицы оксида железа, тогда с помощью томографа можно будет контролировать распределение частиц по всему организму.

Универсальное оснащение платформ готово.

#### Платформа пористых микрочастиц.

Микрочастицы «подходят» по размерам к клеткам, вырабатывающие онколитические вещества, поэтому логично их использовать в одной отдельной платформе (на наночастицу клетки никак не поместятся). Также тут логично разместить онколитические ферменты: они могут расщеплять оболочки раковых клеток «снаружи». Кроме «универсальной» составляющей, на этой платформе больше нечего разместить: функция плазмид сюда уже включена, а препараты химиотерапии и фотосенсибилизаторы размещать рядом с клетками нельзя. Прикреплять к таким частицам антитела необязательно: частицы не несут опасных веществ, а их достаточно крупный размер будет способствовать накоплению в опухолях (в них более суженные капилляры). Применение: клеточная терапия, энзимотерапия.

#### «Золотая» платформа.

Используется для транспорта НК-содержащих фрагментов. Платформа годится для доставки плазмид в клетки опухоли (для встраивания в ДНК генов, отвечающих за «борьбу» с клетками опухоли) и антисмысловых нуклеотидов (блокируют гены, приводящие к злокачественной трансформации клетки). Применение: генная терапия.

### Полимерная платформа.

Здесь логично разместить средства для химиотерапии: если полимер разлагается в клетке, высокотоксичные препараты будут медленно высвобождаться в опухоли, не попадая в другие клетки, а быстроразрушающиеся препараты будут высвобождаться в месте доставки, таким образом, сократится их путь по организму к мишени. Также фотосенсибилизаторы для физико-биологических методов терапии.

#### **Уточнение диагноза:**

Порядок действий на полимерной платформе: кроме универсальных компонент располагаем квантовыми точками, фотосенсибилизаторами, в сами полимерные частицы встраиваем нестабильные и токсичные лекарства.

Но логичнее было бы разделить диагностическую функцию и лечебную, разместив на диагностических частицах лишь самые безопасные вещества для лечения – частицы оксида железа и, максимум, фотосенсибилизаторы.

После введения препарата через некоторые промежутки времени делаем томограмму и регистрируем через зонд свечение возбужденных светом КТ в районе опухоли. Через некоторое время, когда препарат селективно концентрируется в опухоли, можно будет определить п.1. По изменению распределения интенсивности свечения опухоли по времени – п.2. По томограммам - п.3.

Когда препарат селективно сконцентрировался, можно провести точечную гипертермию, поместив в переменное магнитное поле. Частицы оксида железа будут разогреваться, что вызовет селективную гибель клеток опухоли. Посветив на опухоль через зонд – активируется фотосенсибилизатор, что вызовет селективное повреждение клеток опухоли. Через некоторое время из биоразлагаемой частицы биополимера начнут выделяться лекарства, улучшив результат от предыдущих терапий.

При проведении 2.2 иммунотерапии и 2.4 клеточной терапий, используем нанесенные на микрочастицу и замаскированные дендримерами клетки. Для проведения 2.2 иммунотерапии необходимы дендритные клетки, которых в условии задания нет (ДК способны усиливать иммунный ответ, представляя Т-лимфоцитам неизвестные для них антигены, активируя ответ на низкоиммуногенный антигены опухоли).

Для 2.1 энзимотерапии и 2.3 генной терапий используем наночастицу золота, с прикрепленными к ней молекулами дендримеров, через которые будут связаны плазмиды и ферменты.

2.

- 1) Разрушаются, но гораздо меньше, чем немодифицированные наночастицы. От распознавания иммунной системой их защищают специальные молекулы на

поверхности, дендримеры: в силу своей структуры не взаимодействуют с иммунными клетками. Большая часть таких наночастиц выводится без изменений. Если же сделать наночастицу из биоразлагаемого полимера, то в клетке-мишени она сможет разлагаться, высвобождая лекарства.

## 2) Диагностика:

- применение биологических методов «распознавания» тех или иных клеток и их частей (например, антителами) позволяет вводить неорганические контрасты и КТ непосредственно в «мишень», что ведет к более точной диагностике.

## Терапия:

- легко переносит лекарства по организму.

- высокоэффективно доставляет лекарства «по адресу», в нужные клетки и их части, и контролирует их высвобождение.

- снижается количество побочных эффектов, связанных общим действием «обычных» лекарств.

- инкапсуляция быстроразрушающихся и токсичных веществ.

Не существует точных методов предсказания свойств новых веществ, поэтому поиск новых лекарств часто состоит в переборе большого количества молекул.

Наночастицы используют изученные селективные методы доставки лекарств точно по месту назначения, таким образом, давая возможность использования давно известных неселективных лекарств.

3) Наночастицы используют изученные селективные методы доставки лекарств точно по месту назначения, таким образом давая возможность использования давно известных неселективных лекарств.

4) Наночастицы препараты не являются новыми лекарствами, а используют проверенные свойства известных веществ (возможно уже запатентованных). Наночастичная форма - это лишь «способ упаковки» вещества, если даже удастся запатентовать конкретную комбинацию наночастиц и лекарств, легко могут быть созданы тысячи аналогов, не попадающих под патент. Идею же доставки лекарств наночастицами патентное законодательство запатентовать не даст.

## 3.

1) Клетки на нановолокнистой матрице лучше приживаются: для них уже создан каркас, имитирующий естественную структуру ткани, в котором они легче закрепляются, им легче и быстрее создать 3-х мерную структуру, заполнив

постепенно пустоты, чем расти в одном направлении. Также в неплотной структуре улучшается обмен веществ, тоже увеличивая скорость роста.

- 2) В нанопористые стенты можно внести лекарство, которое будет в течении длительного времени медленно выделяться, понижая скорость регенерации тканей, и, таким образом, препятствуя отторжению сосуда и «обрастанию» стента соединительной тканью.

На нанопористой поверхности хорошо растут клетки эндотелия сосудов, таким образом предотвращая рост клеток мускулатуры – главной причины повторного сужения.

- 3) Датчик реагирует на перепад давления. Если давление до стента и после не сильно различаются, датчик имеет минимальное сопротивление жидкости (пластинка стоит перпендикулярно потоку). При сужении просвета сосуда, давление до стента и после начинают различаться, возникает сила, отклоняющая «пластинку» от направления совпадающего, с направлением сосуда, причем под хитрым углом, чтобы возникающая при этом сила «фаскручивала» пружинку стента. Как только просвет опять открывается, разность давлений исчезает, пластинка возвращается на место.

#### Евтушенко Евгений Геннадиевич

1. Всегда мечтал поиграть в доктора Хауса ☺. Ответы под пунктами а, б и в – различные варианты достижения одной и той же поставленной задачи.

1) Определить локализацию опухоли, ее размер

а) Будем считать, что у нас имеются в наличие «хьюманизированные» моноклональные антитела на различные раковые маркеры. Используя конъюгат этих антител с квантовыми точками, визуализируем опухоль в желудке пациента и определим ее локализацию и размер с помощью внутрижелудочного зонда.

б) Получим конъюгат этих антител с дендримерами или полимерными наночастицами, несущих атомы иода. Введем препарат и сделаем рентгеновский снимок желудка. Идентифицируем опухоль как светлое пятно на позитиве (темное на негативе).

в) Сделаем то же самое с золотыми наночастицами: введем перорально их конъюгат с антителами, сделаем рентген желудка. Идентифицируем светлое пятно на рентгенограмме.

2) Степень ее кровоснабжения

а) Если на стадии определения локализации опухоли мы использовали флуоресцентный метод (а), то для определения степени кровоснабжения можно провести селективную ангиографию: ввести в кровь (в нужную артерию) контрастирующий препарат (конъюгат

антител с иодсодержащим полимером или золотыми наночастицами диаметром 20-40 нм) и сделать рентгеновский снимок области желудка, в которой обнаружена опухоль. На фотографии мы четко увидим сосуды, питающие опухоль.

б) Если на предыдущей стадии мы уже использовали рентгеновское контрастирование, то придется степень кровоснабжения опухоли определять при помощи магнитно-резонансного исследования. Третьего не дано.

3) Выявить метастазы, их размеры и степень кровоснабжения

Выявление метастаз – сложная процедура, потому что они потенциально могут возникнуть во многих внутренних органах пациента. Потому самым надежным методом будет магнитно-резонансная томография. Проверить отдельные органы на наличие метастаз можно также с использованием компьютерной томографии с селективным контрастированием сосудов (как уже было описано).

### **Провести комплексное лечение с использованием:**

Итак, локализацию и степень кровоснабжения опухолей мы знаем; представляем себе, какие опухоли будут прогрессировать, какие нет. Поскольку дальнейшие действия потребуют введения различных конъюгатов антител в кровоток, будем считать, что наши моноклональные антитела получены из клеток «хьюманизированных» мышей, то есть химерных мышей с введенными им человеческими генами. Такие антитела практически не вызывают иммунного ответа со стороны организма человека и не уничтожаются фагоцитами еще «на подлете к цели».

Во всех последующих манипуляциях нам придется адресно доставлять препараты к опухоли, поэтому проверим эффективность связывания наших антител с обнаруженными раковыми опухолями. Для этого дождемся выведения из кровотока контрастирующего агента со стадии диагностики, и будем по очереди вводить в кровоток конъюгаты иодсодержащих дендримеров или полимеров со всеми имеющимися у нас антителами с контролем областей опухолей методом компьютерной томографии (или просто рентгеном). Будем считать, что данный этап успешно пройден, и мы выбрали антитела, специфичные к нашей опухоли/опухолям (то есть гиперэкспрессию соответствующего маркера).

Также стоит отметить, что необходимо использовать многократное повторение перечисленных ниже процедур, следя за реакцией организма пациента на них. Плохо переносимые и неэффективные процедуры надо исключать из курса лечения.

1) Высокотоксичных для организма химиопрепаратов

Несмотря на адресную доставку наших химиопрепаратов, для начала введем пациенту сопутствующие лекарства, предохраняющие его здоровые органы от повреждения химиопрепаратами. Далее будем вводить в кровоток одно из нижеследующих соединений:

а) Конъюгаты антител с полупроницаемыми микрочастицами, заполненными химиопрепаратами. Антитела доставят эти «резервуары» к раковой опухоли. Последующее медленное высвобождение препаратов позволит поддерживать высокую локальную концентрацию химиопрепарата.

б) Конъюгаты антител с дендримерами, построенными из мономерных звеньев химиопрепарата таким образом, чтобы:

- данный дендример постепенно гидролизовался ферментами крови (эстеразами, фосфатазами и др.) с выделением активного химиопрепарата;
- ферменты могли отщеплять только концевые мономеры, для того чтобы не получилось ситуации, когда вся частица целиком будет «откушена» от антитела и унесена кровотоком.

2) Быстро разрушающихся в организме биопрепаратов и клеток:

2.1. провести энзимотерапию

Стратегия та же, что и в случае химиопрепаратов: использовать конъюгаты антител с онколитическим ферментами. При этом необходимо учитывать специфику действия онколитического фермента. Все их можно разделить на два класса: первые гидролизуют низкомолекулярные субстраты, необходимые раковым клеткам больше, чем обычным, например L-аспарагиназа, L-метиониназа и т.п. Вторые – действуют непосредственно на раковую клетку, разрушая мембранные полисахариды или белки, например карбоксипептидаза G1, нейроамидаза. Следовательно, для ферментов первого класса необходимо обеспечить как можно большую загрузку антител ферментами (2 и более молекулы фермента на антитело или использовать полимерные формы этих ферментов). Для ферментов второго класса необходимо производить пришивку с использованием длинного (до 100 нм) гибкого линкера, чтобы дать ферментам свободу действий.

2.2. провести иммунотерапию

Вводим в кровоток немеченые антитела к раковым маркерам. Они локализуются на раковых клетках и укажут фагоцитам, что эту клетку надо уничтожить.

2.3. провести генную терапию

Генная терапия основана на блокировке м-РНК путем добавления комплементарной ей ДНК или РНК. Таким образом, синтез белка на данной матрице оказывается заблокированным. м-РНК – мишени в клетках хорошо известны исследователям, основная проблема состоит в доставке этих нуклеиновых кислот внутрь раковых клеток.

а) Одним из путей решения этой задачи является изготовление конъюгатов золотых наночастиц с антисмысловыми ДНК. Удивительно, но факт, наночастицы каким-то образом помогают ДНК проникать в клетку. Почему бы и нам не воспользоваться этим наблюдением?

б) Другой вариант терапии антисмысловой ДНК заключается в изготовлении конъюгатов антисмысловой ДНК с фолиевой кислотой (принцип «тройного коня»). Раковые клетки, судя по всему, испытывают повышенную потребность в этом витамине и эффективно втягивают его через поры в клеточной мембране. Таким образом, наш действующий агент попадает в клетку. Модификацией этого метода является «нагрузка» остатками фолиевой кислоты и антисмысловыми ДНК дендримерной частицы.

в) Раз уж пациент экспериментальный, стоит опробовать на нем и действие онколитических вирусов – вирусных частиц, безопасных для большинства клеток, но поражающих раковые клетки. В геном этих вирусов можно встроить до 20 тыс. пар оснований нужных нам фрагментов антисмысловой ДНК и ДНК, кодирующей онколитические ферменты.

Аналогично антисмысловой ДНК, можно использовать все те же методы для введения чужеродных плазмид в раковые клетки. Но я бы не стал надеяться на высокую эффективность этого метода, потому что в эукариотических клетках действуют очень мощные и многоступенчатые механизмы защиты от чужеродной ДНК. И если вариант с антисмысловой ДНК проходит (на какое-то время, до деградации нашей антисмысловой ДНК, синтез белка замедляется), то шанс, что с чужеродной ДНК успеет произвестись м-РНК и запуститься белковый синтез, очень мал.

#### 2.4. провести клеточную терапию

Модифицируем поверхностные полисахариды онколитических клеток антителами против раковых клеток и запускаем в кровоток. Хотя я бы не надеялся на успех. Если эти клетки чужеродны организму, то еще по пути к раковой опухоли они будут уничтожены фагоцитами, потому что на их поверхности наверняка найдутся антигенные детерминанты.

### 3) Физических методов лечения:

#### 3.1. точечной гипертермии

Для этого нам необходимо точно доставить магнитные однодоменные частицы в область раковой опухоли. Например, как уже было продемонстрировано, для адресной доставки их на место можно конъюгировать их с антителами. Наночастицы оксида железа из всех магнитных наночастиц обладают наибольшей биосовместимостью. Через некоторое время после введения препарата необходимо поместить пациента в

высокочастотное магнитное поле. Магнитные наночастицы за счет магнетокалорического эффекта будут нагреваться. И нагрев будет продолжаться до тех пор, пока частица не достигнет температуры Кюри.

Еще одним важным способом введения магнитных наночастиц в объем опухоли является модификация поверхности недифференцированных клеток крови (моноцитов) магнитными наночастицами. Здесь также используется принцип «троянского коня». Попадая в окружение раковой клетки, моноциты трансформируются в раковые макрофаги (tumor-associated macrophages), которые способны проникать в толщу раковой опухоли. Что нам и надо. После этого можно провести сеанс точечной гипертермии, но важным отличием от предыдущего подхода будет то, что раковая опухоль будет уничтожаться в своей толще, а не с поверхности.

### 3.2. точечной фотодинамической терапии

а) конъюгация сенсibilизаторов с антителами

б) «загрузка» фотосенсibilизаторов на поверхность дендримера совместно с фолиевой кислотой или антителами.

Необходимо произвести пероральное введение этих препаратов и через некоторое время осветить место опухоли интенсивным источником света для образования большого количества активных радикалов, воздействующих на раковые клетки. Данный метод будет действенен только против самой опухоли в желудке, но не против метастаз во внутренних органах.

Итог: мы предложили целый спектр методов адресного воздействия на раковые клетки. К сожалению, без картинок, но некогда их рисовать. Из предложенных методов нам необходимо сформировать три стратегии лечения:

1) Используем повторные сеансы точечной гипертермии раковой опухоли в варианте макрофагов для уничтожения основной части опухоли; для уничтожения остатков опухоли и метастаз можно провести иммунотерапию. В промежутках между сеансами будем проводить генную терапию для предотвращения прогрессирования опухоли, если она имеет высокую степень кровоснабжения.

2) Если метастаз не обнаружено, то для уничтожения основной части опухоли можно использовать повторные сеансы фотодинамической терапии, а для «зачистки» - клеточную терапию, поскольку в этом случае не придется вводить онколитические клетки в кровотоки (вместо этого можно будет обойтись пероральным введением) и они не будут «поедаться» фагоцитами. Опять же при высокой степени кровоснабжения опухоли будем проводить генную терапию для блокировки дальнейшего ее роста.



3) Уничтожаем основную часть опухоли (опухолей) повторными сеансами адресной химиотерапии (введение лекарств в кровоток) с защитой организма препаратами-протекторами. Остатки раковой опухоли уничтожаем иммунотерапией в сочетании с постоянной энзимотерапией для подавления развития опухоли или метастаз.

Впервые в мире вылечив больного со злокачественной опухолью без хирургического вмешательства, вы потрясли научный и ненаучный мир.

Это сильно сказано! Как минимум половина раковых опухолей лечится без хирургического вмешательства. В прогрессивных онкологических клиниках до 60%.

2.

1) Да, это серьезная проблема на пути создания селективных онкопрепаратов. Но мы знаем и используем эффективные пути ее решения. Как уже было сказано, мы используем «хьюманизированные» препараты антител, не распознающиеся иммунной системой как чужеродные. Также вся свободная поверхность наших нанообъектов «забивается» человеческим сывороточным альбумином, чтобы закрыть возможные антигенные детерминанты. Единственным объектом, который возможно будет деградироваться клетками иммунной системы, являются онколитические клетки. Но мы их будем применять в тех случаях, когда нет необходимости вводить препарат в кровоток (рак желудочно-кишечного тракта, например).

2) За счет своей селективности и адресности. Возьмем для примера уничтожение опухоли путем физического воздействия. Первый пример, иллюстрирующий разницу в подходах к диагностике: обнаружение метастаз. Традиционно эта процедура сложная, осуществляется путем анализа жалоб пациента и компьютерной томографии локальной области (органа) или путем дорогостоящего полного магнитно-резонансного обследования. При этом шансов обнаружить метастазы на ранних стадиях (< 1 см) очень невелики. Если же ввести в кровоток конъюгат антител на раковые маркеры с дендримерами, содержащими иод (хороший контрастирующий агент для рентгеновских лучей, тяжелый элемент), мы сможем определять гораздо меньшие метастазы и с большей уверенностью (часто невозможно отличить, например, воспаленный лимфатический узел от опухоли). Второй пример поясняет разницу в эффективности терапии. Так, традиционная химиотерапия приводит к целому спектру побочных явлений, самым известным из которых является угнетение быстроделющихся клеток, что выражается в выпадении у пациентов волос. Адресная доставка химиопрепаратов в области опухолей, используя конъюгаты антител с пористыми микрокапсулами, значительно снизит тяжесть побочных эффектов.

2.1 Эффективные препараты уже существуют. Нужна их адресная доставка с использованием наносомальных форм этих препаратов.

Обнаружение новых противораковых препаратов в настоящее время ведется перебором возможных вариантов, предсказанных компьютерным моделированием. Очень недешевый процесс. У меня есть знакомый, который работая химиком-синтетиком, варил на заказ десятки различных производных одних и тех же соединений в месяц. Его компания затем отсылала эти соединения в США, где проводили их скрининг на противораковую активность.

3) Такое положение на рынке не вечно. Когда-нибудь одна из фармакологических компаний первой выйдет на рынок с новым поколением противораковых препаратов, в наносомальной форме. Тогда вы окажетесь не у дел. Убытки за счет нераспроданного товара, убытки за счет простаивающих мощностей, косвенные убытки за счет потери престижа торговой марки. Так что в настоящий момент наилучшей стратегией развития является активные инвестиции в научные разработки наносомальных форм противораковых препаратов с постепенным внедрением их в производство. Помните! Процветать будут те, кто одними из первых перешагнет эту черту.

Можно еще упомянуть про гуманность к пациентам, но вряд ли это тронет суровые сердца бизнесменов.

4) Потому что в качестве наполнителей для наносомальных форм противораковых препаратов можно использовать не только ваши патентованные соединения, избирательно поражающие клетки с высокой скоростью деления, а вообще любые цитотоксичные. Доставка-то адресная, к раковым клеткам.

Кстати, как доктор заявляю вам: бросайте курить сигары, это сильно увеличивает риск инфаркта ☺.

3.

1) Нановолокнистая матрица отлично удерживает в своей структуре имплантированные клетки, не давая им разноситься кровотоком по организму. Модифицируя поверхность волокон нужными лигандами межклеточной адгезии, можно ускорить дифференцировку стволовых клеток. Дополнительно такая матрица исполняет роль поддерживающих «строительных лесов», вдоль которых растут клетки, повышая скорость пролиферации, а также уменьшая степень образования рубцов.

2) При введении стента в закупорившийся сосуд мы, по сути, вводим в организм инородное тело. Естественно, это вызывает иммунные и воспалительные процессы, в результате которых происходит миграция клеток (мышечных) из средних слоев стенки сосуда поверх имплантата и их пролиферация, что приводит к быстрой закупорке сосуда. Использование пористых биосовместимых покрытий (как, например, пористый оксид алюминия, или, что лучше, гидроксиапатит) уменьшает интенсивность данных

процессов. Постепенно поверх материала такого стента образуется эпителиальный монослой, имплантат органично врастает в стенку сосуда. Еще большего эффекта можно достичь, поместив в наноразмерные поры покрытия препарат, уменьшающий интенсивность процессов отторжения (например, Такролимус) и закрыв эти поры тонкой пленкой полимера, ограничивая скорость высвобождения этого препарата.

3) Клиент готов платить большие суммы? Любой каприз за ваши деньги! ☺ В стенку стента встроим 2 дистанционных сенсора (один перед трансплантатом, второй – после). Каждый из сенсоров изготовлен на едином кристалле кремния с применением BiCMOS-технологии. Он состоит из емкостного датчика давления, приемной антенны (колебательного контура), настроенной на определенную радиочастоту, микроэлектронного CMOS-блока и передающей антенны. Данные сенсоры работают только при поднесении к пациенту специального измерительного устройства, которое генерирует излучение на двух нужных нам радиочастотах, подавая, таким образом, питание нашим схемам. Емкостный датчик представляет собой гибкую мембрану или даже большой кантилевер, на который нанесен металлический электрод. Второй электрод находится на дне полости под кантилевером или мембраной. Увеличение внешнего давления вызывает отклонение балки или прогиб мембраны, что изменяет емкость такого конденсатора. Электронный блок производит измерение емкости, производит частотную модуляцию сигнала и передает измеренные показатели через передающую антенну. Естественно, вся поверхность кремниевого кристалла покрыта сверху биосовместимым покрытием для предотвращения тромбообразования на сенсоре.

Харламова Марианна Вячеславовна

1. Как Вы просили в задании к этой задаче, я предлагаю три способа лечения рака желудка с помощью достижений нанотехнологии.

### **Способ №1**

**Для начала уточним диагноз:**

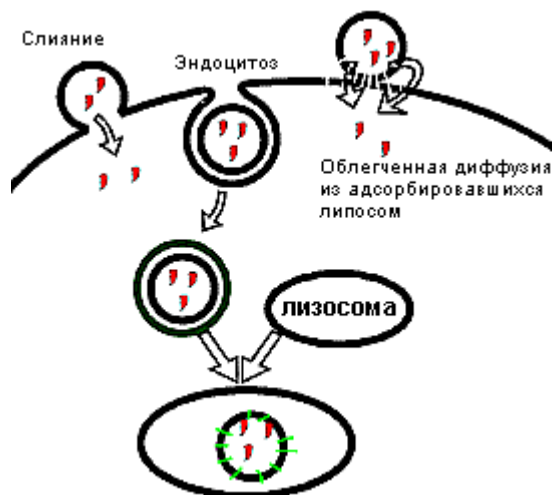
Проведем *магнитно-резонансную томографию* (МРТ). Это сложный, но безопасный и эффективный метод диагностики, не связанный с ионизирующим излучением и введением радиоактивных веществ. МРТ позволяет получать отчетливые изображения внутренних органов, помогает установить диагноз и назначить правильное лечение.

МРТ брюшной полости и органов таза проводится только натощак. Никакая специальная подготовка к МРТ других видов обычно не нужна. Из-за сильного магнитного поля томографа, в большинстве случаев МРТ нельзя проводить больным с

имплантированными в теле металлом (костные имплантаты, имплантированные водители сердечного ритма, осколки снарядов и т.д.).

С помощью проведенного метода можно обнаружить опухолевое поражение желудка, ее локализацию и размер, определить степень ее кровоснабжения, выявить метастазы, их размеры и степень кровоснабжения.

**Теперь будем проводить комплексное лечение:**



Для начала попробуем подействовать **высокотоксичным химиопрепаратом**. Будем использовать для достижения своей цели и разработки нанотехнологии – **полимерные нанокapsулы**, например, липосомы. Заклучим химиопрепарат в липосомы. Вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных биодеструкции в биологических жидкостях.

Мембрана липосом состоит из природных фосфолипидов, что определяет их многие привлекательные качества. Они нетоксичны, биодергадируемы, при определенных условиях могут поглощаться клетками, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к внутриклеточной доставке их содержимого (рисунок).

Очень важное свойство липосом (как, впрочем и других наночастиц) стало основой для конструирования эффективных антираковых препаратов. Речь идет о соотношении размеров наночастиц и диаметра пор капилляров.

Так как размер наночастиц больше диаметра пор капилляров, их объем распределения ограничивается компартаментом введения. Например, при внутривенном введении они не выходят за пределы кровотока, т.е. должны плохо проникать в органы и ткани. Следовательно, резко понижается токсическое действие субстанции, ассоциированной с наночастицами. С другой стороны, это свойство может служить основой для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в солидные опухоли и очаги воспаления, так как капилляры, снабжающие эти области кровью, как правило, сильно перфорированы. Следовательно, наночастицы будут накапливаться в опухоли. Это

явление получило название пассивное нацеливание. Таким образом, существует две причины, вследствие которых липосомальные препараты антиканцерогенных субстанций очень эффективны: уменьшение токсичности и пассивное нацеливание.

Если химиопрепараты не помогли излечить больного, попробуем другие методы лечения. Будем лечить больного с помощью **наночастиц золота**. Известно, что наночастицы золота вылечивают рак, вызывая атрофию кровеносных сосудов опухоли. Они останавливают развитие ангиогенеза в опухолях. Большинство применяемых ингибиторов ангиогенеза – антитела к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), молекулы которого стимулируют образование эндотелия в растущих кровеносных сосудах. Наночастицы золота блокируют функцию VEGF, не оказывая токсического действия на клетки.

Чтобы доставить наночастицы до опухоли будем использовать **моноклональные антитела** — антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы. Моноклональные антитела могут быть выработаны на почти любое вещество, которое антитело будет специфически связывать. Как известно, при заболевании человека вырабатываются специфические антитела, которые находятся в крови человека. Связываясь с этими антителами наночастицы попадать в клетки опухоли.

Попробуем теперь использовать **антисмысловые олигонуклеотиды**. В качестве молекулярного вектора для доставки препаратов в опухолевые клетки могут быть использованы некоторые факторы роста, гормоны и онкофетальные белки, в частности, альфа-фетопротеин (АФП). Преимущество их использования заключается в отсутствии иммуногенных свойств, высокой аффинности к рецепторам и высоком уровне экспрессии рецепторов на опухолевых клетках. Так, показано, что рецепторы АФП экспрессируются на поверхности подавляющего большинства опухолевых клеток независимо от типа опухоли, в то время как у нормальных клеток организма они отсутствуют, или присутствуют в незначительных количествах. Вышеперечисленные экспериментальные данные по уровню экспрессии рецепторов АФП и высокой скорости эндоцитоза позволили сделать предположение о высокой избирательности доставки конъюгатов АФП с цитотоксическими препаратами в опухолевые клетки. В качестве альтернативного подхода могут быть рассмотрены результаты разработки препаратов направленного действия в виде конъюгатов АФП с антисмысловыми олигонуклеотидами (АСОН) к мРНК генов, играющих ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза. Экспериментальные исследования по использованию АСОН для ингибирования трансляции мРНК генов, гиперэкспрессия которых приводит к опухолевой

трансформации, продемонстрировали их высокую специфичность в отношении своих мишеней. В отличие от большинства химиотерапевтических препаратов, АСОН легко подвергаются биодegradации и удалению из организма. Для предотвращения их расщепления эндо- и экзонуклеазами применяют модифицированные олигонуклеотиды, из которых наиболее перспективными признаны фосфоротиоатные производные.

В заключении комплексного проведем точечную гипертермию. Будем использовать **наночастицы оксида железа**. Известно, что наночастицы оксида железа обладают магнитными свойствами, поэтому их используют для лечения опухолевых образований. Под действием магнитного поля наночастицы разогреваются и убивают клетки злокачественной опухоли. Доставить наночастицы в клетки опухоли можно с помощью **моноклональных антител**. Эти антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы. Моноклональные антитела могут быть выработаны на почти любое вещество, которое антитело будет специфически связывать. Как известно, при заболевании человека вырабатываются специфические антитела, которые находятся в крови человека. Связываясь с этими антителами наночастицы попадать в клетки опухоли.

Теперь, в заключении лечения, проведем магнитно-резонансную томографию. И к радости больного, да и к своей радости тоже обнаружим, что мы излечили больного. Опухоль рассосалась!!!

## **Способ №2**

**Для начала уточним диагноз:**

Для уточнения диагноза будем использовать разработки нанотехнологии – **квантовые точки**.

Квантовая точка — фрагмент проводника или полупроводника, ограниченный по всем трём пространственным измерениям и содержащий электроны проводимости. Точка должна быть настолько малой, чтобы были существенны квантовые эффекты. Это достигается, если кинетическая энергия электрона  $\hbar^2/(2md^2)$ , обусловленная неопределённостью его импульса, будет заметно больше всех других энергетических масштабов: в первую очередь больше температуры, выраженной в энергетических единицах ( $d$  — характерный размер точки,  $m$  — эффективная масса электрона на точке).

Квантовой точкой может служить любой достаточно маленький кусочек металла или полупроводника. Исторически первыми квантовыми точками, вероятно, были микрокристаллы селенида кадмия CdSe. Электрон в таком микрокристалле чувствует себя

как электрон в трёхмерной потенциальной яме, он имеет много стационарных уровней энергии с характерным расстоянием между ними  $\hbar^2/(2md^2)$  (точное выражение для уровней энергии зависит от формы точки). Аналогично переходу между уровнями энергии атома, при переходе между энергетическими уровнями квантовой точки может излучаться фотон. Возможно также забросить электрон на высокий энергетический уровень, а излучение получить от перехода между более низколежащими уровнями (люминесценция). При этом, в отличие от настоящих атомов, частотами переходов легко управлять, меняя размеры кристалла. Собственно, наблюдение люминесценции кристаллов селенида кадмия с частотой люминесценции определяемой размером кристалла и послужило первым наблюдением квантовых точек.

Квантовые точки при действии на них излучения с определенной длиной волны, начинают люминесцировать. Таким образом, введя квантовые точки в раковые клетки и подействовав на них светом с определенной длиной волны, можно детектировать присутствие раковых клеток определенного вида в организме. Дело в том, что при заболевании в организме человека выделяются антитела. Причем антитела специфичны для каждого заболевания. Для доставки наночастиц в клетки опухоли можно использовать моноклональные антитела. Они будут связываться с антителами, вырабатываемыми в организме, и доставляться в раковые клетки.

Взяв с помощью внутрижелудочного зонда пробу тканей желудка, в которых в случае присутствия опухоли содержатся квантовые точки, будем проводить следующий эксперимент. Будем облучать эту пробу ткани светом с определенной длиной волны (длина волны зависит от вида квантовых точек), если мы протестируем свечение (люминесценцию), то значит раковые клетки есть.

Протестировав люминесценцию квантовых точек в раковых клетках, мы выявили их.

### **Теперь будем проводить комплексное лечение:**

Будем использовать *биопрепараты*. Для того, чтобы они не были отвергнуты иммунной системой человека, будем использовать *дендримеры*. Учёные установили, что к поверхности раковых клеток очень хорошо прилипают молекулы фолиевой кислоты. Поэтому, если внешняя оболочка дендримеров будет содержать молекулы фолиевой кислоты, то такие дендримеры будут избирательно прилипать только к раковым клеткам. Таким образом, с помощью этих дендримеров можно раковые клетки сделать видимыми, если к оболочке дендримеров прикрепить ещё какие-нибудь молекулы, светящиеся, например, под ультрафиолетом. Прикрепив к внешней оболочке дендримера лекарство,

убивающее раковые клетки, можно не только обнаружить их, но и убить. Таким образом, пришив к дендримеры биопрепарат, мы сможем внедрить его в раковые клетки.

Для лечения можно использовать также **клетки, выделяющие онколитические вещества**. Для их доставки до места опухоли будем использовать **полупроницаемые микрочастицы** (капсулы). Целью таких капсул является создание устройства, способного поддерживать инородные живые клетки, которые могут быть вживлены в человеческие. Капсула сделана из кремния и состоит из двух связанных мембран, содержащих лекарство, предназначенное для долгой транспортировки. Поры в наноканалах полупроницаемой мембраны имеют размер 6 нм и используются для регулирования потока для долгого высвобождения лекарств. Наномембрана также защищает терапевтические вещества от атак иммунной системы человека. Поры достаточно велики, чтобы через них прошли нутриенты (например, молекулы глюкозы) и лекарства (например, инсулин), но малы для антител. Антитела имеют способность проходить через любые отверстия больше 18 нм.

Вместе с клетками, выделяющими онколитические вещества, будем вводить в организм **онколитические ферменты**. Эти вещества являются катализаторами процесса "рассасывания" раковых клеток, процесса, начинающегося при введении в раковую опухоль клеток, выделяющих онколитические вещества. Для введения онколитических ферментов будем использовать моноклональные антитела.

Если ничего не поможет, будем использовать высокотоксичные химпрепараты (см. способ №1).

Теперь убедимся, что наша методика лечения успешна. Проведем еще раз детектирование раковой опухоли с помощью квантовых точек. Не обнаружив люминесценции пробы ткани желудка, взятой с помощью внутрижелудочного зонда, мы радостно воскликнем: "Ура!!! Я вылечил!!!". Подтвердим теперь наше заключение с помощью магнитно-резонансной томографии. Да, раковых клеток нет больше! Нанотехнология - прорыв в будущее, в том числе и в излечении болезней, до сих пор считавшихся неизлечимыми!!!

### **Способ №3**

**Для начала уточним диагноз:**

Уточнять диагноз будем с помощью магнитно-резонансной томографии (подробнее см. способ №1) и с помощью квантовых точек (подробнее см. способ №2).

**Теперь будем проводить комплексное лечение:**

Будем использовать **фотосенсибилизаторы** (фототоксичные вещества). В этих веществах, полупроводниках, под действием УФ-излучения возникает электронный



переход из валентной зоны в зону проводимости. Далее носители заряда (электрон и дырка) могут выходить на поверхность частицы, где они образуют вещества - окислители, которые способны убить раковые клетки. Ввести фотосенсибилизаторы в клетки опухоли можно с помощью дендримеров (подробнее см. способ №2).

Если этот способ не поможет, будем использовать **плазмиды, кодирующие онколитические гены**. Эти вещества при введении в организм человека кодируют специальные онколитические гены таким образом, что они начинают продуцировать онколитические вещества. Доставить плазмиды в раковые клетки можно с помощью моноклональных антител (подробнее см. способ №1).

Теперь убедимся, что наша методика лечения успешна. Проведем еще раз детектирование раковой опухоли с помощью квантовых точек. Не обнаружив люминесценции пробы ткани желудка, взятой с помощью внутрижелудочного зонда, мы радостно воскликнем: "Я - настоящий нанотехнологический врач!!!". Подтвердим теперь наше заключение с помощью магнитно-резонансной томографии. Да, раковых клеток нет больше! Еще раз убеждаемся, что нанотехнология - прорыв в будущее, в том числе и в излечении болезней, до сих пор считавшихся неизлечимыми!!!

## **2. Ответы на вопросы:**

1) Да, эти наши наночастицы, транспортирующие вещества, не распознаются в организме как инородные тела и не разрушаются. Почему? Сейчас объясню.

*Полимерные нанокapsулы, например липосомы:* мембрана липосом состоит из природных фосфолипидов, таких, из которых состоит мембрана клетки, что определяет их многие привлекательные качества. Они нетоксичны, биодергадируемы, при определенных условиях могут поглощаться клетками, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к внутриклеточной доставке их содержимого. Они не распознаются в организме как чужеродные тела, они распознаются организмом как свои, родные. Их можно смело использовать для доставки лекарств к очагу заболевания.

*Моноклональные антитела:* это антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки - предшественницы. Моноклональные антитела могут быть выработаны на почти любое вещество, которое антитело будет специфически связывать. Они для организма являются родными, поэтому не воспринимаются как инородные тела.

*Антисмысловые олигонуклеотиды:* в отличие от большинства химиотерапевтических препаратов, они легко подвергаются биодegradации и удалению из организма. Для предотвращения их расщепления эндо- и экзонуклеазами применяют модифицированные

олигонуклеотиды, из которых наиболее перспективными признаны фосфоротиоатные производные.

*Дендримеры:* к поверхности раковых клеток очень хорошо прилипают молекулы фолиевой кислоты. Поэтому, если внешняя оболочка дендримеров будет содержать молекулы фолиевой кислоты, то такие дендримеры будут избирательно прилипать только к раковым клеткам. Организмом дендримеры не отторгаются, поскольку по составу они воспринимаются как родное для организма соединение.

2) Наносомальная диагностика и терапия эффективней традиционных методов лечения сразу по нескольким причинам:

- безусловно, главным преимуществом является то, что наносомальная диагностика и терапия - безоперационная. А "Операции" (правильнее сказать, вмешательства в организм) могут проводиться в "стационаре".

- многие из веществ, используемых в наносомальной диагностике и терапии нетоксичны для организма и биodeградируемы, в отличие, например, от химпрепаратов, которые используют для лечения рака.

- сокращается время диагностики и лечения

Я отмечу, что нанотехнологические разработки применяются не только для лечения рака. Например, имплантаты и медицинские инструменты изготавливают из наноматериалов. Обычные имплантаты изготавливают из специального медицинского сплава ВТ6, в состав которого входят титан, алюминий и ванадий. Два последних металла, растворяясь в организме, действуют на него негативно. Имплантат, изготовленный из нанотитана, без добавления других металлов, безвреден для организма. На его поверхность наносятся два покрытия: более толстый слой — естественного оксиданта титана и верхний слой — гидроксилapatит, близкий по своим химическим свойствам к костной ткани, а значит, биологически совместимый с организмом человека. Имплантаты из нанотитана легче и тоньше обычных, но при этом намного прочнее.

2.1 Создание наносомальных форм существующих лекарств дешевле синтеза новых препаратов, поскольку для диагностики заболевания и лечения человека нужно будет совсем небольшое количество каждого из препаратов. Если разработать промышленный способ получения лекарств или веществ для диагностики, а потом наладить их производство, это будет гораздо дешевле. Для лечения человека нужно, во-первых, меньше лекарства, поскольку можно будет создать такие эффективные лекарства, которые будут вылечивать человека после единичного воздействия. Во-вторых, самого лекарства нужно будет очень небольшое количество. Учитывая то, что все наноматериалы получают из объемных веществ, стоимость которых не сильно будет

возрастать оттого, что они используются в дальнейшем для получения нанолекарств, экономически отработанный промышленный способ получения нанолекарств выйдет дешевле. Кроме того, для получения нанолекарств и исходных прекурсоров тоже надо меньше. Остается дело только за оборудованием для синтеза. Ну а это уже дело методики получения.

3) Вы меня спрашиваете, с какой стати нам отказываться от сверхприбыли продаж существующих препаратов? Господа! Тут речь идет о прорыве в медицине, в науке!!! Перестаньте быть материалистами! Хотя да, если уж вы такие материалисты, то что поделать... Да вы знаете, сколько вам денег дадут за внедрения нового патента? Вам мало не покажется, поверьте. Да вы посмотрите, как нанотехнология сейчас развивается в нашей стране! Давайте сделаем десять проектов, на всех хватит, пока что, на начальных этапах. Потом внедрим методику, и будем получать боьшие денежки, от той же продажи препаратов!!! Ну, кроме того, кто сказал, что мы прямо сейчас будем отказываться от продажи существующих препаратов. Это уже кому как нравится. Кому хочется, тот пусть лечится нанотехнологиями, кому нет - тот пусть старыми испытанными методами. Господа, главное начать продвигать нашу идею!

4) Почему существующие патенты не защитят наши препараты? Защитят, еще как защитят! Да такие перспективные методики излечения неизлечимых заболеваний в любом государстве защитят!!! Да ради излечения неизлечимых заболеваний какая угодно крутая компания даст проект!

### **3. В кардиореанимации:**

1) Стволовые клетки — это иерархия особых клеток живых организмов, каждая из которых способна впоследствии изменяться (дифференцироваться) особым образом (то есть получать специализацию и далее развиваться как обычная клетка).

Наилучшие результаты при использовании метода пересадки стволовых клеток были достигнуты при применении аутологичных стволовых клеток пациента. Эффективность использования этого метода у пациентов с инфарктом миокарда, ишемической болезнью сердца, недостаточностью кровообращения, не оставляет сомнений. Доступность применения аутологичных стволовых клеток пациента, безопасность и эффективность их использования делает метод пересадки стволовых клеток высокоперспективным. Результатом пересадки стволовых клеток является обновление и замещение поврежденных или утраченных клеток в различных органах и тканях человеческого организма. В случае сердечно-сосудистых заболеваний это означает, что стволовые клетки дифференцируются и в клетки сердца, и в клетки сосудистой ткани (т.е. участвуют в ангиогенезе).

Использование стволовых клеток в кардиологии, в частности, при лечении инфаркта миокарда и его последствий, интенсивно разрабатывается последние 5 - 7 лет. Этому способствовали достижения в клеточной биологии. В частности, в 1995 г. были получены кардиомиоциты из эмбриональных стволовых клеток, а 4 года назад - из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Три года назад стало ясно, что преимущество имеют стволовые клетки костного мозга, поскольку они обладают еще одним важным свойством - способностью участвовать в образовании новых сосудов (ангиогенезе) и усиливать питание кровью ишемизированных участков миокарда. Стволовые клетки могут преобразовываться в новые клетки миокарда, и при необходимости, в кровеносные сосуды.

Результаты клинического применения стволовых клеток при лечении инфаркта миокарда показали эффективность их использования в предупреждении развития постинфарктной аневризмы, предотвращении процессов ремоделирования левого желудочка и распространения очага некроза, а также в улучшении насосной функции сердца.

При введении стволовых клеток в организм больного инфарктом и приживлении их среди стареющих и патологически измененных клеток организма, создается неповторимая ситуация - на клетки организма начинают действовать мощные факторы развития и обновления, клетки продолжают жить, начинают делиться и выделять биологически активные вещества в течении длительного времени, а часто на протяжении многих лет.

При лечении заболеваний сердца использование нановолокнистых матриц для стволовых клеток позволяет повысить их “приживаемость” в организме человека, а также увеличить время их жизни и способности нормально функционировать. Нановолокнистая матрица защищает стволовые клетки от негативного воздействия иммунной системы организма, а кроме того является искусственной средой для их функционирования.

Стент - это обычно металлический каркас, представляющий собой маленькую металлическую трубочку из проволочных ячеек. Стент вводят в артерию после ее расширения и устанавливают в месте поражения артерии с целью предотвращения рестеноза. Стент поддерживает стенки артерии.

Сейчас используются самые различные стенты, отличающиеся конструктивными особенностями. Все они должны отвечать следующим требованиям: быть совместимыми с органами и тканями человека, быть достаточно гибкими и упругими, чтобы выполнять функцию поддержания стенки артерии, должны обладать рентгеноконтрастностью, чтобы была возможность контроля состояния стента, диаметр стента должен иметь возможность изменяться, чтобы приспособиться к состоянию сосуда.

Операция производится обычно через бедренную артерию. Стент, закрепленный на баллонном катетере вводится в артерию, под контролем рентгеновского аппарата, катетер проводится к сердцу и подводится к месту сужения сосуда. Затем баллон раздувается и стент вдавливается в сосудистую стенку. Иногда может потребоваться несколько стентов. Контроль установки стента производится на экране монитора. Для уверенности закрепления стента на сосудистой стенке баллон раздувается несколько раз.

Результаты операции обычно хорошие. С учетом возможности модификации стентов: изменения их длины, диаметра, успешное стентирование возможно у 95% больных. Осложнения после операции стентирования бывают у 5-7% пациентов. Наиболее частое осложнение тромбоз области стентирования. Поэтому всем больным назначаются препараты препятствующие тромбообразованию.

2) В последнее время используются стенты с лекарственным покрытием (например, стент с сиролимусом). После установки стента в течение нескольких недель из него высвобождается препарат, препятствующий тромбообразованию.

Перспективны стенты на основе нанопористых материалов. Вероятность прилипания тромба к такому стенту очень мала, поскольку поверхность у такого стента пористая, площадь поверхности большая, но за счет внутренних пор, а не за счет внешней поверхности, которая у нанопористого материала наоборот мала. Кроме того, у многих нанопористых материалов поверхность гидрофобная (или, по крайней мере, можно сделать нанопористый материал, у которого гидрофобная поверхность).

3) Датчики давления в стентах работают таким образом. При попадении на место, где расположен датчик, тромба, он оказывает давление на датчик, датчик реагирует. Датчики давления - устройства, физические параметры которых изменяются в зависимости от давления. В датчиках давление преобразуется в электрический, пневматический, цветовой или другой сигнал.

### Смирнов Евгений Алексеевич

#### 1. Уточнение диагноза:

Для начала стоит просто осмотреть желудок больного с помощью зонда с видеокамерой, быть может, удастся сразу определить размер опухоли или её отсутствие. Однако, всё равно после это необходимо с помощью наночастиц убедиться в правильности такого предварительно обследования. В кровь пациента необходимо ввести моноклональные антитела (МА) с пришитыми к ним квантовыми точками (КТ). Таким образом, это позволит при облучении УФ этих КТ зафиксировать люминесценцию и определить фактически реальный размер опухоли с точностью до нескольких клеток, что очень

важно, так как даже из одной новой раковой клетки может вырасти новая опухоль. Но УФ излучение может нанести вред, особенно внутренним тканям организма, поэтому если мы точно не знаем, куда направлять поток УФ излучения (т.е. зондом ничего не обнаружено), то лучше выбрать другой способ. Взять наночастицы золота (НЧЗ) стабилизировать их с помощью какого-либо нетоксичного вещества и прикрепить к тем же МА, тогда с помощью обычного света мы сможем так же локализовать опухоль.

Так как предложенные НЧЗ с МА достаточно небольшие и для их детектирования нет необходимости применять УФ излучение, то становится возможным следить в режиме реального времени, как частицы перемещаются внутри тела и где они концентрируются. Так же для этих целей можно использовать дендримеры (ДД) с радионуклидной меткой или меткой из тяжёлых металлов и пришитым МА. Такие метки входят между ветвей дендримера, и поэтому нет опасности проникновения вредных, токсичных веществ внутрь организма. Детектировать такую метку можно с помощью ЯМР-спектрометра. Таким образом, мы так же можем оценить степень кровоснабжения раковых клеток, снимая изображения через некоторые промежутки времени.

Способы, предложенные в пункте 2 можно так же использовать для выявления метастаз, их размеров и кровоснабжения. Проведение комплексного лечения:

1) Для точечной доставки высокотоксичных химиопрепаратов (ВХ) можно предложить следующую схему. К ДД, пропитанному таким препаратом, можно пришить МА для целевой доставки или фолиевую кислоту, которая необходима всем растущим клеткам, а раковым клеткам в особенности. Необходимо так же прикрепить на такие частицы метки, например, флюорисцентный краситель или те же КТ, чтобы иметь возможность проследить, где ещё кроме раковых клеток накопился этот препарат и каким органам и тканям необходима при восстановлении организма «помочь», уделить большее внимание. В случае с фолиевой кислоты необходимо вводить препарат непосредственно в опухоль или рядом с ней, чтобы избежать распространения ВХ по организму.

2)

а) Для проведения энзимотерапии можно предложить следующую схему. Онколитические ферменты инкапсулировать в нанопористых полупроницаемых микрочастицах (НПМ), чтобы у организма не было ответной реакции на данный фермент и чтобы повысить его живучесть в организме. Затем связать НПМ с МА или фолиевой кислотой и ввести в непосредственной близости от опухоли, что будет способствовать целевой доставке фермента к раковым клеткам.

б) Иммунотерапию можно провести следующим образом. Инкапсулировать в ПНМ биопрепараты (БП), что в разы увеличит стойкость этих препаратов к воздействию

окружающей среды, а так же увеличит время, в течение которого данные препараты будут действовать. По сравнению с обычным применением таких препаратов, инкапсулированные БП будут давать постоянную концентрацию БП в организме, что приведёт к менее вредному воздействию это препарата и его постоянной активности. Так же возможно применение ДД для инкапсулирования БП, при этом необходимы ДД определённого диаметра, чтобы препарат мог разместиться во внутренних полостях (гость-хозяин).

в) В данном случае можно связать антисмысловые олигонуклеотиды с ДД или инкапсулировать в нутрии НПМ, при этом доставка такого рода лекарства будет осуществляться за счёт МА или той же фолиевой кислоты.

г) В НПМ «посадить» плазмиды, кодирующие онколитические гены (Пл). Тогда в клетки будет попадать не просто одна две молекулы фермента, а исходный код и клетка, таким образом, убьёт сама себя. При этом, вероятность того, что Пл попадёт в другую клетку намного выше, чем в случае фермента (обычно после выполнения своих функций они погибают или в них происходят изменения, снижающие каталитическую активность), а, следовательно, их можно вводить ещё в более малых дозах, что будет способствовать скорейшему процессу восстановления организма. Другой способ - попытка ввести клетки, выделяющие онколитические вещества, но в этом случае возможна иммунная реакция организма пациента, что не желательно.

3)

а) Наночастицы оксида железа (НЧ) необходимо связать со стабилизатором и МА или фолиевой кислотой. Так как мы знаем, в какой области расположены раковые клетки, то при гипертермии будет затронуты только эти участки тканей, а, следовательно, никакие другие ткани не пострадают, что будет способствовать быстрому заживлению.

б) Полимерные наночастицы (ПНЧ) с фотосенсибилизатором (ФС) можно ввести в раковые клетки с помощью метки из МА или фолиевой кислоты. Затем при облучении светом таких малотоксичных веществ будет образовываться активная форма кислорода, которая будет «сжигать», активно реагировать с органикой раковых клеток, что приведёт к их уничтожению. Из представленных вариантов лечения можно сконструировать более 3 схем рационального лечения больного. К примеру, заменяя методы доставки лекарств к раковым клеткам (изменяя маркирование наночастиц с необходимым препаратом).

2. Вопросы боссов:

1) Они не распознаются организмом и не разрушаются, так как имеют специальную защитную оболочку из веществ, которые вырабатывает сам организм. Т.е. иммунной

реакции не возникает, а связывание с этим веществами достаточно сильное, чтобы предотвратить разрушение наночастиц (возникает своеобразная «шуба»).

2) Они эффективнее традиционных, так как диагностика проводится достаточно быстро, и мы имеем возможность с высокой точностью проследить такие важные, как размер опухоли, её локализация, снабжение кровью, определить метастазы, а лекарственные препараты при терапии могут быть доставлены точно в цель – в раковую клетку, что снижает риски интоксикации организма в целом. Это особенно важно при использовании высокотоксичных препаратов. При этом можно обходиться довольно малыми количествами веществ. Создание новых препаратов очень трудоёмкий процесс, который заключается в разработке методики промышленного синтеза, тестировании данного препарата, апробации, выявлении побочных действий и т.д. На это необходимо тратить большие суммы денег, а создание наносомальных форм лекарств позволяет увеличить их эффективность и снизить вводимые количества лекарства, что снижает их стоимость и делает более доступными для широкого круга потребителей.

3) Наносомальные препараты могут проникнуть повсюду, так как они практически инертны по отношению к окружающей их среде, а обычные лекарственные препараты могут встречать защитную реакцию организма, что будет приводить к аллергиям (и другим нежелательным последствиям вплоть до смерти пациента), следовательно, такие препараты использовать будут редко. К тому же природа адаптируется к новым условиям, следовательно, препараты, которые эффективны сегодня через 10 лет не будут давать никакого результата, если продолжать их нынешнее применение. Значит, необходима разработка новых препаратов, что является очень сложным, трудоёмким и дорогим занятием.

4) Так как мы будем использовать эти препараты на молекулярном уровне, и они будут входить в состав новых препаратов с модифицированными свойствами.

### 3. Кардиология:

1). Вещество, находящееся в нановолокнистой матрице, расходуется постепенно, при этом концентрация этого вещества практически постоянна в организме, следовательно, это приводит к увеличению эффективности, по сравнению с тем случае, когда вещество вводится в организм большими порциями.

2) В нанопоры данных стентов можно ввести лекарство, которое будет препятствовать образованию тромбов рядом со стентированным участком сосуда. Так же внутри этих нанопористых материалов может прорасти стенка сосуда, т.е. организм будет относиться к такому сосуду не как к инородному образованию, а как к обычной ткани организма.

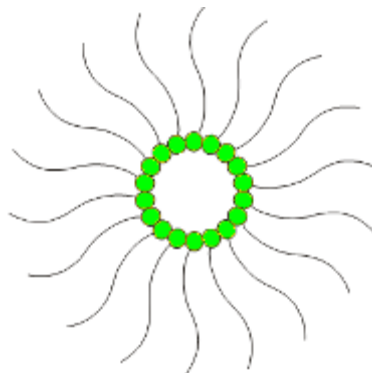


3) Скорее всего, эти датчики необходимы для того, что при установке стента не разорвать сосуд и для дальнейшего контроля за работой стентированного участка (например, могут передавать информацию о давлении)

## Обращенные мицеллы – ферментативные нанореакторы (2008, биология / медицина)

Макеева Екатерина Анатольевна

1. Зеленые кружки – полярные «головы», снаружи – гидрофобные «хвосты» контактируют с органическим растворителем.



2. Возможны два похожих варианта объяснения, приводящие к одному и тому же результату.

1) Низкий выход дипептида в водной фазе означает, что для водной фазы константа равновесия процесса:

$$K_b = [peptide]/[a/k] < 1$$

Ферменты, проводящие такого рода процессы, обычно не могут «работать» в органическом растворителе, поэтому в нем равновесие между аминокислотой и пептидом установиться не может. Значит, для увеличения выхода необходимо «извлекать» продукт из водной фазы. Поскольку не указаны растворители и аминокислоты, то возможно несколько вариантов или их комбинация.

Малополярные аминокислота и дипептид имеют большие коэффициенты распределения между органическим растворителем и водой. Причем коэффициент распределения дипептида больше, чем аминокислоты (так как он более гидрофобный). Тогда, за счет органического растворителя, в водной фазе по ходу реакции будет создаваться пониженное соотношение  $[peptide]/[a/k]$ , поэтому для поддержания в водной фазе  $[peptide]/[a/k] = K_b$  потребует дополнительного превращения аминокислоты в дипептид. Таким образом, суммарный выход реакции увеличивается.

Низкая скорость процесса будет обусловлена тем, что основные количества малополярной аминокислоты будут содержаться в органической фазе и медленно переходить в водную фазу.

2) Образование мицелл (считаем, что аминокислоты находятся в биионной форме). При образовании мицелл и молекулы аминокислоты, и дипептида, будут находиться преимущественно на границе фаз, причем дипептиду с двумя менее полярными

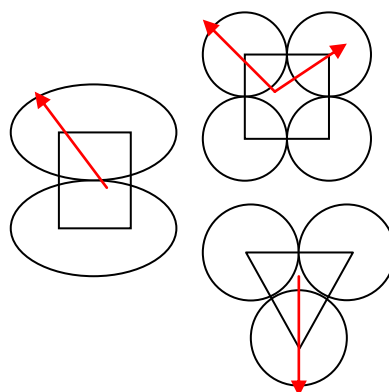
радикалами будет сложнее переходить в водную фазу, чем в аминокислоте. Поэтому, аналогично первому варианту, такое распределение увеличит выход дипептида.

Скорость массопереноса с границы фаз в раствор будет маленькая (переход как в водную, так и в органическую фазу будет не выгоден), еще меньше будет скорость массопереноса между двумя разными мицеллами (их разделяет что-то похожее на малопроницаемый липидный бислой живых клеток). Фермент будет находиться в очень малом количестве мицелл, поэтому суммарная скорость процесса будет определяться малой скоростью массопереноса между мицеллами

- Из рассуждений предыдущего пункта следует, что чем более гидрофобен радикал, тем больше разница коэффициентов распределения аминокислоты и дипептида между фазами, и тем сильнее будет сдвинуто суммарное равновесие в сторону дипептида.

Предположим, что константы равновесия в водной фазе реакций синтеза этих пептидов примерно совпадают:  $K = [peptide]/[a/k]$ . Среди перечисленных в условии аминокислот наибольшее отличие коэффициентов распределения будет в случае изолейцина (Ile), имеющего наиболее гидрофобный радикал (*втор*-бутильный). Аланин (Ala) углеводородного радикала не имеет, а *изо*-пропильный радикал валина (Val) меньше, чем *втор*-бутильный изолейцина (Ile).

- Считая мицеллы полностью сферическими. Чтобы рассчитать оптимальную степень гидратации  $\omega_0$ , необходимо найти радиус мицеллы  $R_m$ . (схемы приведены на рисунке, правда в Wordart'е не удалось корректно поставить радиусы)



а) В случае планарного тетрамера минимальный радиус описанной вокруг него окружности равен сумме половины диагонали квадрата со стороной  $d = 10$  нм, в вершинах которого лежат геометрические центры субъединиц, и радиуса субъединицы:

$$R_m = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{2} \cdot d + \frac{d}{2} = 12 \text{ нм} = 120 \text{ \AA}, \quad \omega_0 = R_m / 1,64 = 73,1$$

б) Центры сферических субъединиц образуют равносторонний треугольник, радиус мицеллы – сумма  $2/3$  медианы этого треугольника и радиуса сферы:

$$R_m = \frac{2}{3} \cdot \sqrt{3} \cdot \frac{d}{2} + \frac{d}{2} = 10,8 \text{ нм} = 108 \text{ \AA}, \omega_0 = R_m / 1,64 = \mathbf{65,7}$$

в)  $d_1 = 8 \text{ нм}$ ,  $d_2 = 12 \text{ нм}$ .

Рассмотрим прямоугольник, вершины которого лежат в эпицентрах овалов (центрах, отвечающих меньшему радиусу). Тогда радиус мицеллы складывается из половины диагонали этого прямоугольника и меньшего из радиусов.

$$d' = \sqrt{(d_1 - d_2)^2 + d_2^2} = \sqrt{80} = 4\sqrt{5} \text{ нм}$$

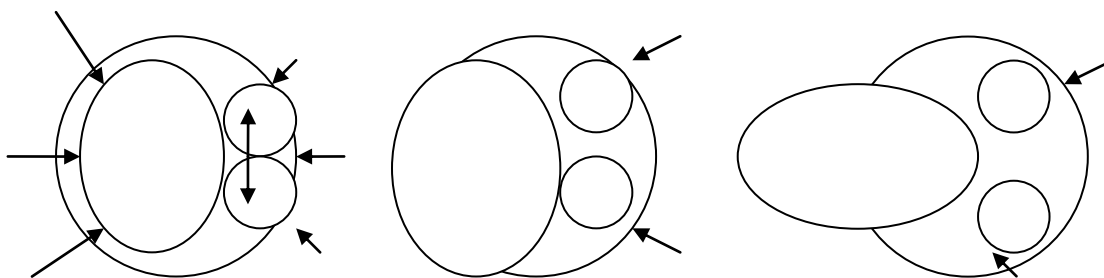
$$R_m = \frac{d'}{2} + \frac{d_1}{2} = 2\sqrt{5} + 4 = 8,47 \text{ нм} = 84,7 \text{ \AA}, \omega_0 = R_m / 1,64 = \mathbf{51,6}$$

5. При добавлении к системе различных веществ, суммарный результат их действия будет зависеть от многих факторов (в общем случае, однозначного, скорее всего не будет):

- а) изменения степени гидратации мицелл;
- б) в какой части мицеллы окажется добавляемое вещество;
- в) насколько степень гидратации близка к максимальной;
- г) радиуса мицелл и количества добавляемого вещества.

Далее полагаем, что внутренние радиусы мицелл одного размера и ферменты проявляют свою максимальную активность. Также полагаем, что в каждой мицелле содержится одна молекула фермента и добавляется количество веществ, большее, чем количество мицелл.

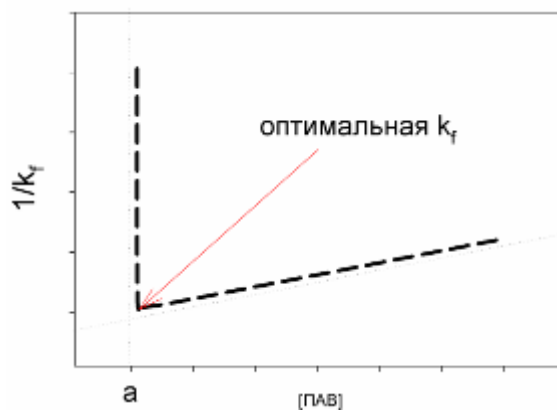
Б) Мочевина – полярное, легко гидратируемое вещество. Не влияет на радиус мицеллы, но стремится разместиться в центре мицеллы. Допустим, в мицелле оказалось несколько молекул мочевины, тогда, стараясь расположиться с минимальным отталкиванием 3-х молекул, фермент будет сильно «прижат» к границам внутренней полости (фактически лишен с этой стороны гидратной оболочки), что крайне негативно скажется на окружении фермента и на его активности. Из рисунка 2 приведенного в условии задачи видно, что на часть ферментов сильно влияет уменьшение степени гидратации, а на часть – нет. Логично предположить, что ферменты, у которых это влияние сильно – гидрофильные (имеющие гидрофобные группы не должны сильно менять свою активность при «втискивании» части молекулы в гидрофобное окружение). Тогда молекула мочевины будет наиболее влиять именно на гидрофильные ферменты.



А) неионный ПАВ: встраиваясь в мицеллу, будет влиять на те ферменты, которые больше всего погружены в мицеллу - ферменты с протяженными гидрофобными областями на поверхности (III)

В) манит – органический полиол, возможно, будет больше всего влиять на ферменты, содержащие длинноцепочечные неполярные заместители (II).

6. А) Поскольку степень гидратации фиксирована, размер мицелл во всем диапазоне концентраций ПАВ будет постоянен, и с увеличением [ПАВ] будет расти число мицелл в системе. В свою очередь, это приведет к росту числа столкновений, которое пропорционально квадрату количества мицелл ( $\sim[\text{ПАВ}]^2$ ). Кроме этого, существует пороговая концентрация [а], ниже которой мицеллы не образуются (критическая концентрация мицеллообразования). При этой концентрации ПАВ скорость ферментативной реакции равна нулю.



Обобщая, получаем  $k_f \propto \frac{[\text{ПАВ}] - a}{[\text{ПАВ}]^2}$ , или  $\frac{1}{k_f} = \frac{b \cdot [\text{ПАВ}]^2}{[\text{ПАВ}] - a}$ , где  $b$  - некоторый коэффициент пропорциональности. Вид функции представлен на рисунке.

Чтобы найти предельно максимальное значение константы, необходимо продифференцировать полученную функцию, и, приравняв к нулю, получить значение  $[\text{ПАВ}]_{\text{оптимум}}$ , отвечающее максимальному значению константы.

$$[\text{ПАВ}]_{\text{оптимум}} = \frac{1 + \sqrt{17a}}{4}$$

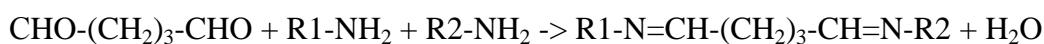
Б) Число мицелл в оптимальной системе будет равно  $\frac{[ПAB]_{оптималь} - a}{c}$ , где  $c$  – число

молекул ПАВ в одной мицелле.

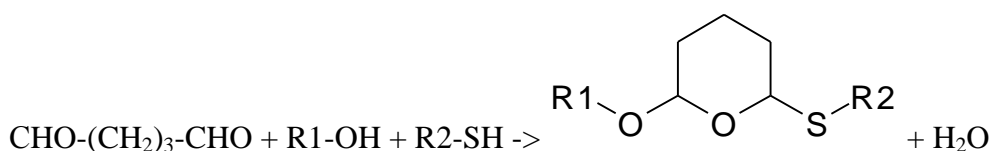
Число молекул фермента в идеальной системе  $[фермент]=d*[мицелл]$ , где  $d$  – степень заполнения мицелл. Как правило, она не превышает нескольких процентов.

7. а) Наиболее вероятно взаимодействие с диаминокислотами (аргинином и лизином), спиртами и тиолами (серином, треонином и цистеином), маловероятно, но возможно, с производным фенола (тирозином), и индола (триптофаном).

б) Реакция с аминокислотами:

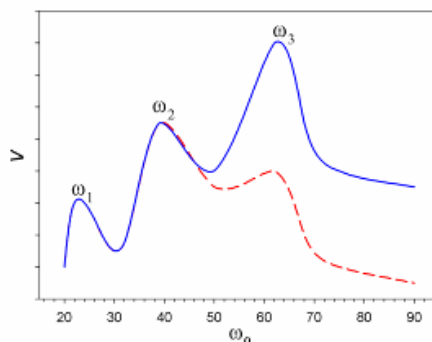


где R1, R2 – оставшиеся радикалы диаминокислот,



Где R1 - радикал серина/треонина, R2 - радикал цистеина

8.



Для фермента, содержащего две каталитически активные субъединицы, возможны три пика каталитической активности, отвечающие совпадению с радиусами отдельных субъединиц и случай, когда в мицелле оказывается вся молекула фермента.

$$\omega_0(1) = 7,4 \cdot 10 / (2 \cdot 1,64) = 22,6$$

$$\omega_0(2) = 12,8 \cdot 10 / (2 \cdot 1,64) = 39$$

$$\omega_0(3) = (7,4 + 12,8) \cdot 10 / (2 \cdot 1,64) = 62$$

Рассмотрим отдельные участки по  $\omega_0$ :

22,6 первый максимум (меньшая субъединица в оптимальной мицелле)

22,6-39 некоторое снижение по сравнению с оптимумом – меньшая субъединица в мицелле, но размер мицеллы растет и перестает удовлетворять условию оптимума.

39 второй максимум (бОльшая субъединица в оптимальной мицелле плюс меньшая в неоптимальной)

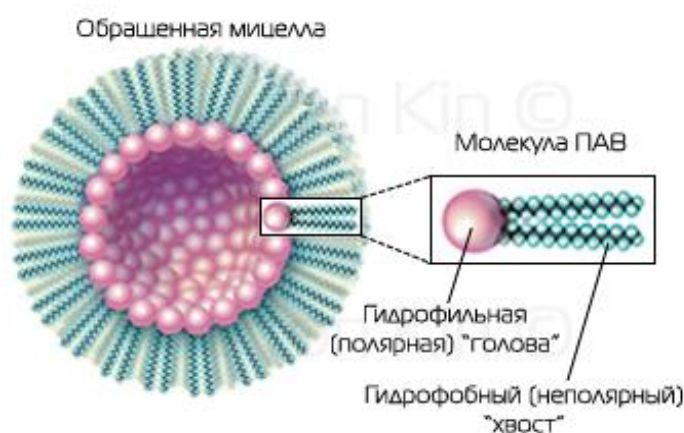
39-62 здесь возможны два варианта поведения. Первый (сплошная синяя линия) – при отсутствии взаимно ингибирующего эффекта двух субъединиц, второй (красная пунктирная линия на графике) – при его наличии.

62 третий максимум (весь фермент в оптимальной мицелле)

62- рост размера мицеллы, снижение каталитической активности фермента.

#### Евтушенко Евгений Геннадиевич

4.



*Схематическое строение обращенной мицеллы*

5. М-м! Люблю тесты. А нужно просто угадать или объяснить свой выбор?

А) Давайте нагреем и уберем фермент напрочь. Тогда ждать придется еще дольше, почти бесконечно ☺

Б) Есть аминокислоты, которые плохо растворимы в воде (например, Phe, Ile, Tyr, Glu, Asp, Cys). Но поскольку растворимость их выше, чем  $K_M$  фермента, он все равно будет работать на максимальной скорости в насыщенном растворе аминокислоты.

В) Именно из-за этого и возможно проведение такой реакции. Продукт (дипептид) должен уходить в органическую фазу.

Г) Да, да! Именно поэтому.

Д) Если бы фермент инактивировался, то увеличение времени протекания реакции ни к чему бы не приводило. Фермент-то помер...

Е) Растворимость истинно полярных растворителей (гексана, октана, толуола) в воде ничтожна.

6. Интересный вопрос... Вероятно, по логике авторов, необходимо сравнить между собой гидрофобность представленных аминокислот, выбрать самую гидрофобную

(изолейцин). Это и будет система с наибольшим выходом. Гидрофобность дипептида больше гидрофобности аминокислоты, и чем более неполярный радикал несет аминокислота, тем больше дипептида будет концентрироваться в органическом слое, увеличивая выход. Это навскидку. А если подходить к вопросу серьезно, то для того, чтобы ответить на него однозначно, нужно знать коэффициенты распределения между органической и водной фазой для каждого дипептида и аминокислоты при pH, равном оптимальному pH фермента. Честно расписывая все равновесия в данной системе, приходим к выводу, что выход сложным образом зависит и от соотношения объемов фаз, и от константы равновесия данной реакции в водной среде, и от начальной концентрации аминокислоты. Проверим, что же из всего этого получится. Коэффициенты распределения оценим в ChemOffice пакетом ClogP для цвиттер-ионной формы аминокислот и дипептидов в системе октанол-вода, сверимся с [http://www.jenner.ac.uk/Bioinformatics/peptide\\_structures.htm](http://www.jenner.ac.uk/Bioinformatics/peptide_structures.htm) по известным дипептидам, убедимся, что ChemOffice дает разумные значения. После этого введем систему из 4 уравнений (константа равновесия, два коэффициента распределения и материальный баланс) в Mathematica, положив соотношение объемов органической и водной фазы, равное 10, константу равновесия, равную  $1 \text{ M}^{-1}$ , начальную концентрацию аминокислот  $1 \text{ M}$ . Выход оценим как отношение суммарного количества дипептида ( $x \cdot 2$ ) в обеих фазах к начальному количеству аминокислоты.

Получаем: 0.499 (Ala), 0.508 (Val) и 0.595 (Ile). Все верно, как и предсказывали. Наибольший выход достигается для самой гидрофобной аминокислоты, изолейцина.

7.

А) Радиус описанной сферы для такого тетрамера равен  $R_m = d_E \left( \frac{1}{\sqrt{2}} + \frac{1}{2} \right) = 12 \text{ нм}$ ,

степень гидратации  $w_0 = \frac{R_m}{1.64} = 7.3$

Б) Радиус описанной сферы  $R_m = d_E \left( \frac{1}{\sqrt{3}} + \frac{1}{2} \right) = 11 \text{ нм}$ , степень гидратации  $w_0 = 6.6$ .

В) Радиус описанной сферы равен почти 8 нм ( $\approx 8.05$ ), степень гидратации  $w_0 = 4.9$ .

8. Прежде всего стоит отметить, что ферменты III типа в их нативном состоянии (в липидной бислойной мембране) очень редко бывают полностью погружены в мембрану (не могу я себе представить полностью гидрофобный фермент), как правило часть поверхности белка экспонирована в водную фазу. Для ферментов II типа могут реализовываться два случая: 1) ферментная глобула полностью находится



во внутренней полости, будучи лишь одним или несколькими гидрофобными участками «заякорены» в слое ПАВ; 2) ферментная глобула встроена в слой ПАВ.

Второй случай ничем не отличим от ферментов типа II.

А) неионогенный ПАВ встроится в оболочку мицелл, таким образом, оказывая влияние на ферменты II и III класса, преимущественно III, т.к. вторые просто «заякорены» своими гидрофобными хвостиками в оболочке мицеллы, но не испытывают большого влияния с ее стороны.

Б) мочевины сконцентрируется исключительно в водной фазе. А поскольку она очень эффективно дестабилизирует систему водородных связей белков, то всем трем классам ферментов придется не сладко. При достаточно высоких концентрациях мочевины окажутся (частично) денатурированными как ферменты, локализованные во внутренней полости (I и II), так и III, лишь частично экспонированные внутрь мицеллы.

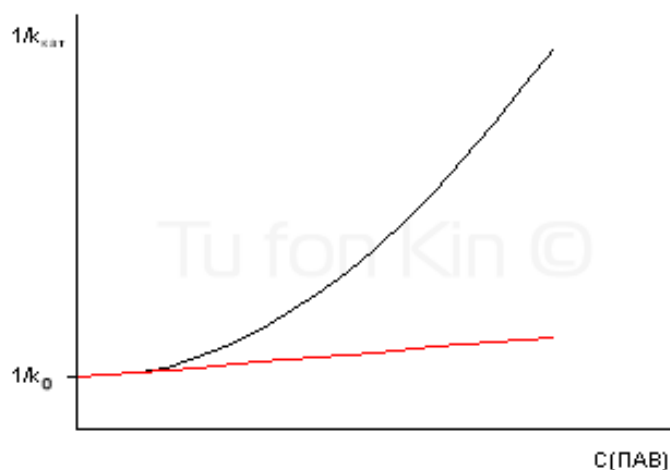
В) Маннит также преимущественно будет находиться в водной фазе. Маннит не оказывает по большому счету никакого деструктивного влияния на ферменты. Он может лишь предохранять от денатурации (при озвучивании, заморозке и т.д.).

9.

А) Оговоримся, что рассматривать будем ферменты II типа, встроенные в мембрану (как следует из описания).

Так как степень гидратации остается постоянной с возрастанием концентрации ПАВ, следовательно, должно возрастать количество мицелл в единице объема. При этом не ясно, будет ли оставаться постоянной концентрация фермента в водной фазе или его суммарное количество в системе.

Будем считать, что эффективная каталитическая константа фермента обратно пропорциональна числу столкновений мицеллы, содержащей фермент с другими мицеллами. При постоянной концентрации фермента в водной фазе количество столкновений будет расти пропорционально квадрату количества мицелл, а при постоянном количестве фермента в системе – пропорционально первой степени. Таким образом, исходя из задания, нам необходимо схематически изобразить число столкновений (черная кривая для постоянной концентрации фермента в водной фазе, красная – для постоянного количества фермента в системе):

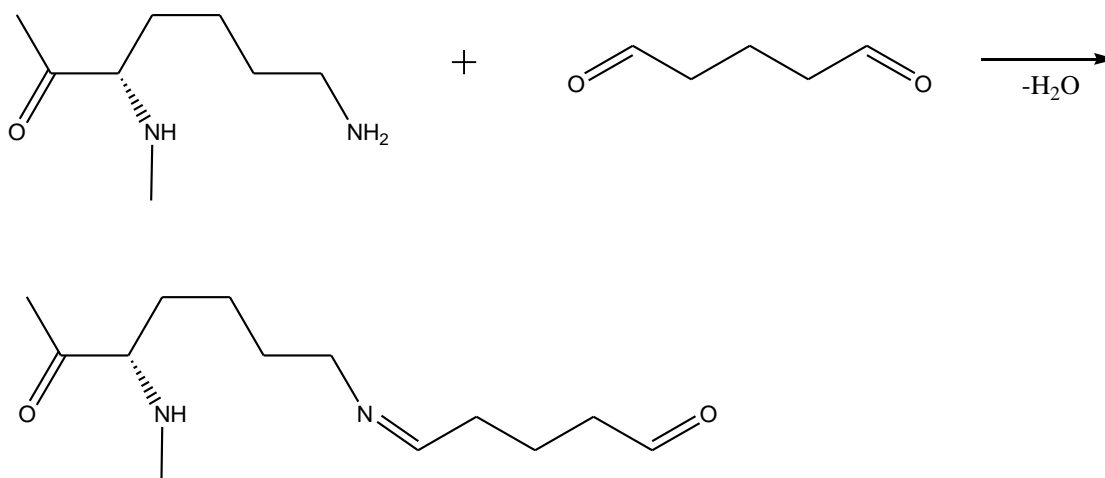


Б) Очевидно, чтобы не было столкновений с другими мицеллами, должна остаться только 1 мицелла (как в «Горце» прямо!). А сколько в этой мицелле молекул фермента оптимально для проявления наивысшей каталитической активности зависит от субъединичности белка и взаимного влияния субъединиц. В случае мономерного фермента ответ 1.

10.

А) Из групп, присутствующих в боковых остатках аминокислот, альдегиды способны взаимодействовать с аминогруппами (Lys, Arg), спиртовыми (Ser, Thr) и  $-SH$  (Cys). Однако получающиеся полуацетали и полутиоацетали неустойчивы к гидролизу, так что остаются только аминогруппы, реагирующие с альдегидом с образованием оснований Шиффа. Аминокислоты, несущие аминогруппы – лизин (Lys) и аргинин (Arg). Как правило, на поверхности глобулы лизиновых остатков в несколько раз больше, чем аргининовых, поэтому считается, что глутаровый альдегид шьется за лизин.

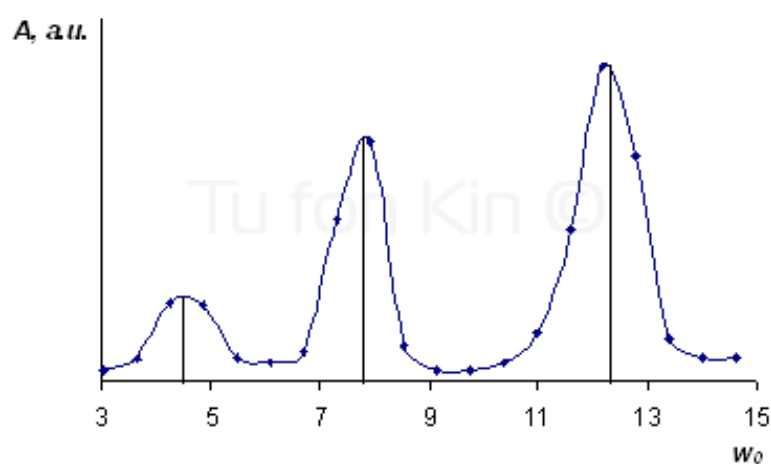
Б)



Поскольку данная реакция обратима, после обработки глутаровым альдегидом фермент обрабатывают боргидридом для восстановления основания Шиффа во вторичный амин.

Также иногда перед обработкой боргидридом проводят блокировку избытка альдегидных групп глицином.

11. То есть у нас есть гетеросубъединичный белок, у которого две разных субъединицы проявляют одну и ту же каталитическую активность? С трудом верится в существование таких белков. Ну да ладно. Будем отталкиваться от прозвучавшего в условии утверждения: «установлено, что ферменты проявляют максимальную каталитическую активность, когда их размеры совпадают с диаметром внутренней полости обращенной мицеллы». Значит при уменьшении степени гидратации (пропорциональной размеру мицелл) при значении  $w_0 = (12.8 + 7.4)/1.64 = 12.3$  мы должны получить максимум активности (работают обе субъединицы). При понижении радиуса мицеллы при столкновениях пустых и заполненных мицелл субъединицы расходятся по разным мицеллам. Но размер их слишком велик, чтобы быть оптимальным для любой из субъединиц. Поэтому в этот момент каталитическая активность должна быть низкой. При приближении к значению  $w_0 = 12.8/1.64 = 7.8$  настает оптимум для большей субъединицы, поэтому при данном значении степени гидратации должен наблюдаться локальный максимум активности, меньший, чем для двух работающих субъединиц (будем считать, что кооперативные эффекты отсутствуют). При дальнейшем понижении размера мицеллы активность большей субъединицы падает, меньшей – растет, достигая максимума при  $w_0 = 7.4/1.64 = 4.5$ . Эта зависимость схематически показана на графике:



## Квантовоточечная раскраска (2008, биология / медицина)

Макеева Екатерина Анатольевна

1. В верхней части рисунка квантовыми точками (КТ) маркировано ядро, (на ядерные антигены посадили молекулы), на нижней – микротрубочки, составляющие внутренний скелет клетки.

При поглощении кванта света с энергией, большей ширины запрещенной зоны полупроводникового материала, в нем происходит образование пары электрон-дырка. При излучательной рекомбинации данной пары происходит излучение кванта света с энергией, равной ширине запрещенной зоны материала. Особенностью наноразмерных объектов, к которым относятся и квантовые точки, является то, что, начиная с некоторого радиуса (равного Боровскому радиусу экситона), ширина запрещенной зоны материала начинает зависеть от размера частиц:

$$E_g = E_{g0} + \frac{\pi^2 \cdot \hbar^2}{2 \cdot \mu \cdot r^2}, \text{ где } E_{g0} - \text{ ширина запрещенной зоны объемного полупроводника,}$$

$r$  – радиус КТ.

2. Экспериментальная установка должна включать в себя возможность проведения следующих этапов:

- 1) Термо-инжекционный синтез гидрофобных КТ - синтез в органическом растворителе при нагревании, в присутствии стабилизатора-ПАВ (как правило, олеиновая кислота), с впрыскиванием растворов реагентов заданной концентрации и контролируемым временем синтеза). Размер частиц, а, значит, и их фотоэлектронные характеристики можно задавать, варьируя температуру синтеза, концентрацию реагентов и время синтеза. Варьируя природу КТ либо их структуру (например, типа «ядро-оболочка»), также можно получать материал с разной величиной ширины запрещенной зоны, а, значит, «подбирать» длину волны максимума излучения. Необходимо отметить, что реальный размер КТ складывается из размера полупроводниковых частиц и толщины олеатной «шубы», что необходимо учитывать при подборе маркеров для тех или иных частей клетки.

Таким образом, выбор материала будет происходить как исходя из необходимой длины волны излучения, так и из допустимых размеров наночастиц.

- 2) Гидрофилизирование КТ – покрытие молекулами-линкерами, обеспечивающими растворимость КТ в воде и, одновременно, имеющими ту или иную функциональную группу, к которой далее может присоединяться белковый маркер, специфически связывающийся с теми или иными частями клетки. Например, можно использовать гидролипоевую кислоту, являющуюся лигандом для положительно заряженных белков.

Или ПАВ, содержащий в своем составе альдо-группу для возможности привязки к свободным аминогруппам белков.

Чтобы улучшить прохождение квантовыми точками клеточной мембраны, к ним можно еще дополнительно «привязать» свободно проходящий (например, за счет рецептор-активированного эндоцитоза) белок, например, инсулин.

3) Конъюгация с молекулами, специфически связывающимися с «нужными» частями клетки (например, антитела к белкам, содержащимся в данной части клетки).

На нижней фотографии квантовыми точками помечены микротрубочки (для ядра тоже подойдет универсальная процедура с использованием антител). Значит, нужно найти молекулу, специфически связывающуюся с белками микротрубочек. Универсальный метод решения – взять моноклональные антитела, однако он дорог, и, поскольку не всегда можно найти антитело для необходимой задачи, зачастую требует сначала процедуры создания этих антител методами биоинженерии. Молекула должна иметь специфические участки, за которые ее можно было «привязать» к функциональным группам «шубы» квантовой точки.

Пусть у нас уже есть КТ с линкером, имеющим альдогруппу и антитело с многочисленными аминогруппами, тогда можно их связать, например, по реакции восстановительного аминирования (выбрана эта реакция, т.к. в результате получается стабильная к клеточным ферментам химическая связь):



5) Введение модифицированных КТ в культуру клеток.

6) Исследование клеточной культуры при освещении УФ.

Схема установки и последовательность действий:

Для нашего эксперимента возьмем, например, CdSe – высокая эффективность люминесценции, относительная простота получения, хорошее разрешение по длинам испускаемых волн, размеры, отвечающие размером компонент клетки.

В термостатированной трехгорлой колбе в атмосфере аргона получаем по описанной методике квантовые точки. Далее к исходному раствору добавляем раствор требуемого ПАВ в том же растворителе, после «высаживания» КТ отделяем и переводим в водный раствор с фиксированным рН (стабильность мицеллы + «рабочая среда» в клетке). Затем смешиванием растворов КТ и моноклонального антитела, добавляем мягкий восстановитель, ждем, пока пройдет реакция. Добавляем полученный раствор в культуру клеток и ждем некоторое время, пока за счет, например, питоцитоза, наночастицы попадут в клетку и свяжутся за счет антител с нужными белками. Несколько раз промываем

культуру клеток чтобы удалить несвязанные НТ. Светим УФ лазером и наблюдаем люминесценцию.

Все перечисленные манипуляции можно произвести в рамках одного помещения с тягой, микроскопом, набором соответствующей посуды и при наличии УФ-лазера.

Приведенная выше схема весьма упрощена. Подобные методы одностадийной модификации часто приводят к дестабилизации мицеллярной частицы и слипанию частиц. Обычно для дальнейшей модификации антителами (например иммуноглобулинами) используется координация (за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженной олеатной шубой) положительно заряженной молекулы авидина («линкер»), к которой химическими методами присоединяются антитела.

3. Поскольку, как было описано выше, для одного и того же материала частота испускаемого кванта зависит от его размера, то, изменяя размер, мы варьируем и частоту излучения. Для маркировки 2-х структур необходимо, чтобы максимумы частот КТ хорошо различались глазом. Для этого лучше использовать КТ с достаточно удаленными друг от друга частотами (например, красные и зеленые). В рассмотренном выше примере это можно сделать, например, изменив температуру синтеза КТ.
4. Конъюгируя каждый тип КТ со «своим» белком, селективно «адресуем» каждый тип КТ к своей «мишени». КТ без селективных молекул, но с разным размером, будут с разной скоростью взаимодействовать с клеточными структурами (например, проходить через мембраны), поэтому разные структуры клетки (в основном, разделенные мембранам) окрасятся ими с различной интенсивностью (селективность, скорее всего, будет не высокой)
5. Причины, по которым более удобным является использование маркировки при помощи КТ:

1) У квантовых точек частота люминесценции строго определяется размером частиц и шириной запрещенной зоны материала. Получающаяся в ходе синтеза дисперсия по размерам невысока, и у результирующего спектра наблюдается довольно узкий максимум (20-30 нм). У обычных биологических красителей суммарный цвет может быть вызван несколькими максимумами, ширина пика на полуволне обычно гораздо шире. Чтобы различить свечения нескольких молекул красителя, необходимо использовать узкие оптические фильтры, что требует более одного измерения.

2) У КТ (как правило, CdSe) интенсивность излучения выше, чем у красителя (больше квантовый выход).

3) Кроме того, КТ имеют широкий спектр поглощения, поэтому можно возбуждать свечение с разными длинами волн одним источником света (с маленькой длиной волны).

4) Использование узкой частоты возбуждения уменьшает самосвечение органелл клетки, таким образом, увеличивая контрастность изображения.

5) Возможность использования одного и того же материала для создания маркеров для люминесцентной «подсветки» органелл клетки с *разной* частотой излучения, тогда как для множества органических красителей, характеризующихся каждый своей частотой, спектральные параметры (например, максимум поглощения) также сильно отличаются.

6) Большая фотостабильность КТ по сравнению с органическими красителями.

### Евтушенко Евгений Геннадиевич

1. Судя по изображениям, квантовые точки имеют красную окраску (стабильное во времени свечение). В первом ряду изображений квантовыми точками помечено ядро раковой клетки, а красителем Alexa 488 – цитоскелет (актиновые филаменты и микротрубочки). Во втором ряду изображений наоборот: квантовые точки – цитоскелет, Alexa 488 – ядро.

Свечение квантовых точек – это флуоресценция. Поглощение кванта лазерного излучения полупроводниковой наночастицей вызывает возникновение в ней пары электрон-дырка. Далее происходит быстрая релаксация обоих носителей заряда до основных уровней энергии. Последующая рекомбинация электрона и дырки приводит к испусканию кванта света с длиной волны, соответствующей ширине «запрещенной зоны» (вернее, разнице между НОМО и LUMO) квантовой точки.

2. То есть, если я правильно понял задачу, мне надо синтезировать красные квантовые точки (QD608), провести их конъюгацию с антителами и пометить цитоскелет клетки? Ни один биохимик или молекулярный биолог не возьмется за совершенно неизвестный ему синтез. Он скорее купит нужные ему квантовые точки (например, в Invitrogen., <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Qdot.html>). Вот конъюгировать наночастицы с антителами будет он сам, хотя тот же Инвитроген предлагает и услуги по конъюгации. Ну да ладно, от мира реального перейдем в вымышленный мир задач. Если задание есть, надо его решать ☺.

Квантовые точки будем изготавливать из CdSe с покрытием из более широкозонного полупроводника, ZnS для существенного увеличения квантового выхода. Синтез будем проводить в высококипящем координирующем растворителе, TOP/TOPRO. Именно этот путь синтеза дает высокие выходы квантовых точек с узким распределением по размерам.

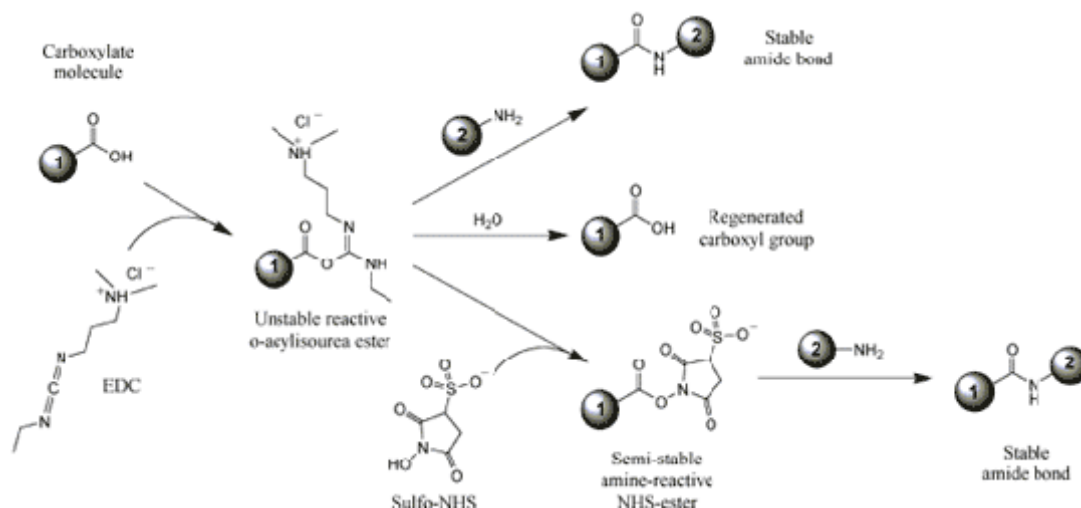
Берем круглодонную четырехгорлую колбу, помещаем в нее смесь ТОР (триоктилфосфин) и ТОРО (триоктилфосфин оксид). Сверху ставим мешалку, капельную воронку с раствором триоктилфосфин селенида ( $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7]_3\text{PSe}$ , ТОР:Se) и диметилкадмия ( $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ ) в ТОР/ТОРО. В третье горло помещаем капилляр, через который будем продуть азот, на четвертое наденем клапан для выравнивания давления (Откуда все это стекло и реагенты в биохимической лаборатории? Снова подумываю о том, чтобы просто купить квантовые точки ☺) Нагреваем до  $360^\circ\text{C}$  и быстро прибавляем некоторое количество смеси прекурсоров. При этом происходит частичное их разложение, раствор оказывается сильно пересыщен относительно фазы будущей наночастицы. Происходит образование большого количества зародышей CdSe одинакового размера. При этом важную роль играют ТОРО и ТОР – они координируют продукты разложения прекурсоров и зародыши, предотвращая их слипание и быстрый рост. ТОРО координируется к Cd через кислород, а ТОР координирует селен в составе наночастиц. Под словом «координируют» в современном представлении о механизме данного процесса понимается динамическое тепловое равновесие, когда вся поверхность наночастицы покрыта молекулами координирующего агента, однако такие молекулы могут «уходить» на короткое время с поверхности, открывая доступ к ядру частицы для ее роста или растворения. Вслед за стадией нуклеации смесь быстро охлаждают до температуры около  $300^\circ\text{C}$ . При этом степень пересыщения снижается и процесс нуклеации становится энергетически невыгодным. На этой стадии происходит медленный рост уже образовавшихся зародышей. Для получения более узкого распределения частиц по размерам на этом этапе можно по каплям прикапывать раствор смеси прекурсоров. По ходу синтеза из реакционного сосуда отбираются аликвоты, для них определяются спектральные характеристики растущих наночастиц. Более всего нас интересует максимум спектра испускания частиц, так как из него можно рассчитать средний размер частиц. Как только нужные спектральные характеристики достигнуты, охлаждаем реакционную смесь, добавляем метанол и осаждаем квантовые точки. Промываем метанолом, перерастворяем в ТОР/ТОРО, переносим в реакционную колбу. Нагреваем до  $300^\circ\text{C}$ , добавляем смесь прекурсоров для формирования оболочки ZnS. Отбираем аликвоты с контролем на электронном микроскопе. Как только изначальный диаметр точек увеличится на 3-4 нм, можно останавливать синтез (охлаждением до комнатной температуры), снова осаждаем точки метанолом, промываем и перерастворяем в хлороформе.

Далее нам надо гидрофилизировать поверхность квантовых точек и одновременно ввести группы для конъюгации с биомолекулами. Вот тут-то процесс и переходит в привычные



для биологов полипропиленовые эппендорфы ☺. Квантовые точки можно гидрофилизовать разными способами: физической адсорбцией амфифильного полимера или олигомера (циклодекстрана), а можно используя специфическое сродство атомов цинка к тиоловым соединениям. Так, наверное, и поступим: ковалентная модификация все же надежней, чем физическая адсорбция. Для этого приготовим раствор депротонированной формы 3-меркаптопропионовой кислоты (ЗМРА) в хлороформе: растворим кислоту в хлороформе и добавим твердого гидроксида тетраметиламмония, дадим постоять ночь на мешалке и отберем органическую фазу. Прибавим к этому раствору наш раствор квантовых точек и опять же оставим на ночь на мешалке. Наутро обнаружим, что раствор расслоился на прозрачный под УФ-лампой органический слой и капельку с интенсивной красной флуоресценцией. Добавим 1 мл воды и отберем водную фазу. Диализуем этот раствор против PBS, используя ацетатцеллюлозную мембрану. Все. Мы получили суспендированные в нужном буфере гидрофильные квантовые точки с карбоксильными группами на поверхности.

Итого: на квантовых точках есть карбокси-группы, на белках – в основном аминокислоты. Значит, шитье будем с использованием EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) в присутствии 5 мМ Sulfo-NHS. Этот метод дает стабильно высокие выходы конъюгатов. Общая схема пришивки приведена на рисунке:



Можно шитье непосредственно к антителам на актин или тубулин, но я бы выбрал стратегию пришивки стрептавидина, чтобы сделать этот конъюгат универсальным.

Подготавливаем препарат клеток: фиксируем на покровном стекле, обрабатываем метанолом, забиваем BSA. Далее добавляем к нашему клеточному препарату либо конъюгат QD-антитела на актин + тубулин, либо конъюгат фаллоидин-биотин (продажный реагент, специфично взаимодействует с актином) + биотин-антитела на тубулин с последующей обработкой QD-стрептавидин. Отмываемся от неспецифики PBS-

Т и смотрим на конфокальном флуоресцентном микроскопе на длине волны 605 нм с возбуждением на 485 нм (ртутная лампа+фильтр). Уф... Целая дипломная работа получилась ☺

3. Абсолютно также как и для одного типа квантовых точек: получаем два конъюгата точек с антителами (или ДНК, или другого специфического маркера, как уже было показано на примере фаллоидина) против двух клеточных мишеней и обрабатываем клеточный препарат смесью двух конъюгатов.

Разница в энергии НОМО и LUMO (или, по аналогии с массивным полупроводником, ширина «запрещенной зоны») полупроводниковой квантовой точки зависит от ее размера из-за явления квантового ограничения (quantum confinement). Формула, выведенная в приближении эффективных масс электрона и дырки, выглядит следующим образом:

$$E_{QD} = E_g^{bulk} + \frac{h^2}{8em_0r_{QD}^2} \left( \frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h} \right) - \frac{1.8e}{4\pi\epsilon\epsilon_0r_{QD}},$$

Где  $E_g^{bulk}$  - ширина запрещенной зоны массивного полупроводника (в эВ);  $h$  - постоянная Планка;  $e$  - заряд электрона;  $m_0$  - масса свободного электрона,  $r_{QD}$  - радиус квантовой точки;  $m_e$  и  $m_h$  - эффективные масс электрона и дырки;  $\epsilon$  - диэлектрическая постоянная для материала точки;  $\epsilon_0$  - диэлектрическая проницаемость вакуума.

Таким образом, можно из одного и того же материала получать квантовые точки с разным положением максимума в спектрах флуоресценции. А можно наоборот варьировать спектральные характеристики при фиксированном размере частиц путем изменения состава точек  $Cd_xZn_{1-x}Se/ZnS$ .

Почему такую маркировку нескольких «мишеней» сразу нельзя произвести с использованием обычных флуоресцентных красителей?

Маркировку-то произвести можно, наблюдать одновременно нельзя. Потому что в случае органических флуоресцентных красителей разница в положении максимумов спектрах флуоресценции и поглощения невелика. И используя два красителя, мы полосой возбуждения одного «залезем» в полосу испускания другого. Для квантовых точек максимумы в спектрах поглощения и испускания существенно разнесены, да и полоса поглощения сама по себе широкая, что позволяет возбуждать разные квантовые точки на одной длине волны.

#### Харламова Марианна Вячеславовна

1. Квантовая точка — фрагмент проводника или полупроводника, ограниченный по всем трём пространственным измерениям и содержащий электроны проводимости.

Точка должна быть настолько малой, чтобы были существенны квантовые эффекты. Это достигается, если кинетическая энергия электрона  $\hbar^2/(2md^2)$ , обусловленная неопределённостью его импульса, будет заметно больше всех других энергетических масштабов: в первую очередь больше температуры, выраженной в энергетических единицах ( $d$  — характерный размер точки,  $m$  — эффективная масса электрона на точке).

Квантовой точкой может служить любой достаточно маленький кусочек металла или полупроводника. Исторически первыми квантовыми точками, вероятно, были микрокристаллы селенида кадмия CdSe. Электрон в таком микрокристалле чувствует себя как электрон в трёхмерной потенциальной яме, он имеет много стационарных уровней энергии с характерным расстоянием между ними  $\hbar^2/(2md^2)$  (точное выражение для уровней энергии зависит от формы точки). Аналогично переходу между уровнями энергии атома, при переходе между энергетическими уровнями квантовой точки может излучаться фотон. Возможно также забросить электрон на высокий энергетический уровень, а излучение получить от перехода между более низколежащими уровнями (люминесценция). При этом, в отличие от настоящих атомов, частотами переходов легко управлять, меняя размеры кристалла. Собственно, наблюдение люминесценции кристаллов селенида кадмия с частотой люминесценции определяемой размером кристалла и послужило первым наблюдением квантовых точек.

В настоящее время множество экспериментов посвящено квантовым точкам, сформированным в двумерном электронном газе. В двумерном электронном газе движение электронов перпендикулярно плоскости уже ограничено, а область на плоскости можно выделить с помощью затворных металлических электродов, накладываемых на гетероструктуру сверху. Квантовые точки в двумерном электронном газе можно связать туннельными контактами с другими областями двумерного газа и изучать проводимость через квантовую точку. В такой системе наблюдается явление кулоновской блокады. Миграция между энергетическими уровнями квантовых точек сопровождается изменением энергии электрона, что соответствует поглощению или излучению кванта света при переходе электрона соответственно на более высокий или низкий уровень. Описанное выше поведение электронов в квантовой точке приводит к нехарактерному для макрообъектов дискретному энергетическому спектру. Данный факт является причиной люминесценции в квантовых точках.

Вероятно, на рисунках, приведенных вверху, квантовые точки находятся в цитоплазме клетки. Это наиболее простой случай, где могут находиться квантовые точки. Вводить

квантовые точки в другие составные части клетки (вакуоли, ядро) будет гораздо более сложно. В случае же цитоплазмы это гораздо проще. Квантовые точки через мембрану попадают сразу в цитоплазму клетки.

2. Как формируются квантовые точки? Сила (энергия) связи дырки и электрона определяет радиус экситона, который является характеристической величиной для каждого вещества. Если размер частицы меньше радиуса экситона, то экситон оказывается ограничен в пространстве ее размерами, а соответствующая энергия связи значительно изменяется по сравнению с объемным веществом. Не трудно догадаться, что если энергия экситона изменяется, то изменяется и энергия фотона, излучаемого системой при переходе возбужденного электрона на свое исходное место. Таким образом, получая монодисперсные коллоидные растворы наночастиц различных размеров, можно управлять энергиями переходов в широком диапазоне оптического спектра.

Получение квантовых точек:

В настоящий момент известно множество способов получения квантовых точек, например, их можно «вырезать» из тонких слоев полупроводниковых «гетероструктур» с помощью «нанолитографии», а можно спонтанно сформировать в виде наноразмерных включений структур полупроводникового материала одного типа в матрице другого. Методом «молекулярно-пучковой эпитаксии» при существенном отличии параметров элементарной ячейки подложки и напыляемого слоя можно добиться роста на подложке пирамидальных квантовых точек, за исследование свойств которых академику Ж.И.Алферову была присуждена Нобелевская премия. Контролируя условия процессов синтеза, теоретически можно получать квантовые точки определенных размеров с заданными свойствами.

Наиболее доступным и удобным способом для получения квантовых точек является коллоидный синтез. Для получения квантовых точек CdSe можно, например, использовать следующую методику. Берем раствор олеата кадмия в трехгорлой колбе. В качестве растворителя используем октиловый эфир. Нагреваем смесь до 150-180 градусов, и через некоторое время добавляем в расвор реактив TOPSe. Получаем квантовые точки!!!

Способы переноса квантовых точек в клетку:

- 1) Рассмотрим, каким образом можно было бы привязать молекулу белка к наночастицам. Организм человека устроен таким образом, что при заболевании начинают активно вырабатываться антитела. Антитела- это белковые образования и каждому из них соответствует строго определенный антиген. Антиген-это тоже белок, к которому посредством сульфидных связей -мостиков, ковалентно можно привязать наночастицы, и

запустить таким образом в кровь человека. С кровью наночастицы попадают во все органы человеческого организма. А уже из крови они могут попадать через мембрану клетки в цитоплазму клетки какого-нибудь органа.

2) Привязать наночастицы к белкам по указанному выше механизму можно посредством оболочки из сульфида. Наиболее безопасной и наименее токсичной для здоровья человека будет оболочка из ZnS.

3) Еще одним способом сборки является сборка на основе одиночных молекул ДНК, привитых к наночастицам. Такие частицы будут соединяться только с теми частицами, которые несут вторую, комплементарную молекулу ДНК, прочно связываясь с образованием двойной молекулы ДНК. Частицы при этом не надо даже подводить друг к другу. Они сами находят вторую половинку, свободно плавая в растворе.

3. Если размер частицы меньше радиуса экситона, то экситон оказывается ограничен в пространстве ее размерами, а соответствующая энергия связи значительно изменяется по сравнению с объемным веществом. Не трудно догадаться, что если энергия экситона изменяется, то изменяется и энергия фотона, излучаемого системой при переходе возбужденного электрона на свое исходное место. Таким образом, получая монодисперсные коллоидные растворы наночастиц различных размеров, можно управлять энергиями переходов в широком диапазоне оптического спектра. Проще говоря, частицы различных размеров будут иметь различную окраску. Поэтому квантовые точки различного размера можно использовать для маркировки различных мишеней. Обычные флуоресцентные красители будут окрашивать все мишени в один и тот же цвет, поскольку у фотонов, излучаемых при переходе возбужденного электрона на свое исходное место, будет одинаковая энергия.

Направлять квантовые точки различного размера и цвета в разные мишени можно следующим образом. Можно пришивать квантовые точки к различным белкам. При этом квантовые точки вместе с одним белком будут попадать в одну мишень, а - другие, вместе с другим белком, в другую.

#### Смирнов Евгений Алексеевич

1. Клетки на картинке снизу маркированы квантовыми точками, так как свечение продолжается в течение длительного времени (красная область), а сверху расположены фотографии клеток, маркированных флуоресцентным красителем, и сигнал от этих клеток затухает уже на второй минуте (зелёная область). Свечение в квантовых точках обусловлено излучательной рекомбинацией экситона. Сам же

экситон (электрон дырочная пара) возникает при воздействии на квантовую точку УФ излучения, которое переводит электрон из валентной зоны в зону проводимости, а в валентной зоне остаётся дырка.

- Используем простейшую методику синтеза квантовых точек. Синтез квантовых точек полупроводников можно проводить следующим образом (на примере селенида и телурида кадмия, как самые распространённые материалы для квантовых точек): в  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7]\text{ZP}$  (ТОР) растворяют селен для получения  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7]\text{ZPSe}$  (ТОР:Se). Полученный раствор смешивают с  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7]\text{ZPO}$  (ТОРО) и кадмиевым прекурсором ( $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ ). Полученную смесь прекурсоров быстро вводят в разогретую до  $360\text{ }^\circ\text{C}$  смесь ТОР и ТОРО, через которую продувается аргон или азот. При этом происходит частичное разложение прекурсоров, раствор оказывается сильно пересыщен относительно фазы полупроводника, формирующего будущие наночастицы. Происходит образование большого количества зародышей одинакового размера. При этом ТОРО и ТОР являются координирующими агентами для продуктов разложения прекурсоров и зародышей, предотвращая их слипание и быстрый рост. ТОРО координируется к Cd через кислород, а ТОР координирует Se в составе наночастиц. В данном случае «координация» - тепловое динамическое равновесие, т.е. координирующие агенты могут отрываться от поверхности, открывая доступ к ядру частицы. Вслед за стадией нуклеации смесь быстро охлаждают до температуры  $300\text{ }^\circ\text{C}$ . При этом степень пересыщения снижается и процесс становится кинетически невыгодным. На этой стадии происходит рост зародышей. Через некоторое время смесь быстро охлаждают до комнатной температуры, что препятствует дальнейшему росту наночастиц. Все операции проводятся в кварцевой трёхгорлой колбе.

Затем при частичной замене «шубы» на шубу содержащую тиольную группу (так как кадмий склонен к образованию прочной связи с S) на одном конце достаточно длинной углеводородной цепи и аминоруппу на другом, мы уже будем иметь квантовые точки, которые можно пришить к белку. Например, первичная активация аминогруппы «шубы» квантовой точки хлоридом или эфиром гидроксисукцинимидом с образованием амида с последующей обработкой бис-имидом и пришивкой к белку через аминогруппу. А затем белок вводится в клетку, белок должен соответствовать той части клетке, которую мы хотим «подсветить».

- Квантовые точки разных размеров можно пришивать к различным белкам (или другим биомолекулам), которые характерны для какой-либо области клетки и, следовательно, будут в ней концентрироваться.

4. Это будет возможно осуществить, так как длина волны люминесценции квантовой точки зависит от её размера, а, следовательно, при съёмке мы увидим различные цвета.
5. Для флуоресцентных красителей очень сложно подобрать такое их сочетание, чтобы было возможным их различить, так как ширина полосы излучения достаточно широка, тогда как у квантовых точек она очень узка. То есть при использовании красителей мы получим размытую картину, тогда как квантовые точки дадут чёткую картину того, где находятся данные белки в клетке.

#### Ромашка Михаил Юрьевич

1. Свечение квантовых точек происходит там, где идёт активное расщепление АТФ. Свечение возникает за счёт перехода электронов с более высоких энергетических уровней на более низкие. Но для длительного свечения нужна энергетическая подпитка, которую в клетках можно осуществить за счёт энергии АТФ. На верхней серии рисунков квантовыми точками помечено ядро, а красителем – митохондрии, а на нижней серии рисунков – наоборот.
- 3-4. Два типа квантовых точек для маркировки двух различных мишеней можно использовать, просто взяв точки различного размера, потому что *точки различного размера светятся разными цветами*. Расстояние между соседними уровнями энергии электрона в квантовой точке можно оценить из принципа неопределённостей Гейзенберга. Оно равно  $\Delta E = \frac{\hbar^2}{2md^2}$ , где d – характерный размер точки, m – эффективная масса электрона. Отсюда, учитывая, что  $E = h\nu$ , имеем выражение для частоты излучения точки:

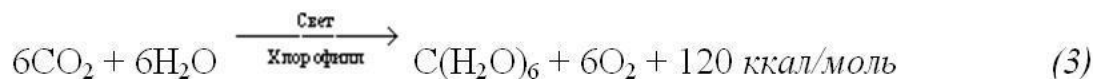
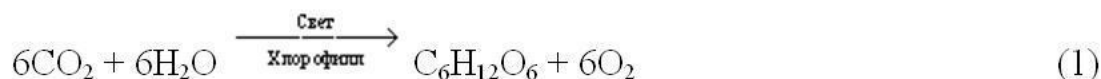
$$\nu_0 = \frac{h}{2md^2}$$

Видим, что, меняя размер точки, можно легко менять цвет её свечения.

5. Маркировку двух мишеней нельзя провести с помощью двух обычных флуоресцентных красителей из-за их недолгого действия. Условно говоря, пока мы покрасим вторую мишень, первая уже перестанет светиться.

## Биологическая нанобатарея (2009, биология)

1. Суммарное уравнение химических реакций, протекающих при фотосинтезе: (1)



Разные организмы используют в качестве источника водорода разные вещества – это может быть не только вода, как у растений, но и сероводород, лактаты и другие соединения. Таким образом, уравнение фотосинтеза можно записать следующим образом:

(2)

(где  $\text{H}_2\text{X}$  – донор водорода, а  $\text{X}$  – окисленная форма этого вещества, например, вода – кислород, изопропанол – ацетон).

2. а) Если мы их видим зелеными, значит они поглощают свет, дополнительный к зеленому, то есть красный. Диапазон длин волн поглощаемого света примерно 600-750 нм.

б) Энергия моля квантов (Эйнштейна) красной части спектра составляет около 40 ккал/моль (из справочника) или поскольку 1 Джоуль = 0,24 калори, то примерно 179 кДж/моль

Расчеты:

1) по формуле Эйнштейна

$$E = h\nu$$

где  $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ м}^2 \text{ кг} / \text{с}$  постоянная Планка

$\nu$  = частота излучения, которая связана с длиной волны через скорость света по формуле

$$\lambda = c/\nu,$$

следовательно

$$E = 6,63 \times 10^{-34} \text{ Дж} \times c \times 300\,000\,000 \text{ м/с} \times 6,02 \times 10^{23} \text{ 1/моль} / 700 \times 10^{-9} \text{ м}$$

или примерно 170 кДж/моль

Можно просуммировать энергию из двух диапазонов поглощения хлорофилла, 380-500 и 600-750 нм, тогда получится примерно (с учетом 50% из одного диапазона и 50% из другого диапазона) 280 кДж/моль.



3. Проблемой, с которой сталкиваются проводящие кислородный фотосинтез организмы, является различие окислительно-восстановительных потенциалов окисления воды (для полуреакции  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2$   $E_0=+0,82$  В) и восстановления  $\text{CO}_2$  до сахаров ( $E_0=-0,32$  В). Хлорофилл при этом должен иметь в основном состоянии потенциал больший  $+0,82$  В чтобы окислять воду, но при этом иметь в возбуждённом состоянии потенциал меньший, чем  $-0,32$  В, чтобы восстанавливать  $\text{CO}_2$ . Одна молекула хлорофилла не может отвечать обоим требованиям. Поэтому сформировалось две фотосистемы и для полного проведения процесса необходимо два кванта света и два хлорофилла разных типов.

4. Суммарное уравнение фотосинтеза выражается как: (3)

для фотосинтеза, идущего в соответствии с приведённым уравнением, было бы достаточно поглощения энергии 3 квантов на выделение молекулы  $\text{O}_2$ , поскольку, как мы посчитали в ответе на вопрос 2, энергия 1 моля квантов составляет 40 ккал/моль. Однако в окислительно-восстановительной реакции от воды должны быть перенесены 4 электрона:

(4)

Логично, что 1 квант света может вызвать перенос не более чем одного электрона. С учетом того, что максимальная эффективность преобразования энергии красного света составляет около 30-50%, то квантовый расход при оптимальных условиях составляет 8–12 квантов на молекулу  $\text{O}_2$ .

5. Поскольку идет перенос от больших энергий к меньшим, то, следовательно, длина волны в максимуме поглощения должна меняться от меньшей к большей (так как  $E = \hbar c / \lambda$ , то есть энергия и длина волны обратно пропорциональны), поэтому первый г)  $\text{Chl}_{520}$  затем б)  $\text{Chl}_{570}$ , потом в)  $\text{Chl}_{620}$  и уже последний собственно хлорофилл реакционного центра а)  $\text{Chl}_{680}$

6. Поскольку в результате разделения зарядов в батарейке находится только одна пара электрон-дырка, то общий заряд равен заряду одного электрона, или  $1,6 \cdot 10^{-19}$  Кл, заряд  $q_1$  на расстоянии  $r$  от себя создает, в среде с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$ , электрическое поле с потенциалом

$$j = q_1 / \epsilon r$$

и взаимодействует с находящимся на этом расстоянии зарядом  $q_2$  с энергией (то есть с разностью потенциалов)

$$U = j q_2 = q_1 q_2 / \epsilon r$$

Или, переходя в систему СИ

$$U = q_1 * q_2 / \epsilon * \epsilon_0 * r$$

$$U = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Кл} / (3 \cdot 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Ф/м} \cdot 5 \cdot 10^{-9} \text{ м})$$

поскольку  $\Phi = \text{Кл/В}$ , то разность потенциалов получается 1,2 В.

## Киборги (2009, биология)

Извечная мечта многих членов технократического общества – быстрая замена или даже улучшение «природных» человеческих органов – частей тела. Очень спорный вопрос, но... соединение электроники и живых клеток все равно является одним из наиболее интересных направлений нанотехнологий, биотехнологий, биофизики и медицины и с точки зрения фундаментальных исследований, и практической значимости полученных результатов.

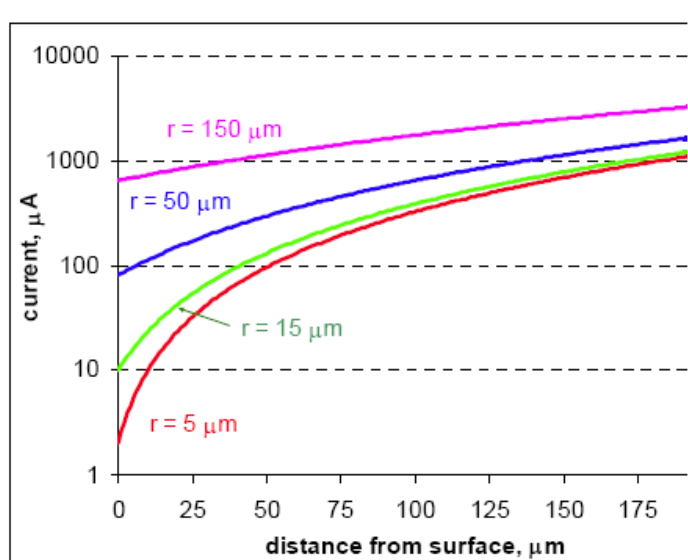


Рис. 1. Зависимость силы тока (в мкА), генерирующей падение напряжения

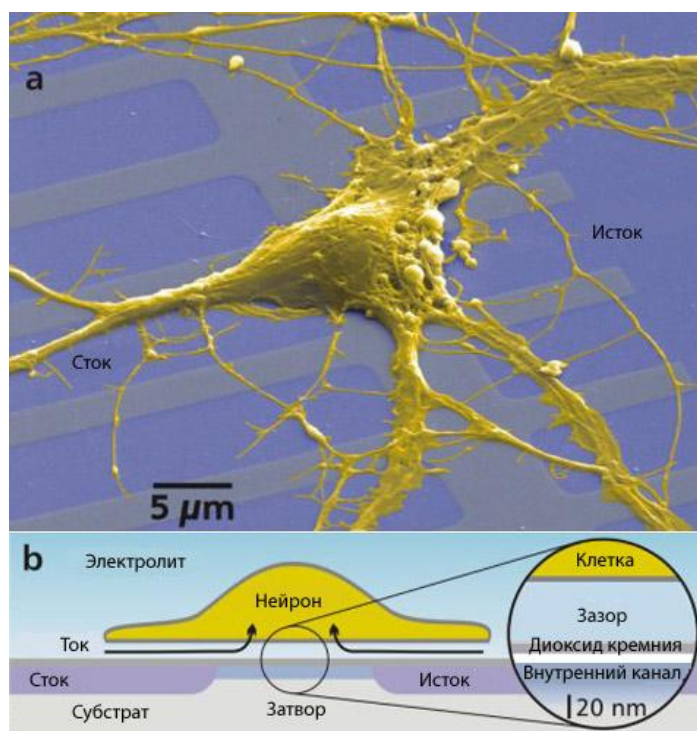
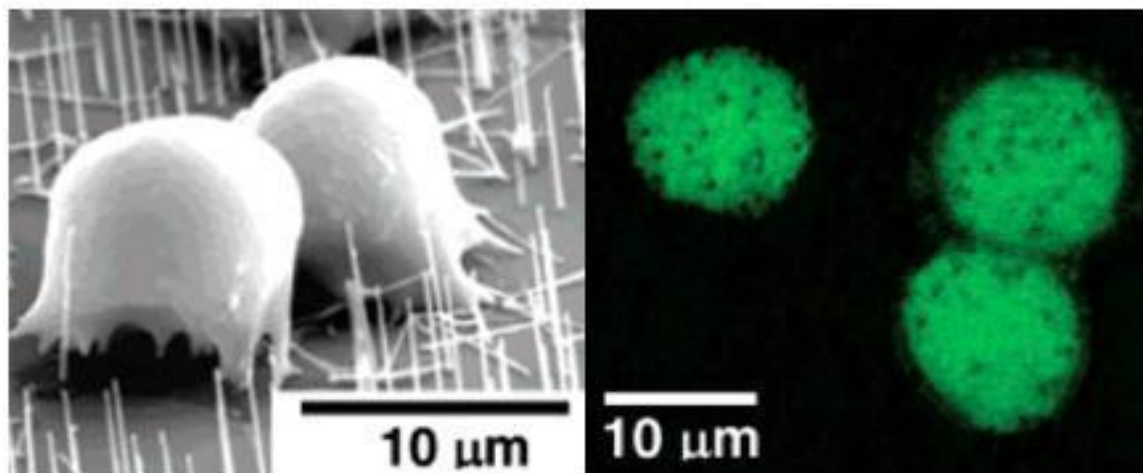


Рис. 2. Один нейрон крысы на микросхеме. Ионный поток в клетке превращает её в составную часть полевого транзистора, позволяя клетке влиять на работу электроники.

Опыт Петера Фромхерца (фото с сайта [biochem.mpg.de](http://biochem.mpg.de))



*Рис. 3. Пара мышечных клеток, пронизанных кремниевыми нанозэлектродами (слева) Флуоресцирующие клетки мышцы (справа) хорошо показывают точки проникновения проводов (фото Peidong Yang et al)*

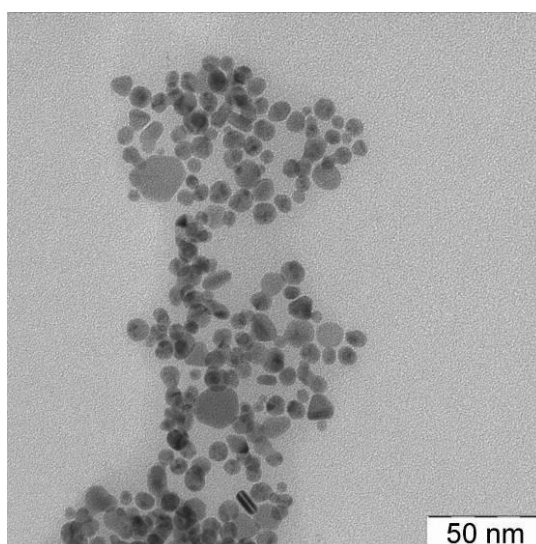
1. Может. При возбуждении нервной клетки происходит изменение локального заряда мембраны, которое воспринимает транзистор.
2. Может. Возбуждение нейрона возникает при деполяризации мембраны до или выше порогового уровня; этот процесс называется также стимуляцией, или раздражением. Стимулом может служить приложенный извне электрический ток, во время протекания которого происходит деполяризация мембраны нейрона.
3. Может. При этом стимулирующим нервную клетку (т.е. вызывающим деполяризацию мембраны клетки) электродом является катод. Он должен иметь наименьшую поверхность, т.е. быть максимально острым. Анод должен располагаться на как можно большем расстоянии и иметь большую поверхность, т.к. он вызывает гиперполяризацию нейронов. Анод является индифферентным электродом.
4. Электроды, контактирующие с нервными клетками, должны быть изготовлены из химически инертных материалов, обладающих высокой электропроводностью. Т.к. при функционировании электродов в живых тканях электрохимические влияния, возникающие при увеличении плотности электрического заряда ведут к эрозии металлических электродов, то в качестве материалов для их изготовления должны быть выбраны металлы и их оксиды, обеспечивающие наибольшее сохранение заряда: платина (Pt), золото (Au), хлорид серебра (AgCl) и оксид иридия (IrOx). Можно использовать также кремниевые электроды и электроды из электропроводящих полимеров, например, из полипирролов. Материалы для

- изготовления электродов должны обладать высокой биосовместимостью по отношению к нервным клеткам.
5. Перспективными наноматериалами для изготовления электродов, контактирующих с нервными клетками, являются углеродные нанотрубки и кремниевые нанонити. Возможно также изготавливать электроды из нанонитей на основе платины, золота, хлорида серебра и оксида иридия, а также электропроводящих полимеров. Чем меньше электрод, тем меньшая нужна сила тока, чтобы возбудить рецепторный потенциал. Кроме того, чем меньше расстояние от электрода до клетки, тем меньше электрохимические влияния, происходящие из-за появления ёмкостной связи и увеличения плотности электрического заряда, и нагрев тканей, происходящие из-за рассеивания тепла при электрическом потоке в проводящей среде живых тканей. Из вышесказанного следует, что чем меньше отдельный электрод и чем он ближе к стимулируемым клеткам, тем меньше энергопотребление в целом, и тем выше эффективность (и ниже наличие побочных влияний) имплантируемого электрического устройства. Следует также принять во внимание значительное уменьшение инвазивности (повреждения) тканей при имплантации электродов нанометровых размеров.
  6. Взаимодействие между нейроном и транзистором (или электродом) происходит благодаря перемещению ионов натрия через ионные каналы в клеточной мембране, что приводит к развитию потенциала действия и изменению локального заряда мембраны (деполяризации), на который и реагирует транзистор. В свою очередь, управляемый электроникой заряд на конденсаторе смещает заряд на мембране до порогового значения, что приводит к развитию потенциала действия за счет потока ионов натрия через мембрану, что и является реакцией нейрона на сигнал извне. Такой же механизм обмена сигналами нейрона с электродами с учетом геометрических и электрохимических особенностей электродов.
  7. Творческий вопрос. Для этих целей необходимо использовать полевой металл-оксид (диэлектрик)-полупроводниковый (МО(Д)П) транзистор на основе кремния и оксида кремния. Транзистор должен обладать пониженным шумом, эффективно усиливать сигнал от клетки и работать в микромощном режиме (мкВт), т.к. культивируемая на нем клетка становится частью транзистора. Поэтому электромагнитный ток, проходящий через клетку должен по своим параметрам соответствовать параметрам сигналов, которыми обмениваются сами нейроны. Возможны и другие параметры.

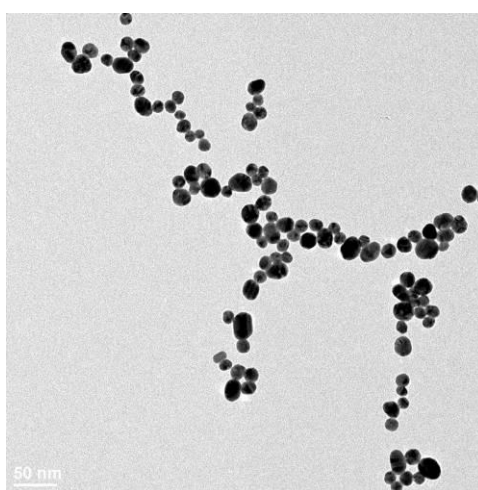
8. Творческий вопрос. Сигнал должен представлять собой постоянный, а не переменный электрический ток. Предпочтительно приложение прерывистого постоянного тока. В этом случае временной интервал между последовательными сигналами не должен быть меньше 2 мс или частота возбуждения нервной клетки не должна быть более 500 Гц, т.к. минимальный период рефрактерности нейрона составляет 2 мс. Для возбуждения нейрона требуется приложить напряжение в 25-30 мВ: от потенциала покоя (-80 мВ) до порога потенциала действия (-50 мВ). Сила тока сигнала должна быть минимальной: от 10 нА до 10 мкА в зависимости от размеров и материала электрода. Возможны другие характеристики.
9. Низкая биосовместимость по отношению к нервным клеткам, низкое электрохимическое сопряжение между мембраной нейрона и материалом транзистора (для предотвращения этого эффекта транзистор покрывают специальными белками); слишком высокое (низкое) напряжение; слишком высокая (низкая) сила тока; наводка между соседними электродами, если их несколько; эрозия металлических электродов при их функционировании, низкий уровень энергосбережения электродов; нагрев тканей и др.
10. Творческий вопрос. Одним из оригинальных способов неинвазивного введения наноэлектродов в клетку является культивирование клеток на подложке с кремниевыми нанонитями. В этом случае клетки оказываются пронизанными кремниевыми нанонитями, но при этом не получают никаких повреждений за счет медленного обволакивания нанонитей. Возможны другие способы.

## Нанотоксикология (2009, биология)

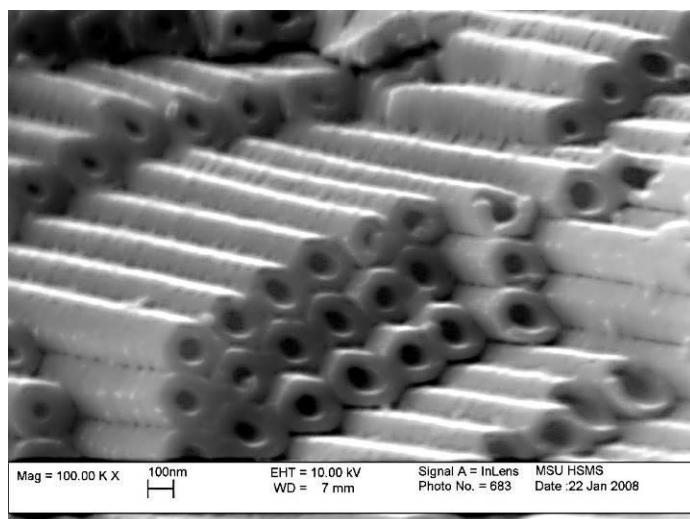
1. Размер (и удельная площадь поверхности) (менее 50-100 нм – проникновение через физиологические барьеры, свободная циркуляция в крови и лимфе, нечувствительность клетками иммунной системы; менее 5-10 нм – возникающая из-за высокой кривизны поверхности повышенная химическая активность, резкое изменение физических свойств и т.п.), растворимость в воде и биологических жидкостях (чем меньше – тем выше токсичность, т.к. токсичность растворимых наночастиц не отличается от токсичности обычных молекулярных растворов их компонентов), заряд (чем выше заряд – тем выше токсичность, т.к. повышается химическая активность наночастиц и уменьшается способность к агрегации наночастиц), способность генерировать свободные радикалы (свободные радикалы вызывают повреждение клеток и тканей).



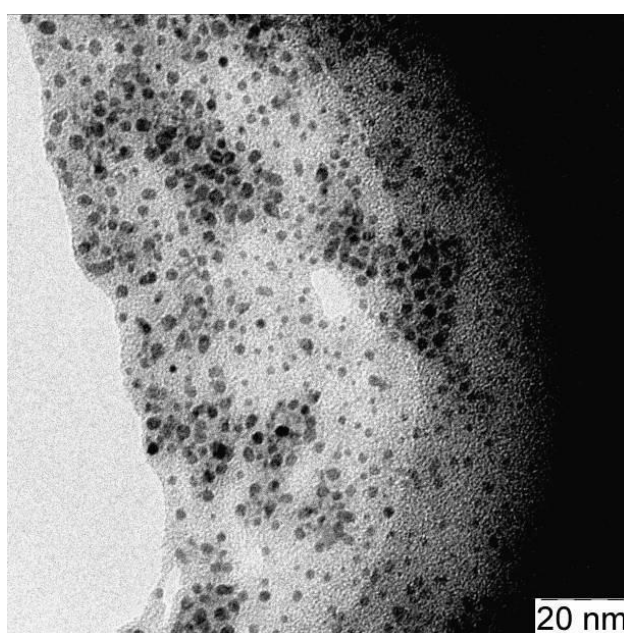
*Наночастицы серебра из Галереи "Нанометра".*



*Наночастицы золота из Галереи "Нанометра".*



*Нанотрубки диоксида титана из Галереи "Нанометра".*



*Оксид железа (III), модифицированный гумусом*

2. а) за счет химического повреждения липидов и белков самими наночастицами и сгенерированными ими свободными радикалами, за счет денатурации белков при разогреве под воздействием переменного магнитного поля; б) за счет химического повреждения липидов и белков самими наночастицами и сгенерированными ими свободными радикалами; в) за счет химического повреждения липидов и белков самими наночастицами и за счет денатурации белков при разогреве под воздействием электромагнитного излучения; г) за счет химического повреждения липидов и белков самими наночастицами и сгенерированными ими свободными радикалами, за счет повреждения свободными радикалами белков и липидов при их генерации под воздействием электромагнитного излучения; д) за счет



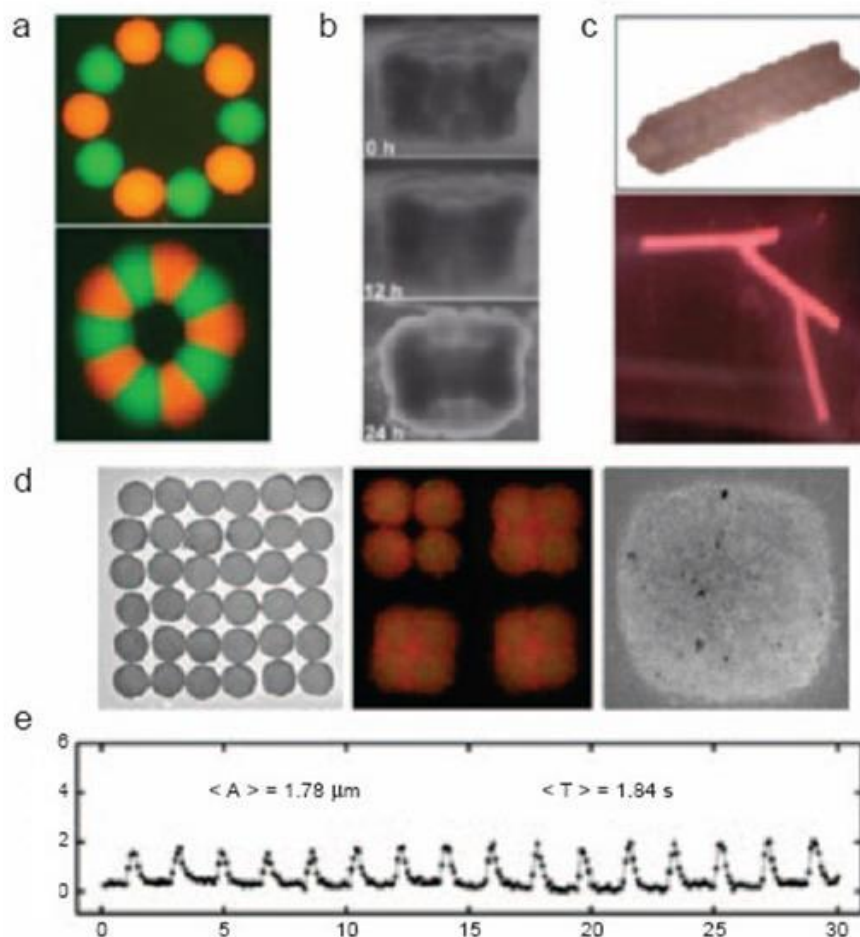
химического повреждения липидов и белков самими наночастицами и сгенерированными ими свободными радикалами. Повреждения возможны а) в темноте в стандартных условиях (наночастицы оксида железа, диоксида кремния, золота, диоксида титана, оксида алюминия); б) под воздействием электромагнитного излучения (наночастицы золота и диоксида титана; в) под воздействием переменного магнитного поля (наночастицы оксида железа).

3. Основными путями поступления наночастиц в организм человека являются: ингаляционный, пероральный и перкутанный (через кожу). Возможно также поступление наночастиц в организм человека с парентерально вводимыми лекарствами и миграция из протезного материала.
4. Наночастицы диоксида кремния наиболее токсичны для человека при ингаляционном и парентеральном (внутривенном) введении, т.к. в обоих случаях вероятность аккумуляции наночастиц в токсичных концентрациях в жизненно-важных органах наиболее высока. Сравнить токсичность при ингаляционном и внутривенном введении проблематично, т.к. в первом случае используется сухой нанопорошок, а во втором случае – водная суспензия наночастиц.
5. Наночастицы (на примере наночастиц оксида титана) внутривенном введении аккумулируются в наибольшей степени в печени, в меньшей степени: в легких, почках, селезенке, сердце, половых железах, в наименьшей степени – в мозгу. В зависимости от типа наночастиц профиль их распределения в различных органах может сильно изменяться. Эта проблема находится в стадии изучения и в настоящее время еще недостаточно данных для точного ответа на этот вопрос. Однако, основная функция печени - обезвреживание и удаление из организма различных чужеродных веществ делает этот орган основным фильтром для наночастиц (несмотря на то, что некоторая часть наночастиц благодаря своим размерам может проникать и накапливаться в других органах). Важной функцией легких также является неспецифическая защита организма от чужеродных веществ, которая осуществляется альвеолярными макрофагами, поэтому часть наночастиц задерживается в легких. Аналогичные функции выполняет селезенка - удаляет из крови бактерии, форменные элементы крови и инородные частицы, поэтому во многих работах показано значительное накопление наночастиц в селезенке. Несмотря на способность к прохождению через гематоэнцефалический барьер для значительной части наночастиц он может служить препятствием для попадания из кровотока в мозг, поэтому в мозгу, как правило, аккумулируется наименьшее количество наночастиц. Возможны и другие предположения.



## Напечатанный хомо сапиенс (2009, биология)

1. "Бумагой" в таком принтере являются подложки из биополимеров: коллагена, хитозана или сополимеров полимолочной и полигликолевой кислот. Возможно применение и других материалов для ее изготовления. "Бумага" служит каркасом для культивируемых клеток и придает создаваемому органу необходимую форму. Любой орган имеет соединительно-тканый каркас, структурным элементом которого являются волокна "строительных" белков, коллагена и эластина. В идеале такая "бумага" должна быть достаточно прочной, тонкой и подвергаться биодegradации, замещаясь формирующейся тканью. В "бумагу" можно вводить различные вещества (например, гормоны и тканевые факторы роста), которые будут способствовать росту и дифференциации клеток для формирования органа.
2. Клетки должны адгезироваться друг к другу, сформировав межклеточные контакты. Должна возникнуть коммуникация между клетками посредством выделяемых ими тканевых факторов и гормонов. Должна произойти дифференциация клеток в соответствии с их типом и функциями в органе.
3. Препятствовать нормальному функционированию почечных тканей может отсутствие или недостаточное формирование сложной разветвленной системы нефронов – основных структурно-функциональных единиц почки, а именно почечных канальцев и клубочков, а также оплетающих их капилляров и сосудов, которые осуществляют процессы фильтрации, секреции и реабсорбции, определяющие выделительную функцию почки. Кроме того, в почечных тканях, как и в любых других, должна быть создана разветвленная капиллярная и сосудистая сеть, которые обеспечивают орган питательными веществами и кислородом. Для "печати" этих структур требуется гораздо более сложная и точная технология – "печать" отдельными клетками. Возможны другие способы преодоления этих препятствий
4. Творческий вопрос. Да, возможно, и было показано экспериментально. Наличие межклеточной коммуникации с использованием различных сигнальных молекул (гормонов и ростовых факторов) в значительной степени способствует самоорганизации клеток в новые функционирующие ткани. Подобные процессы самоорганизации клеток и формирования новых тканей происходят в процессе эмбриогенеза. Причем, клетки различных типов могут самостоятельно формировать те структуры, в состав которых они входят в организме, например, клетки эндотелия сосудов формируют трубчатые структуры, мышечные клетки – мышечное волокно и т.п.



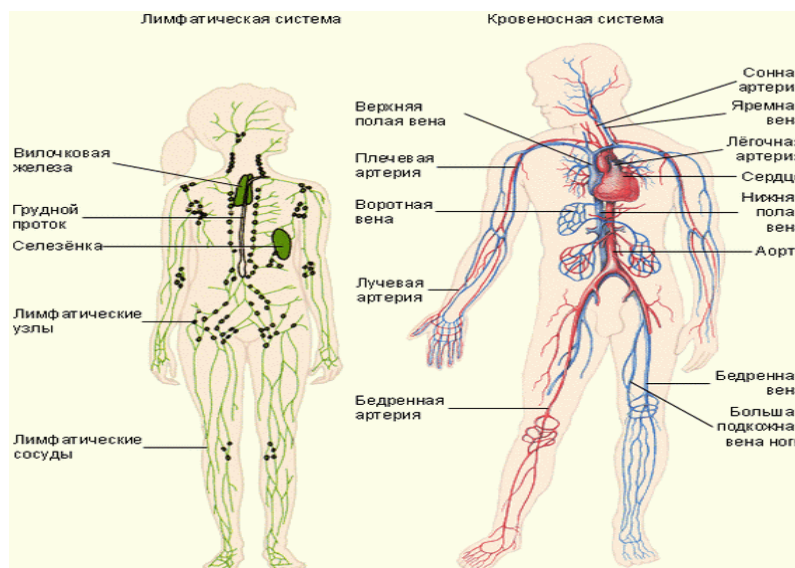
Примеры напечатанных тканей и биологических "запчастей": (а) расположенные кольцом частицы "биочернил" (флуоресцирующие благодаря красителю двумя цветами) сразу после печати и через 60 часов; (b) эволюция трубки, набранной из колец, показанных на картинке (а); (с, сверху) 12-слойная трубка, составленная из клеток гладких мышечных волокон пуповины; (с, внизу) разветвлённая трубка (прообраз сосудов для трансплантации); (d) построение сокращающейся сердечной ткани. Слева показана решётка (6 x 6) из сфероидов с клетками сердечной мышцы (без эндотелия), распечатанных на коллагеновой "биобумаге". Если в те же "чернила" добавляются клетки эндотелия (второй рисунок — красный цвет, кардиомиоциты же тут показаны зелёным), они заполняют сначала пространство между сфероидами, а через 70 часов (d, справа) вся ткань становится единым целым. Внизу: график сокращения клеток полученной ткани. Как видно, амплитуда (отмерена по вертикали) сокращений составляет примерно 2 микрона, а период — около двух секунд (время отмечено по горизонтали) (фото и иллюстрации *Forgacs et al*, в ответе взята из работы Артура Емельянова).

### **Микроманипулятор (2009, биология)**

Микроскопическое устройство (не путать с нанороботами!), способное захватывать скопление клеток, а затем переносить в другое место, создали инженеры из университета Джона Хопкинса в Балтиморе. В отдалённой перспективе такая способность новинки может привести к прорыву в хирургии: через миниатюрный надрез медики смогут отправить в кровеносные сосуды, сердце или мозг пациента подобные устройства с тем, чтобы провести операцию на самых мелких сосудах изнутри. Манипулятор, похожий по форме на краба (он составлен из шести пальцев, по три сочленения в каждом), может перемещаться внутри кровотока при помощи внешнего магнита, хотя пока учёные испытывали устройство только в пробирках. Сочленения этого микрозахвата активируются изменением температуры или при химическом воздействии. Никелевые тело и лапки микрокраба покрыты золотом. А вот сочленения лапок сделаны из трехслойной тонкой пленки меди, хрома и специального полимера. Механические характеристики этой пленки таковы, что в нормальном состоянии она держит лапки согнутыми, а для того, чтобы ее выпрямить, необходимо это тонкопленочное металлическое сухожилие растянуть. В растянутом состоянии ее удерживает полимер. При нагреве до 40°C полимерная пленка растягивается, ослабляя крепление. В этот момент щипцы сжимаются и захватывают кусочек ткани. В перспективе исследователи предполагают значительно уменьшить размеры этого устройства.

- 1.
2. Тромбообразование, вызванное активацией каскадов комплимента и свертываемости крови при контакте химически активных частей микроманипулятора с клетками и белками крови; повреждение клеток (эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов) и эндотелия сосудов микроманипулятором, что также может вызывать тромбообразование; адгезия устройства на эндотелии сосуда может приводит к тромбообразованию, сужению сосуда, гипертрофии сосудистой стенки и воспалительным процессам; повреждение капилляров и мелких сосудов микроманипулятором может вызвать кровотечение; возможна иммунная реакция на устройство, что может вызвать воспалительные процессы.

3.

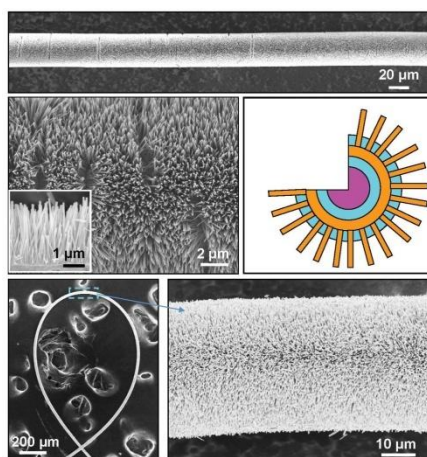


Творческий вопрос. Тромбообразование на сочленениях лапок микроманипулятора может снизить его функциональность, адгезия клеток крови на устройстве или адгезия устройства на эндотелии сосудов может снизить его мобильность и т.п.

4. Творческий вопрос. Уменьшение размеров устройства за счет использования наноматериалов; использование биосовместимых и химически инертных материалов, автономное снабжение энергией для передвижения и функционирования и т.п.

## Микроэнергогенераторы (2009, биология)

1. Творческий вопрос. За счет небольших перепадов температуры (на основе термопар) (а); за счет колебательных движений при передвижении человека или сокращения сердца, сосудов и мышц (б); за счет электрохимических процессов в клетках (на основе электрохимических топливных элементов) (в); за счет энергии химических веществ в крови и тканях (на основе окислительных топливных элементов) (г).
2. Творческий вопрос. Устройства, получающие энергию за счет (а) – под кожу в области наиболее интенсивного теплообмена (лоб, щеки, ладони), за счет (б) – под кожу кистей рук и стоп, под кожу в области крупных мышц рук и ног, под кожу левой стороны груди; за счет (в) и (г) – в непосредственной близости с мелкими кровеносными сосудами.
3. 30-200 мкВатт при напряжении - 3-10 В и силе тока – 10-20 мкА для устройств получающих энергию за счет перепадов температуры (на основе термопар), т.к. при перепаде температур в 5 градусов напряжение, создаваемое на термопарах одного из устройств, составляет 3 вольт, ток же составляет около 10 микроампер. Мощность элемента, таким образом, составляет около 30 микроватт при данном перепаде температур. Разумеется, мощность устройства всецело зависит от способа генерации электроэнергии.



Например, генератор на основе нановискеров оксида цинка, см. "Умная одежда зарядит батарейки"

4. Творческий вопрос. Может возникнуть хроническая воспалительная и аллергическая реакции на имплантированный микроэлектрогенератор, возможно токсическое воздействие веществ, выделяющихся при функционировании микроэлектрогенераторов, например, при окислении электродов на ткани и др.



Рис.1

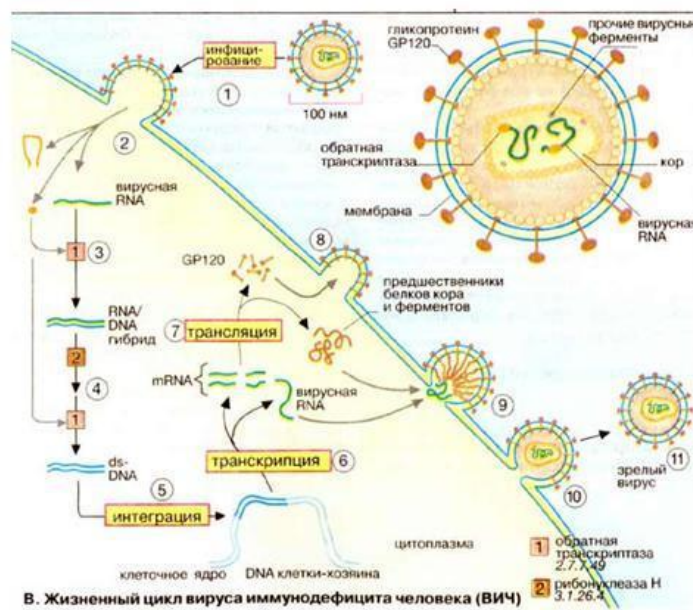


Рис. 2

1. Вирус – неклеточная примитивная форма жизни, представляющая собой нуклеопротеидную частицу. Вирусы являются облигатными паразитами — они не способны размножаться вне клетки, не имеют собственных ферментативных систем, обеспечивающих энергетический обмен, процессы синтеза и распада веществ. Вирусы состоят из нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), заключенной в белковую оболочку (капсид). Многие вирусы имеют дополнительную оболочку, окружающую капсид. Она состоит из липидной мембраны с встроенными в нее гликопротеиновыми комплексами. Очень часто дополнительная оболочка вируса



построена из мембранного материала зараженной клетки. Размеры различных вирусов колеблются от 20 (пикорнавирусы) до 500 (мимивирусы) и более нанометров.

2. Можно, т.к. вирус полиомиелита является РНК-содержащим пикорновирусом примитивного строения. Геномная РНК представлена в виде одноцепочечной плюс-цепи РНК, имеет длину около 7500 пар нуклеотидов и кодирует 9 белков. Вирусная частица состоит из молекулы РНК и белкового капсида [Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science. 2002, 297(5583):1016-1018].
3. Сможет, т.к. строение этого вируса полностью определяет его функциональность. Однако, далеко не у каждого лабораторного животного этот вирус сможет вызвать заболевание. а только у обезьян. У обезьян, как и у человека в плазматических мембранах нервных и некоторых других клеток присутствует особый белок, который является рецептором для вируса полиомиелита. Однако, специальных трансгенных мышей, мембраны нервных клеток которых несут этот белок-рецептор, искусственный вирус может "заразить" [Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science. 2002, 297(5583):1016-1018].
4. Нужно использовать методы генетической инженерии: необходимо трансфецировать культивируемые опухолевые клетки человека или обезьяны РНК вируса, после чего произойдет сборка вирусной частицы из белков, синтезированных на РНК вируса.
5. а) трансфекция культивируемых опухолевых клеток человека или обезьяны РНК вируса, белки капсида и РНК-полимераза синтезируются в цитоплазме культивируемых клеток на РНК вируса с использованием аппарата трансляции клетки;  
б) трансфекция культивируемых опухолевых клеток млекопитающих ДНК вируса, синтез РНК на ДНК вируса с использованием ферментативного аппарата транскрипции клетки, синтез вирусных белков в цитоплазме культивируемых клеток на синтезированной РНК с использованием аппарата трансляции клетки, сборка вирусной частицы, выход частицы из клетки путем почкования с захватом плазматической мембраны клетки;  
в) синтез ДНК на РНК вируса при помощи обратной транскриптазы вируса *in vitro*, трансфекция культивируемых опухолевых клеток человека синтезированной ДНК, синтез мРНК на РНК вируса на синтезированной ДНК с использованием ферментативного

аппарата транскрипции клетки, синтез вирусных белков в цитоплазме культивируемых клеток на синтезированной РНК с использованием аппарата трансляции клетки, сборка вирусной частицы, выход частицы из клетки путем почкования с захватом плазматической мембраны клетки;

Творческий вопрос. Ответ не исчерпывается приведенными схемами. Имеют место многие другие варианты синтеза компонентов искусственного вируса.

6. ДНК *Mycoplasma genitalium* состоит из 582 970 пар нуклеотидов и кодирует всего 485 белков, что свидетельствует об ее крайне примитивном строении. ДНК ВИЧ состоит из 9000 пар нуклеотидов и кодирует 15 белков. Поэтому, несмотря на то, что ВИЧ имеет сложное строение и сложный жизненный цикл, создать искусственный геном вируса представляется проще, чем даже самой примитивной бактерии. Однако, принимая во внимание повышенную склонность ВИЧ к мутациям, вопрос не имеет точного решения. Следует отметить, что ДНК *Mycoplasma genitalium* уже создана, а геном ВИЧ еще нет.

## **Опять и снова о нанороботах (2009, простые задачи)**

1. При конструировании «нанозондов» (выполняющих описанные «фантастические» функции) можно использовать 2 подхода.

1. По принципу действия «нанозонды» сильно напоминают онкогенные вирусы, не разрушающие клетку и приводящие к изменению ее свойств. Путем генной инженерии в перспективе возможно создание таких типов вирусов, которые будут направлено менять структуру и метаболизм клеток, не нанося при этом вреда организму. При этом кибернетические устройства придется внедрять в организм отдельно.

2. Более фантастичный вариант - создание полностью искусственных «нанозондов», представляющих собой наноэлектромеханические устройства и средства их доставки.

В обоих случаях важно соблюдать некоторые общие принципы при конструкции «нанозондов»:

- В структуре «нанозонда» должны присутствовать компоненты, обеспечивающие его проникновение внутрь клетки (модифицировать структуру и метаболизм клетки извне не получится). Средством доставки может служить липосома, несущая рецепторы, узнающие клетки, на которые направлена активность данного зонда – это обеспечит специфичность взаимодействия. Возможны и другие варианты.
- Нанозонды должны быть иммунонейтральны – состоять из специальных материалов, не вызывающих иммунного ответа организма.
- «Нанозонды» должны обладать самовоспроизводимостью, и, следовательно, состоять из органических веществ, синтезируемых в клетке, или должны быть способны многократно взаимодействовать с клетками и быть достаточно долгоживущими, или должны существовать отдельные устройства для воспроизводства «нанозондов».
- По-видимому, «нанозонды» должны использовать те же источники энергии, что и живые клетки – а именно АТФ – в настоящее время имеются НЭМС, работающие на энергии АТФ, но возможны и другие источники энергии. Для модификации организма понадобится много энергии – возможно потребуются увеличение эффективности энергетических систем клетки – изменение электронтранспортной цепи митохондрий и скорости метаболизма.
- Поскольку действие «нанозондов» направлено на генетический материал клетки, то необходим аппарат, способный распознавать последовательности ДНК тех генов, в которые будет внесено изменение.
- Должны присутствовать системы обеспечивающие перенос генетического материала из «нанозонда» в ДНК клетки или внесение сохраняющихся при делении

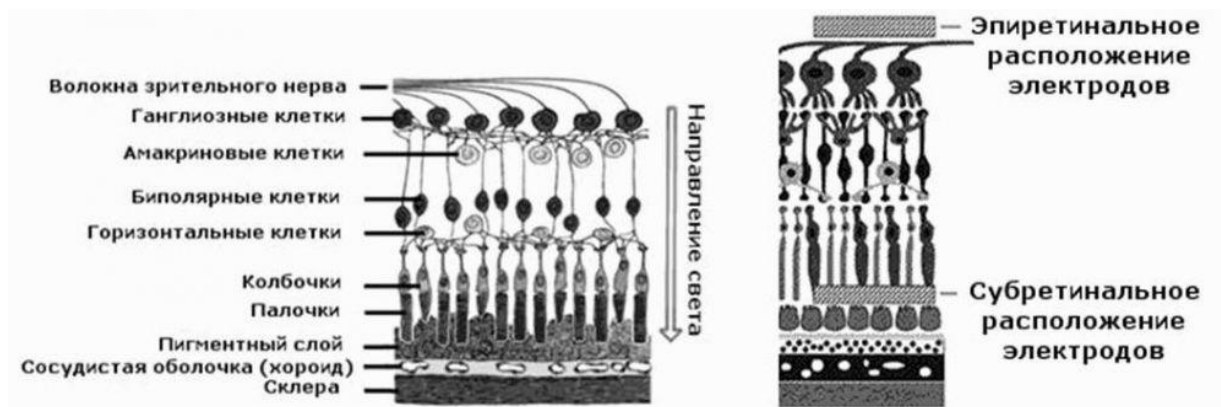
мутаций в последовательность ДНК (если наш нанозонд сконструирован не по принципу вируса).

- При необходимости немодифицированные клетки должны удаляться путем апоптоза под действием сигнальных факторов, выделяемых модифицированными клетками.
- Необходима координация изменений, производимых в организме – должны быть соответствующим образом модифицированы сигнальные системы и системы межклеточного взаимодействия: нервная и гормональная регуляция, паракринная система и локальная межклеточная сигнализация.
- Для того, чтобы изменения были достаточно быстрыми необходимо ускорение катаболизма и анаболизма клеток – ускорение распада старых и построения новых компонентов клетки (белков, липидов и т.п.)
- Необходимо изменение иммунной системы организма для того, чтобы не иммунный ответ не возникал на модифицированные клетки (модифицированные белки).
- В случае, если нанозонды создаются на основе наноэлектромеханических устройств (не являются вирусоподобными), необходима возможность программировать их действия и осуществлять передачу сигнала извне.

Этим проблемы, встающие на пути создания функционирующих нанозондов, не ограничиваются.

## Искусственный глаз (2009, наноинженерия)

1. В первую очередь повреждаются колбочки и палочки, т.к. они как светочувствительные рецепторы со сложным строением наиболее чувствительны к повреждениям.
2. Помимо сетчатки глаза (субретинальная и эпиретинальная имплантация) электроды можно имплантировать в зрительный нерв и зрительную кору головного мозга. Электроды можно также имплантировать в другие органы, богатые нервными окончаниями, например, язык.
3. а) возможно только в случае имплантации электродов в зрительную кору головного мозга или в другие органы, например, язык; б) возможно только в случае имплантации электродов в зрительный нерв, зрительную кору головного мозга или в другие органы, например, язык; в) возможно только в случае имплантации электродов в другие органы, например, язык.
4. Электроды нанометровых размеров из золота, хлорида серебра, платины и оксида иридия, электроды на основе углеродных нанотрубок и кремниевых нанонитей. Благодаря стимулирующим электродам нанометровых размеров можно значительно увеличить разрешающую способность искусственного глаза, в т.ч. благодаря индивидуальной стимуляции нейронов и клеток сетчатки.



5. От 16 до 500 точек по количеству стимулирующих электродов. Теоретически достижимая разрешающая способность искусственного глаза - 1200000 точек (пикселей), т.к. в зрительном нерве содержится примерно 1.2 млн нейронов.
6. Творческий вопрос. Проблемы, связанные с низким разрешением существующих моделей искусственного глаза. Могут возникнуть проблемы, связанные с развитием воспалительных и аллергических реакций при имплантации чипов и электродов. В случае размещения фотодетекторов за пределами глаза (например, как у всех практически реализованных эпиретинальных моделей) теряется возможность микроперемещений взгляда по изображению, что непрерывно делает

здоровый глаз. В итоге изображение всегда зафиксировано в мозгу пациента и его нельзя “выключить”, закрыв глаза. Проблемы, связанные с восприятием движущихся объектов. Невозможность восприятия цвета.

Преимущества: полный обзор, приближение/удаление изображения при использовании камер с "зумом", видение в ультрафиолетовом или инфракрасном свете и т.п.

## Исследование био-нано-конъюгатов (2009, нанобиотехнология)

### 1. Преимущества золотых наночастиц вкратце:

Интенсивная окраска, молярный коэффициент поглощения составляет  $10^7$ - $10^9$  М<sup>1</sup>×см<sup>-1</sup>

Высокая стабильность наночастиц в коллоидной системе и множество вариантов дополнительной стабилизации (покрытие полиэлектролитами или монослоем бифункциональных органических молекул, содержащих –SH группу на одном конце (для взаимодействия с золотом) гидрофобной цепи и заряженную группу на другом)

Простота получения конъюгатов с биомолекулами – за счет адсорбции или через тиолы.

золото – биосовместимый материал

золото химически инертно

наночастицы золота способны нагреваться под действием инфракрасного излучения, безопасного для организмов.

### 2. Методов разделения как биомолекул, так и наночастиц существует очень много, основной вопрос состоит в детекции. Как же можно определить, сколько молекул белка связалось с наночастицей, и связались ли вообще?

Например, УФ-спектроскопия. Не подходит, поскольку золотые нанокристаллы поглощают ультрафиолетовый свет значительно сильнее, чем белковые молекулы, поэтому взаимодействия белок-нанокристалл будут незаметными.

Еще один метод, электронная микроскопия, например ТЕМ, не дает достаточно четких и точных картинок, поскольку в белковых молекулах есть только легкие атомы.

### 3. F1 – выталкивающая сила (сила Архимеда), или сила плавучести; F2 – сила трения; F3 – центробежная сила. От вязкости среды зависит сила трения, а от скорости вращения – центробежная сила и сила трения.

### 4. Коэффициент седиментации представляет собой отношение скорости оседания частицы при центрифугировании ( $v$ ) к $\omega^2 r$ , то есть $S = v/\omega^2 r$ , где $\omega$ – угловая скорость вращения ротора, а $r$ – расстояние от оси вращения до местоположения наночастицы. Угловая скорость вращения задается исследователем, а скорость оседания и расстояние, на котором находится наночастица, нужно определить.

$$S_{20,w} = \frac{D^2(\rho - \rho_{20,w})}{18 \times \eta_{20,w}} \quad (1)$$

$$S_{20,w} = \frac{v \times (\rho - \rho_{20,w}) \times \eta_c}{\omega^2 r \times \eta_{20,w} \times (\rho - \rho_c)} \quad (2)$$

$$S_{20,w} = \frac{10^6 \times v}{4 \times N^2 \times r_{\min}} \times \left[ \frac{r_{\min} \times (\rho - \rho_{20,W}) \times \eta_c}{r \times (\rho - \rho_c) \times \eta_{20,W}} \right] \quad (3)$$

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} \quad (4)$$

$$v = \frac{dr}{dt} \quad (5)$$

$$S = \frac{dr}{\omega^2 r dt} \quad (6)$$

$$dt = \frac{dr}{S \omega^2 r} \quad (7)$$

$$t = \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \frac{dr}{S \omega^2 r} \quad (8)$$

$$t = \frac{1}{S \omega^2} \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \frac{dr}{r} \quad (9)$$

$$t = \frac{1}{850 \times 10^{-13} c \cdot \left( 2\pi \frac{50000}{60} \frac{MHz}{\omega} \right)^2} (\ln 15.2 \times 10^{-2} M - \ln 6.6 \times 10^{-2} M) \quad (10)$$

$$\approx 429c \cdot \ln \left( \frac{15.2 \times 10^{-2} M}{6.6 \times 10^{-2} M} \right) \approx 358c \approx 6 MHz \quad (11)$$

$$t = \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \frac{dr}{v} \quad (12)$$

$$t = \frac{10^5}{s_{20,W} \times N^2 \times 0,4 \times r_{\min}} \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \frac{dr}{\alpha} \quad (13)$$

$$\alpha = \frac{r \times (\rho - \rho_c) \times \eta_{20,W}}{r_{\min} \times (\rho - \rho_{20,W}) \times \eta_c} \quad (14)$$



$$\Sigma = \frac{1}{0,4 \times r_{\min}} \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} \frac{dr}{\alpha} \quad (15)$$

$$t = \frac{10^5 \times \Sigma}{s_{20,w} \times N^2} \quad (16)$$

$$t = \frac{10^5 \times \Sigma}{s \times N^2} = \frac{100000 \times 3,5}{850 \times 50^2} \approx 0,1654 \approx 10 \text{ мин} \quad (17)$$

а) Согласно формуле для определения константы седиментации сферической частицы: **(1)** нужно знать диаметр частицы и ее плотность, потому что плотность и вязкость воды при 20С – табличные величины.

б) Для определения константы седиментации опыты проводят в специальных растворах. Поэтому пользуются другой формулой: **(2)** или **(3)**

где  $v$  – скорость оседания частицы, см/час,  $N$  – число тысяч оборотов в минуту,  $r_{\min}$  – расстояние мениска пробирки от оси вращения, величина известная для данного ротора с данным типом пробирок.

При этом нужно знать скорость частицы и ее плотность, а также плотность и вязкость раствора, в котором происходит центрифугирование. Остальные величины или задаются экспериментатором, или табличные.

Конечно, для экспериментального определения константы пользуются стандартными веществами, константы седиментации которых известны. Кроме того, используют раствор с градиентно изменяющимися свойствами среды, так называемый градиент плотности. Причем профиль градиента должен быть таков, что увеличение расстояния от оси вращения компенсируется изменениями плотности и вязкости среды вдоль него, и все частицы движутся с постоянными скоростями, которые определяются только их размерами. В этом случае отношение констант седиментации двух частиц будет равно отношению расстояний от мениска жидкости до зоны, где находится частица, к моменту окончания эксперимента:  $S_{20,w1} / S_{20,w2} = 11/12$ .

5. Силы, противодействующие движению частицы, увеличиваются, поскольку 1) меняется общая плотность частицы и 2) меняется форма, то есть жидкости приходится обтекать уже не сферический нанокристалл, а сферу, на которой выпячиваются молекулы белка. Это приводит к уменьшению  $S_{20,w}$  в зависимости от числа молекул белка, «прилипшего» к наночастице.

6. Молекулярная масса белка иммуноглобулина IgG 167000, а миоглобина 16700, то есть в 10 раз меньше. Поскольку масса = плотность\*объем, следовательно,

увеличение массы в 10 раз при той же плотности означает увеличение объема в 10 раз. А это означает, что на одной наночастице может разместиться молекул IgG в 10 раз меньше, чем молекул Mb.

Следовательно картинка слева соответствует IgG, а картинка справа – миоглобину. Для определения количества белка в полученном конъюгате можно белок пометить, например радиоактивной меткой, и посчитать количество метки в полученной суспензии, то есть радиоактивность.

Другой вариант – определить концентрацию белка методом Лоури или Бредфорд, если концентрация находится в необходимом интервале концентраций для данного метода, а в растворе нет веществ, мешающих определению.

7. Сначала общее замечание. Поскольку в смеси присутствуют частицы двух типов – собственно золотые нанокристаллы, и наноконъюгаты, то время полного оседания всех частиц будет равно времени оседания самой легкой частицы, то есть той, у которой меньше всего коэффициент седиментации. Исходя из приведенных графиков, он составляет около 850S.

Далее эту задачку можно решать двумя способами:

Способ 1. Поскольку коэффициент седиментации, как уже указывалось в решении вопроса 3, (4), а скорость седиментации, по определению скорости (5) то, подставляя выражение для скорости в выражение для коэффициента седиментации, получим (6).

Из последнего выражения получаем (7), т.е. для вычисления скорости надо проинтегрировать полученное выражение в пределах  $r_{\min}$  до  $r_{\max}$ , т.е. (8).

Поскольку не зависят от  $r$ , то их можно вынести за знак интеграла, т.е. (9).

Подставляя значения, получаем (10), (11)

Способ 2. Оценочный, хотя и не совсем верный.

Этот способ подходит именно для оценки общего времени оседания, и ответ будет отличаться от точно рассчитанного предыдущим способом, но не более чем в несколько раз, то есть с точностью до порядка. Поскольку (12), то можно провести графическое интегрирование. Величины коэффициента седиментации и угловой скорости вращения не зависят от расстояния, пройденного частицей, поэтому (13), где (14).

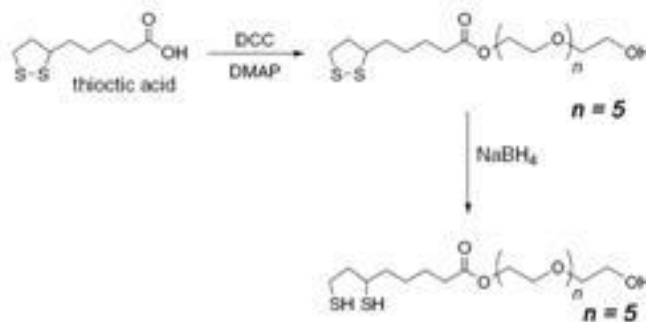
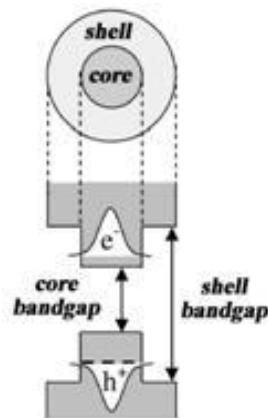
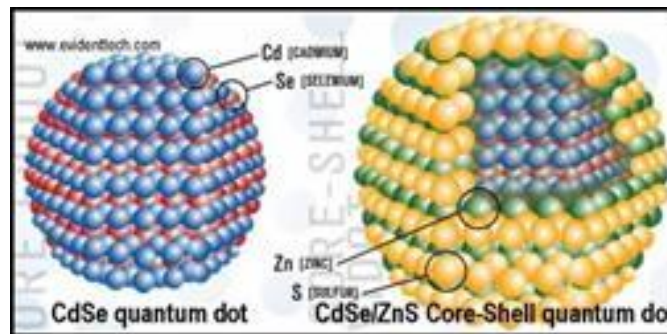
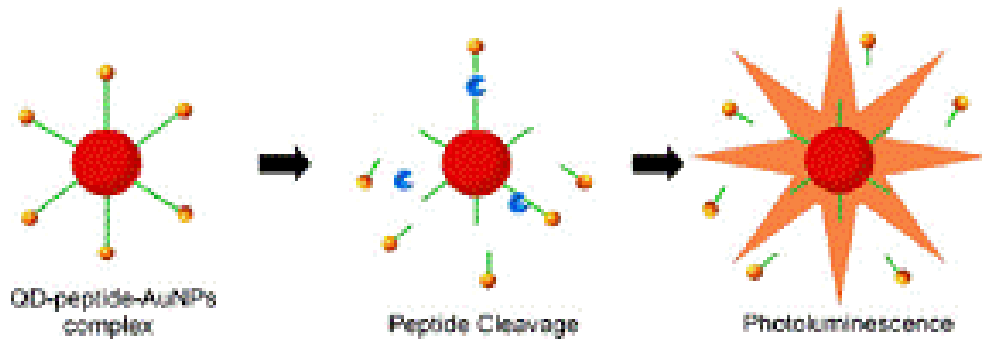
Если обозначить (15) то получается простое выражение для времени: (16), величина  $\Sigma$  зависит от среды, в которой происходит центрифугирование, и для всех роторов данного типа ( $r_{\max} = 1,25 \cdot r_{\min}$ ) может быть найдено по номограммам. В данном случае, когда центрифугирование происходило в разбавленном буфере, можно взять номограмму из учебника Л.А. Остермана по методам исследования белков и нуклеиновых кислот, раздел ультрацентрифугирование, рис. 59 для градиента сахарозы 5-20%

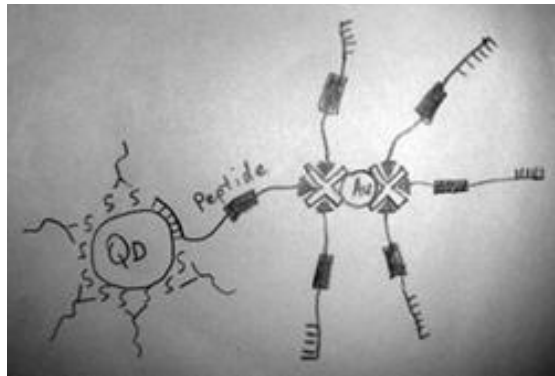
(поскольку плотность сахарозы в этих пределах не сильно отличается от 1). Из этой номограммы при  $20^{\circ}\text{C}$   $\Sigma = 3,5$ , тогда **(17)**.

Этот ответ, конечно, не совпадает с точным ответом, рассчитанным первым способом, но отличается от него незначительно. Различия связаны в основном с тем, что разбавленный буферный раствор сильно отличается от раствора сахарозы по вязкости, хотя и практически не отличается по плотности.

**A new biosensor for cancer (2009, нанобиотехнология)**

- The idea of such biosensor has been recently published by researchers from Rice university (see E. Chang, J.S. Miller, J.T. Sun, W.W. Yu, V.L. Colvin, R. Drezek, J.L. West, Protease-activated quantum dot probes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 334 (4), pp. 1317-1321 (2005)).





2. Presence of Au nanoparticles in the proximity of fluorescent quantum dots results in the quenching of fluorescence.
3. Quantum yield of fluorescence is too low for uncoated quantum dots because electrons excited into conduction band have high probability of hitting a solvent or stabilizer molecule just outside the nanoparticle. Such events result in a non-radiative loss of energy and decreased quantum yield. If CdSe is coated by a larger-bandgap semiconductor, excited electrons are localized in the core because conduction band of the core has lower energy (see schematic below). This dramatically reduces non-radiative loss of energy due to collisions with the outside molecules and increases the quantum yield.
4. For detection of cancer, the cross-linking peptide should contain a sequence recognized only by tumor-specific protease.
5. There are many possibilities, any correct route is acceptable. Points to watch for: if you decided to synthesize core-shell quantum dots instead of buying them, be sure to include hydrophilization step: synthesis of fluorescent quantum dots is performed in hydrophobic medium (using TOPO as a solvent), and they would not form a stable suspension in water unless hydrophilized (e.g., by mercaptoacetic acid, but many other ways are available).
6. The biosensors prepared as described would not be able to reach the tumor site(s). They will be quickly uptaken by reticuloendothelial system (RES) in vivo and will end up in liver in few minutes. To prolong their half-life in the circulation and mask them from the RES, additional coating by polyethyleneglycol is required. In addition, since red light is easily adsorbed by the tissues, fluorescence would not be easily detectable in a live mouse. Use of quantum dots that fluoresce in the near-infrared part of the spectrum should be considered because absorption of near infrared radiation by tissues is much weaker.

7. Although solubility of CdSe is quite low and CdSe-containing nanoparticles were shown to have low short-term toxicity, it is unlikely they will ever be used in vivo in human patients. The reason is that long term degradation pathway for these nanoparticles is not known and all soluble cadmium and selenium compounds are known to be highly toxic. Very long term studies (tens of years) on large number of volunteers are needed to determine the safety of these nanoparticles; however the risk of such studies is too high and it is unlikely they will ever be conducted.

## Оболочки (2009, нанобиотехнология)

1. Липосомы (от греч. *lipos* - жир и *soma* - тело) (липидные везикулы)— искусственно получаемые частицы, образованные одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями, аналогичными по строению с липидной компонентой биологических мембран, при этом внутренний водный объем липосом изолирован от внешней среды. В липосомах внутренняя водная фаза отделена от внешнего раствора. Такая организация позволяет использовать липосомы для исследования барьерных свойств липидного бислоя и некоторых других специальных задач.
2. Наличие холестерина в липидном бислое приводит к увеличению жесткости мембран липосом, уменьшает текучесть липидного бислоя и ограничивают проницаемость липидных мембран для малых водорастворимых молекул, а также увеличивает упругость и механическую прочность бислоя. Таким образом, присутствие холестерина способствует увеличению стабильности липосомы. Лецитин (здесь используется как синоним фосфолипида фосфатидилхолина) — один из основных четырех мембранообразующих фосфолипидов в мембранах живых клеток. Фосфатидилхолин является наиболее распространенным фосфолипидом в мембранах клеток, достаточно легко способен к самопроизвольному образованию липидного бислоя в водной среде. Это что делает его наиболее одним из наиболее удобных веществ для изготовления липосом. При некоторых методах приготовления однослойных липосом из различных фосфолипидов, молекулы фосфатидилхолина обнаруживаются главным образом, в наружном монослое, что, вероятно, определяет ассиметричное расположение некоторых белков, встроившихся в бислои. Полиэтиленгликоль (очень часто при работе с липосомами используются конъюгаты содержащие остатки фосфолипидов, например фосфатидилэтаноламина, и полиэтиленгликоля, что обеспечивает лучшее проникновение таких молекул в бислои) — полимер с гибкой гидрофильной цепью, содержащей различное количество звеньев, в зависимости от условий синтеза. Это вещество является универсальным стабилизатором, достаточно слабо взаимодействующим с мембранами (концевыми заряженными группами) и действующим независимо от липидного состава липосом, наличие полиэтиленгликоля приводит к экранированию поверхностного заряда липосом. Кроме того молекулы ПЭГ создают в примембранной области избыточное осмотическое давление, что позволяет загружать в липосомы больше вещества, предотвращая осмотический разрыв. Одной из основной причин использования

полиэтиленгликоля является его способность предохранять липосомы от поглощения их макрофагами, что приводит к увеличению времени циркуляции в кровеносном русле и способствует накоплению в тканях-мишенях (напр., различных опухолях).

3. В зависимости от размера частиц и числа образующих их липидных слоев различают следующие типы липосом: **мультиламеллярные (многослойные)** и **моноламеллярные (однослойные)** липосомы. Мультиламеллярные липосомы состоят из нескольких концентрических липидных бислоев. Их средний диаметр в зависимости от приготовления составляет 0,3-0,4 мкм или даже достигать нескольких микрон (до 10) в диаметре. Таким образом, **мультислойные липосомы не могут быть отнесены к наночастицам. Однако, поскольку толщина липидного бислоя составляет менее 10 нм, можно определить такие частицы как микрочастицы, имеющие наноструктурированную поверхность.** Мультиламеллярные липосомы осмотически активны: они изменяются в объеме при изменении осмотических свойств внешней среды. Моноламеллярные липосомы состоят из одного бислоя. Различают малые моноламеллярные (диаметр 20-50 нм) и крупные моноламеллярные, (диаметр 50-200 нм и выше). Согласно определению ИЮПАК, наночастицами являются частицы с размерами 100 и менее нм, поэтому **моноламеллярные липосомы можно отнести к наночастицам.** Моноламеллярные липосомы широко и эффективно используют в разнообразных исследованиях биологического и медико-биологического характера а также различных био(нано)технологических процессах. Также возможна классификация веществ в зависимости от типа веществ, входящих в состав липосом: например если в состав липосом входят белки их называют **протеолипосомы**. Кроме того возможно классифицировать липосомы в зависимости от **формы**: шарообразные, дискообразные, неправильной формы (если в состав липосомы инкорпорирована твердая частичка), тубулярные липосомы; **поверхностного заряда**: положительно нейтрально или отрицательно заряженные; **морфологии поверхности**: гладкие, негладкие; **наличие осмотической активности**: осмотически активные или неактивные и др.

*Таблица 1*



Характеристики липосом	Методы определения/приборы
Форма липосом и морфология поверхности	Трансмиссионная электронная микроскопия, электронная микроскопия по методу замораживания-скальвания
Средний диаметр липосом и распределение по размерам	Динамическое светорассеяние, фотонная корреляционная спектроскопия, лазерное светорассеяние, гель-фильтрация
Поверхностный заряд	Свободный электрофорез
Поверхностный электрический потенциал	Измерение дзета-потенциала
Количество липидных бислоев	Малоугловое рентгеновское рассеяние, <sup>31</sup> P-ЯМР, электронная микроскопия по методу замораживания-скальвания
Устойчивость двойного слоя липидов	Электронная микроскопия по методу замораживания-скальвания, дифференциальная сканирующая колориметрия
Эффективность инкапсулирования (процент невключившегося препарата/процент включения)	Центрифугирование, ионообменная хроматография, тест с использованием радиометки, гель-фильтрация с последующим спектрофотометрическим определением эффективности инкапсулирования
Высвобождение препарата <i>in vitro</i>	Диализ, спектрофлуориметрия
Концентрация фосфолипидов	ВЭЖХ
Концентрация холестерина	ВЭЖХ, холестерин-оксидазный метод
Перекисное окисление фосфолипидов	УФ-спектрофотометрия, йодометрическое титрование
Гидролиз фосфолипидов, самоокисление холестерина	ВЭЖХ и ТСХ
Осмолярность	Осмометр
Стерильность	Тест с использованием анаэробных и аэробных культур
Пирогенность	LAL-тест, испытания на кроликах
Токсичность	По выживаемости животных, гистопатологическое определение

4. При помощи липосом решаются различные задачи, соответственно, в зависимости от типа задачи необходимо использовать методы, оценивающие различные характеристики липосом. Ниже очень приведено краткое описание нескольких таких методов. Так, при необходимости оценки **формы и морфологии** образцов используют различные виды микроскопий. При этом в случае оценки липосом малых (нано)размеров используются различные **электронные микроскопы** (при этом образцы, как правило, разрушаются); **сканирующие зондовые микроскопы**, напр., **атомно-силовые** (в этом случае используются как фиксированные липосомы, так и, особенно в последнее время, форма и размер липосом оценивается *insitu*, без дополнительного воздействия); различные виды **лазерных интерференционных микроскопов**, позволяющих *insitu* оценить форму и состояние отдельной липосомы. Для оценки липосом микронных размеров можно

использовать различные разновидности **фазово-контрастной микроскопии**, поскольку, как правило, препараты на основе липосом обладают очень низкой контрастностью. Вышеописанные микроскопические методы с высокой точностью позволяют оценивать форму и состояние отдельных липосом, однако они малопригодны для массовых поточных исследований или тестов препарата. Поэтому для оценки **среднего размера липосом** обычно используются различные разновидности метода **динамического светорассеяния**. Основная трудность здесь состоит в корректном использовании заложенных методик при оценке частиц субмикро- и наноразмеров. Существует ряд приборов позволяющих это сделать с достаточно высокой точностью (напр., Submicron Particle Sizer в различных модификациях).

Используя метод **динамического светорассеяния** в сочетании с **электрофоретическими** методами можно оценивать такие характеристики липосом как **подвижность** и **поверхностный заряд**. Используя различные **флуоресцентные красители** можно оценить величину **заряда поверхности** (в довольно грубом приближении), **вязкость**, а также ряд других характеристик мембран и веществ, инкорпорированных в липосомы. Метод **электронного парамагнитного резонанса** позволяет оценить изменение **вязкости** мембран липосом не только локально (в плоскости), но также и оценить профиль изменения вязкости внутри липидного бислоя. Для **оценки состояния инкорпорированных в липосомы веществ на молекулярном уровне** используется **спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия)**. Для оценки **количества вещества**, загруженного в липосомы, можно использовать различные **аналитические методы**, например, различные методы хроматографии, **после разрушения липосом**. При использовании липосом для введения различных веществ в живые организмы, включая людей, необходимо оценивать **стерильность** используемых растворов липосом. Проще всего это сделать поместив бактерии в питательную среду, благоприятствующую росту различных микроорганизмов, и после некоторого времени оценить количество образовавшихся бактерий. В настоящее время все большую популярность получает использование методов генной инженерии для определения микроорганизмов по наличию специфических ДНК или белков в растворах липосом. Для **разделения липосом по фракциям или отделения липосом, содержащих некое вещество, от этого же вещества, находящегося в том же растворе** используют **ультрацентрифугирование** или различные **хроматографические методы**. При работе с живыми организмами очень важно оценивать **токсичность** образцов, различных препаратов, созданных на основе липосом. Традиционно, в первую очередь, оценивают

**острую токсичность** препаратов для оценки полумлетальной дозы (ЛД50) — концентрации вещества при которой половина объектов, подвергшихся действию препарата, погибает. Для оценки более долговременного действия препаратов проводятся более длительные исследования, направленные на более точную оценку состояния организмов, подвергшихся действию препаратов.

5. *доксорубицин*

*ибупрофен*

*индометацин*

*циклоспорин*

*пилокарпин*

*винкристин*

*пироксикам*

*тимолол*

*дофамин*

*ципрофлоксацин*

*эпинефрин*

*хинин*

*кодеин*

*лидокаин*

*налидиксовая кислота*

После спонтанной перегруппировки безводных фосфолипидов в присутствии воды в гидратированную бислойную структуру часть водной фазы захватывается внутрь замкнутой бислойной структуры. С помощью этого процесса водорастворимые вещества пассивно загружаются в липосомы. Кроме пассивного инкапсулирования существуют методы активной загрузки, к которым относятся: метод рН-градиента через липидную мембрану, загрузка с помощью градиента сульфата аммония, градиента ацетата кальция или натрия, градиента иона переходного металла и трансмембранного фосфатного градиента. Загрузка за счет различных градиентов используется для конкретных препаратов, которые могут находиться как в заряженной, так и в незаряженной форме в зависимости от рН среды. Такие вещества можно добавлять в водную фазу в незаряженном состоянии для проникновения внутрь липосом через липидный бислой. Далее внутри липосом устанавливается значение рН, необходимое для возникновения заряда на молекуле вещества. Заряженные молекулы не способны пройти через липидный бислой и вернуться во внешнюю среду.

Слабые амфифильные основания загружают в липосомы с помощью градиента рН, а также ионных градиентов неорганических солей аммония и трансмембранного фосфатного градиента. Загружаемое основание в нейтральной форме способно проникать через бислой, однако, приобретая положительный заряд в кислой среде внутреннего объема липосом, почти полностью теряет эту способность, т.к. коэффициент проницаемости для заряженной молекулы значительно меньше, чем для незаряженной. Этот процесс можно описать как обмен через мембрану аммиака и загружаемого основания (антипорт).

К амфифильным соединениям со слабыми основными свойствами относятся: доксорубин, пилокарпин, винкристин, тимолол, дофамин, эpineфрин, хинин, кодеин, лидокаин и др. Для загрузки слабых кислот используется градиент ацетата кальция; в этом случае движущей силой загрузки является антипорт уксусной кислоты и загружаемой слабой кислоты. К соединениям со слабыми кислотными свойствами относятся: ибупрофен, индометацин, пироксикам, ципрофлоксацин, налидиксовая кислота и др. Соединения, растворимые в органических растворителях (циклоспорин), распределяются в двойном слое липидов. Такие соединения растворяют вместе с фосфолипидами в подходящем органическом растворителе. Полученную смесь вначале высушивают под вакуумом до полного удаления растворителя, а затем к ней непосредственно добавляют водную фазу.

*(Альтернативный ответ: Липосома состоит из гидрофобного липидного бислоя, который отделяет внутренний водный объем от внешней среды. Соответственно, если вещество, которое необходимо загрузить в липосому гидрофильно, то его помещают во внутренний объем, если гидрофобно, то оно может оказаться в липидном бислое. Обычно для переноса водорастворимых веществ используются крупные моноламеллярные липосомы, поскольку для них удается достичь наибольшей величины внутреннего объема при сохранении стабильности. Для гидрофобных веществ, накапливающихся в липидном бислое, гораздо выгоднее использовать малые моноламеллярные и многослойные липосомы. К гидрофильным веществам, предложенным в вопросе, относятся: доксорубин, циклоспорин, пилокарпин, винкристин<sup>+</sup>, дофамин, ципрофлоксацин, эpineфрин, кодеин, лидокаин; к гидрофобным: ибупрофен, индометацин, пироксикам, тимолол (гель), хинин, налидиксовая кислота;*

*Вводить вещества в липосомы можно на стадии их получения или позднее, водорастворимые вещества можно загружать во внутренний объем липосом при помощи создания осмотического градиента. Так, традиционный способ загрузки водорастворимых веществ в липосомы основан на регидратацию липидных пленок в*

присутствии буфера, содержащим исходные вещества. При правильном подборе компонентов и оптимальных условий проведения процедуры эффективность введения препарата составляет более 50%. В случае гидрофобных веществ, хорошо растворимых в липидном бислое, целесообразным является добавление необходимых веществ прямо в липидную фазу, после чего следуя стандартной процедуре формирования липосом. Разумеется, следует учитывать возможность взаимодействия вводимых веществ с детергентами, иногда используемыми для формирования липосом. Например, ряд водорастворимых гидрофильных препаратов (напр. Пилокарпин и тимолол) смешивают с растворителем, содержащем фосфолипиды (или другими компонентами липосом), и затем получают из этой смеси эмульсию. После удаления растворителя из эмульсии формируется нестабильный, содержащий водорастворимое вещество, липидный монослой из которого можно получить липосомы с высоким содержанием лекарства внутри. Помимо этого, используя ряд методических приемов, можно достичь высокой эффективности загрузки искомого вещества в липосомы. Так, в частности, для амфифильных веществ (напр., доксорубицин, пилокарпин, тимолол, дофамин, эpineфрин, хинин, кодеин и лидокаин) используется разница в проницаемости мембраны для нейтральных (несущих суммарный нулевой заряд) и заряженных форм молекул. Незаряженные молекулы более гидрофобны и лучше растворимы в липидной мембране клеток и липосом. При добавлении таких веществ в раствор, содержащий липосомы, они по градиенту концентрации будут проникать внутрь липосом через мембрану. Если при этом подкислить внутренний объем липосом, то проникшие в него нейтральные молекулы присоединяют протон, приобретают положительный заряд и, в результате, эффективность их выхода из внутреннего объема липосом резко снижается. Наиболее распространенный способ создания протонного градиента (увеличения количества протонов во внутреннем объеме липосом) это помещение липосом в раствор, содержащий ионы аммония  $\text{NH}_4^+$ . Данные ионы проникают по градиенту концентрации во внутренний объем липосом пока концентрация между ним и наружным объемом не выровняется, затем разбавлением уменьшают концентрацию ионов аммония во внешнем растворе. Это приводит к диффузии нейтральных молекул аммиака во внешний объем, что приводит к подкислению внутреннего объема липосом.)

6. В настоящее время липосомы являются одним из наиболее активно используемых средств доставки различных веществ, включая растительные препараты к живым клеткам. Основным преимуществом липосом перед другими средствами доставки является сходство липосом с природными мембранами клеток по

**химическому составу**, поскольку главным компонентом мембран живых клеток являются фосфолипиды. Кроме того, благодаря относительно простой процедуре изготовления липосом **можно широко варьировать их размеры, характеристики, состав поверхности, что позволяет использовать липосомы для транспорта широкого круга фармакологически активных веществ**: противоопухолевых и противомикробных препаратов, гормонов, различных ферментов, вакцин, а также дополнительные источники энергии для клетки (например Q10), и генетический материал (нуклеиновые кислоты), а также **позволяет адресно доставлять вещества к тканям и клеткам**. Липосомы **сравнительно легко разрушаются в организме**, высвобождая доставленные вещества, при этом до взаимодействия с клетками, липосомы **защищают свое содержимое от контакта с иммунной системой, что может вызвать последующее разрушение данного вещества и/или стать причиной развития аллергических реакций**. Используя липосомы можно доставлять до тканей-мишеней **водонерастворимые или токсичные вещества** (например, если возникает необходимость доставить ядовитые вещества к клеткам опухолей, не повреждая при этом здоровые клетки). Таким образом, липосомы помогают дольше сохранять высокий уровень концентрации лекарственных препаратов в крови и клетках, а также помогают веществам проникать к тканям и клеткам, недоступным для этих веществ при обычном способе доставки в организм.

В настоящее время липосомы широко используются в **косметологии** как основа для различных кремов, наносимых на кожу и волосы, а также **в пищевой промышленности** (напр. в сыроварении, хлебопечении и производстве кондитерских изделий), а также в ряде других областей. Помимо этого липосомы по-прежнему остаются удобным экспериментальным объектом, моделью клеточной мембраны, используемой для проведения различных исследований (оценка транспорта веществ, процессов слияния, работы различных каналов и др.).

## Гигантское комбинационное рассеяние (2009, нанобиотехнология)

1. Самопроизвольно НЧ могут проникнуть в клетки, обладающие фагоцитозом. Это макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, фибробласты и такие простейшие, как амеба. При этом перечисленные объекты будут отличаться по эффективности проникновения НЧ в цитоплазму, что связано с различной фагоцитирующей активностью клеток. Эффективность поглощения НЧ определяется двумя факторами: активностью и специфичностью фагоцитоза. Наибольшей активностью к фагоцитозу обладают макрофаги, нейтрофилы и амеба. Фибробласты способны к фагоцитозу, однако этот процесс для них является менее характерным, чем для клеток, перечисленных выше. Специфичность фагоцитоза также отличается для всех клеток. Для большинства фагоцитирующих клеток фагоцитоз является рецептор-опосредованным процессом, инициируемым связыванием интернализуемых лигандов со специфическими рецепторами на поверхности клетки, с последующим формированием окаймленных пузырьков и отделением таких первичных эндосом от плазматической мембраны. В случае НЧ фагоцитоз будет неспецифичным, поскольку отсутствует связывание НЧ с рецепторами на поверхности клетки. Наиболее активным неспецифическим эндоцитозом обладают некоторые простейшие, в частности, амебы. Для тех клеток, у которых фагоцитоз инициируется преимущественно связыванием интернализуемого лиганда с рецепторами, поглощение НЧ не будет очень эффективным. К таким клеткам относятся, в первую очередь, дендритные клетки – одни из основных иммунных антиген-представляющих клеток, у которых фагоцитоз является строго рецептор-специфическим, и в меньшей степени нейтрофилы и макрофаги. В нейроны, эритроциты и, особенно, миелиновые нервные волокна НЧ проникать не будут, во всяком случае, без нарушения структурной целостности плазматической мембраны. Суммируя: НЧ могут самопроизвольно по механизму фагоцитоза проникать в цитоплазму амебы, макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток и фибробластов. Амебы, макрофаги и нейтрофилы будут обладать наибольшей эффективностью к поглощению НЧ. Логично предположить, что преимущественно в цитоплазме клеток будут накапливаться более мелкие НЧ, хотя все перечисленные клетки способны к фагоцитозу НЧ указанных размеров (10-200 нм).
2. Вызвать или усилить проникновение НЧ в цитоплазму клеток можно путем присоединения к наночастице участков соответствующих антител, узнающихся рецепторами на поверхности клеток, что будет вызвать образование окаймленной ямки и активировать фагоцитоз. (2) Кроме того, поскольку НЧ несут заряд на своей

поверхности, то для всех типов клеток можно использовать электрофорез. В простейшем случае клетки находятся на горизонтальной подложке или в растворе, куда помещаются два электрода и создается разность потенциалов. Разность потенциалов на электродах будет приводить к появлению направленного горизонтального движения частиц в растворе и "бомбардированию" наночастицами поверхности клеток. Для того, чтобы избежать чрезмерного повреждения плазматической мембраны клеток, следует использовать коллоидные растворы наночастиц с наименьшим диаметром. Второй вариант электрофореза: в электрофоретическую камеру с двумя вертикально опущенными электродами помещается вертикальная перегородка с порами, на которой иммобилизованы клетки. Создаваемая разность потенциалов на электродах приводит к горизонтальному движению наночастиц и их ударению с поверхностью клеток. Этот вариант отличается от первого тем, что увеличивается число ударений НЧ о поверхность клеток. (3) Третий способ – это использование "электромагнитной пушки", создающей направленный сильный поток НЧ на клетки. (4) Четвертый способ – ультразвуковое озвучивание суспензии клеток с раствором наночастиц. Ультразвук будет приводить к нанометровым повреждениям мембран, в результате чего НЧ самого маленького размера могут проникать в цитоплазму клеток. (5) Наночастицы можно заключить внутрь липосом. При добавлении липосом к клеткам и совместной инкубации будет происходить слияние липосомальной мембраны с плазматической мембраной и попадание наночастиц в цитоплазму. (6) Микроинъекция наночастиц в клетки при помощи нанотрубок и стеклянных микроэлектродов.

3. Для адсорбции наночастиц на поверхности клетки можно применить: механическое осаждение: «мягкое» центрифугирование — совместное осаждение клеток и коллоидных частиц приведет к осаждению частиц на поверхности клеток. Агрегация коллоидных частиц на поверхности клетки – происходит самопроизвольно или при изменении ионной силы окружающего раствора. Поверхность клетки будет служить центром агрегации. Изменение заряда на поверхности клетки или на поверхности частиц. Частицы коллоидов металлов несут заряд. Поверхностный заряд может препятствовать адсорбции коллоидов на поверхности клетки. Для снятия заряда можно изменить рН среды, добавить соответствующие противоионы или изменить заряд на мембране клетки. Заряд на мембране можно изменить путем добавления ионофора – снимает градиент ионов и заряд на мембране, или, для возбудимых клеток – путем де- или гиперполяризации.



Модификация поверхности коллоидных частиц путем добавления органических соединений, хорошо взаимодействующих с поверхностью частицы и, другой своей частью, взаимодействующая с поверхностью клетки. Синтез антител к белкам клеточной поверхности, к которым присоединены коллоидные частицы.

### **Клеточное лежбище (2009, нанобиотехнология)**

1. Основные требования к подложке для длительной культивации клеток – это : (1) геометрическая наноструктура поверхности, соответствующая размерам компонентов экстраклеточного матрикса клеток данного типа. Например, для культуры фибробластов необходима наноструктура поверхности в виде тонких длинных тяжей с характерными размером коллагеновых волокон; (2) использование материалов, обеспечивающих хорошую клеточную адгезию; (3) нетоксичность и устойчивость материалов.
2. В этом случае основным требованием является зафиксировать клетки на подложке, при этом наноструктура ее поверхности менее важна, чем в предыдущем случае. Для фиксации клеток можно использовать иммобилизованные на подложке антитела, связывающиеся с рецепторами на плазматической мембране клеток, а также положительно заряженные полимеры, покрывающие подложку. Поскольку поверхность клеток несет отрицательный заряд, то клетки будут связываться с положительно заряженными группами полимеров подложки.
3. В этом случае необходимо создать подложку с наноструктурой, соответствующей структуре экстраклеточного матрикса. При этом нельзя использовать материалы, обеспечивающие сильную адгезию, поскольку они будут препятствовать движению клеток. Для усиления интенсивности флуоресценции или интенсивности комбинационного рассеяния клеток используют подложки из золота или серебра. Наносыпание из золота и серебра делают неоднородным, а с созданием "наношероховатостей", благодаря которым на поверхности металла возникает плазмонный резонанс и усиливается интенсивность комбинационного рассеяния или флуоресценции.

### **Нанотрубочки (2009, нанобиотехнология)**

1. Через нанотрубочки (НТ) свободно проходят ионы. Наиболее важное значение в этом случае играют ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , поскольку  $\text{Ca}^{2+}$  является одной из основных сигнальных молекул в клетках. Увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в одной клетке приведет к увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  во всех связанных с ней нейронах и глиальных клетках и последующим процессам – экзоцитозу медиатора, активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых генов и т.д. Через НТ свободно переносятся молекулы аминокислот, АТФ и глюкоза. Таким образом, происходит "обмен" внутриклеточными источниками энергии и строительным материалом. Через НТ свободно проходят цитоплазматические водорастворимые белки и другие макромолекулы, диаметр которых не превышает диаметр НТ. Таким образом, клетки сообщаются друг с другом и при помощи сигнальных белков, например, белка c-fos – белка раннего ответа и белков-прионов. Кроме того, по НТ могут проходить белки и собранные комплексы белков-ДНК/РНК многих вирусов, в результате чего происходит распространение вируса по большему числу клеток. Органоиды (митохондрии и крупные везикулы с диаметром порядка 50-100 нм и выше) проходить не могут, поскольку их транспорт осуществляется при помощи микротрубочек, а суммарный диаметр микротрубочек и транспортируемого органоида превышает внутренний диаметр НТ.
2. По плазматической мембране НТ путем латеральной диффузии от клетке к клетке переносятся липиды и, кроме того, возможна латеральная диффузия трансмембранных белков.

## Protein unfolding (2009, нанобиотехнология)

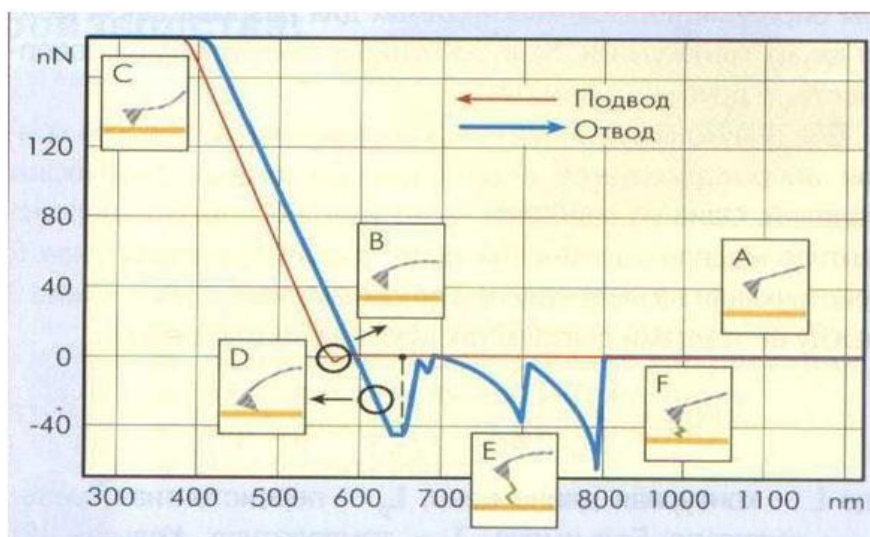


Fig.1. Силовая кривая. А – свободное состояние кантилевера при подводе к поверхности; В – притяжение к образцу перед контактом; С – контакт с поверхностью; D – удержание силами адгезии иглы кантилевера у поверхности образца после начала отвода; E – растяжение связавшейся макромолекулы; F – разрыв молекулы и переход кантилевера в недеформированное состояние. (the picture was reproduced from Н.Темкина, А.Филонов, И.Яминский “Силовая спектроскопия единичных макромолекул и их комплексов с использованием АСМ”, Бионанотехнологии, 2007, iss. 6)

1. The size of the protein ranges from  $\sim 2\text{-}5$  nm (globular protein) to several micrometers (for example, elastin in sarcomere).
2. Unfolding force for the protein depends on many factors with pulling speed being the main one. In general the range for unfolding forces accessible by AFM is  $\sim 40\text{pN} - 500$  pN (for more details see A. Borgia, P.M. Williams, J. Clarke, “Single-molecules studies of protein folding”, Ann. Rev. of Biochem., 2008, 77, 101-125.). Depending on the rate and force unfolding pathways of the protein can be very different.
3. The process of tip approach is presented on the figure 1. Far away from the surface only long range Van-der-Waals (VdW) forces are acting between tip and the surface. As tip approaches the surface the magnitude of long-range VdW increases (see region B on the image, brown curve). When tip is close enough to the surface, it snaps into contact with the surface (brown curve). While in contact short range VdW forces are acting between tip and the surface (brown curve). Let's assume no molecule situation: when tip is retracted from the surface (blue curve), the contact force is responsible for the increase in the force on the region D. As soon as pulling force exceeds contact force the force on the tip zeros and the tip will continue to follow (brown curve). So

the retraction curve will look like blue curve in the range from 400 nm to 700 nm, than it will continue as brown curve. Let's assume that tip picks up molecule: the tip will still follow blue curve in the distance ranges between 400 – 700 nm. Then protein starts to stretch (700 – 750 nm), protein unfolds at ~ 750nm. Number of domains in the protein determines the maximum number of unfolding cycles. Sometimes protein detaches from either tip or surface.

4. There are several requirements for the proteins to be standards for protein unfolding: reproducible unfolding pattern, known parameters of domain lengths and unfolding forces for selected protein, the presence of multiple domains in protein structure. Well known structure of protein helps to correlate unfolding events with the change in protein structure. Usually titin I27 is used as standard. Sometimes it is beneficial to have protein of similar structure as the sample of interest and use that one as standard. For example for filamentous protein spectin might be a good standard, because its unfolding curve is well known.

## Химера (2010, школьники, биология)

### 1. Иммуниет против белков

Основной механизм защиты организма – выработка антител к чужеродному белку. Белок связывается в комплексы и далее лизируется.

Механизм запуска выработки антител (упрощённый):

- 1) Поглощение белка макрофагом и В-лимфоцитом;
- 2) Активация макрофагом покоящихся хелперных клеток (Т-лимфоциты);
- 3) Размножение активированных хелперных клеток;
- 4) Образование комплекса активированной хелперной клетки и В-лимфоцита (поглотившего белок);
- 5) Созревание В-лимфоцитов, превращение их в плазматические клетки и выработка антител.

Источник – Кольман, Рём Наглядная биохимия

Второй механизм – неспецифическое расщепление белка протеазами, присутствующими в крови.

Защита от него.

Практически все участники правильно и очень подробно описали, что такое иммуниет. Основная неточность, которая приводила к потере 0,5 – 1 балла (из 2,5 за этот пункт) это описание механизмов иммуниета против бактерий и вирусов. Для борьбы с инфекцией и для борьбы с белками организм использует несколько различные схемы. Например, фагоцитоз нативных чужеродных белков лейкоцитами практически невозможен.

Как правило, защита состоит в маскировке чужеродного белка, что препятствует запуску механизма наработки антител.

Это может быть:

1. ПЭГ-илирование белка (химическое присоединение одной или нескольких молекул полиэтиленгликоля);
2. Создание химер, белков почти полностью идентичных белкам организма;
3. Укорачивание чужеродного белка до предельно необходимого минимума. К малым молекулам антитела формируются плохо.

Второй способ защиты – применение иммунодепрессантов.

На этот вопрос большая часть участников не смогла дать правильный ответ. Среди средств защиты часто предлагались вакцинация, занятия спортом и правильный образ жизни. Здесь, видимо, произошла путаница в понятиях: защита белка от систем иммуниета организма и защита организма от белка.

2. Вкратце схема такова:

- Секвенируем ДНК и находим фрагмент, отвечающий за синтез необходимого белка.
- Размножаем нужный фрагмент методом ПЦР и выделяем его.
- Действием рестриктаз и лигаз вставляем ген в плазмиду. (методик много, конкретные примеры – это хорошо, но не обязательно)
- Обеспечиваем проникновение плазмиды в клетку (разными способами, от введения с помощью вируса, до электропорации) В задаче принимались любые разумные способы введения.
- Высеваем культуру на селективные среды. Как правило, среды содержат антибиотики, которые убивают немодифицированные клетки (возможны и иные схемы селекции, например с красителями.)

Ответы участников на этот пункт задачи делились на два типа примерно поровну: 1 – блестящие ответы, описывающие схему много подробнее, чем авторское решение; 2 – ответы, описывающие только биосинтез белка, без манипуляций с генами. Во втором случае участник терял от 0,5 до 1,5 баллов. Примерно половина участников не смогли ответить на вопрос.

3. Мифическое существо с телом козы, головой льва и хвостом дракона (или змеи).

Ключевой смысл – в самом вопросе КТО ТАКАЯ ХИМЕРА. Подразумевается не вид животных или организмов, а именно конкретное существо.

На этот вопрос ответили практически все. Ключевая зацепка в решении: формулировка вопроса “КТО ТАКАЯ”. Это подразумевало, что такое существо уникально и косвенно указывало на мифологию.

4. Белок, содержащий естественные или искусственные скомбинированные фрагменты природного происхождения. Обязательное условие – наличие значительного фрагмента идентичного исходному белку организма. Должен производиться системами биосинтеза.

Большинство участников правильно ответили на этот вопрос. Некоторые неточности были в том, что писали это не белок, а ген. Такой ответ не засчитывался, так как вопрос сформулирован именно под рекомбинантный белок. Второй тип ошибок – явление химеризма растений. Этот ответ также не засчитывался, поскольку химеризм растений и химерные белки – это различные понятия.

5.

- Свиной инсулин (для человека) – Да. Почти полная идентичность, различие – 1 аминокислота
- Конъюгат антитела и квантовой точки. Нет. Химера – естественное образование, не продукт химического синтеза
- Генно-инженерный белок с Hys-тагом Да. Полная идентичность структуры плюс довесок нескольких аминокислот
- Пэгилированный белок – Нет. Искусственное образование
- Мутантные белки с заменой буквы в ДНК - Да. Почти полная идентичность (различие в 1 аминокислоту)
- Мутантные белки сдвигом рамки считывания ДНК. - Нет. Сдвиг рамки означает синтез совершенно иной белковой структуры. Исключение – сдвиг на целый кодон.
- Белки с изотопно-мечеными аминокислотами. - Да. Структуры идентичны, а изотопы организм различает плохо и биосинтез идёт (хотя многие аспекты из-за изотопного эффекта различны).
- Гликопротеины – Да, могут являться в зависимости от структуры.

Этот пункт получился наиболее сложным для участников. Полностью решить его смогли только несколько человек. К сожалению, большинство участников оформило ответ по принципу “да/нет”, без объяснений. Это не штрафовалось, но это и не позволило определить, кто из участников действительно знает ответ, а кто его угадал.

В саму задачу попала некоторая неточность. Белки с изотопно-мечеными аминокислотами можно считать химерными, а можно идентичными белкам организма. Дело в том, что изотопно чистых элементов в природе нет, следовательно каждый организм синтезирует некоторое количество белков, содержащих минорные изотопы. Иное дело, что природный белок, содержащий сразу несколько изотопных меток – это исключительная редкость.



### Куда идешь, путешественник? (2010, школьники, биология)

1. На большие расстояния перемещаются клетки иммунной системы, функция которых – нахождение чужеродного антигена с последующей активацией систем иммунного ответа. К таким клеткам относятся дендритные клетки, макрофаги. В соединительной ткани постоянно перемещаются фибробласты, формирующие коллагеновые нити. В нервной системе перемещаются клетки микроглии, сползающиеся к местам поражений и воспалений и выполняющие роль иммунных клеток, а также стволовые клетки, которые могут мигрировать к местам поражений для того, чтобы дифференцироваться в нейроны или глиальные клетки.
2. В эмбриогенезе миграция клеток необходима для формирования тканей и органов. Обычные флуоресцентные зонды или красители плохо подходят для исследования перемещений клеток, поскольку подобные эксперименты занимают много времени и зонды за это время обесцвечиваются и вытекают из клеток.
3. В качестве наноматериалов, позволяющих исследовать перемещения клеток в течение длительного времени, можно использовать: (1) Квантовые точки, по флуоресценции которых можно отслеживать перемещения клетки. Для того, чтобы следить за перемещением одной клетки в культуре или срезе ткани, квантовые точки можно инъецировать в цитоплазму клетки при помощи микроэлектродов. Если необходимо исследовать перемещения нескольких клеток, то в цитоплазмы каждой из них можно инъецировать квантовые точки с различными спектральными свойствами, чтобы спектры флуоресценции у каждой клетки были различными. Метод исследования – конфокальная флуоресцентная микроскопия. Также к квантовым точкам можно “пришить” антитела к поверхностным белкам плазматической мембраны нужного типа клеток. В этом случае инъекция квантовых точек не потребуется. (2) Наночастицы серебра или золота, к поверхности которых “пришиты” молекулы, нетоксичные для клеток и дающие интенсивный спектр комбинационного рассеяния, многократно усиливающийся на наночастице благодаря плазмонному резонансу. Клетки, обладающие эндоцитозом (макрофаги, дендритные клетки, фибробласты), поглатят НЧ. Для того, чтобы пометить клетки наночастицами избирательно, можно инъецировать раствор с наночастицами серебра или золота в цитоплазму нужной клетки. Перемещения клетки отслеживаются по перемещению сигнала комбинационного рассеяния от молекулы, пришитой к наночастицам, находящимся в цитоплазме клеток. Метод исследования – микро-спектроскопия гигантского (поверхностно-усиленного) комбинационного рассеяния. (3) Углеродные нанотрубки. Они обладают очень

интенсивным комбинационным рассеянием без всякой дополнительной модификации. Клетки с активным эндоцитозом поглатят нанотрубки и в дальнейшем перемещение клеток отслеживается по комбинационному рассеянию от нанотрубок внутри клеток. Метод исследования – спектроскопия или микроспектроскопия КР.

4. Для исследования миграций клеток в целом организме можно применять все перечисленные подходы. Затрудняющим фактором будет проникновение возбуждающего света в ткани и флуоресценции или сигнала КР из тканей. В этом случае можно использовать многофотонную систему возбуждения с инфракрасным лазером, обладающим глубокой проникающей способностью. Так, одной группой авторов были опубликованы результаты по исследованию перемещения по телу мыши раковых клеток, помеченных углеродными нанотрубками.

**Наномашинки (2010, школьники, биология)**

1. В качестве двигателя могут выступать ферменты, например аналоги АТФ-синтаз или жгутиковых комплексов некоторых бактерий. Задача творческая, оценивается оригинальность, реалистичность и обоснованность предложенных вариантов.

## Солнечное утро (2010, школьники, биология)

1. В задаче речь идет о фотосинтезе зеленых растений, а именно о фотосинтетическом переносе электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи от воды до реакционного центра фотосистемы 1. Наш герой Петя представляет собой электрон. Другие мальчики, которые встречаются ему на пути - тоже электроны. Лодка, на которую попал Петя, – это атом кислорода. Два мальчика (два электрона) вместе с кепками (два протона) и лодкой составляют молекулу воды ( $2\text{H}^+ + 2\text{e} + \text{O} = \text{H}_2\text{O}$ ) в хлоропластах. Крытая пристань – это марганцевый кластер кислород выделяющего комплекса (КВК), в котором две молекулы воды разлагаются на 4 электрона (4 мальчика из двух лодок), 4 протона (4 кепки) и молекулу  $\text{O}_2$  (две лодки соединяются вместе). 4 работника пристани обозначают 4 атома марганца в КВК. Вагончик обозначает редокс-активный остаток тирозина КВК, который участвует в переносе электронов от КВК к первичному донору P680, молекуле хлорофилла реакционного центра фотосистемы 2 (остановка вагончика у подножья горы). Соединенные вместе лодки, вылетевшие из пристани, – это молекулярный кислород  $\text{O}_2$ , побочный продукт фотолиза воды, который выделяется в окружающую среду.
2. Синие и красные вспышки света, осветившие кабину Пети, символизируют соответствующие области солнечного спектра, где находятся максимумы поглощения хлорофилла. За счет энергии света электрон переходит в возбужденное энергетическое состояние (Петя оказывается на вершине горы). Сильный ветер и скользкая гора обозначают нестабильность возбужденного состояния электрона, а падение с горы символизирует один из путей дезактивации возбуждения – излучение в виде флуоресценции. Независимо от длины волны возбуждающего света, высвечивание квантов флуоресценции всегда происходит с самого нижнего колебательного подуровня возбужденного синглетного состояния. Поэтому флуоресценция имеет красный цвет (красная вспышка, которую увидел Петя при падении мальчика с горы).
3. Спасатель – это феофитин, промежуточный акцептор электронов. Домик, куда он проводил нашего героя – это пластохинон QA – первичный хинонный одноэлектронный акцептор. Гараж, в котором находится двухместный снегоход – это вторичный хинонный акцептор QB (двухэлектронный акцептор). QA и QB являются связанными хинонами, поэтому они представлены в виде неподвижных строений. В отличие от этого, пластохинон PQ (снегоход), получающий от QB два электрона (Петя и второй мальчик) и переносящий 2 протона (2 кепки), является

подвижным переносчиком (PQH<sub>2</sub>). Пластохинон PQH<sub>2</sub> обеспечивает транспорт электронов от ФС<sub>2</sub> к цитохромному b<sub>6</sub>f комплексу (горнолыжный парк). Дважды восстановленный и протонированный пластохинон PQH<sub>2</sub> передает один электрон гему цитохрома f (горнолыжная трасса, выбранная Петей), а второй электрон – на гем низкопотенциального цитохрома b<sub>6</sub>L (саночная трасса). При этом оба протона выделяются во внутритилакоидное пространство (обе кепки улетают с голов ребят). Цитохром f восстанавливает пластоцианин, медь-содержащий водорастворимый белок (медный конь). Этот подвижный одноэлектронный переносчик доставляет электрон к реакционному центру фотосистемы 1 (станция у подножья второй горы). В задаче не упоминается о дальнейших приключениях мальчика, который выбрал санки, но следует отметить, что этот электрон, восстановивший гем низкопотенциального цитохрома b<sub>6</sub>L, переносится на высокопотенциальный гем b<sub>6</sub>H и используется в цикле восстановления молекулы окисленного пластохинона.

4. Знание особенностей структурной и функциональной организации фотосинтетического аппарата является основой для создания систем, которые могут быть использованы в различных областях нанотехнологии. Например, фотосинтетические пигмент-белковые комплексы (реакционные центры бактерий и высших растений) используются в качестве рецепторного элемента для создания высокочувствительных биосенсоров, детектирующих загрязнение окружающей среды выхлопными газами, гербицидами и тяжелыми металлами. Также, фотосинтетические пигмент-белковые комплексы могут быть использованы для производства водородного топлива и очистки атмосферы от парниковых газов с помощью искусственного фотосинтеза (artificial photosynthesis). В этом случае в качестве светособирающих комплексов (ССК) для фотосинтетических реакционных центров можно использовать квантовые точки, которые в силу своих необычных свойств поглощают свет значительно эффективнее природных ССК.

### **Маленький и еще меньше (2010, школьники, биология)**

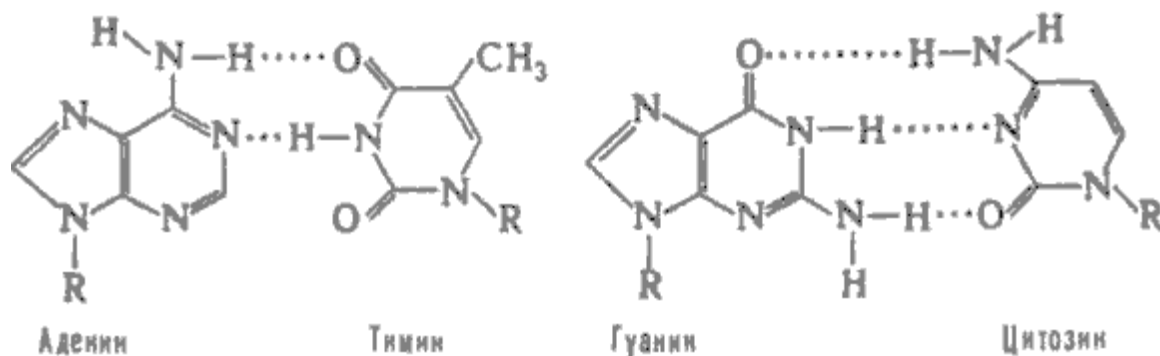
1. Самые маленькие маленькие клеточные живые организмы – бактерии, среди них самые маленькие – микоплазмы (порядка 100-150 нм). Для поддержания метаболизма и размножения необходимо определенное количество структурных каталитических белков, этим определяется минимальный размер бактерии.
2. Если считать вирусы живыми организмами, хотя и не способными к самостоятельному размножению, то они могут претендовать на роль самых маленьких живых организмов – от 20 до 200 нм. Их размеры меньше, т.к. нет необходимости содержать аппарат метаболизма, а только структурные элементы и генетический материал.
3. Для малых организмов, поддерживающих метаболизм (клеточных) важным является соотношение поверхности клетки к объему, что позволяет поддерживать более интенсивный обмен веществ с окружающей средой.
4. Для визуализации бактерий могут быть пригодны методы световой микроскопии и варианты с повышением разрешения – темнопольная микроскопия и т.п., для организмов размером менее 200 нм подходят методы электронной и атомно-силовой микроскопии.

### Чеширский кот (2010, школьники, биология)

1. Комплементарность в ДНК – это строгое соответствие пар азотистых оснований, позволяющее образовывать двухцепочечные структуры. Следует и объясняется правилом Чарграффа. (равенство количеств букв G и C и A и T соответственно).

Все участники успешно ответили на этот вопрос. Единственно, что в молекулярной биологии слово комплементарность пишется через Е. КомплИментарность – это понятие из социологии и филоффии.

2. Крепче связываются буквы G и C. 3 водородные связи в паре C-G и только 2 в A-T



Большинство участников также ответили правильно, многие также указали на разное количество водородных связей, определяющее прочность связывания оснований.

Длина одного праймера равна 32 буквы, второй на 4 или 6 букв длиннее (смотря кто как намеряет масштаб) Принципы – праймеры строго комплементарны между собой, не обратно симметричны относительно центра и не содержат участков более 4 букв комплементарных внутри праймера (иначе может быть петля) и между праймерами в неправильной ориентации (иначе - полимер) В условиях задачи также недопустима комплементарность, приводящая к дуплексам типа

ААААААТТТТТ 3'

ААААТТТТТ 3'

Большинство участников правильно описали принципы построения праймеров, но правильной структуры не привёл никто.

Основные ошибки:

1. внутренняя комплементарность и образование шпильки
2. симметричность относительно центра. В зависимости от типа может либо привести к образованию полимера, либо шпильки.

3. неспецифичность. Предлагались праймеры, способные связываться различными способами. Например: 1-  
AAAAAAAAAACGCGCGCGTTTTTTTTTTT и 2-  
TTTTTTTTTGCCGCGGCCGCAAAAAAAAAA.

Дуплекс может начаться либо с любой из букв А первого праймера. Кроме того, очевидно, что эта структура склонна к образованию шпилек. 4 ошибка уникальная. Один участник предложил образование тетраплекса. Такие образования тоже известны, но для их формирования нужны очень специфические условия, которые указаны не были. Кроме того, предложенная структура по энергии проигрывала соответствующему дуплексу

3. Он называется петля или шпилька.

Многие участники дали правильный ответ. Некоторые дали более широкий ответ, чем описано в авторском решении.

4. Нельзя. В уголках улыбки петли из 1 буквы будут слишком напряжёнными. В петлю войдёт несколько букв и вся структура будет выглядеть так:



К сожалению, на этот пункт почти никто правильно не ответил.



## Рыбки (2010, школьники, биология)

1. Соединением, которое придает рыбкам медака (*Oryzias latipes*) зеленое свечение является зеленый флуоресцентный белок (GFP). Флуоресцентная составляющая окраски трансгенных рыб, то есть эмиссия зеленого излучения (максимум при 509 нм – «нижний» уровень зеленой области видимого спектра), возрастает при освещении рыб (с ослабленной природной пигментацией) ультрафиолетовым светом (безопаснее всего использовать источник излучения мягкого ультрафиолета "А" (400-320 нм – long-wave ultraviolet), и наблюдать её лучше всего в темноте, когда флуоресценция проявляется в незамаскированном виде, так как хроматофорам просто нечего отражать в видимом нами диапазоне световых волн.
2. GFP светится при облучении, так как обладает способностью к флуоресценции. Способность GFP к флуоресценции обусловлена его первичной, вторичной и третичной структурой как белка. Белок состоит из 238 аминокислот с молекулярной массой 26,9 кДа. Белок представляет собой типичную бета-складчатую структуру, формирующую «бочонок» или «цилиндр» из 11 поворотов первичной последовательности, внутри которого находится флуорофор. Флуорофор образуется благодаря специфическим реакциям циклизации трипептида Ser65–Tyr66–Gly67 внутренней структуры молекулы. Оболочка цилиндра защищает флуорофор от тушения его флуоресценции компонентами микроокружения.
3. Для того, чтобы ввести GFP рыбкам, с помощью методов генетической инженерии (использование вирусных или плазмидных векторов, трансфекции при помощи микроинъекции в икринку) вводят ген белка в геном рыбки, получая таким образом трансгенные рыбки. Затем с помощью селекции «выводят» линию рыбок, несущих ген этого белка. Синтез белка у трансгенной рыбы осуществляется так же, как и синтез всех других белков через процессы транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации белка. Для создания трансгенных рыб часто применяют промотор, контролирующий синтез актина. В норме организм интенсивно синтезирует актин и миозин в мышечной ткани, поэтому соответствующие промоторы искусственно связанные с GFP-трансгеном отлично обеспечивают его экспрессию в мышцах.
4. Светящиеся трансгенные рыбки получают с использованием комплекса методов генетической инженерии для получения трансгенных животных.

Для более подробного ознакомления:

- [1] Как и зачем получили генетически модифицированных рыб? Трансгенные рыбы для развлечения, еды и науки
- [2] Glowinthedarkfishfortheaquarium
- [3] О.В. Степаненко, В.В. Верхуша и др., Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование // Цитология, том 49, №5 (2007), 395-420

### Мембрана (2010, школьники, биология)

1. От бактерий при помощи этой технологии очистить плазму крови без изменения ее макромолекулярного состава теоретически можно, но практически это сложно достижимо. От вирусов очистить плазму крови при помощи трековых мембран без изменения ее макромолекулярного состава нельзя и теоретически.
2. В случае бактерий – 100-150 нм, в случае вирусов – минимальный диаметр пор трековых мембран 20 нм, а теоретически – 10 нм (но макромолекулярный состав плазмы при этом изменится).
3. Технология «очистки» плазмы крови от бактерий, вирусов и патогенных макромолекул и частиц при помощи трековых мембран с диаметром пор 20-70 нм уже применяется в медицинской практике и носит название – каскадная фильтрация плазмы крови или каскадный плазмаферез, в отличие от обычного плазмафереза, при котором происходит отделение форменных элементов крови, а плазма выбрасывается (мембрана для обычного плазмафереза с диаметром пор 400 нм и изображена на фотографии).

От бактерий при помощи этой технологии очистить плазму крови без изменения ее макромолекулярного состава теоретически можно, т.к. наименьшие размеры бактерий (микоплазмы и L-формы – 150-200 нм) все же значительно больше, чем размеры макромолекул. Тем не менее практически это сложно достижимо, т.к. макромолекулярный состав плазмы крови хотя бы в минимальной степени изменится из-за процессов адсорбции белков и других молекул на трековой мембране и на отфильтрованных бактериях. От вирусов очистить плазму крови при помощи трековых мембран без изменения ее макромолекулярного состава нельзя и теоретически, т.к. размер самых маленьких вирусов, вызывающих инфекции человека (например, диаметр вируса полиомиелита – 10-15 нм) может быть меньше, чем, например, размер липопротеинов низкой и очень низкой плотности (до 20-40 нм) и иммунных комплексов (до 100-150 нм и даже более - но крупные комплексы осаждаются при получении плазмы путем центрифугирования цельной крови).

4. Может, т.к. некоторые патогенные бактерии (например, вызывающие бруцеллез, некоторые пиелонефриты и некоторые др.) под воздействием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки (антибиотиков пенициллинового ряда и циклосерина) могут превращаться в так называемые L-формы, т.е. бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. L-формы могут иметь значительно меньшие размеры (до

200 нм), в отличие от нормальных бактерий (как правило, 1 и более мкм) поэтому они часто проходят через бактериальные фильтры.

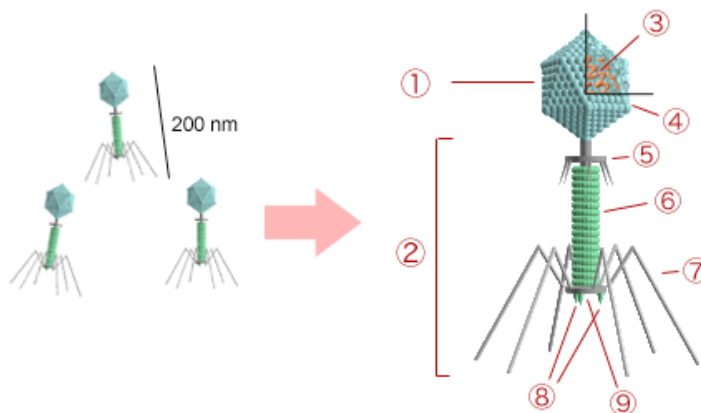
Фотография взята с сайта: <http://www.trackpore.ru/products/product.htm?id=4>

Для подробного ознакомления:

<http://dubna.rosocz.ru/upload/dubna/files/prezentacii/Titkov.pdf>

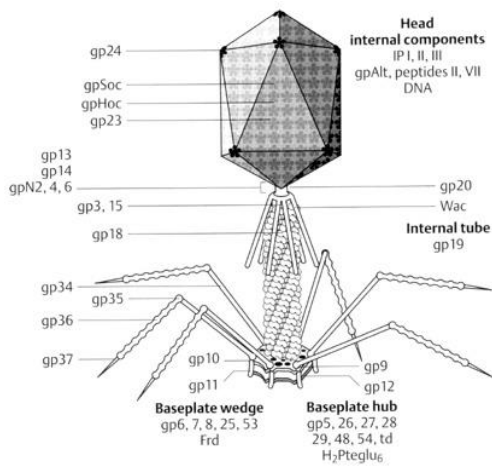
## Штучка (2010, школьники, биология)

1. На рисунке изображен бактериофаг – вирус бактерии, а точнее фаг Т4, инфицирующий кишечную палочку *E.coli*. Общая схема строения бактериофага (взята с сайта <http://ru.wikipedia.org/wiki/Бактериофаги>):



- 1 — головка, 2 — хвост, 3 — нуклеиновая кислота, 4 — капсид, 5 — "воротничок", 6 — белковый чехол хвоста, 7 — фибрилла хвоста, 8 — шипы, 9 — базальная пластинка.

Схема строения фага Т4 (взята с сайта <http://www.molbiol.ru/pictures/80837.html>):



2. Размеры бактериофагов почти идеально соответствуют размерам нанобъектов – так, головка фага на приведенной фотографии составляет примерно 100 нм в длину и 75 нм в ширину. Причем, такие малые размеры бактериофага, наряду с прочими характеристиками, придают ему принципиально новые свойства – например, возможность инфицировать бактерии. Однако, для того, чтобы относиться к объектам нанотехнологии, бактериофаг должен быть искусственно изменен, например, должен быть изменен его геном с помощью генноинженерных методов, химически модифицирован его белковый капсид и т.п. Бактериофаги активно используются и изучаются в таких «нанотехнологических» дисциплинах, как генная инженерия, молекулярная биология, медицинская вирусология и даже нанoeлектроника.

3. Можно. Примеры лекарственных препаратов на основе бактериофагов, существующие на фармацевтическом рынке: Дизфаг, Клебсифаг, Колифаг, Протеофаг, Стафилофаг и другие. Бактериофаги в основном используются для лечения инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также при бактериальном поражении при лечении ран, ожогов, гнойно-септических и гнойно-воспалительных заболеваний уха, горла, носа, дыхательных путей, легких и органов урогенитальной сферы.

4. Преимущества перед антибиотиками:

1. Узкоспецифичность и целенаправленность — каждый штамм поражает только несколько штаммов болезнетворных бактерий.
2. Безвредность для всех остальных бактерий (например, полезных бактерий кишечного тракта) и для многоклеточных организмов (всех клеток человека).
3. Действие по принципу «биологического оружия» - при однократном введении в организм (его не надо принимать его по схеме, как антибиотик) фаг дальше сам размножается в инфицированных бактериях. Когда все бактерии данного патогенного штамма будут уничтожены, бактериофаги не смогут размножиться и их популяция исчезнет сама собой.

Недостатки:

1. Точное установление возбудителя инфекции - только в этом случае можно будет выбрать эффективного фага. Соответственно, трата времени, лабораторных материалов, и привлечение сторонних специалистов.
2. Необходимость в огромном количестве видов бактериофагов — для каждого штамма бактерии нужен особый бактериофаг. Тогда как один антибиотик можно применять против широкого спектра микробов.
3. Необходимость культивирования фагов в лаборатории.
4. Отсутствие чёткой законодательной базы и плохой имидж вирусов в глазах общественности как лекарственных средств.

Фотография взята с сайта:

[http://www.molbiol.ru/pictures/list\\_biochem.html](http://www.molbiol.ru/pictures/list_biochem.html)

Этот же сайт может быть использован для более подробного ознакомления.

Для более подробного ознакомления с терапевтической ролью бактериофагов:

<http://www.selnov.ru/publikat.php?aid=374>

### **Анализ (2010, школьники, биология, повышенной сложности)**

1. Самый простой вариант – для визуализации разных элементов цитоскелета при помощи селективных флуоресцентных зондов или неспецифических флуоресцентных зондов, связанных с антителами к соответствующему элементу цитоскелета. Для длительных исследований перестроек цитоскелета следует использовать квантовые точки, меченные антителами к нужным элементам цитоскелета. Преимущество квантовых точек заключается в их меньшей токсичности для клеток по сравнению с флуоресцентными зондами, а также более стабильная флуоресценция во времени.
2. Аналогичный подход можно использовать для исследования движения моторных белков, например, кинезина или динеина по микротрубочкам. Квантовая точка метится антителом к моторному белку, а затем при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии исследуется перемещение квантовой точки (моторного белка) в клетке. Так же можно пометить нужный органоид в клетке, например, экзоцитозную везикулу и следить за его перемещением по клетке.
3. Относительно новый метод для исследования перемещений моторных белков – лазерный пинцет. Динеин или кинезин метится золотой наночастицей, а затем на ней фокусируют несколько инфракрасный лазер. По силе, которую надо приложить для того, чтобы золотая НЧ оставалась неподвижной, можно судить о силе, которую прикладывает моторный белок для перемещения по нанотрубочке. Лазерный пинцет также используют для деформации цитоскелета и исследования влияния структуры цитоскелета на морфологию клеток и клеточные процессы.

Для ответа на часть задачи по углеродным нанотрубкам следует учесть, что:

- Механические деформации и химическая модификация нанотрубок при взаимодействии с цитоскелетом и др. белками клетки будут хорошо видны на спектрах КР. Отсюда – возможность визуализировать напряжения и силы, возникающие в архитектуре цитоскелета, вхождение попадания белков внутрь трубок и т.п.
- Используя методы интерференционной, флуоресцентной и КР-микроскопии позволит визуализировать упорядоченность в расположении нанотрубок и ее зависимость от состояния и активности клеток
- Выращивание культуры клеток или биопленок бактерий на поверхности с включенными нанотрубками выявит механическое воздействие клеток на субстрат, т.к. деформации субстрата приведут к ориентации нанотрубок.

### **Зеленая слизь (2010, школьники, биология, повышенной сложности)**

1. Вирусы бывают РНК и ДНК типов.

Цикл вируса ДНК типа:

1. Закрепление на целевой клетке и её заражение;
2. Встраивание ДНК вируса в геном клетки;
3. Запуск репликации ДНК вируса и производства вирусных белков;
4. Формирование капсида и оболочки вируса. Самосборка вирусных частиц;
5. Гибель клетки и выход молодых вирусных частиц.

Цикл вируса РНК типа:

1. Закрепление на целевой клетке и её заражение;
2. Обратная транскрипция вирусной РНК;
3. Встраивание ДНК вируса в геном клетки;
4. Запуск транскрипции РНК вируса и производства вирусных белков;
5. Формирование капсида и оболочки вируса. Самосборка вирусных частиц;
6. Гибель клетки и выход молодых вирусных частиц.

Большинство участников правильно ответили на этот вопрос, подробно описав жизненный цикл вирусов. Чаще всего, почему-то описывался цикл вируса иммунодефицита человека. Потеря баллов чаще всего была по причине не описывания цикла РНК вирусов, то есть участник приводил решение только для ДНК типа.

Как правило, они быстро распространяются воздушно-капельным путём. Защитой от заражения может служить марлевая повязка, но её защитный ресурс невелик. Значительно больше ресурс респираторов, особенно специальных моделей. Ещё больше ресурс противогаза, однако непрерывное ношение противогаза более 2-3 часов очень затруднительно. Полную, длительную и достаточно комфортную защиту обеспечивают скафандры с принудительной подкачкой очищенного воздуха. Как правило, для подкачки используется небольшой компрессор и система воздушных фильтров.

2. Логично предположить, что поры фильтра должны быть меньше, чем вирусные частицы. Размеры вирусов составляют 10 – 100 нм. (редко больше) Следовательно, поры должны в пределе иметь размер менее 10 нм.

Большинство участников правильно ответили на этот вопрос, указав размеры вирусной частицы и то, что поры должны иметь меньший размер.

3. Скафандр должен полностью разделять внешнюю воздушную среду и очищенный воздух. Для этого, в идеале, он должен быть полностью газонепроницаем. Но такой скафандр пригоден только для ограниченного температурного диапазона. В



реальности достаточно, чтобы скорость просачивания воздуха сквозь ткань была пренебрежимо мала, то есть ткань должна быть плотной. Все края одежды: рукава, штанины, воротник должны плотно прилегать к телу, если они не прилегают, то необходимо вшить резинки. Также должны быть защитные резиновые перчатки и сапоги. Для дополнительного уплотнения ткани её можно пропитать. Самые простые пропитки делаются на основе хозяйственного мыла и, например, железного или медного купороса (лучше, конечно, алюминиевые квасцы, но их добыть несколько труднее). Ткань, пропитанная раствором мыла, опускается в раствор купороса. При этом образуются нерастворимые стеараты железа или меди, которые забивают поры ткани, делают её гидрофобной и значительно уменьшают газопроницаемость. Можно промазывать ткань резиновым клеем, раствором каучука в бензине, раствором поливинилбутираля или другого полимера в подходящем растворителе. Подойдут ПВА, монтажная пена, но ткань, пропитанная ими, становится жёсткой. Возможны и другие приёмы обработки. Понятное дело, после обработки ткань не должна быть мокрой. Итак, одежда и обувь подготовлены. Осталось изготовить эквивалент шлема. Для этого удобнее всего взять пластиковый щиток станочника (продаются в магазинах) и приклеить к прозрачному забралу полосы плотной ткани. Ткань должна образовывать матерчатый “шлем” и спускаться ниже уровня подбородка не менее чем на 30-35 см. Со спины она должна свисать ниже уровня лопаток также не менее чем на 30 см. Сзади и сбоку можно пришить её к куртке и проклеить шов резиновым клеем. Если лень заниматься шитьём, то можно взять вязаную шапку максимального размера, и приклеить её сверху на щиток станочника. После этого её надо будет щедро пропитать для стойкости. Шланг системы подачи воздуха выводится в шлем либо сверху, либо сбоку на уровне глаз. Его поток должен быть направлен на стекло шлема для удаления конденсата. Объём фильтруемого воздуха должен превышать потребности дыхания на 30 – 50%. Избыточный очищенный воздух непрерывно выходит из под шлема и предотвращает попадание внутрь заражённого.

Участники проявили большую фантазию и предложили самые разнообразные конструкции защитной одежды. Потеря баллов была только по невнимательности. Часто забывали прикрыть защитной одеждой руки, ноги или лицо.

#### 4. Реальные:

- Блокировка обратной транскрипции или работы вирусной ДНК-полимеразы;
- Интерфероны;

- Блокировка сорбции вируса на поверхность клетки;
- Ингибиторы протеаз (блокировка процессинга белков вируса);
- ЧАС-ы (четвертичные аммонийные основания), разрушение оболочки, но вещества ядовиты;
- Гипертермия;
- Блокировка интегрирования ДНК вируса в геном.

Гипотетические:

- Обманка. В кровь вводится вещество или материал, имеющее высокую аффинность к области вируса, ответственной за закрепление на клетке. Вирусные частицы теряют способность закрепляться и заражать клетки;
- Управляемый апоптоз (гибель клетки до продуцирования вирусов);
- Нанороботы;

Участники привели разнообразные способы борьбы с вирусной инфекцией, среди которых встречались и некоторые, не описанные в авторском решении, например вирофаги. Ошибками было упоминание антибиотиков и вакцинация. Антибиотики на вирусы не действуют, а при заражении вакцинацию делать уже поздно. Также не засчитывались профилактические меры, такие как закаливание, проветривание помещений, ватно-марлевые повязки.

5. Для решения начнём отсчёт от хронической формы заболевания. Для этого титр вируса должен оставаться постоянным, то есть в течение суток 1 частица вируса должна заражать 1 клетку. Вероятность 5%. При вероятности заражения более 5% количество вирусных частиц будет расти и вирус начнёт развиваться. При вероятности менее 5% - вирус исчезнет.

Многие участники не смогли решить этот пункт задачи. Проводились какие-то расчёты по вероятности заражения клеток, что-то определялось связанное со временем жизни вирусной частицы и клетки, но правильных ответов было немного.

6. Эффективность в 20% означает, что из каждого поколения вирусов полученного от клетки будет заражено 10 новых клеток. Это число растёт в геометрической прогрессии. Общее число клеток –  $10^9$ . Это значит, что через 9 полных циклов вся культура будет уничтожена. Один цикл – 1 час. Следовательно, потребуется 9 часов. В зависимости от стартовой точки отсчёта к исходу 9 часа будет либо полное заражение культуры (что в принципе эквивалентно уничтожению, так как вылечить заражённую клетку не получится) либо уже полный лизис.

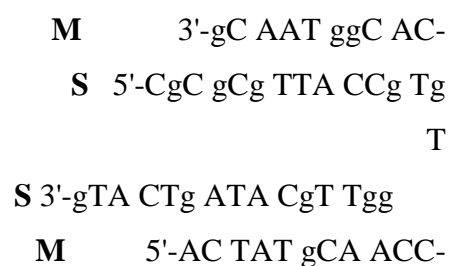
Здесь решения участников были различными. Наиболее частые неправильные ответы – 5 и 6 часов. Некоторые насчитали 23 и 70 часов. Принимались решения с указанием времени около 9 часов, например, было решение 8 часов 57 минут. Это (идеально теоретически) невозможно, так как означает, что последнее поколение вирусов будет “недоношено”. В реальности же, изменение температуры развития вируса на пару градусов вполне может к этому привести. Принимались также ответы, что через 10 часов наступит полный лизис культуры. Вообще, заражённую клетку в условиях задачи можно считать убитой, поскольку её собственные программы теперь полностью работают на вирус. Полное заражение закончится к исходу 9 часа, полный лизис – к исходу 10. Стартовая точка – заражение первой клетки.

7. Да. Вирусы не способны к самостоятельному перемещению, а агар ограничивает диффузию.

Правильных ответов на этот вопрос было мало. Чаще всего писали что нет, не учитывая, что слой агара для вирусов вообще-то непроницаем. Следовательно, колония клеток, растущая в массиве агара будет изолирована от внешней среды и полностью защищена.

## Наноконструктор из ДНК (2010, школьники, химия, повышенной сложности)

1. Причиной самосборки является термодинамически выгодное формирование структур, происходящее с уменьшением свободной энергии системы. При этом происходит образование большого количества нековалентных связей (водородных, гидрофобных контактов, стекинга), каждая из которых сама по себе дает небольшой выигрыш в энергии, но все вместе они приводят в значительным энергетическим преимуществам.
2. Из рисунка следует, что соотношение цепей L:M:S составляет 1:3:3.
3. Учитывая, что у комплементарных цепей 3' конец одной цепи взаимодействует с 5'-концом другой цепи, и внимательно рассмотрев рисунок, на котором изображено, что черные концы как бы свисают, то есть не входят в двойную спираль, можно найти следующие соответствия:

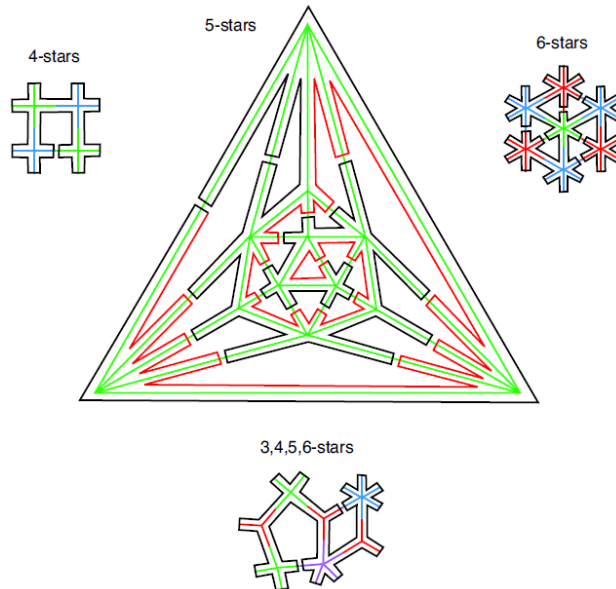
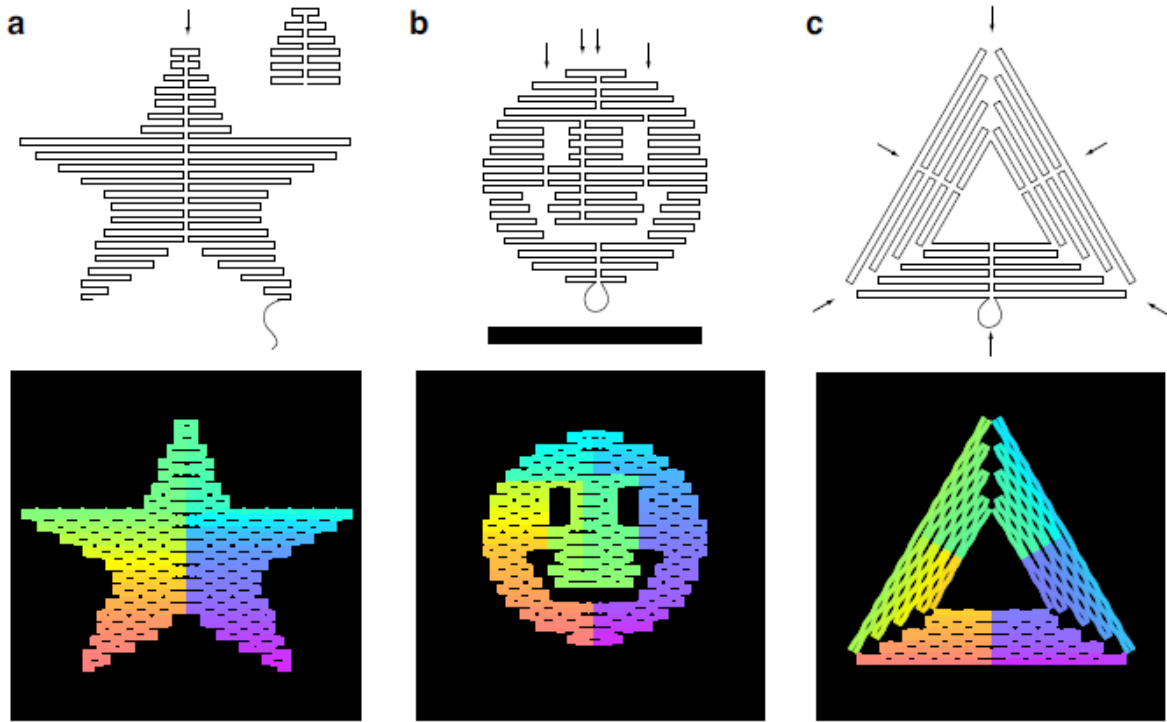


Итого 10 пар в верхнем двуспиральном участке и 11 пар в нижнем двуспиральном участке. Всего 21 основание цепи **S** участвует в образовании двойной спирали.

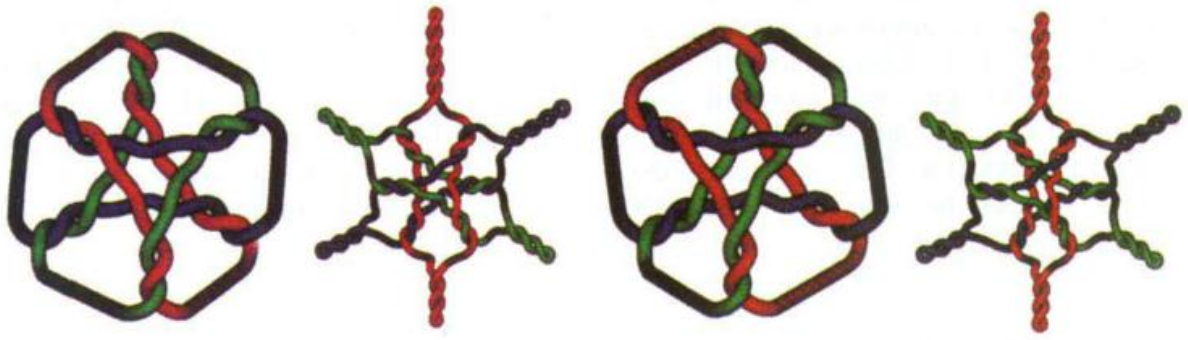
4.  $(1,8 \text{ ккал}/6,022 \cdot 10^{23}) \cdot 21 = 6,28 \cdot 10^{-20} \text{ ккал}$  или  $2,62 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$ , поскольку  $E = F \cdot L$ , где  $L = 0,33 \cdot 21 = 6,93 \text{ нм}$ , то  $F = 2,62 \cdot 10^{-19} / 6,93 \cdot 10^{-9} = 3,8 \cdot 10^{-10}$  или  $380 \text{ пН}$
5. Поскольку на рисунке указано, что длина ребра составляет 4,5 оборота спирали, то есть 45 пар нуклеотидов, и длина на одну пару составляет 0,33 нм, то  $0,33 \cdot 45 = 14,85 \text{ нм}$ . Это длина ребра без учета толщины ребра. Чтобы посчитать полную длину, нужно прибавить еще удвоенную толщину ребра, то есть  $14,85 \text{ нм} + 4 \text{ нм} = 18,85 \text{ нм}$
6. Если прибор измеряет радиус частиц в приближении сфер, значит нужно описать сферу вокруг куба и вычислить ее радиус. Диаметр сферы, описанной вокруг куба, равен его диагонали, то есть  $a\sqrt{3}$ . Длина ребра куба была посчитана в вопросе 5 и составляет 18,85 нм. Следовательно  $(18,85 \cdot \sqrt{3})/2 = 16,3 \text{ нм}$ .
7. Всего в цепи **M** 43 нуклеотида, значит ее первоначальная длина была  $43 \cdot 0,43 = 18,49 \text{ нм}$ . После образования двойной спирали расстояние между концами цепи уменьшилось и составило  $43 \cdot 0,33 = 14,19 \text{ нм}$ . Поскольку образовался куб, то двойная спираль изогнулась на угол  $90^\circ$ , причем, как видно из рисунка, изгиб приходится примерно на середину цепи **M**, следовательно, расстояние между

концами цепи равно длине гипотенузы прямоугольного треугольника с катетами, равными половине от длины двойной спирали, то есть:  $\sqrt{2} * (14,19/2)^2 = 7,095\sqrt{2} = 10,03$  нм. Следовательно, разница в длине составляет  $18,49 - 10,03 = 8,46$  нм

8. Можно создавать самые разнообразные конструкции. Вот только несколько примеров:



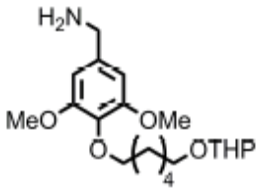
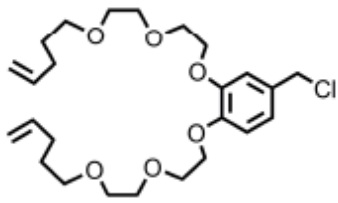
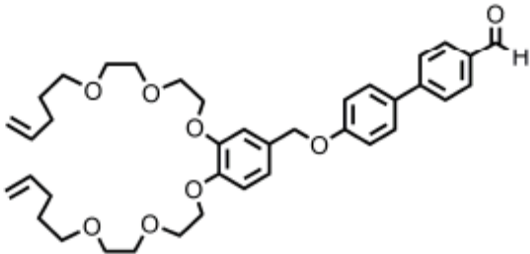
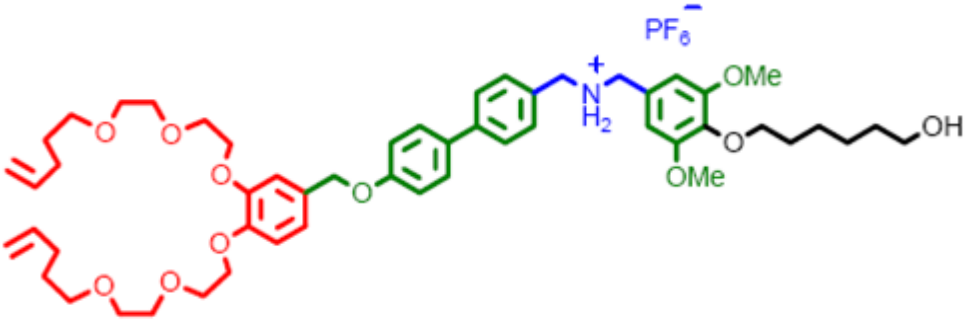
*Paul W.K. Rothemund «Scaffolded DNA origami: from generalized multi-crossovers to polygonal networks»*



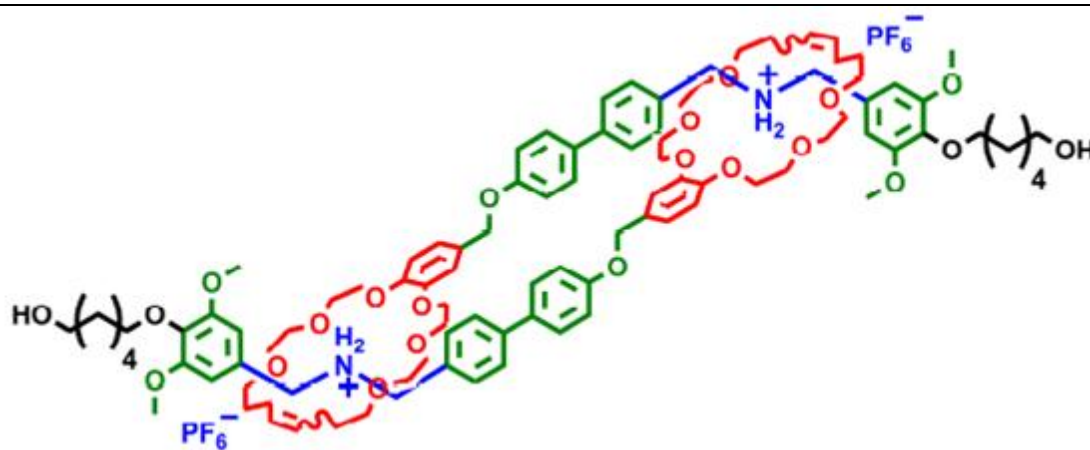
*Assembly of Borromean rings from DNA, Nature, V.386. 1997*

### Искусственные мышцы (2010, школьники, химия, повышенной сложности)

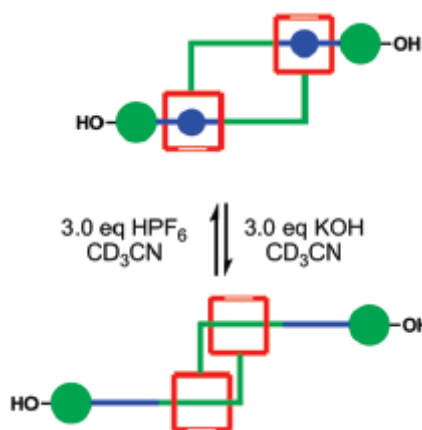
1. Проще всего относительное удлинение образца рассчитать, зная коэффициент линейного расширения железа –  $10^{-5}$ . Это означает, что при повышении температуры на 50 градусов относительное удлинение проволоки составит  $5 \cdot 10^{-4}$ , то есть 0.05%. Несмотря на то, что в технических приложениях необходимо считаться и с такими небольшими изменениями размеров, очевидно, что для конструирования искусственных мышечных волокон обычные металлы непригодны. Ротаксаны - соединения, молекулы которых состоят из цикла и открытой цепи, продетой сквозь цикл. Из-за геометрических препятствий, создаваемых объемистыми группами на концах линейной части молекулы, разъединить такую композицию без разрыва химических связей невозможно.
2. Рассуждения при расшифровке цепочки могут быть самыми разными, поэтому приведем лишь правильные структуры зашифрованных соединений.

A <sub>1</sub>		A <sub>2</sub>	
A <sub>4</sub>			
M'			

M



3. Идея: в щелочной среде аминогруппа депротонируется, и водородные связи между ней и олигооксиметиленовым фрагментом разрушаются. Схематически:



4. Из приведенной в ответе на вопрос 3 схемы очевидно, что при подкислении каждое мономерное звено будет принимать более компактную конформацию, а значит, полимерная цепочка будет укорачиваться:



5. Точная оценка может варьироваться исходя из того, принимается конформация мономерного звена предельно вытянутой или нет, считаются ли связи в первом приближении идентичными по длине, или используются индивидуальные параметры для связей каждого типа. Приблизительная оценка (исходя из числа связей, составляющих контурную длину мономера) показывает, что относительное изменение длины мономерного звена составляет около 20%. Экспериментальное определение гидродинамического радиуса дает изменения в 10%, так что самая



грубая оценка дает удовлетворительный результат с учетом того, что полимер в растворе находится не в вытянутой конформации, а в конформации клубка, и при оценке не принималась во внимание длина «связок», соединяющих отдельные звенья в полимерную цепь.

## Супергерои (2010, нанобиотехнологии и медицина)

1. Как правило, сложнее синтезировать небелковое вещество. Для его биосинтеза в организме необходим ряд белков, следовательно, задача усложняется пропорционально количеству потребных белков.

Большинство участников ответили правильно, верно описав причины, почему белок получить легче. Был также один ответ “смотря какое вещество”, который в принципе тоже может быть верным, так как нуклеиновые кислоты синтезируются ещё легче.

2. Необходимо соблюдение следующих условий:

- Толщина слоя золота порядка  $\frac{1}{4}$  длины волны падающего света (в случае использования лазера);
- Определённый угол падения света. (при отклонении – нарушение SPR, что, собственно, и является аналитическим сигналом);
- Однородность толщины слоя золота;
- Определённая длина волны (не фиксирована, но находится в жёстком соответствии пунктами 1 и 2).

На данный вопрос большинство участников не ответило. Ответившие же описали всё без ошибок.

3. AAG GAC UCC AGA UCA – некодирующий участок  
AUG – старт кодон

GGC	ACA	CCC	UGG	UUG	CCC	UAU	UUU	GGA	GCU	GCC	UGG	GUG
Gly	Thr	Pro	Trp	Leu	Pro	Tyr	Phe	Gly	Ala	Ala	Trp	Val

UAG – стоп кодон

CAA CUC UUG CCC AUA AAA AAA AAA – некодирующий участок

Аминокислотная последовательность:

Глицин-Треонин-Пролин- Триптофан-Лейцин-Пролин-Тирозин-Фенилаланин-Глицин-Аланин-Триптофан-Валин

или Gly-Thr-Pro-Trp-Leu-Pro-Tyr-Phe-Gly-Ala-Ala-Trp-Val (GTPWLPYFGAAWV)

Это задание оказалось очень сложным и правильно с ним справились лишь немногие участники, хотя решать его пытались почти все. В данной РНК были включены старт- и стоп-кодона и, соответственно, имелись некодирующие участки. Большинство участников их не распознало и привело полную расшифровку всей цепочки, что было неверно.

4. Наиболее удобный способ иммобилизации белка на золото – это введение тиольного якоря. Лучше всего для этого подходит аминокислота цистеин. Так как известно, что специфический участок находится на конце аминокислотной последовательности, то на начало этой последовательности необходимо ввести цистеин.

Это можно сделать двумя подходами:

1. Замена аминокислоты на цистеин; 2
2. . Добавление в начало цепочки последовательности, кодирующей цистеин.

Для данной задачи очень удобна замена аминокислоты

Первый кодон – GGC, кодирует глицин. Цистеин кодируется триплетом UGC. Значит, необходимо заменить первую букву (G) на (U).

Для этого лучше всего подходит олигонуклеотид-направленный мутагенез с использованием ПЦР-амплификации.

Действие первое – обратная транскрипция. Необходимо, чтобы получить из РНК – ДНК. РНК не пригодна для амплификации ПЦР напрямую.

Действие второе – подбор парных праймеров, полностью комплементарных участкам, кодирующим некодирующий фрагмент и старт-кодон и 2-6 аминокислоты, но с различием на 1 букву (которую требуется заменить) на 1 аминокислоте.

Действие третье – ПЦР.

Более детальная схема чуть сложнее, но принцип сохраняется.

Добавление цепочки, кодирующей цистеины (несколько штук) после старт-кодона. Осуществляется действием соответствующих рестриктаз и лигаз, либо созданием нового гена.

Этот пункт пытались решить немногие. Из приведённых решений описываемые подходы чаще всего верны, но основная ошибка – модификация не того конца аминокислотной последовательности, что приведёт к полной потере необходимых свойств. Сложнее всего было тем, кто пытался применить постсинтетическую химическую модификацию белка. Как правило, это очень тяжело сделать специфически. Данные решения оценивались в часть баллов.

5. На поверхности чипа должны быть расположены упорядоченные выступающие участки золота, типа закреплённых пирамидок, размерами порядка  $n \cdot 10$  нм.

С данным пунктом справились почти все. Основная ошибка – не указание размерности участков золота, что является важным условием реализации СППП.

б. Методов может быть много. Это и иммобилизация золотых наночастиц, и формирование структуры типа фотонного кристалла с упорядоченным заполнением пространства между частицами и последующим травлением матрицы, и плазменно-химическое травление по шаблону. Может, даже что-то типа “нанопечати”.

Немногие решавшие этот пункт участники всё указали верно, и грубых ошибок не было. Некоторые неточности имелись в предложенных схемах получения наночастиц. Например, распыление золота в электродуговом разряде приводит к широкому разбросу по размеру частиц, что непригодно для СПП.

## **Нанодиагностика (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

Методами, позволяющими регистрировать наличие определенных молекул в исследуемом образце в субмикромольных концентрациях, являются спектроскопия и микро-спектроскопия локального поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) (Local Surface Plasmon Resonance spectroscopy, LSPRS) и спектроскопия и микро-спектроскопия гигантского (или поверхностно-усиленного) комбинационного рассеяния (ГКР) (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS). Оба метода основаны на использовании эффекта плазмонного резонанса, существующего на поверхности наночастиц (НЧ) или наноструктур (НС) тонких подложек, сделанных из благородных металлов (обычно используют золото или серебро).

Спектроскопия ЛППР основана на регистрации изменений спектров поглощения, пропускания или отражения серебряных или золотых наночастиц или наноструктур подложек при сорбции на них молекул. Сорбция любых молекул на поверхность НЧ Ag, Au или НС Ag, Au приводит к изменению локального показателя преломления на поверхности НЧ или НС, в результате чего изменяется локальное электро-магнитное поле и сдвигается максимум поглощения (пропускания или отражения, в данном случае, что более удобно регистрировать) в спектре поглощения (пропускания или отражения) НЧ Ag, Au или НС Ag, Au. Для того, чтобы получить селективность во взаимодействии НЧ и НС с теми молекулами, которые надо обнаружить в образце, необходимо модифицировать поверхности НЧ и НС веществами, избирательно связывающими исследуемые молекулы. В спектроскопии ГКР исследуемая молекула должны быть сорбирована на поверхности НЧ Ag, Au или НС Ag, Au, в результате чего за счет плазмонного резонанса происходит многократное усиление падающего излучения и комбинационного рассеяния молекулы. Поскольку спектр КР уникален для каждой молекулы, то при правильно подобранных условиях по спектрам поверхностно-усиленного КР можно установить, какие молекулы находятся в образце даже при их субмикромольных концентрациях.

1. Основная идея – использовать спектроскопии ЛППР или ГКР с наночастицами или наноструктурными поверхностями из серебра или золота. В случае ЛППР поверхности НЧ и НС должны быть модифицированы для селективного связывания антитела и пр. Поверхность колонки, через которую пропускают образец плазмы крови или экстракт из тканей, взятых биопсией, можно покрыть наночастицами Ag или Au, которые на себе будут нести антитела к тем антителам или другим белкам, которые нужно обнаружить. До и после пропускания через колонку исследуемого образца регистрируют спектры отражения и определяют сдвиг положения максимума плазмонного резонанса. Другой вариант –

использовать подложки с наноструктурами из золота или серебра с пришитыми антителами к белку, который надо обнаружить. Другой возможный вариант – это использовать спектроскопию ГКР: на подложку с наноструктурами Ag или Au, помещенными, например, в чашку Петри, нанести плазму крови или экстракт из ткани. Спектр ГКР будет соответствовать колебаниям связей в молекулах, присутствующих в пробе. Необходимо заранее иметь “стандарты” - набор спектров ГКР, которые присущи “здоровым” пробам – и по ним сравнивать спектры исследуемого образца. При правильно подобранных условиях эксперимента при наличии в образце нового антитела или неспецифического/патологического белка в спектре ГКР будут появляться новые полосы. Преимущество спектроскопии ГКР перед спектроскопией ЛППР в данном случае является отсутствие необходимости модифицировать поверхность наночастиц или наноструктур подложки, а недостатком – более сложный анализ данных.

2. При канцерогенезе на ранних стадиях патологий будут изменяться интенсивность синтеза белка и пролиферативная активность клеток, а также будет изменяться белково-липидный состав мембран, в первую очередь, плазматической мембраны. Изменение структуры, состава и физико-химических свойств плазматической мембраны и ее подмембранных областей наблюдаются и при других патологиях клеток. Кроме того, при большинстве патологий происходит изменение функционального состояния и (иногда) морфологии митохондрий. Следовательно, надо подбирать методы, которые чувствительно и, желательно, неинвазивно, могут оценивать перечисленные свойства клеток. Например, для того, чтобы обнаружить изменение белкового состава плазматической мембраны клеток, можно использовать спектроскопию ГКР. Клетки помещаются на подложки с серебрянными или золотыми наноструктурами и, вследствие плазмонного резонанса, усиление сигнала КР будет идти от молекул плазматической мембраны и тонкой подмембранной области. Спектр ГКР патологических клеток с другим составом белков в плазматической мембране будет отличаться от спектра ГКР здоровых клеток. Для дискриминации здоровых и больных клеток может использоваться традиционная микро-спектроскопия КР, позволяющая получать КР-изображения клеток – спектры КР в каждой точке клетки. Поскольку белковый синтез в патологических клетках будет изменен, то и общий вид их спектров КР будет отличаться от спектров нормальных клеток.
3. Поскольку дискриминация клеток ведется во время хирургической операции, необходимо, чтобы предложенный метод был: (1) неинвазивным и не повреждал

клетки и (2) быстрым и при этом эффективным. Возможный вариант – создание специальных оптических зондов с маленьким диаметром, чтобы в реальном времени зонд можно было подвести к оперируемому участку органа и “просканировать” его – получить спектры клеток и по имеющимся спектрам-стандартам отличить здоровые клетки от больных (раковых или др.патологических). Вариантами таких зондов могут быть: ЯМР(ядерно-магнитный резонансный)-зонд, регистрирующий спектры ЯМР клеток и зонд с гигантским КР на кончике (англ. tip-enhanced Raman). Во втором случае (зонд с гигантским КР на кончике) поднесение зонда на расстояние 20-30 нм от поверхности клеток будет происходить многократное усиление сигнала КР от молекул клеточных поверхностей и по сравнению спектров-стандартов для здоровых клеток можно будет отличить здоровые клетки от больных. Отметим, что ЯМР-зонд уже используется в одном из клинических госпиталей во Франции.

### **Миграция энергии (2010, нанобиотехнологии и медицина)**

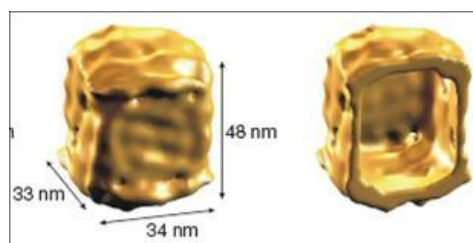
1. В первом случае увеличится интенсивность флуоресценции GFP, во втором увеличится интенсивность флуоресценции YFP, а интенсивность флуоресценции GFP снизится, поскольку GFP станет донором энергии для квантовой точки.



## Наногеометрия (2010, нанобиотехнологии и медицина)

1. Эта биомакромолекула – длинная цепь ДНК, которую скрепляют при помощи коротких синтетических олигонуклеотидов, придавая желаемую форму. Ее цепочки по правилам комплементарности самопроизвольно складываются в нужные структуры, если задана соответствующая первичная последовательность нуклеотидов. Фотография взята с сайта Нанометр, см. также источники 1-5.
2. Принцип формирования этой структуры – самопроизвольная складывание структуры при взаимодействии различных участков цепочки ДНК по правилам комплементарности, причем происходит самопроизвольная складывание повторяющихся фрагментов определенной длины, одни из которых комплементарны другим. Складывание такой структуры может происходить в растворе самопроизвольно за счет теплового движения молекул или при перемешивании или встряхивании.
3. Во-первых, это особенности строения ДНК, а именно способность к образованию двойной спирали, комплементарность и антипараллельность цепей ДНК при формировании двойной спирали ДНК. Во-вторых, это особая первичная последовательность нуклеотидов, обеспечивающее такое взаимодействие цепей ДНК, которое приводит к формированию именно такой пространственной структуры. В данном случае, это особое расположение в составе одной цепи ДНК повторяющихся фрагментов определенной длины, одни из которых комплементарны другим.
4. Создание таких структур возможно при использовании комплекса методов нанобиотехнологий, называемых ДНК-оригами. Собирают эту конструкцию из одной длинной молекулы ДНК, которую скрепляют при помощи коротких синтетических олигонуклеотидов, придавая желаемую форму. В качестве длинной ДНК ученые выбрали ДНК бактериофага M13: это кольцевая одноцепочечная ДНК длиной 7349 нуклеотидов. Сборка шкатулки осуществляется последовательно. Сначала добавляют те олигонуклеотиды, которые помогают сформировать грани. Затем эти грани соединяют друг с другом при помощи другого набора фрагментов ДНК (см. рисунки 1 и 2 из статьи Л.А. Трусова "Наношкатулки"). При этом можно «сшить» не все грани, оставив одну (или даже две) в качестве крышки для наношкатулки (см. рисунок 3 из статьи Л.А. Трусова "Наношкатулки"). Самое сложное - это правильно подобрать последовательности олигонуклеотидов (это делается при помощи специальной программы для компьютера), остальное происходит "само собой".

5. Для доставки лекарственных веществ, белков и генетических конструкций в определенные клетки с целью их уничтожения или терапии.
6. Схема создания наноскатулки (рис. 2). (а) ДНК бактериофага M13; (b) после добавления первой порции олигонуклеотидов формируются прямоугольники боковых граней, (c) которые затем при помощи второй порции олигонуклеотидов собираются в наноскатулку.



*Рис. 1 - Объект, представленный на фотографии (слева – вид «спереди», справа – вид в разрезе), получен путем самопроизвольного «сворачивания» биомакромолекулы в растворе (из условия задачи)*



*Рис. 2 - Схема создания наноскатулки. (а) ДНК бактериофага M13; (b) после добавления первой порции олигонуклеотидов формируются прямоугольники боковых граней, (c) которые затем при помощи второй порции олигонуклеотидов собираются в наноскатулку.*

7. С помощью технологии ДНК-оригами можно создавать самые разнообразные плоские и объемные фигуры, в том числе весьма сложные структуры: смайлики, контур Америки, звездочки [5], дельфины [6], и даже герб Украины [7], ну и конечно вышеописанную коробочку или шкатулку [1,2] и другие объемные структуры [3,4] В скобках указаны источники информации.

## Нановизуализация (2010, нанобиотехнологии и медицина)

1. На фотографии слева – красный флуоресцентный белок (максимум поглощения - 557 нм, максимум испускания – 585 нм), на фотографии справа – флуоресцентный краситель Cy5.5 (максимум поглощения - 675 нм, максимум испускания – 694 нм).
2. Синтез красного флуоресцентного белка (RFP) в трансгенных опухолевых клетках человека, имплантированных в мышь, осуществляется так же, как и синтез всех других белков, т.е. посредством процессов транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации белка. Место синтеза RFP – клетки рака молочной железы человека линии MDA-MB-435. Синтез флуоресцентного красителя Cy5.5 осуществляется посредством химического синтеза на химическом заводе или в химической лаборатории.
3. Для того, чтобы ввести RFP мышам, сначала с помощью методов генетической инженерии (конструирование RFP-экспрессирующего вектора, трансфекция опухолевых клеток этим вектором) ввели ген белка в культивируемые клетки рака молочной железы человека линии MDA-MB-435, затем эти клетки, экспрессирующие RFP, имплантировали в жировую ткань мыши, где они сформировали опухоль. Флуоресцентный краситель Cy5.5 ввели мышам в составе наночастиц сложного строения, представляющим собой конъюгат магнитных наночастиц с молекулой Cy5.5 и пептидом ERPT, способным специфически связываться с опухолевым антигеном uMUC-1. При внутривенном введении этой наноконструкции мышам с моделью рака груди, полученной путем имплантации в жировую ткань мыши uMUC-1-позитивных клеток аденокарциномы груди человека линии BT-20, наночастицы специфически аккумулировались в опухоли посредством механизма направленной доставки с помощью лиганда направленной доставки пептида ERPT.
4. а
5. На фотографии слева – рак груди был смоделирован посредством имплантации в жировую ткань трансгенной мыши (с экспрессией в тканях зеленого флуоресцентного белка) клеток рака молочной железы человека линии MDA-MB-435. На фотографии справа – рак груди был смоделирован посредством имплантации в жировую ткань мыши клеток аденокарциномы груди человека линии BT-20.
6. Метод визуализации опухоли с помощью RFP нельзя использовать для диагностики опухоли, т.к. RFP экспрессируется только в трансгенных клетках или организмах. Метод визуализации опухоли с помощью введения наночастиц,

конъюгированных с флуоресцентными метками и лигандами направленного действия имеет большие перспективы как метода диагностики опухолевых заболеваний, но в клинике пока не используется.

7. Квантовые точки Qdot® 525, Qdot® 585 и Qdot® 655 с максимумами излучения, соответственно, 525, 585 и 655 нм.
8. Тубулиновые микрофиламенты в цитоплазме (зеленый цвет), структуры аппарата Гольджи (желтый цвет), ядро (красный цвет).
9. Тубулин (зеленый цвет), гиантин (желтый цвет), нуклеосома (структура, включающая часть двойной цепи ДНК и комплекса белков-гистонов) (красный цвет).
10. Благодаря тому, что квантовые точки были конъюгированы со вторичными антителами, которые специфически связывались с предварительно добавленными первичными антителами к соответствующим антигенам. Эти системы представляют собой: 1) крысиные анти- $\alpha$ -тубулин антитела, биотин-конъюгированные козы анти-крысиные IgG антитела и Qdot® 525 квантовые точки, конъюгированные со стрептавидином (зеленый цвет); 2) кроличьи анти-гиотин антитела и Qdot® 585 квантовые точки, конъюгированные с козьими F(ab')<sub>2</sub> анти-кроличьими IgG антителами (желтый цвет); 3) мышьиные анти-нуклеосома антитела и Qdot® 655 квантовые точки, конъюгированные с козьими F(ab')<sub>2</sub> анти-мышьиными IgG антителами (красный цвет).
11. Наноантитела, пептиды, лектины, трансферрин и др.
12. Наноантитела – преимущества: специфическое узнавание, компактность как лигандов для направленной доставки, меньшая иммуногенность; недостатки: очень сложная и дорогая технология получения. Пептиды – преимущества: компактность как лигандов для направленной доставки, относительная простота получения; недостатки: меньшая по сравнению с антителами селективность, иммуногенность. Лектины - преимущества: меньшая иммуногенность, высокая специфичность, компактность как лигандов для направленной доставки, относительная простота получения; недостатки: узкая направленность на узнавание полисахаридов. Трансферрин - преимущества: меньшая иммуногенность, высокая специфичность; недостатки: ограниченность функциональности только в пределах системы Трансферрин–трансфериновый рецептор.

## Наномедицина – фокус на акромегалию (2010, нанобиотехнологии и медицина)

1. Традиционными методами лечения акромегалии являются: хирургический подход (удаление опухоли гипофиза), рентгенотерапия (облучение гамма-лучами либо протоновым пучком искомой области гипофиза), применение гормональных препаратов, уменьшающих выработку соматотропного гормона (в частности, агонисты дофамина).
  2. Средняя молекулярная масса аминокислотного остатка в типичном белке равна 109-115 г/моль. Отсюда в главной изоформе гормона роста должно быть 191-201 аминокислотных остатков. Число аминокислотных остатков в соматотропном гормоне в действительности составляет 191, находясь в рамках рассчитанного интервала. Следует отметить, что принимались только оценочные расчеты; приведение точного числа аминокислотных остатков в гормоне, изъятые из литературных данных, баллами не премировалось.
  3. Возможными механизмами образования двух изоформ белка, кодируемого одним геном, могут служить:
    - постранскрипционные модификации (например, гидролитическая модификация цитозина до уридина с формированием стоп-кодона);
    - посттрансляционные модификации (например, альтернативный сплайсинг, как в случае соматотропного гормона).
- Полным баллом оценивались ответы, в которых участники предлагали возможные пути образования двух изоформ белкового продукта, а не предоставляли исключительно данные веб-серфинга.
4. Мономерный фрагмент полиэтиленгликоля  $-CH_2-CH_2-O-$  имеет молекулярную массу 44 г/моль. Соответственно, масса полимерного фрагмента полиэтиленгликоля со степенью полимеризации 5000 составляет 220 кДа. Тогда число сайтов пегилирования составляет  $(1120-22)/220 \approx 5$ . Следует отметить, что число сайтов пегилирования варьирует между 4-6 (так что полученное значение – даже без округления – можно рассматривать как среднее значение).
  5. Свободная аминогруппа в боковом радикале есть только у одной канонической аминокислоты – лизина (глутамин и аспарагин содержат амидные группы, аргинин – гуанидиновый фрагмент). Число пегилированных аминокислотных остатков лизина равно 4, тогда как сайтов пегилирования – 5. Это означает, что пегилирование происходит также по N-концевой аминокислоте, содержащей интактную аминогруппу.

6. Вопрос исходно создавался для отлова ответов, построенных на бессмысленном поиске информации в литературных источниках. Сравнить пегвисомант и соматотропный гормон с клинической или физиологической точки зрения не представляется возможным, так как первое соединение является антагонистом, используемый при высокой скорости биосинтеза второго белка. Можно только сопоставить фармакокинетические и фармакодинамические параметры двух препаратов, учитывая их генерическую схожесть, но не более.

## Нанотоксичность (2010, нанобиотехнологии и медицина)

1. Наночастицы могут попадать в организм различных групп населения, в частности пациентов, получающих диагностические и лекарственные препараты, разработанные с позиций наномедицины, или исследователей, разрабатывающих новые наноматериалы. Существует несколько путей поступления наночастиц в организм человека: внутривенный, трансдермальный, подкожный, ингаляционный, внутрибрюшинный и пероральный.
2. Наночастицы меди взаимодействуют с соляной кислотой, находящейся в просвете желудка с образованием ионов меди (II). Снижение содержания соляной кислоты в желудке приводит к усилению ее синтеза париетальными клетками желудка. При этом клеткам приходится в большем количестве поставлять гидрокарбонат ион в кровотоки в обмен на хлорид ионы, что приводит к увеличению рН крови и развитию метаболического алкалоза (см. Рис.1.). Свою лепту вносит также нефротоксичный эффект ионов меди (II), обуславливающий нарушение экскреции ионов аммония и гидрокарбонат-ионов.

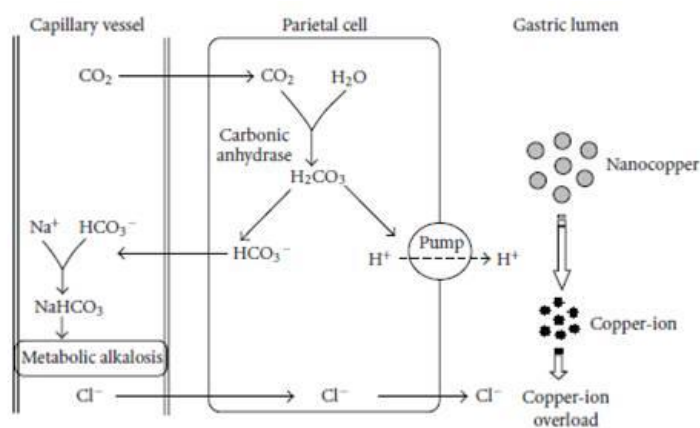


Рис. 1

3. Частицы меди диаметром 17 мкм имеют V класс токсичности (практически безвредные вещества) при приеме per os. В то же время наночастицы меди диаметром 23,5 нм оказывают среднетоксическое действие (класс III по рассматриваемой шкале) на организм подопытных животных.
4. Средняя смертельная доза токсического вещества – это экспериментально получаемый параметр (путем прямого токсикологического опыта). Любые теоретические зависимости, построенные только на двух экспериментальных значениях  $\text{LD}_{50}$ , будут носить исключительно грубый оценочный характер (проще говоря: можно оценить, но не рассчитать точное значение). К оценке принимались любые здравые идеи, включая нахождение в литературных источниках

токсичности самих ионов меди (II), использование логарифмических координат и прочее.

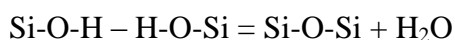
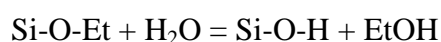
5. Каноническими аминокислотами, имеющими идентичное молярное соотношение углерода, кислорода, азота и водорода, являются пары цистеин и селеноцистеин; изолейцин и лейцин. Представить характер взаимодействия серебра с боковыми алкильными радикалами лейцина и изолейцина не представляется возможным. В то же время схожими химическими свойствами обладают боковые радикалы остатков цистеина и селеноцистеина (X и Y), отсутствие модификации которых критически важно для утилизации активных форм кислорода. Понятно, что необходимо выбрать из небольшого спектра селенсодержащих белков те, что участвуют в процессах предотвращения перикисного окисления липидов: это глутатионпероксидаза и тиоредоксинредуктаза.



## **Нанокapsулы для доставки лекарств» (2010, нанобиотехнологии и медицина, повышенной сложности)**

Многие современные противораковые препараты высокотоксичны, поэтому необходима адресная доставка этих препаратов непосредственно в клетки опухоли; это позволяет избежать повреждения здоровых тканей и проявления побочных эффектов. Недавно было разработано элегантное наноразмерное устройство, позволяющее высвободить модельное соединение в ответ на изменение pH окружающего раствора (рис. 1). Лекарство загружается в мезопористые частицы оксида кремния (диаметр частицы около 130 нм). Поры на поверхности затем закрываются специальными наноклапанами, которые открываются и позволяют лекарству диффундировать наружу лишь при определенном значении pH. Сами частицы нецитотоксичны и легко поглощаются лизосомами клетки.

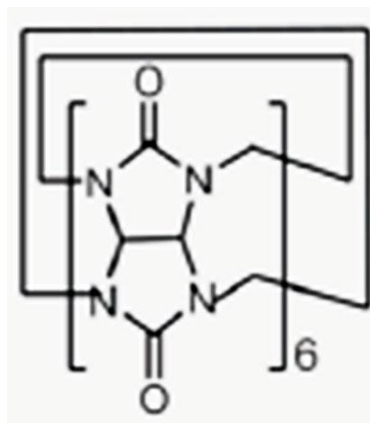
1. Наночастицы оксида кремния получают из ТЭОС в результате комбинации параллельно протекающих процессов гидролиза и конденсации:



ПАВ (цетилтриметиламмоний бромид) в основном выполняет порогенную функцию, способствуя образованию нанокapпель водной фазы в частице оксида кремния.

2. Размер пор определяется размером мицелл, которые образует темплат – ПАВ. Использованный цетилтриметиламмоний бромид в зависимости от условий образует мицеллы с радиусом от 1 до 100 нм, в этих пределах может варьироваться и размер пор в образующемся оксиде кремния. Наноклапан представляет собой сложную ротаксаноподобную систему. На поверхность частицы оксида кремния прививается специальный линейный аминоксодержащий фрагмент, на который насаживается подвижная часть клапана – молекула циклического строения. При движении по линейному фрагменту эта молекула либо блокирует поры, располагаясь вблизи поверхности частицы, либо открывает их, перемещаясь на периферийную часть стержня (рис. 2). Линейный фрагмент имеет строение, представленное на рис. 3.
3. В структуре линейного фрагмента имеются две алифатические и 1 ароматическая аминоксодержащие группы. Разница в их кислотностях позволяет титровать алифатический и ароматический амин отдельно, но два алифатических амина титруются совместно. Соответственно, на кривой титрования будут наблюдаться два скачка, причем соотношение объемов титранта в точках эквивалентности составляет 2:1.

4. Искомую структуру фрагмента можно представить так как это дано на рис. 5. В соединении имеются два типа протонов, которые в ПМР спектре дадут отдельные сигналы, причем соотношение их интенсивностей определяется соотношением числа соответствующих протонов ( $2:4 = 1:2$ ) Авторы приносят свои извинения за ошибки, допущенные в формулировке этого вопроса. В результате правильный ответ на вопрос 4 не совпадает со структурой соединения, использованного в оригинальной работе. Тем не менее, вопрос даже в ошибочной формулировке имеет решение, которое и будет оценено. Идея задачи не пострадала. Переключение наноклапана между открытым и закрытым положениями происходит за счет образования и разрушения водородных связей между линейным «стержнем» и подвижным фрагментом. Принимая во внимание, что при  $\text{pH} < 4-5$  клапан открыт, при 4-5.



*Рис. 5 - искомая структура фрагмента*

5. В нейтральной и слабокислой среде протонированы алифатические амины, и именно с ними связывается подвижный циклический фрагмент. При подкислении протонируются все три аминогруппы, но то, что клапан открыт, указывает на то, что связывание предпочтительно происходит с ароматической аминогруппой и центральной алифатической. (Примечание – причина этого в оптимальном расстоянии между ароматической и центральной аминогруппами по сравнению с расстоянием между алифатическими аминогруппами). Схематически переходы при изменении  $\text{pH}$  авторы работы изображают так это дано на рис. 6. Отметим, что в сильнощелочной среде, когда депротонированы все три аминогруппы, подвижная часть полностью снимается со стержня. Обратимость этого процесса – под вопросом (см. рис. 7).

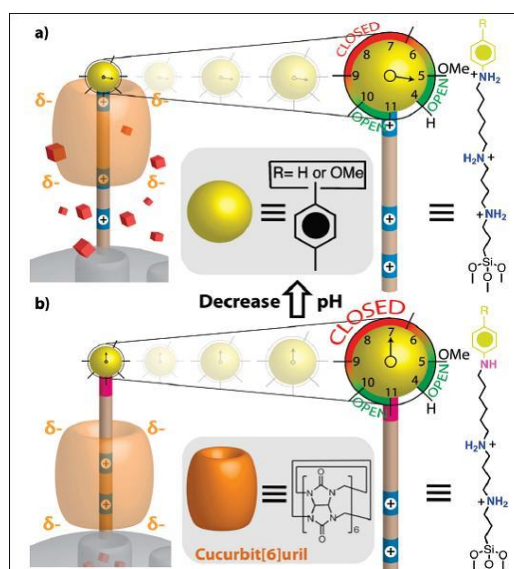


Рис. 6 - Схема переходов при изменении рН

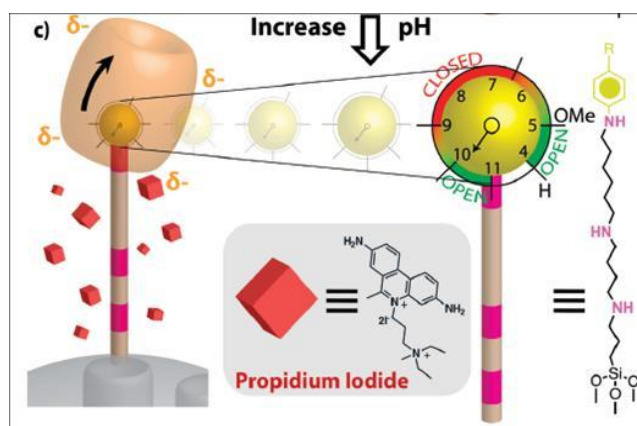


Рис. 7 - в сильнощелочной среде, когда депротонированы все три аминогруппы, подвижная часть полностью снимается со стержня.

6. Верхняя из границ (10-11) соответствует условию, при котором происходит полное депротонирование аминогрупп и разрушение системы клапана. Происходит это, как видно из схем выше, при депротонировании алифатических аминогрупп, так как в нейтральной среде ароматическая аминогруппа уже депротонирована. С другой стороны, рН 4-5 соответствует границе, ниже которой протонируется ароматическая аминогруппа и происходит обратимое открытие клапана. Изменение природы заместителя в ароматическом ядре влияет на кислотность ароматической аминогруппы и сдвигает эту границу.
7. Сдвиг центральной алифатической аминогруппы по цепи приводит к тому, что в новой структуре стерически более выгодно связывание подвижной части с парой алифатических аминогрупп, а не с ароматической и центральной. Соответственно, в нейтральной среде клапан будет закрыт (ароматическая аминогруппа депротонирована, и связывание с ней невозможно), в кислой – также закрыт (хотя

ароматическая аминогруппа и протонирована, связывание с ней невыгодно по геометрическим соображениям), а в щелочной среде клапан будет разрушен (все аминогруппы депротонированы, связывание с ними невозможно). С точки зрения доставки лекарства клапан будет открыт.

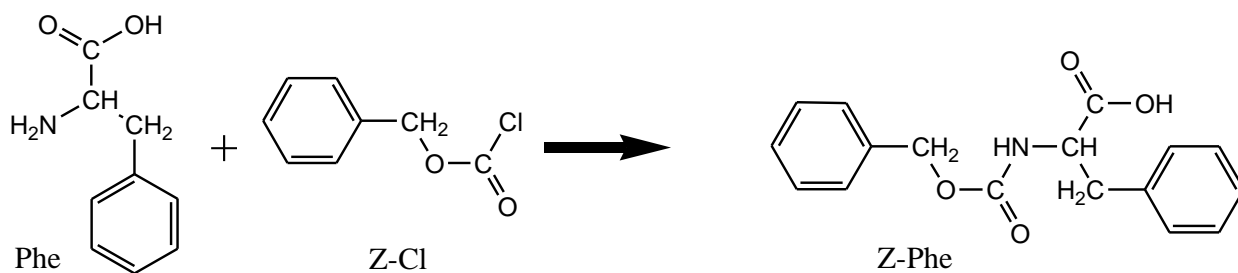
## Пептидные нанотрубки (2010, нанохимия и функциональные наноматериалы)

1. Чтобы получить дипептид из двух разных аминокислот, нужно защитить те функциональные группы, которые не должны взаимодействовать. Таким образом, общая стратегия синтеза такова:

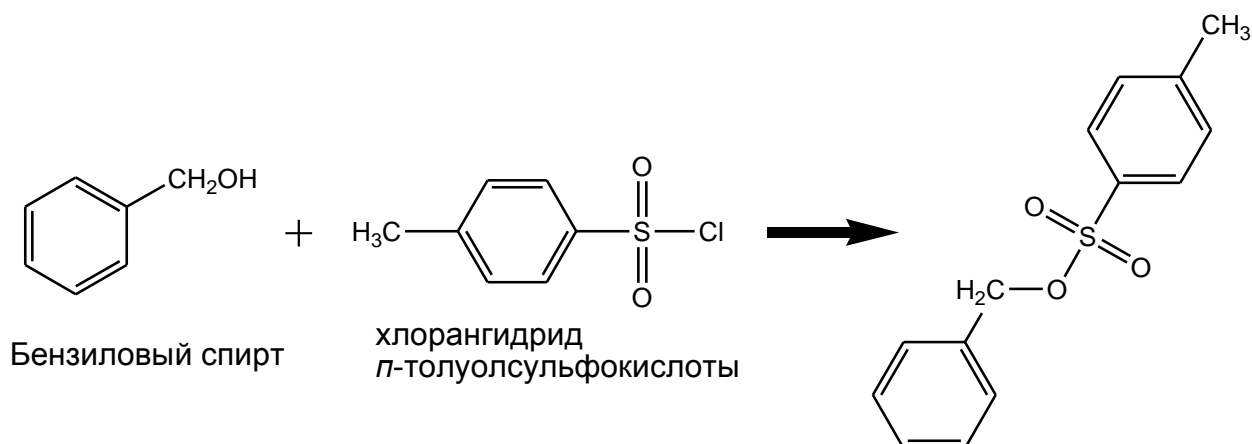
- 1) защита аминогруппы фенилаланина
- 2) защита карбоксильной группы триптофана
- 3) образование пептидной связи
- 4) снятие защитных групп

И в данном случае защиты лучше ставить однотипные, чтобы потом в конце синтеза их сразу снять, в одну стадию. Поэтому лучше использовать карбобензокси-защиту для аминогруппы фенилаланина и бензильную для карбоксильной группы триптофана. Кроме того, этот вариант предпочтительнее еще и потому, что боковой радикал триптофана неустойчив в кислой среде, а обе перечисленные защиты легко снимаются каталитическим гидрированием. Поэтому схема синтеза выглядит следующим образом:

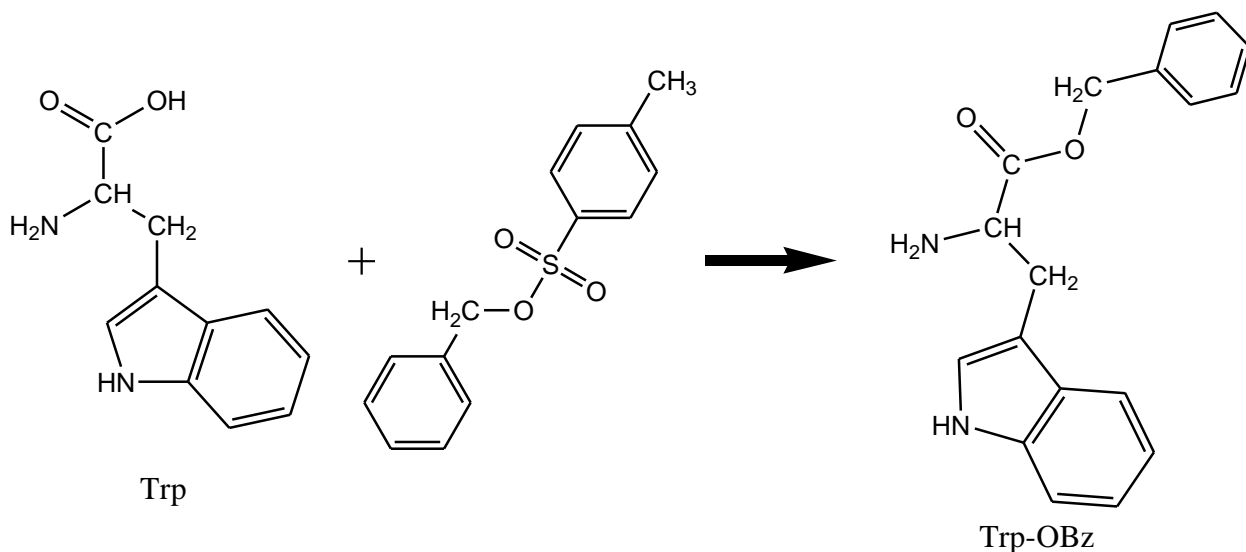
Первая стадия – защита аминогруппы фенилаланина:



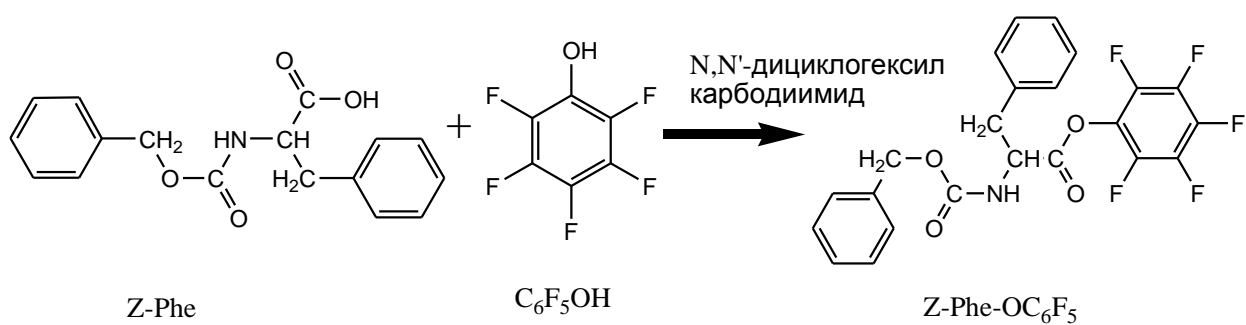
Дальше, для защиты карбоксильной группы триптофана лучше поступить следующим образом. Сначала приготовить сложный эфир *p*-толуолсульфонокислоты:



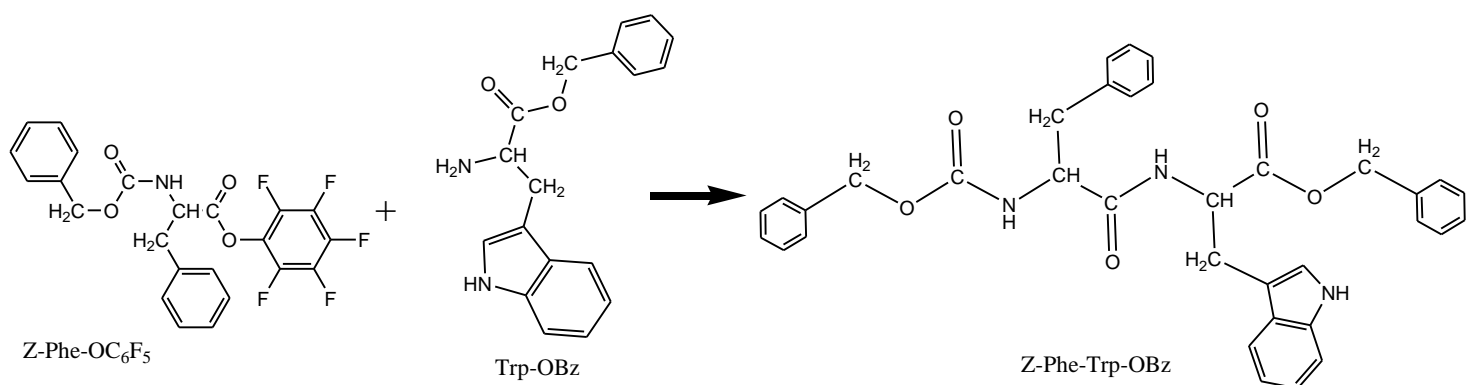
а уже потом проводить реакцию с триптофаном:



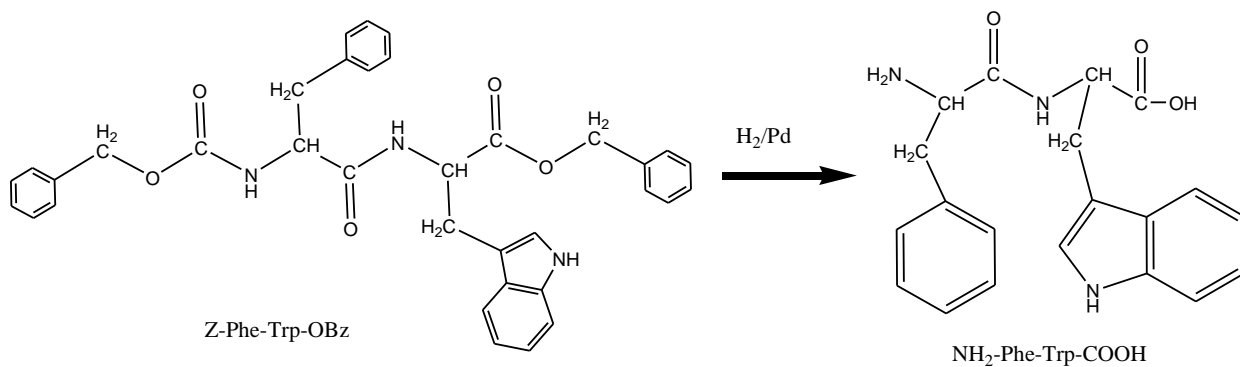
Третья стадия – активация карбоксильной группы фенилаланина, образование активированных эфиров:



Затем проводят конденсацию



И последняя стадия – снятие защитных групп



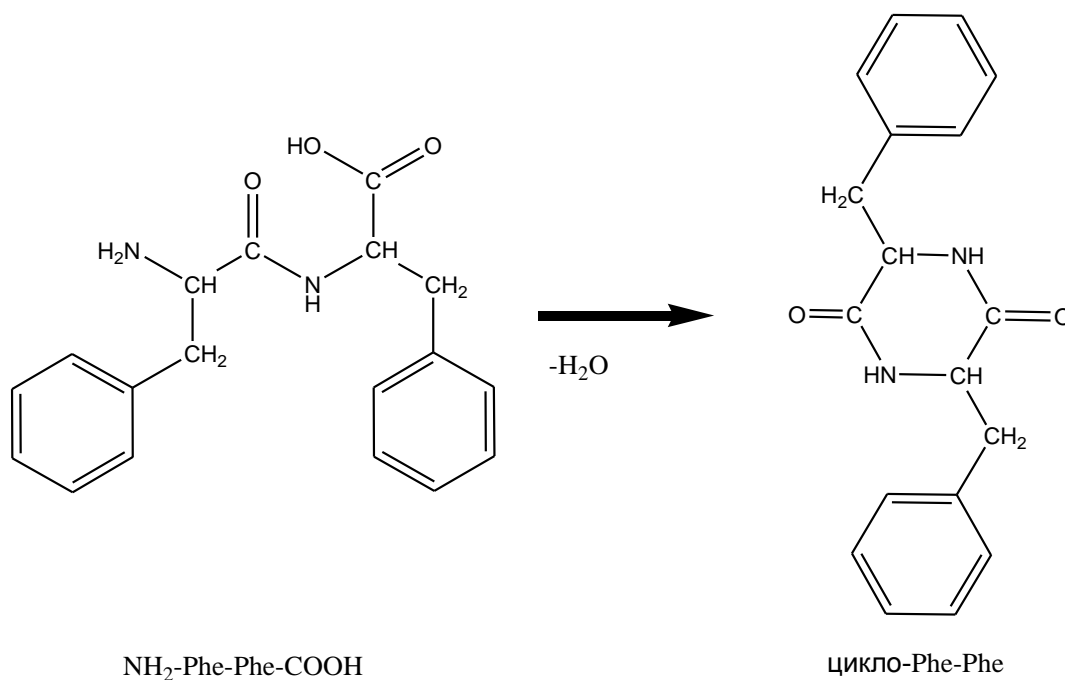
2. Посчитаем молекулярную массу дифенилаланина:

$$165 \cdot 2 - 18 = 312,36$$

Масса, которую нам дает спектр

$$312 - 294 = 18$$

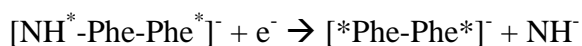
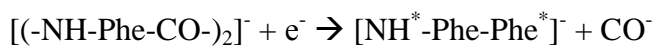
очень похожа на то, что от дипептида отняли воду. Это могло случиться только в случае, если произошла внутримолекулярная конденсация amino- и карбоксильной групп:



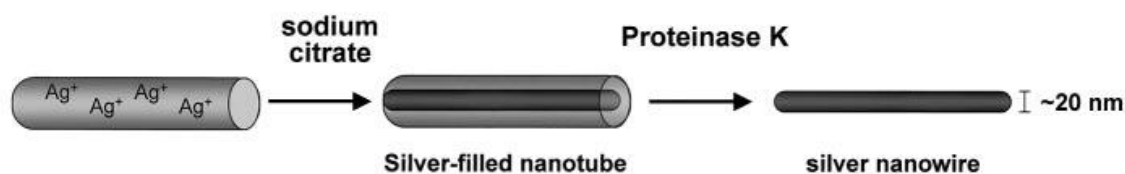
Сигнал при 203 m/z соответствует веществу, когда от цикла отрывается один бензильный радикал:



Сигналы при 266 и 251 m/z соответствуют веществам, полученным при следующих превращениях:



- Причиной самосборки является образование большого количества нековалентных связей а именно водородных связей между группами C=O и N-H (энтропийный эффект), гидрофобных контактов (энтропийный эффект растворителя), а также стекинга, то есть перекрывания  $\pi$ -электронных облаков, между ароматическими кольцами фенилаланина (энтальпийный эффект). Каждая из этих типов связей сама по себе дает небольшой выигрыш в энергии, но все вместе они приводят в значительным энергетическим преимуществам.
- В данном случае хорошо подходит метод просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с прокрашиванием уранилацетатом, или каким-то другим тяжелым металлом. Поскольку уранилацетат проникает внутрь нанотрубок, это и означает, что это трубка (то есть полая внутри) и у нее открыты концы, через которые идет диффузия уранилацетата. Для красоты эксперимента использовался и другой метод, а именно добавление соли серебра с последующим восстановлением ионов серебра до металлического состояния, так что образовывалась серебряная проволока. Дальше трубку деградировали с помощью фермента и измеряли параметры полученной проволоки:



- Для того, чтобы затруднить ферментативную деградацию, проще всего использовать в качестве исходного дипептид, состоящий не из L-, а из D-аминокислот.
- На рисунке приведено несколько циклических вольтамперограмм. Поскольку, по идее, емкость двойного электрического слоя не зависит от скорости изменения напряжения, то можно выбрать любой понравившийся эксперимент. Для расчетов используем зеленую линию, которая соответствует изменению напряжения 600 мВ/с и плотности тока примерно 180 мкА/см<sup>2</sup>.

Емкость двойного электрического слоя можно вычислить по формуле

$$C_{dl} = \frac{I}{\partial V / \partial t} = \frac{180 \mu A / cm^2}{600 mV / c} = 3 \times 10^{-4} \Phi / cm^2$$

поскольку площадь поверхности электрода равна 0,125 см<sup>2</sup>, то емкость двойного электрического слоя равна

$$3 \times 10^{-4} * 0,125 = 0,375 * 10^{-4} \Phi = 37,5 \mu\Phi$$



### **Нанолечение замедленного действия (2010, задачи для начинающих)**

1. Можно привести несколько примеров механизмов открывания контейнеров. Первый механизм - это саморастворение через заданное время. Возможно лазерное уничтожение через световоды подведенные к ткани. Третий вариант — разогрев контейнера ультразвуком или высокочастотным магнитным полем, который приводит к его распаду.
2. Главное свойство жидкости, в которой растворено действующее вещество, такое: взаимодействие ее молекул с поверхностью контейнера должно быть сильнее, чем с клеточной жидкостью. В противном случае, все содержимое контейнера быстро растворится. При повышении вязкости растет время выхода лекарства из контейнера.