



В.Ф. Сыч, Е.П. Дрождина, А.Ф. Санжапова

ВВЕДЕНИЕ В НАНОБИОЛОГИЮ И НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие для учащихся 10-11 классов
средних общеобразовательных учреждений

Экземпляр для апробации в школах
«Школьной лиги РОСНАНО»

Санкт-Петербург, 2012

УДК 573.6.08.83(075.3)
ББК 30.16 Я 721
С 95

Сыч В.Ф., Дрождина Е.П., Санжапова А.Ф.

Введение в нанобиологию и нанобиотехнологии. Учебное пособие для учащихся 10-11 классов средних общеобразовательных учреждений. – СПб: Образовательный центр «Участие», Образовательные проекты, 2012 – 256 с. (Серия «Наношкола»)

Учебное пособие посвящено основным направлениям бурно развивающихся в настоящее время нанобиологии и нанобиотехнологий. В нем отражены наиболее интересные и перспективные достижения фундаментальной биологии, которые находят или могут найти применение в нанобиотехнологиях. Особое внимание уделено углублению знаний учащихся о молекулярном, субклеточном (надмолекулярном) и клеточном уровнях организации живых систем, которые должны составить теоретическую основу для ознакомления с методами и достижениями нанотехнологий. В пособии рассматриваются ключевые направления нанотехнологий в области биологических исследований, а также практическое применение их результатов в медицине, охране окружающей среды и конкретных производствах. Учебное пособие предназначено для учащихся 10-11 классов средних общеобразовательных учреждений.

Рецензенты:

Костюкевич Сергей Владимирович, заведующий кафедрой медицинской биологии Санкт-Петербургской Государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова, доктор медицинских наук, профессор.

Обуховская Анна Соломоновна, заместитель директора лицея №179, кандидат биологических наук.

Серия «Наношкола»

Пособие подготовлено в рамках проекта «Школьная Лига Роснано»

© Ульяновский Государственный университет, 2011
© АНО «Образовательный центр «Участие», 2011

АНО «Образовательный центр «Участие»
196196, Санкт-Петербург, ул. Стахановцев, 13а
Телефон/факс: (812) 444-38-62
www.fondedu.ru

Подписано в печать 16.05.2012
Заказ № Тираж 100 экз.

Отпечатано в ООО «Издательство «ЛЕМА»
Санкт-Петербург, Средний пр. В.О., 24 Телефон/факс: (812) 401-01-74
e-mai: izd_lemma@mail.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	4
Введение	6
Глава 1. Нанобиотехнологии – новый этап развития биологии и биотехнологий	8
Глава 2. Биомакромолекулы как составляющие наномира	29
Глава 3. Нанобиотехнологии на основе структуры и свойств молекул ДНК	62
Глава 4. Нанобиотехнологии на основе метода генетической инженерии	91
Глава 5. Нанобиотехнологии надмолекулярного (субклеточного) уровня организации живых систем	108
Глава 6. Микротрубочки и микрофиламенты клеток в нанобиоструктурах и нанотехнологиях	128
Глава 7. Прокариотические и неклеточные формы жизни в наноконструкциях и нанобиотехнологиях	156
Глава 8. Биореакторы и биокатализаторы в нанотехнологиях	180
Глава 9. Проблема безопасности наноматериалов и нанотехнологий	199
Глава 10. Нанобиотехнологии в медицине	221
Заключение	256

Предисловие

Разработки в области нанобиотехнологий базируются на достижениях молекулярной биологии, биологии клетки, биологии развития и генетики. Для фрагментарного ознакомления с их изрядно устаревшими достижениями отведено лишь немногим более 10 уроков биологии и отведено к тому же в рамках «Общей биологии», изучаемой в 10-11 классах. Следовательно, овладеть нанобиотехнологиями учащимся придется раньше, чем базисными биологическими знаниями, необходимыми для их усвоения. Это накладывает жесткие ограничения на возможности определения содержания и структуры учебного пособия.

В частности, устранить указанное выше несоответствие можно было, применив только следующий подход: в каждой главе пособия кратко и доступно изложить все необходимые для усвоения последующего материала о нанобиотехнологиях современные данные из фундаментальных разделов биологии (молекулярной биологии, биологии клетки, биологии развития, генетики). После этого или параллельно с этим представить основной материал об исследованиях и разработках в области нанобиотехнологий.

Такой подход, а также используемая в настоящем пособии методика изложения материала призваны, на наш взгляд, способствовать:

- глубокому уяснению учащимися сущности биологических явлений и процессов, на основе которых разрабатываются нанотехнологии;
- осмыслению уникальности (оригинальности) методических подходов и конкретных разработок ученых и инженеров в области нанобиотехнологий;
- формированию глубокого устойчивого интереса учащихся к познанию нового, а также к исследовательской работе в области биологии и других естественных наук;
- развитию у каждого учащегося личного потенциала исследователя, преобразователя, конструктора, проектировщика.

Решение перечисленных задач представляется авторам несравнимо более ценным, чем традиционное школьное заучивание чрезмерного количества сведений, которые уже завтра обновятся или окончательно устареют. Тем более в такой бурно развивающейся отрасли как нанотехнологии.

И тем более, если ученик в будущем не свяжет свою судьбу с нанотехнологиями. Но где бы он ни оказался, его развитой потенциал исследователя и конструктора, жажда познания будут всегда востребованы, во всех отраслях производства и науки, «задыхающихся» от недостатка инноваций. Изложенное выше авторы стремились максимально реализовать при подготовке настоящего пособия.

При определении оптимальной структуры пособия были рассмотрены несколько вариантов. В итоге авторы остановились на том, который в наибольшей мере будет удовлетворять решению указанных выше 4-х задач. Учебный материал расположен соответственно иерархии уровней организации живых систем, на основе которых разработаны (разрабатываются) нанотехнологии. Начинается рассмотрение с молекулярного уровня (уровня молекул биополимеров), которому посвящены 2, 3 и 4 главы. Затем обсуждаются нанобиотехнологии, в которые вовлечены живые системы надмолекулярного (субклеточного), клеточного, тканевого и организменного уровней (5-9 главы). В последней (10-й) главе проанализированы и обобщены достижения самой «обязанной» нанобиологии и нанобиотехнологиям прикладной отрасли – медицины.

Введение

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

1. Инфекционно-иммунная катастрофа. Производство и широкое применение с середины XX века антибиотиков обернулось двумя бедами: а) освобожденные временно пострадавшими от антибиотиков бактериями экологические ниши заняли более опасные вирусы; б) к их массированному наступлению на человечество на исходе XX века подключились выдержавшие многочисленные атаки антибиотиков бактерии. В «возмужание» и беспрецедентную устойчивость бактерий весомый вклад внес сам человек, часто прибегая к помощи антибиотиков даже в отсутствие нужды в них. Этим он осуществлял масштабную селекцию бактерий на устойчивость к антибиотикам, с одной стороны, и ослаблял (детренируя и изнеживая) иммунную защиту собственного организма, с другой.

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

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

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

Если не предотвратить, то хотя бы отсрочить время грядущих катастроф человечества в состоянии лишь серьезный прорыв в биологических исследованиях. Прорыв, который должен обеспечить так необходимые следующие грандиозные достижения в медицине, сельском хозяйстве, природопользовании и охране окружающей среды. **Вполне возможно, что ожидаемый прорыв в биологических исследованиях обеспечат стремительно развивающиеся нанобиология и нанобиотехнологии.**

Под нанотехнологиями понимают фундаментальные технологии, основанные на манипуляциях с наноструктурами (наночастицами). Наноструктуры – это объекты, размеры которых лежат в диапазоне от 1 до 100 нанометров (1 нанометр равен 10^{-9} метра). Наномасштаб уникален, поскольку наиболее фундаментальные свойства материалов наномира зависят от их размера так, как не зависят ни при одном другом масштабе. На молекулярном уровне проявляются новые свойства, определяемые поведением молекулярных наноконструкций. Возможность понимать, разрабатывать и контролировать эти свойства открывает целый мир функциональных молекулярных устройств и технологий. Использование достижений нанотехнологий в биологии привело к появлению нового направления – нанобиотехнологии.

Нанобиотехнологии – раздел в нанотехнологиях, посвященный изучению воздействия наночастиц на живые системы, а также разработке способов моделирования и практического применения биологических наноструктур, наноявлений и нанопроцессов в экспериментальной биологии, медицине, экологии, сельском хозяйстве и других отраслях экономики.

В настоящее время **оформились три основных направления в создании и развитии нанобиотехнологий.**

Задачей **первого направления** является моделирование и воспроизведение наноявлений и наномеханизмов живых систем в лабораторных и производственных условиях;

Второе направление предусматривает получение наночастиц и наноматериалов с участием живых организмов;

В рамках **третьего направления** предусматривается разработка методов и способов использования наноструктур и нанопроцессов для вторжения в живой организм с целью его исследования, диагностики состояния и лечения.

Настоящее пособие преследует цель общего ознакомления учащихся с сущностью наиболее перспективных и оригинальных методов нанобиотехнологий, используемых в биологических исследованиях, а также находящих практическое применение в медицине, экологии, промышленном и сельскохозяйственном производствах.

ГЛАВА 1.

Нанобиотехнологии – новый этап развития биологии

1.1. Многоуровневость организации живых систем

В ходе эволюции живой природы сформировалась соподчиненность (иерархия) живых систем. Она проявляется в многоуровневости организации живых существ. Жизненные процессы более высокого уровня обеспечиваются структурами низшего уровня. **Каждый уровень организации живого характеризуется своей структурно-функциональной единицей** – структурой (системой), исторические изменения которой определяют сущность эволюционного процесса на данном уровне. На всех уровнях проявляются основные свойства жизни. **Каковы же эти уровни? В чем заключаются их отличительные особенности?**

Начальным (наиболее глубинным) уровнем организации живого является **молекулярный**. Структурно-функциональной единицей уровня является биомолекула (рис. 1), или молекула биополимера (молекула нуклеиновой кислоты, белка, полисахарида). На этом уровне осуществляются важнейшие процессы жизнедеятельности: хранение и передача наследственной информации, обмен веществ и энергии, дыхание и др. Из биомолекул формируются надмолекулярные структуры.

Субклеточный уровень рассматривается переходным между молекулярным и клеточным уровнями (рис. 1). Единицей уровня является надмолекулярная структура живой системы (элементарная биологическая мембрана, субчастица органоида, органоид). Процессы жизнедеятельности, протекающие на этом уровне, обеспечивают рост и специализацию клетки, самовосстановление и саморазрушение ее органоидов и др.

Клеточный уровень представлен клетками как самостоятельных организмов (бактерии, простейшие), так и клетками многоклеточных организмов.

Обладая способностью к биосинтезу, питанию, дыханию, развитию, размножению и т.п., клетка является основной структурой в организации живой природы (рис. 1).

Тканевой уровень возник в ходе эволюции в связи с появлением многоклеточности и специализации (дифференциации) клеток. Его структурно-функциональная единица – ткань. Последняя объединяет клетки и их производные, характеризующиеся однородностью происхождения, сходством функции, расположения, а в ряде случаев и строения. На тканевом уровне происходит специализация новообразующихся клеток, формирование внеклеточных структур, развитие, функционирование и регенерация тканей.

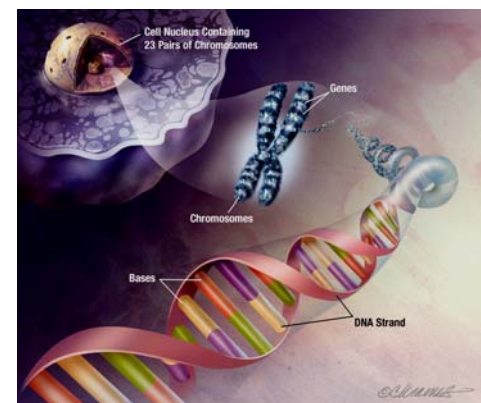


Рис.1. Биологические структуры, представляющие молекулярный (справа), субклеточный (посередине) и клеточный (слева) уровни организации жизни

Органный уровень характеризует сложные многотканевые живые системы. Структурно-функциональная единица уровня – орган. Орган представляет собой часть организма, имеющую определенную форму и выполняющую специфические функции (рис. 2). Взаимосвязанные в первую очередь общей функцией или биологической ролью в организме, органы формируют системы органов.

Структурно-функциональной единицей **системного** уровня организации живого является система органов. Последняя объединяет органы со сходной биологической ролью или функцией. Так, обеспечивающая кровоток в организме кровеносная система состоит из таких органов как сердце и кровеносные сосуды.

Организменный уровень представлен живыми организмами. Живому организму как структурно-функциональной единице уровня присущи все проявления и свойства жизни. На этом уровне происходит развитие и рост организма как единого целого, его приспособление к факторам внешней среды.

Популяционный уровень представлен минимальными группами особей, вовлеченными в эволюционный процесс – популяциями. Структурно-функциональная единица этого уровня – популяция – является одновременно элементарной единицей эволюции. Объединение отдельных особей в популяции обеспечивает их приспособление, выживание, успех в размножении и в эволюции в целом.

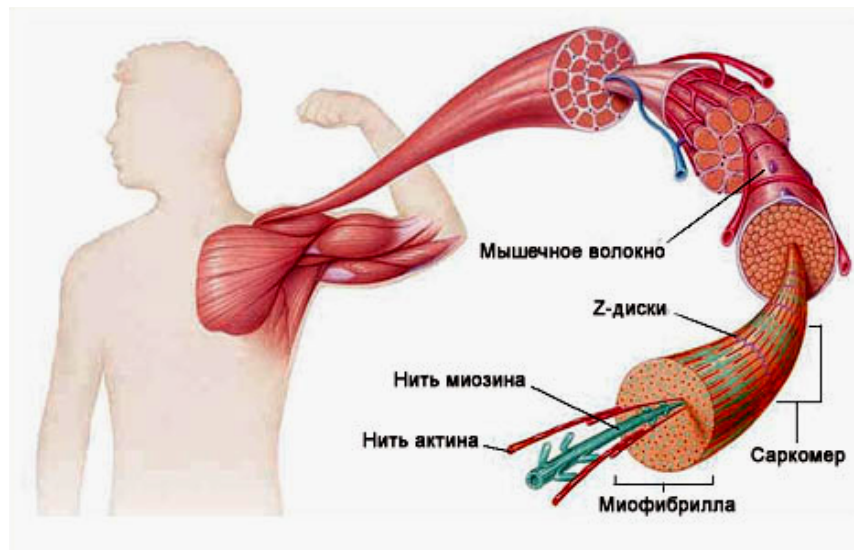


Рис.2. Биологические структуры (системы), представляющие тканевой (мышечные волокна), органный (мышца) и системный (мышечная система – скелетная мускулатура) уровни организации жизни

Видовой уровень представлен надпопуляционными объединениями особей – биологическими видами. Наряду с популяцией, вид – реально существующая в природе группа особей. Вид завершает процесс микроэволюции в природе.

Структурно-функциональной единицей **биоценотического** уровня являются сообщества взаимозависимых организмов разных видов – биоценозы. В ходе эволюции сформировались биогеоценозы (экосистемы), включающие, кроме взаимозависимых организмов (биоценозов), также абиотические факторы окружающей среды.

Биосферный уровень (структурно-функциональная единица – биосфера) рассматривается как наивысший уровень организации живой материи. На этом уровне все биогеоценотические круговороты вещества и энергии объединяются в единый биосферный (глобальный) круговорот вещества и энергии.

1.2. Определение понятий «наноструктуры», «наноявления», «нанопроцессы» и «нанотехнологии»

Наноструктуры – это объекты, размеры которых лежат в диапазоне от 1 до 100 нанометров (нанометр – одна миллиардная часть метра, 10^{-9} метра).

Наноструктуры не просто меньше всего, что создавал человек, они являются наименьшими твердыми материалами, которые можно произвести (выделить) и с которыми можно осуществить манипуляции (рис. 3, 4). Наномасштаб уникален, поскольку фундаментальные свойства элементов наномира зависят от их размера в такой степени, в какой не зависят ни при одном другом масштабе. **На молекулярном уровне возникают новые физические и химические свойства, определяемые поведением атомов, молекул и наноконплексов.**

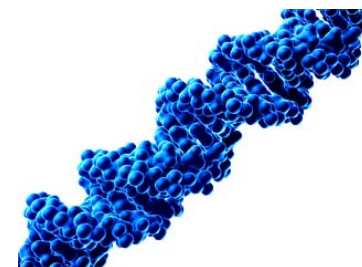


Рис. 3. Двойная спираль молекулы ДНК

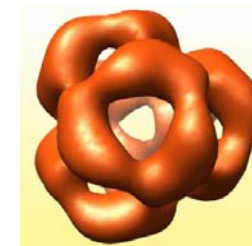


Рис. 4. Молекулы белка – самые распространенные наноструктуры живых систем

К биологическим наноструктурам можно отнести, например, молекулы белков, размеры которых варьируют в пределах от 4 до 50 нм (рис. 4). Размеры строительных блоков белков – аминокислот – составляют около 1 нм. Молекула ДНК, имеющая толщину 1-2 нм (рис. 3), несомненно, является наноструктурой, несмотря на то, что ее длина достигает нескольких миллиметров. Из живых организмов к наномиру можно отнести только неклеточные формы жизни – вирусы. Размеры последних колеблются в пределах 10-200 нм.

В технологиях создания наночастиц существует два принципиально разных подхода к обработке вещества:

- **«сверху вниз»**, т.е. уменьшение размеров физических тел механической или иной обработкой до объектов с нанометровыми размерами;
- **«снизу вверх»**, т.е. сборка создаваемого более крупного нанобъекта из элементов «низшего порядка» (атомов, молекул, структурных фрагментов биологических клеток и т.п.).

Процессы, в которые вовлекаются наноструктуры (наночастицы) получили название нанопроцессов. Самый главный нанопроцесс в живом организме – биосинтез белка.

Явления живой природы, протекающие с участием наноструктур называются наноявлениями. Удивительно, но самоочищение листьев лотоса, который на Востоке считается символом чистоты, можно отнести к наноявлениям. Листья лотоса покрыты микробугорками высотой 5-10 мкм, от которых отрастают нановолоски. Благодаря последним, капли дождя не растекаются, а скатываются по поверхности листа, увлекая за собой частицы грязи и очищая листья лотоса.

Гораздо более древним наноявлением можно рассматривать самовоспроизводство (ауторепликацию) ДНК. Это чрезвычайно сложное явление характеризовало уже первые прокариотические организмы Земли – бактерии, возникшие около 3,5 млрд лет тому назад.

Под нанотехнологиями понимают фундаментальные технологии, основанные на манипуляциях с наноструктурами (наночастицами). Подробнее речь о них пойдет в следующих главах.

1.3. Молекулярный и субклеточный уровни организации живых систем как уровни наномира

Определяющими структурами молекулярного уровня организации живых систем являются молекулы биополимеров (биомакромолекулы). Они включают молекулы нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов (рис. 3, 4). Эти молекулы обладают свойством формирования более крупных по размеру надмолекулярных биологических структур (нанокомплексов). Последние образуются:

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

Коллективное поведение молекул и ионов в составе атомно-молекулярных комплексов крайне своеобразно, но, к сожалению, практически не изучено. **Образование, функционирование и распад подобных**

надмолекулярных нанобиокомплексов представляет более высокий – надмолекулярный, или субклеточный уровень организации живых систем. Особое место в нем занимают биологические мембраны (рис. 5), формирующие плазмалемму и многие другие органоиды клетки всех живых организмов. Возможность изучать, разрабатывать и контролировать эти свойства открывает целый мир функциональных молекулярных устройств. Они являются предметом бурно развивающихся во всем мире нанобиотехнологий.

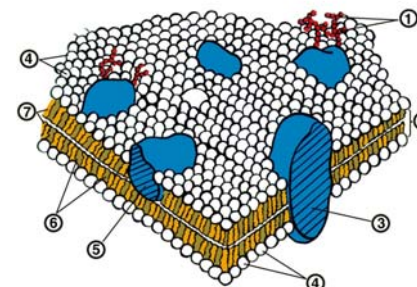


Рис. 5. Схема биологической мембраны.

- 1 – углеводные цепи молекул сложных белков-гликопротеинов; 2 – бимолекулярный слой липидов; 3 – трансмембранный белок; 4 – гидрофильные участки молекул липидов; 5 – полуинтегральный белок; 6, 7 – гидрофобные участки молекул липидов

1.4. Наномир в микроскопе

Световая микроскопия. Размер большинства животных клеток составляет 10-20 мкм. Это в 5 раз меньше любой частицы, которую может увидеть человек (невооруженный глаз человека имеет разрешающую способность около 100 мкм). **Можно ли увидеть животную клетку в обычный световой микроскоп?**

Размер самой маленькой структуры, которую можно увидеть в световом микроскопе, определяется наименьшим разрешаемым расстоянием (d_0). Последнее зависит в основном от длины световой волны (λ). Эта зависимость выражается формулой $d_0 = \frac{1}{2} \lambda$. Обычно в световых микроскопах используются источники освещения в видимой области спектра (400-700 нм). Поэтому максимальное разрешение микроскопа не превышает 200-350 нм (0,2-0,35 мкм). Следовательно, животные клетки, размеры которых превышают несколько микрометров, можно наблюдать в обычном световом микроскопе.

¹ Разрешающая способность микроскопа рассчитывается по формуле: $d_0 = 0,61 \lambda / n \sin \theta$, где λ – длина волны использованного света (для белого света принимают 0,53 мкм), n – коэффициент преломления среды, отделяющей образец от линз объектива или конденсатора (обычно воздух или масло); θ – угол между оптической осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив.

Однако клетки живых организмов бесцветны и прозрачны. Поэтому в естественном состоянии клетки в световом микроскопе невидимы. Как же все-таки увидеть животную клетку в микроскопе?

Сделать клетки видимыми позволяют, во-первых, специальные методы их окрашивания (рис. 6а). Например, основные красители (гемаксалин, азур) специфически окрашивают кислые компоненты клетки (нуклеиновые кислоты ядра). Кислые красители (эозин) связываются со структурами, имеющими щелочную реакцию (белки цитоплазмы). **Во-вторых, наблюдению клеток способствует разнообразие методов световой микроскопии.** Один из них – **метод фазово-контрастной микроскопии**, позволяющий наблюдать живые неокрашенные клетки. Контрастность неокрашенных структур повышается за счет дополнительных оптических систем, встроенных в микроскоп. Повышенная контрастность позволяет рассмотреть те структуры клетки, которые по-разному преломляют проходящий через них свет (рис. 6б).

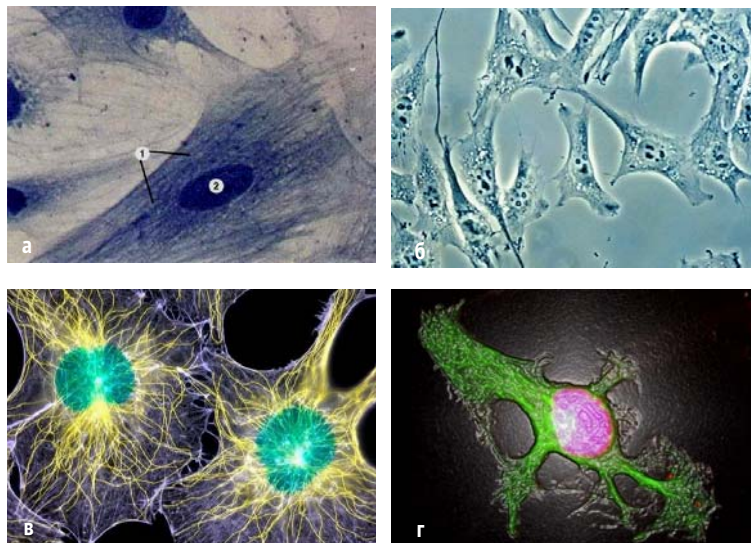


Рис. 6. Фибробласты. Изображения получены с помощью: а) световой микроскопии (1 – актиновые микрофиламенты, 2 – ядро), увеличено в 1000 раз, $\times 1000$; б) фазово-контрастной микроскопии, $\times 500$; в) иммунофлуоресцентной микроскопии (микротрубочки окрашены в желтый цвет, актиновые микрофиламенты – голубой, ядро – зеленый), $\times 980$; г) конфокальной микроскопии, $\times 1000$

Вторым методом наблюдения живых клеток является **флуоресцентная микроскопия**. Метод основан на способности ряда веществ светиться (флуоресцировать) при действии на них коротковолновых лучей. Ряд пигментов, витаминов, гормонов и других веществ характеризуются спонтанной (собственной) флуоресценцией, наблюдающейся при попадании на клетку коротковолновых лучей. Собственной флуоресценцией обладают все клетки

живого организма, однако в большинстве случаев она оказывается чрезвычайно слабой. Поэтому для выявления большинства внутриклеточных структур используют явление вторичной или наведенной флуоресценции. Она требует предварительной обработки клеток специальными флуорохромами (флуоресцеином, родамином и др.).

Флуорохромы могут быть соединены с молекулами антител, что делает их высокоспецифичными реагентами, избирательно связывающимися только со строго определенными макромолекулами. Такой вид флуоресценции называют **иммунофлуоресценцией**. При этом сначала на белок (например, тубулин) получают специфические сыворотки, содержащие антитела. Очищенные антитела химически соединяют с флуорохромами. Такие препараты наносят на объекты. Затем с помощью флуоресцентного микроскопа по свечению флуорохрома исследуют локализацию белков в клетке (рис. 6в).

Можно ли, используя световой микроскоп, получить трехмерное изображение объекта? Обычная световая микроскопия характеризуется небольшой глубиной резкости. Этот недостаток не позволяет получить трехмерное изображение изучаемого объекта. **Проблема трехмерного изображения была решена с созданием конфокального сканирующего светового микроскопа.** В качестве осветителя в нем применяется лазерный луч, который последовательно сканирует всю толщину препарата. Информация о плотности объекта по каждой линии сканирования передается в компьютер, где по специальной программе реконструируется трехмерное объемное изображение объекта. Обычно для такого наблюдения используются объекты, окрашенные флуорохромами (рис. 6г). Конфокальный микроскоп позволяет получить информацию о форме клеток, цитоскелете, структуре ядра и хромосом, характере распределения внутриклеточных органелл (рис. 7).

Большинство флуорохромов, используемых в биологии, относятся к органическим соединениям. Их недостатками являются: 1) низкая фотостабильность; 2) необходимость использования разных красителей для одновременного выявления нескольких объектов; 3) необходимость подбора соответствующего источника света для индукции флуоресценции этих красителей. **Каким образом можно устранить все недостатки органических флуорохромов?**

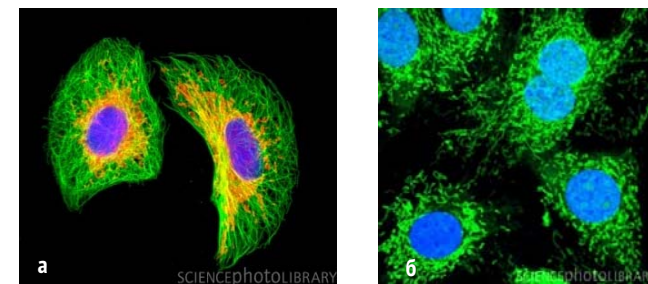


Рис.7. Конфокальная микроскопия: а – эпителиальные клетки почек, $\times 1000$ (митохондрии оранжевого цвета), б – опухолевые клетки человека HeLa, $\times 1000$ (митохондрии окрашены в зеленый цвет)

Проблему решили, **применив квантовые точки или неорганические флуорохромы**. Квантовые точки представляют собой флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы. В биологических исследованиях наиболее распространенными являются коллоидные полупроводниковые нанокристаллы CdSe, покрытые оболочкой ZnS. Последняя позволяет повысить устойчивость квантовых точек к окислению и в несколько раз увеличить интенсивность флуоресценции.

Изменяя размер нанокристаллов, можно получить флуорохром с максимумом флуоресценции, расположенным в любой части оптического спектра. Однако использование синтезированных нанокристаллов CdSe/ZnS в биологических системах часто ограничено их низкой гидрофильностью. Одним из методов солюбилизации (перевода в водную среду) квантовых точек является формирование на их поверхности полимерного слоя. Впоследствии к такому полимеру возможно присоединение антител для специфического и высокоизбирательного связывания нанокристалла с биологической мишенью (рис. 8).

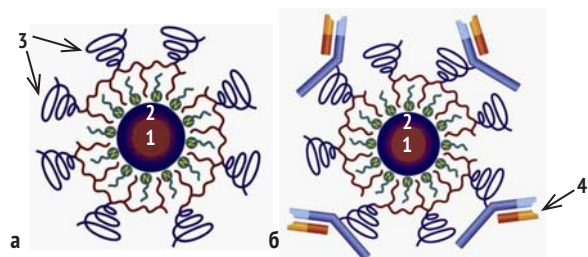


Рис. 8. Схема строения квантовой точки, покрытой полимером (а) и объединенной с антителами (б): 1 – ядро (CdSe), 2 – оболочка (ZnS), 3 – полимер, 4 – антитела

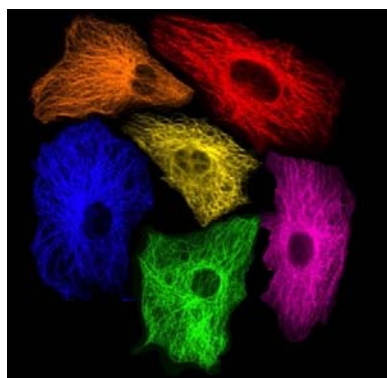


Рис. 9. Выявление белка α-тубулина с помощью квантовых точек в фибробластах. Конфокальная микроскопия

Квантовые точки разных размеров поглощают свет в широком диапазоне оптического спектра от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области. Это позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником

излучения. По сравнению с органическими флуорохромами нанокристаллы обладают более высокой фотостабильностью и узким спектром флуоресценции. Высокая фотостабильность нанокристаллов (на несколько порядков выше, чем у органических флуорохромов) позволяет использовать их в конфокальной микроскопии (рис. 9). При этом можно отслеживать внутриклеточные процессы в реальном времени в течение длительного периода (часы и даже дни).

Электронная микроскопия. В электронном микроскопе используется поток электронов, отличающийся очень короткой длиной волны. При напряжении в 50 кВ длина волны электромагнитных колебаний составляет 0,0056 нм. В этих условиях теоретически рассчитанное максимальное разрешаемое расстояние может быть около 0,002 нм. Это в 100000 раз меньше, чем в световом микроскопе. Реальное разрешение современных электронных микроскопов на практике составляет 0,1 – 0,7 нм, для биологических объектов – около 2 нм.



Рис.10. Трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп для биологических исследований

В настоящее время в биологии широко используются трансмиссионные (просвечивающие) и сканирующие (растровые) электронные микроскопы. С помощью **трансмиссионных электронных микроскопов** (рис. 10) получают двумерное изображение изучаемого объекта (рис. 11а, 12а). В этом случае применяют ультратонкие срезы биологических объектов (толщиной не более 0,1 мкм), а контраст увеличивают, используя тяжелые металлы или их соли.

Можно ли получить пространственное изображение объекта, используя электронный микроскоп? Для такого наблюдения создан **сканирующий электронный микроскоп**. В формировании изображения объекта в нем участвуют электроны, отраженные объектом. Поверхность объекта для этого необходимо сделать электропроводной. В большинстве случаев это достигается путем напыления тонкого слоя металла на образец. Главным преимуществом сканирующего электронного микроскопа является большая глубина резкости. Однако его разрешающая способность (для биологических объектов приближается к 3-5 нм) несколько ниже, чем у просвечивающего электронного микроскопа (рис. 11б, 12б).

Недостатком сканирующей электронной микроскопии является необходимость напыления металла, что часто приводит к искажению некоторых структур клеточной оболочки. Кроме того, клетки подготовленного для рассмотрения образца теряют жизнеспособность.

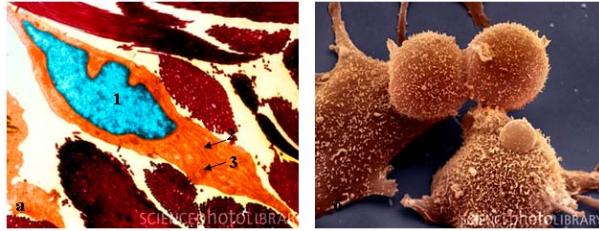


Рис. 11. Просвечивающая (а) и сканирующая (б) электронные микрофотографии фибробласта: 1 – ядро, 2 – каналы гранулярной эндоплазматической сети, 3 – лизосома, $\times 10000$.

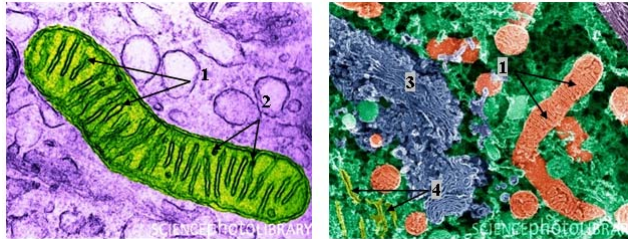


Рис. 12. Просвечивающая (а) и сканирующая (б) электронные микрофотографии клеточных органоидов: 1 – кристы митохондрии, 2 – гранулы в матриксе митохондрии, 3 – аппарат Гольджи, 4 – каналы эндоплазматической сети, $\times 20000$

Как обеспечить наблюдение биологических структур в условиях, более близких к естественным? Проблема была решена благодаря созданию сканирующего зондового микроскопа (рис. 13). Своей разрешающей способностью (рис. 14) он не уступает электронному микроскопу.

Атомно-силовая микроскопия. В современных биологических исследованиях все более широкое распространение получает такой тип сканирующей зондовой микроскопии как атомно-силовая микроскопия. **Каковы особенности атомно-силовой микроскопии?**



Рис.13. Сканирующие зондовые микроскопы в учебно-научной лаборатории

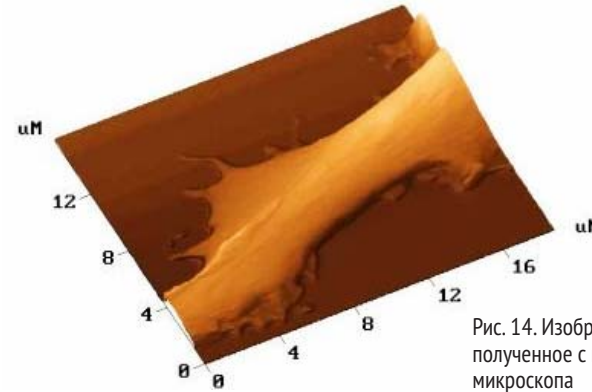


Рис. 14. Изображение части фибробласта, полученное с помощью сканирующего зондового микроскопа

В основе работы атомно-силового микроскопа лежит использование различных видов силового взаимодействия зонда с поверхностью изучаемого образца. Среди них силы Ван-дер-Ваальса, электростатические, капиллярные, химические взаимодействия и др. Этот метод не требует сложной подготовки образца, в частности, контрастирования атомами металлов как в электронной микроскопии. При этом он позволяет изучать образцы не только в воздушной, но и в жидкой средах.

Особым преимуществом атомно-силовой микроскопии является ее **разрешающая способность: она позволяет получать трехмерное изображение на уровне отдельных атомов и молекул** (рис. 15).

В настоящее время атомно-силовая микроскопия используется при исследовании клеточных мембран, характеристике взаимодействия клеток и вирусов, идентификации бактерий. Метод достаточно эффективен при изучении нуклеиновых кислот и структуры ДНК.

Применение атомно-силового микроскопа оказалось успешным при исследовании поверхности клеток опухолей. Опухолевые клетки отличаются от нормальных по структуре, биохимическим и физико-химическим признакам. Поэтому изменение механических свойств клеток органа используется в качестве маркера при выявлении злокачественных изменений.

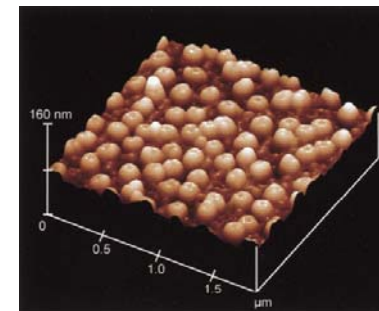


Рис. 15. Белки ядерного порового комплекса. Атомно-силовая микроскопия

1.5. Основные направления развития нанобиотехнологий



Фундаментальные исследования в области нанотехнологий направлены на познание биологических, химических, физических свойств и явлений наномира. Кроме того, они предусматривают разработку способов комбинирования этих свойств при производстве новых материалов и создании новых технологий. Открытия в области наноисследований уже успешно используются в биотехнологиях, медицине, электронике,

транспорте, сельском хозяйстве, охране окружающей среды и других отраслях экономики. Нанотехнологии органически объединяют последние достижения всех естественных наук, создавая основу новой технологической революции. Последняя предусматривает переход от работы с веществом к манипуляциям с отдельными атомами, молекулами и их комплексами.

Основные направления развития нанобиотехнологий можно объединить в три группы:

- моделирование и воспроизведение наноявлений и наномеханизмов живых систем в лабораторных и производственных условиях;
- получение наночастиц и наноматериалов с участием живых организмов;
- использование наноструктур и нанопроцессов для вторжения в живой организм с целью его исследования, диагностики состояния и лечения.

Конкретными задачами нанобиотехнологий в настоящее время **считаются:**

- решение фундаментальных биологических проблем, нерешенных с помощью традиционных цитологических и цитохимических методик (моделирование биологических процессов, анализ поведения биомолекул и атомно-молекулярных комплексов живых клеток, мониторинг жизнедеятельности отдельных клеток);
- изучение взаимодействия наночастиц с молекулами ДНК с целью разработки новых методов генетической инженерии;
- изучение механизмов транспорта веществ через биологические мембраны с применением наночастиц и создание нанотехнологий направленной доставки лекарств;
- разработка биосенсорных систем для биологии и медицины с целью выявления определенного вещества в окружающей среде или организме человека, а также для обнаружения мутаций;

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

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

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

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

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

- разработка на основе нанобиотехнологий лекарственных препаратов нового поколения;

- создание биологически совместимых (неотторгаемых организмом) медицинских материалов для пересадки в живой организм;

- разработка нанороботов, способных устранять возникающие в органах очаги поражения, и не провоцирующих иммунные реакции.

Словарь основных терминов

Биомакромолекулы – молекулы биополимеров (нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов)

Биосфера – оболочка Земли, состав, структура и энергетика которой определяются совокупной деятельностью живых организмов.

Биоценоз – совокупность животных, растений, грибов и микроорганизмов, совместно населяющих участок суши или водоема.

Клетка – основная структурно-функциональная единица всех живых организмов, на уровне которой проявляются все свойства живого.

Нанобиокомплексы – сложные биологические структуры надмолекулярного (субклеточного) уровня организации жизни (клеточная мембрана, субъединица рибосомы и т.п.).

Нанобиотехнологии – раздел в нанотехнологиях, посвященный изучению воздействия наночастиц на живые системы, а также разработке способов применения биологических наноструктур и нанопроцессов в медицине, экологии, сельском хозяйстве и других отраслях производства.

Нанометр – одна миллиардная часть метра (10^{-9} м).

Нанопроцессы – процессы, в которые вовлекаются наноструктуры (наночастицы).

Наноструктуры – объекты, размеры которых лежат в диапазоне от 1 до 100 нанометров (нм) (нанометр – одна миллиардная часть метра, 10^{-9} метра).

Нанотехнологии – фундаментальные технологии, основанные на манипуляциях с наноструктурами.

Наноявления – явления живой природы, протекающие с участием наноструктур.

Орган – анатомически оформленная и функционально специализированная часть организма; элементами органов могут быть клетки, межклеточное вещество, кровеносные и лимфатические сосуды, нервы.

Организм – целостная живая система, являющаяся реальным носителем жизни, характеризующаяся всеми фундаментальными свойствами и проявлениями жизни.

Разрешающая способность – способность прибора давать отдельные изображения двух близких друг к другу точек объекта. Наименьшее расстояние между двумя точками, начиная с которого их изображения сливаются, называется пределом разрешения.

Световой микроскоп – оптический прибор для получения увеличенных изображений объектов (или деталей их структуры), невидимых невооружённым глазом.

Сканирующий зондовый микроскоп – прибор для получения изображения поверхности и её конкретных характеристик, в котором процесс построения изображения основан на сканировании поверхности зондом.

Структурно-функциональная единица уровня организации живой системы – дискретная (делимая) единица системы, исторические изменения которой составляют содержание эволюционного процесса на данном уровне.

Ткань – система клеток и их производных, сходных по происхождению, строению, локализации и функциям в организме.

Фибробласты – клетки соединительной ткани, производящие основные компоненты межклеточного вещества (например, коллаген, эластин, мукополисахариды).

Флуоресценция – кратковременное свечение вещества, возникающее после поглощения им энергии возбуждения.

Флуорофор – фрагмент молекулы, придающий ей флуоресцентные свойства.

Флуорохромы – вещества, применяемые в флуоресцентной микроскопии для обработки объектов, не обладающих природной способностью светиться. Флуорохромами являются красители (например, акридин оранжевый), пигменты и их производные (хлорофилл, порфирины), некоторые алкалоиды и др.

Электронный микроскоп – прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз, благодаря использованию пучка электронов вместо светового потока.

Вопросы для повторения

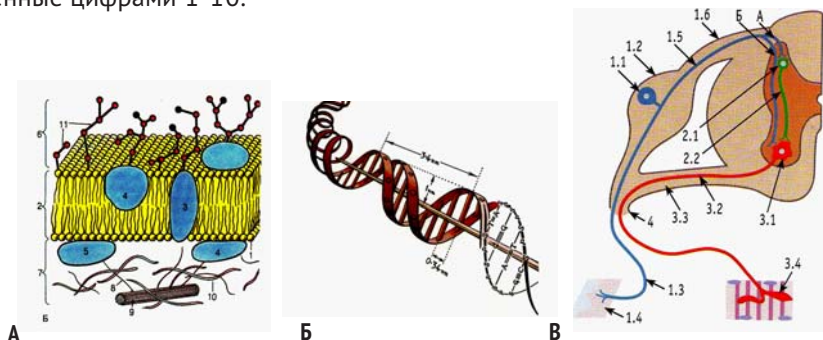
1. Дайте определение понятию «нанотехнологии».
2. Каковы особенности нанобиотехнологий в сравнении с нанотехнологиями?
3. Чем характеризуются наноструктуры?
4. Что представляют собой нанопроцессы и наноявления?
5. В чем заключается уникальность наномасштаба (уникальность элементов наномира)?
6. Что такое нанобиотехнологии?
7. Укажите, с какого уровня начинаются важнейшие процессы жизнедеятельности организма.
8. Почему молекулярный уровень организации живых систем является основой манипуляций с наноструктурами?
9. Каким образом субклеточный и клеточный уровни выступают моделями для разработки и использования наномеханизмов?
10. Охарактеризуйте тканевой, органной и организменной уровни организации живых систем.
11. Укажите, на каком уровне осуществляется процесс видообразования.
12. Опишите популяционный, видовой и биоценотический уровни организации живых систем.
13. Каковы основные методы исследования клетки (ее внутреннего строения и поверхности)?
14. Какова разрешающая способность светового и электронного микроскопов?
15. Охарактеризуйте современные виды световой микроскопии. Какой метод может быть применен для исследования живой клетки?
16. В чем заключается преимущество квантовых точек над органическими флуорохромами?
17. Какие виды электронной микроскопии используются при изучении биологических объектов? Какой результат они позволяют получить?
18. Каковы возможности и перспективы применения сканирующей зондовой микроскопии в изучении клетки?
19. Какие основные группы направлений в разработке нанобиотехнологий можно выделить в настоящее время?
20. Охарактеризуйте задачи в развитии нанобиотехнологий.

Задания

Задание № 1. Заполните таблицу «Уровни организации живых систем»

Уровень организации	Структурно-функциональная единица уровня	Основные атрибуты (проявления) жизни на этом уровне

Задание №2. Какой уровень организации живых систем представляет изображенная биологическая структура (рис. А)? Зарисуйте рисунок в тетрадь и укажите под ним известные вам элементы этой структуры, обозначенные цифрами 1-10.



Задание № 3. Охарактеризуйте уровень организации живых систем, структурно-функциональной единицей которого является изображенная структура (рис. Б). Какие химические соединения ее образуют?

Задание № 4. К какому уровню организации живых систем можно отнести структуры, изображенные на рисунке (рис. В).

Задание № 5. Сравните клеточный и организменный уровни организации живых систем. Какие проявления жизни характерны для структурно-функциональных единиц этих уровней? Можно ли отнести этим уровням особые места в иерархии структурно-функциональных уровней живых систем? Объясните сущность сходства клеточного и организменного уровней жизни, принимая во внимание охарактеризованные вами проявления жизни на этих уровнях. Укажите различия между клеточным и организменным уровнями организации жизни.

Задание № 6. Проанализируйте сходства и различия между молекулярным и субклеточным уровнями жизни. Какие молекулы являются определяющими структурами молекулярного уровня? Могут ли они входить в состав субклеточных структур? Почему субклеточный уровень имеет второе название «надмолекулярный»? Молекулы каких веществ образуют надмолекулярные структуры (нанокомплексы) клетки? Какие из них можно обнаружить в составе биологической мембраны? Какие вещества могут входить в состав атомно-молекулярных комплексов?

Могут ли они входить в состав субклеточных структур? Почему субклеточный уровень имеет второе название «надмолекулярный»? Молекулы каких веществ образуют надмолекулярные структуры (нанокомплексы) клетки? Какие из них можно обнаружить в составе биологической мембраны? Какие вещества могут входить в состав атомно-молекулярных комплексов?

Задание № 7. Максимальное разрешение светового микроскопа при использовании света видимого диапазона не превышает 200-350 нм. Рассчитайте предел теоретического разрешения светового микроскопа, использующего ультрафиолетовое освещение.

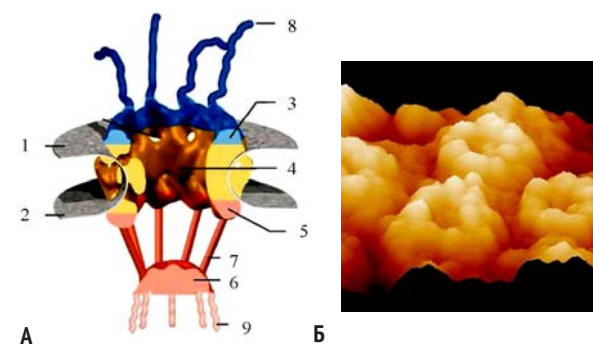
Задание № 8. Световой микроскоп позволяет повысить разрешающую способность глаза человека примерно в 1000 раз. Это и есть «полезное» увеличение микроскопа, выше которого мы будем только увеличивать контуры изображения, не открывая в нем новых деталей. При использовании видимой области света конечным пределом разрешения светового микроскопа является величина 0,2 – 0,3 мкм.

Тем не менее в световом микроскопе можно видеть частицы меньшей величины, чем 0,2 мкм. Объясните, каким образом можно достичь этого? Как необходимо изменить для этого осветительную систему микроскопа? Какой эффект здесь используется? Как называется такой тип световой микроскопии?

Задание № 9. На рисунке А приведена модель строения белкового комплекса X и его изображение, полученное с помощью атомно-силового микроскопа (рис. Б). Что изображено на рисунке А? Сделайте обозначения на рис. А.

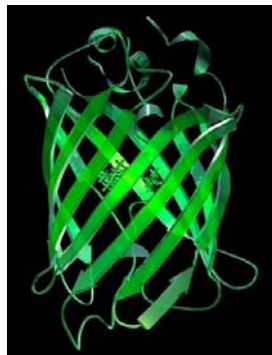
Трехмерная модель строения X получена на основе микрофотографий, изготовленных с помощью просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии. Какие данные о строении и функционировании X позволяет получить атомно-силовая микроскопия?

Какова роль X в клетке? Постоянно ли количество активных X в течение жизни клетки?



Задание № 10. При рассматривании растительных клеток во флуоресцентном микроскопе на темно-синем фоне видны ярко светящиеся красные точки внутри клетки. Какие это структуры? Какое органическое соединение обеспечивает красное свечение в ультрафиолетовых лучах? Приведите примеры подобных соединений в животных клетках.

Задание № 11. Многие морские беспозвоночные светятся сами по себе, используя энергию химических процессов, или же под действием ультрафиолетового или видимого света. В основе этого свечения лежат разнообразные органические вещества. Одно из таких веществ – зеленый флуоресцентный белок (GFP), содержащийся в медузах определенного рода. За поглощение и испускание света отвечает хромофор – особый участок молекулы белка. В ультрафиолетовом освещении этот белок светится голубовато-зеленым светом.



Если ген GFP «пришить» в «хвост» какому-либо гену, то с этого гена будет считываться белок с «фонариком» на конце. И все клетки, в которых активировался данный ген (то есть запустился синтез определенного белка), засветятся зеленым. Таким образом, можно следить за тем, где и с какой интенсивностью работают внедренные гены. Зеленый флуоресцентный белок позволил наблюдать многие скрытые процессы и структуры, например рост и характер связей нейронов, а также распространение раковых клеток в организмах лабораторных животных.

В 2008 году Осаму Симомура, Мартин Чалфи и Роджер Цянь удостоены Нобелевской премии за открытие и разработку методов использования зеленого флуоресцентного белка.

Используя данные литературы, подготовьте краткое сообщение на одну из тем:

- 1) «Зеленый флуоресцентный белок: история открытия»
- 2) «GFP-подобные белки: возможности применения в биологии»
- 3) «Преимущества и недостатки GFP как флуоресцентной метки в живых организмах»

Задание № 12. Используя материал раздела 1.5, определите собственный фактор оценки важности (значимости) задач нанобиотехнологий на современном этапе развития. Составьте собственный ранжированный список задач нанобиотехнологий. Подготовьте объяснение способа (принципа) построения составленного вами списка.

Задание № 13. В технологиях создания наночастиц существует два принципиально разных подхода к обработке вещества: 1) «снизу вверх»,

т.е. сборка создаваемого более крупного нанообъекта из элементов «нижнего порядка» (атомов, молекул, структурных фрагментов биологических клеток и т.п.); 2) «сверху вниз», т.е. уменьшение размеров физических тел механической или иной обработкой до объектов с нанометровыми размерами. Как вы полагаете, какой из этих подходов избран Природой в качестве основного (доминирующего), используемого в ходе естественного формирования наноструктур в живых клетках? Объясните, почему этот подход является основным в функционирующих живых системах. Почему Природа не ограничилась только одним этим подходом? Сравните роль в жизнедеятельности клетки обоих подходов к формированию (созданию) наноструктур. Дайте свою оценку места и значения в жизнедеятельности клетки каждого из подходов.

Литература

Антонов А.Р. Нанотехнологии в медицине и биологии / А.Р. Антонов, Ю.И. Склянов // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины». 11-12 окт. 2007 г., СибГУ (режим доступа <http://www.sibupk.nsk.su/new/05/sem/2007/1>).

Артюхов И.В. Применение нанотехнологий в медицине / И.В. Артюхов, В.Н. Кеменов, С.Б. Нестеров // XIII Международная студенческая школа-семинар «Новые информационные технологии». – М.: МГИЭМ, 2005 (режим доступа <http://nit.miem.edu.ru/2005/plenar/6>).

Белая книга по нанотехнологиям / под ред. В.И. Аржанцева и др. – М.: Изд-во ЛКИ, 2008. – 344 с.

Говорун В.М. «Системный подход» к живому / В.М. Говорун (режим доступа <http://nanosvit.com/publ/15-1-0-113>).

Кирпичников М.П. О развитии нанобиотехнологии / М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан // Инновации. – 2007. – № 12 (режим доступа http://www.vechnayamolodost.ru/article_nanotehnologii/0/o_razvitiu_nanobiotehnologii.html).

Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию: пер. с яп. / Н. Кобаяси. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 134 с.

Коничев А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2005. – 400 с.

Нанотехнологии. Азбука для всех / под ред. акад. Ю.Д. Третьякова. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008. – 368 с.

Сыч В.Ф. Основы биологической терминологии / В.Ф. Сыч. – Ульяновск: УлГУ, 2003. – 456 с.

Сыч В.Ф. Структурно-функциональная организация эукариотической клетки / В.Ф. Сыч, Н.А. Цыганова, Г.В. Абдулкин. – Ульяновск: УлГУ, 2006. – 84 с.

Сыч В.Ф. Общая биология: учебник для высшей школы / В.Ф. Сыч. – М.: Академический Проект, 2007. – 330 с.

Сыч В.Ф. Введение в нанотехнологии. Элективный курс в программу биологии: учебное пособие для 10-11 классов средней общеобразовательной школы / Сыч В.Ф., Дрожжина Е.П., Курносова Н.А. и др. – Ульяновск: УлГУ, 2008. – 100 с.

Хартманн У. Очарование нанотехнологии: пер. с нем. / У. Хартманн. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 173 с.

Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с.

Giepmans B. N. G. Bridging fluorescence microscopy and electron microscopy / Ben N. G.Giepmans // Histochem Cell Biol. – 2008. – V.130. – P.211–217.

Nuclear hourglass technique: An approach that detects electrically open nuclear pores in *Xenopus laevis* oocyte / T. Danker et al. // PNAS. – 1999. – Vol. 96, №23. – P.13530-13535.

Smith A. M. Bioconjugated Quantum Dots for In Vivo Molecular and Cellular Imaging / A.M. Smith et al. // Adv Drug Deliv Rev. – 2008. – Vol. 60, №11. – P. 1226–1240.

Интернет-сайты:

www.strf.ru
www.portalnano.ru
www.scincephoto.com
www.ntmdt.ru
www.microscop.ru
www.vechnayamolodost.ru/article_nanotehnologii/0/o_razvitii_nanobiotehnologii.html
www.sibupk.nsk.su/new/05/sem/2007/1
nit.miem.edu.ru/2005/plenar/6
3danimation.e-spaces.com/royalty-free-images.html
www.internovosti.ru/technologies/?cal=1-3-2008&page=200

ГЛАВА 2. Биомакромолекулы как составляющие наномира

2.1. Биомакромолекулы (биополимеры): нуклеиновые кислоты, белки и полисахариды

Ключевую роль в осуществлении процессов жизнедеятельности на молекулярном уровне организации живых систем играют биомакромолекулы (молекулы биополимеров). Что это за молекулы? **Каковы особенности структуры и свойств биомакромолекул?**

Биомакромолекула – это гигантская молекула полимера (биополимера), построенная из многих повторяющихся единиц – мономеров (рис. 16, 17).

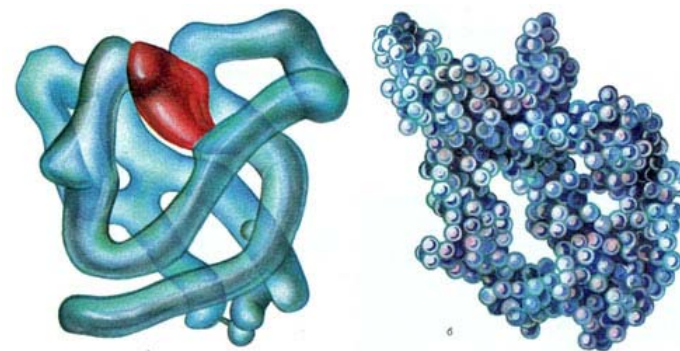


Рис. 16. Полимерная цепь (полипептидная цепь гемоглобина (справа участок полипептидной цепи))

Существует три типа биомакромолекул: белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Мономерами для них служат, соответственно, аминокислоты, нуклеотиды и моносахариды (рис. 17, 18).

Молекулы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) являются носителями генетической информации, без которой невозможно существование и размножение живых клеток. Белки выступают в роли действующего начала молекул ферментов, которые катализируют разнообразные химические реакции в клетке. ДНК, РНК, белки образуют систему биомолекул, ответственных за генетическую информацию и выполняющих над ней различные операции: копирование, хранение, изменение, считывание, исполнение.

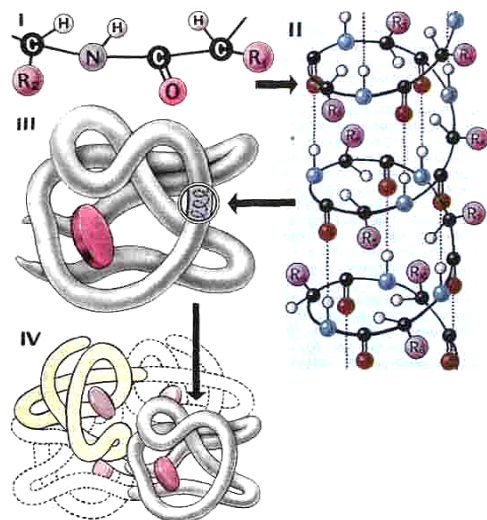


Рис. 17. Этапы формирования молекулы белка гемоглобина:
 I – образование полипептидной цепи из молекул мономеров(аминокислот);
 II – образование правозакрученной полипептидной альфа-спирали;
 III – упаковка альфа-спирали в глобулу (сферу неправильной формы);
 IV – формирование молекулы гемоглобина из четырех полипептидных глобул

2.2. ДНК как носитель и хранитель генетической информации в клетке

Непрерывность и преемственность жизни невозможна без материального носителя наследственной (генетической) информации. Только благодаря ему информация о строении, развитии и жизнедеятельности живых организмов наследуется из поколения в поколение.

Основным носителем генетической информации является ДНК (рис. 18). У вирусов, наряду с ДНК, эту роль может выполнять также РНК. **Что представляет собой ДНК?**

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – это полимер (полинуклеотид), формируемый мономерами – нуклеотидами. Молекула ДНК состоит из двух комплементарных полинуклеотидных цепочек, закрученных в право-

стороннюю спираль (рис. 18). Толщина спирали составляет 1-2 нм, длина витка - 3,4 нм. Полинуклеотидные цепочки удерживаются водородными связями между комплементарными азотистыми основаниями (аденин-тимин, гуанин-цитозин).

Восхищение вызывает то, **каким образом Природа решила проблему записи генетической информации.** Для записи информации, превышающей по объему ту, которая хранится сейчас во всех библиотеках мира, мудрейшему конструктору всех времен – Природе понадобилось лишь 4 буквы.

Генетическая информация записана в ДНК посредством 4-буквенного алфавита (А, Г, Т, Ц) и отражается в последовательности нуклеотидов, содержащих 4 типа азотистых оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин). Участок ДНК, кодирующий структуру молекулы одного из видов белка (РНК), назван геном. Генетическая информация определяет последовательность аминокислот в молекулах полипептидов, а, тем самым, первичную структуру молекул белка. ДНК располагается как в ядре клетки (ядерная ДНК или ДНК хромосом), так и в цитоплазме (внеядерная ДНК).

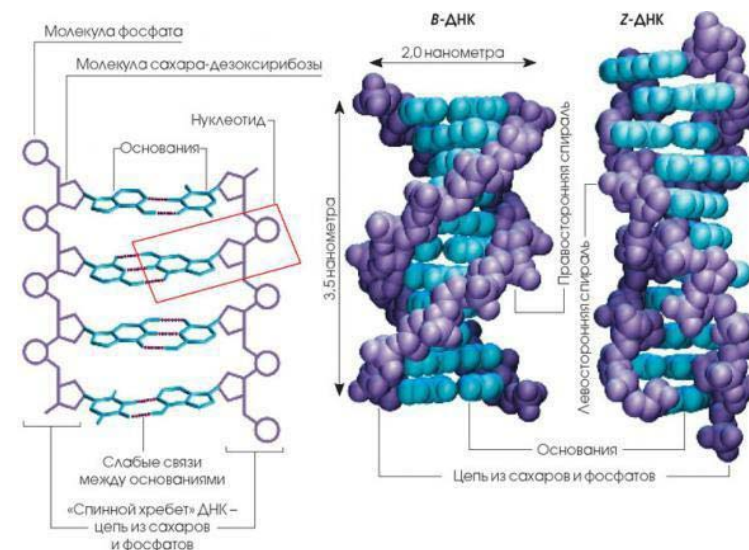


Рис. 18. Химическая (слева) и пространственная (справа) структура фрагмента молекулы ДНК

ДНК органоидов цитоплазмы (хлоропластов, митохондрий) получила название внеядерной, или цитоплазматической ДНК. Она несет наследственную информацию, передающуюся преимущественно по материнской линии.

2.3. Особенности структуры РНК, ее роль в самом древнем нанопроизводстве планеты

Наряду с ДНК нуклеиновые кислоты представлены в живых организмах также РНК (рибонуклеиновой кислотой). **Каковы принципиальные различия между РНК и ДНК?**

В отличие от двухцепочечной молекулы ДНК молекула РНК состоит из одной полинуклеотидной цепочки (рис. 19). РНК синтезируется на молекуле ДНК и является комплементарной копией участка одной из цепочек ДНК. **Своеобразием химического состава РНК является то, что вместо тимина она содержит азотистое основание урацил (рис. 19), а в состав нуклеотида вместо дезоксирибозы входит рибоза.**

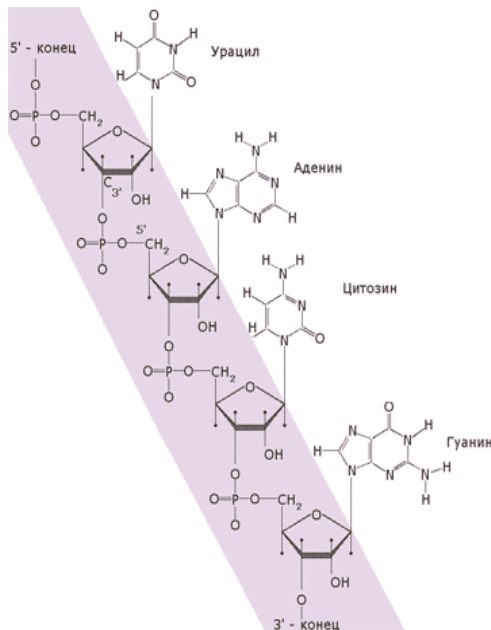


Рис. 19. Химическая структура РНК

Существуют разные типы РНК, различающиеся по величине молекул, структуре, расположению в клетке и функциям. Низкомолекулярные транспортные РНК (тРНК) составляют примерно 10% от всей клеточной РНК. При реализации генетической информации каждая тРНК присоединяет и переносит определенную аминокислоту к рибосомам – месту синтеза белка (рис.

20). Рибосомные РНК (рРНК) составляют до 85% всей РНК клетки. Они входят в состав рибосом и выполняют структурную функцию. Кроме того, рибосомные РНК участвуют в формировании активного центра рибосомы, где происходит образование пептидных связей между молекулами аминокислот в процессе биосинтеза белка.

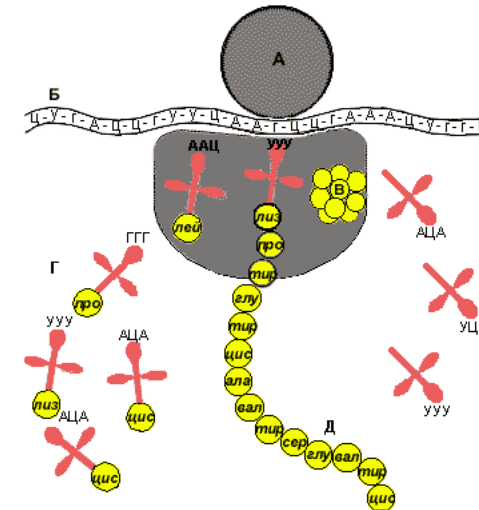


Рис. 20. Матричная РНК (Б) и транспортная РНК (Г) в процессе биосинтеза полипептида (Д) в рибосоме (А)

Информационные или матричные РНК (иРНК, мРНК) программируют синтез всех видов белков клетки. Они осуществляют непосредственную передачу кода ДНК на структуру синтезируемого в рибосомах белка. **Рибосомы можно назвать природными нанопроизводителями белковых наноструктур.** Причем самыми древними нанопроизводителями на Земле, возникшими более 3 млрд лет тому назад. Многие сотни триллионов таких нанопроизводителей содержит в себе организм каждого человека. В рибосомах по копиям проектов, доставляемых иРНК из клеточного ядра, синтезируются все необходимые организму белки.

2.4. Структурная организация и функции белков

В известном вам определении жизнь рассматривается как «способ существования белковых тел». **Почему молекулы белков стали одними из наиболее распространенных веществ в клетке и в организме в целом?**

Ответ следует искать в многогранности функций, которые они выполняют. В качестве только основных функций можно упомянуть следующие: пластическая (строительная), каталитическая (ферментативная), транспортная, гормональная, защитная, двигательная, опорная и формообразующая, энергетическая, рецепторная (чувствительная), запасаящая, антибиотическая, токсическая.

Такое **многообразие функций связано со структурой и свойствами белковых молекул. В чем они заключаются? Какова химическая структура белковых молекул? Как организованы молекулы белка в пространстве?**

Молекула белка представляет собою биополимер, мономерами которого являются аминокислоты. В природе существует около 100 разных аминокислот, однако только 20 из них входят в состав белка живых организмов. Аминокислоты имеют как минимум одну аминогруппу ($-NH_2$) и карбоксильную группу ($-COOH$).

При формировании молекулы белка аминокислоты последовательно соединяются друг с другом пептидными связями. Пептидная (ковалентная азот-углеродная) связь образуется в результате взаимодействия аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой. Соединяясь друг с другом пептидными связями, аминокислоты образуют различной длины пептиды (дипептиды, тетрапептиды и т.д.).

При взаимодействии множества аминокислот образуется полипептид. Большинство белков представляет собой высокомолекулярные полипептиды, в состав которых входят от ста до нескольких тысяч аминокислот. **Последовательность аминокислот в составе полипептидной цепи определяет первичную структуру белка.** От нее зависят форма, свойства и функции белковой молекулы.

Однако первичной структурой формирование белковой молекулы не заканчивается. **Каким же образом завершается структурное оформление белков?**

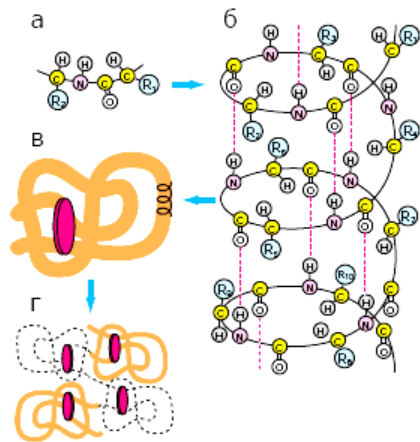


Рис.21. Последовательные этапы формирования первичной (а), вторичной (б), третичной (в) и четвертичной (г) структуры молекулы гемоглобина

Вторичная структура формируется при укладывании полипептидной цепи в правозакрученную α -спираль. Она возникает в результате формирования водородных связей между $-CO$ - и $-NH$ -группами разных аминокислотных остатков полипептидной цепи (рис. 21).

У большинства белков полипептидные цепи изгибаются и сворачиваются особым образом в компактную структуру неправильной сферической формы – глобулу. Тем самым формируется **третичная структура белка**. Прочность глобулы обеспечивается разнообразными связями (дисульфидными, ионными, водородными и гидрофобными), возникающими между радикалами аминокислот. Так называемые олигомерные (мультимерные) белки характеризуются **четвертичной структурой** (рис. 21). Они состоят из нескольких полипептидных цепей, удерживаемых в молекуле вместе за счет гидрофобных взаимодействий, а также при помощи водородных и ионных связей (гемоглобин и т.п.).

2.5. Самоорганизация и модификация белков

Уникальность белков как сложных химических веществ заключается в их способности к самоорганизации. Последняя заключается в самосборке и самоукладке молекулы белка в естественную (нативную) трехмерную структуру (рис. 22).

Удивительно, что самоорганизация белковой молекулы протекает не только в живой клетке, но и, как установили ученые в 60-х годах XX века, за ее пределами, в искусственных условиях. При этом самоорганизация белка может осуществляться спонтанно, нередко даже без участия источников энергии и ферментов.

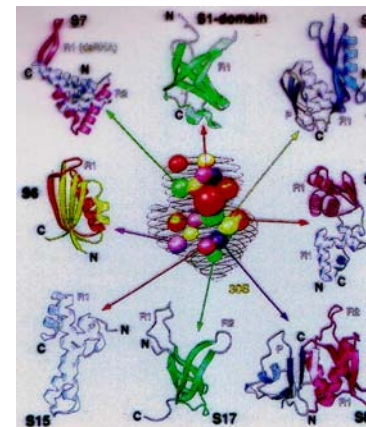


Рис.22. Разнообразие естественной (нативной) структуры белков рибосомы

Какие механизмы лежат в основе самоорганизации белковой молекулы? Способность белковой молекулы к самоорганизации обусловлена **последовательностью в ней аминокислотных остатков, а также свойством функциональных групп этих остатков к взаимодействию.** Каждый аминокислотный остаток имеет около 10 вариантов трехмерных построений (конформаций). Полипептидная цепь из 100 остатков аминокислот может обрести 10^{100} возможных конформаций.

Трудно представить, что молекула белка вынуждена «отыскивать» свою пространственную структуру среди многих триллионов возможных структур. Однако это происходит и к тому же осуществляется немислимо быстро: весь процесс самоорганизации занимает, как и процесс биосинтеза в рибосоме, около 1 минуты.

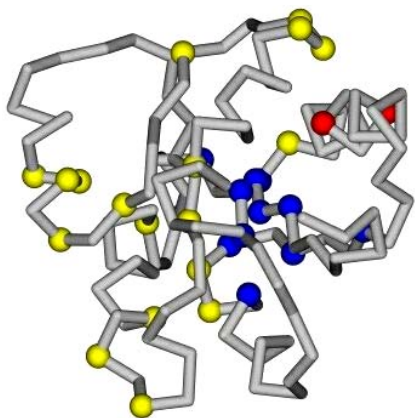


Рис.23. Промежуточный этап самоорганизации белковой молекулы в первичную глобулу (цветные шарики соответствуют меченым для целей наблюдения участкам полипептида)

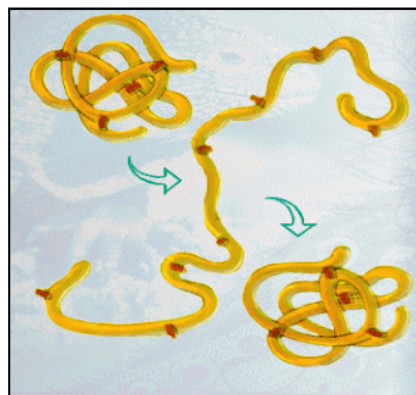


Рис.24. Денатурация (стрелка слева) и ренатурация (стрелка справа) молекулы белка, в ходе которых белковая молекула утрачивает естественную (нативную) конфигурацию и затем снова ее обретает путем самоорганизации

Для глобулярных белков учеными описаны несколько этапов самоорганизации, включающих: образование участков правозакрученных спиралей (альфа-спиралей), формирование выпячиваний полипептида в виде шпилек (бета-шпилек), слипание спиралей и шпилек в первичную глобулу (неправильную сферу), «доводка» структуры глобулы до естественной для данного белка (рис. 23). На этих этапах самоорганизации белка последовательно формируются вторичная и третичная структура белковой молекулы (рис. 21).

А что произойдет с молекулой белка, если разрушится возникшая в ходе ее самоорганизации естественная структура, например, после нагревания до 80 °С? Неужели она необратимо утратит свои свойства и способность выполнять функции в клетке? В лабораторных экспериментах учеными показано,

что такой денатурированный белок (белок, утративший свою естественную конформацию) может обрести ее заново (рис. 24). Это происходит в ходе процесса ренатурации (обратного процессу денатурации). При ренатурации белка имеет место его самоорганизация, включающая указанные выше этапы. Как видим, самоорганизация белка может «подарить» белковой молекуле вторую жизнь после, казалось бы, окончательной гибели. Древнейший и мудрейший наноконструктор планеты – Природа – опять оказался на высоте.

В 1973 г. российский офтальмолог Е. Г. Рапис, изучая травмы глаза, обнаружила, что при высыхании сыворотки крови на стекле возникают удивительные спиральные симметричные фигуры. Такие фигуры регулярно повторялись в последующих опытах, когда высыхали водные растворы других белков. Это явление получило впоследствии название неравновесной самоорганизации белков в искусственных условиях (*in vitro*). В ходе него образуются белковые комплексы (агрегаты) надмолекулярного уровня. В частности, при конденсации растворов белка могут образовываться многослойные белковые пленки. Их формируют разнообразные белковые структуры от наноуровня до микро-макроуровней. Такая сложная надмолекулярная архитектура белка возникает в ходе естественного нанотехнологического процесса. Она привлекла внимание не только биологов, но и ученых-специалистов в области создания наноматериалов и наноустройств. Появились перспективные проекты использования белковых агрегатов и многослойных белковых пленок в нанобиотехнологиях.

Ограничились ли структурные превращения белковой молекулы ее самоорганизацией? Стремящаяся к максимальному разнообразию структур живого Природа не могла допустить подобное. **Вторым естественным направлением превращений белковой молекулы стала модификация белков. Она заключается в дальнейших химических превращениях уже синтезированной или еще синтезируемой в рибосоме полипептидной цепи.** Полипептид подвергается превращениям, в основе которых лежат: 1) разрезание молекулы полипептида на фрагменты; 2) сшивание отдельных фрагментов полипептида в новую молекулу; 3) соединение простых белков с разнообразными веществами с образованием сложных белков – гликопротеинов, липопротеинов, металлопротеинов и др.; 4) химические превращения отдельных аминокислот в составе полипептида (окисление, образование дисульфидных и водородных связей). Модификации подвергаются большинство секреторных клеткой (выделяемых за ее пределы) белков. В превращениях белковой молекулы самоорганизация обычно предшествует ее модификации.

Модифицированные белки стали объектом особого внимания наноконструкторов и нанотехнологов. Ученых из университета французского города Бордо заинтересовали, в частности, гликопротеины. **Чем примечательны сложные модифицированные белки гликопротеины?** Молекула гликопротеина содержит ярко выраженные гидрофобный (белковый) и гидрофильный (углеводный) участки. Такие молекулы, попадая в воду, способны самопро-

извольно организовываться в шарообразные наноструктуры (рис. 25). Используя эти свойства гликопротеинов, исследователи осуществили синтез искусственных мембранных нанопузырьков.

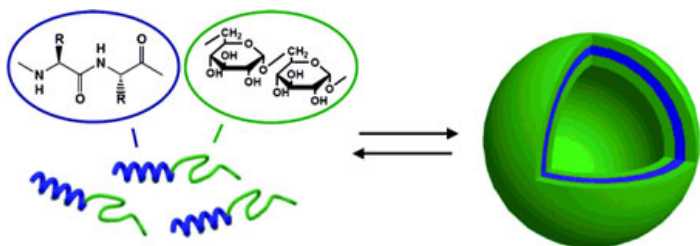


Рис. 25. Молекулы модифицированного белка гликопротеина (изображены на рисунке слева) обладают гидрофобным (синего цвета) и гидрофильным (зеленого цвета) участками. В водном растворе такие молекулы произвольно собираются в мембранные нанопузырьки (справа на рисунке)

Подобные мембранные нанопузырьки предсталяют интерес как возможные контейнеры для направленного транспорта веществ в живом организме.

2.6. Олигомеризация и агрегация белков. Образование белковых наноконплексов

Молекулы полипептидов обладают способностью объединяться в комплексы – олигомерные структуры. Этот процесс объединения полипептидов (протомеров, субъединиц) в олигомерную структуру (олигомерную молекулу) получил название **олигомеризации белков**. Многие ферменты, мембранные и другие белки живых организмов имеют олигомерную природу (рис. 26). Олигомерные структуры могут состоять как из одинаковых (рис. 26 а.б.в), так и из различных (рис. 26 г) протомеров. Протомеры (субъединицы) связываются между собой в процессе олигомеризации нековалентными связями. Поэтому олигомерные комплексы легко распадаются на исходные протомеры.

Влияет ли олигомеризация на свойства отдельных протомеров (полипептидов)?

Как выяснили ученые, олигомеризация повышает устойчивость полипептидов к действию расщепляющих белки ферментов и других химических агентов среды.

Олигомеризация оказалась не единственным способом объединения белковых молекул. Вторым способом является агрегация белков - взаимодействие белковых молекул посредством участков правозакрученных альфа-спиралей с образованием надмолекулярных агрегатов. Если таких вторичных структур нет, например, у окончательно оформленных глобул, естественная агрегация белковых молекул невозможна. Только при «расплавлении» (раз-

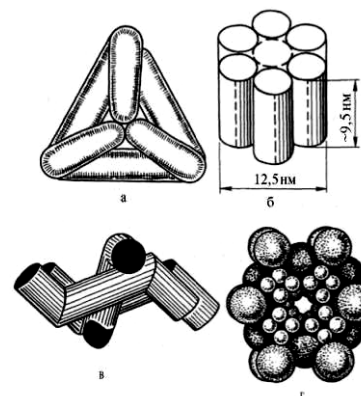


Рис.26. Структурные модели ферментов олигомерной природы: а – шесть субъединиц протомеров образуют молекулу фермента глутаматдегидрогеназы; б – молекула РНК-полимеразы; в – половина молекулы каталазы; г – молекула пируватдегидрогеназы

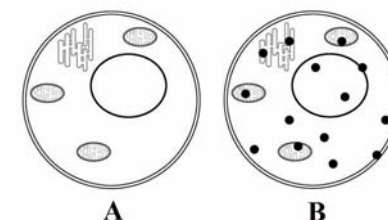


Рис. 27. Покоящаяся клетка (А) содержит оптически прозрачную цитоплазму, активная клетка (В) отличается мутной (менее прозрачной) цитоплазмой из-за появления в цитоплазме множества очагов агрегации белка (отмечены черными кружками)

При некоторых заболеваниях (катаракта глаза, коровье бешенство и др.), а также в процессе старения организма наблюдается неестественная (патологическая) агрегация белков. В отличие от естественной агрегации она имеет, как правило, необратимый характер.

Олигомерные белковые комплексы и надмолекулярные белковые агрегаты представляют собой своеобразные естественные наноконплексы. Их образование, роль в живых клетках таят в себе еще много загадок. Однако уже первые результаты их исследования находят применение в создании новых наноматериалов



Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.И. Илизарова

и нанотехнологий. Так, в Российском научном центре «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.И. Илизарова создаются и изучаются белковые наноконструкции, стимулирующие восстановление костной ткани при ее повреждении. Оригинальность метода заключается в том, что организм пострадавшего можно заставить производить такие наноконструкции самостоятельно из собственных ресурсов, т.е. аутогенно.

2.7. Конструирование наноструктур на основе белков

Описанные в предыдущих разделах самоорганизация, модификация, олигомеризация и агрегация белков демонстрируют чрезвычайно широкие возможности простых молекул (полипептидов) в формировании молекул сложных белков и надмолекулярных наноструктур. В естественных условиях живые организмы образуют из простых белков (протеинов) сложные белки (нуклеопротеины, гликопротеины, липопротеины и др.), олигомерные белковые структуры, надмолекулярные белковые агрегаты, тысячи разнообразных наноструктур и наноконструкций.

Образующиеся белковые наноструктуры чрезвычайно разнообразны по форме (трехмерной структуре) и размерам. Чем обусловлено такое разнообразие белковых наноструктур? Оно является следствием: во-первых, большого количества аминокислотных остатков в молекуле полипептида (от нескольких десятков до нескольких сотен), во-вторых, способностью каждого такого остатка приобретать около 10 пространственных конфигураций и вступать в разнообразные связи с другими молекулами белка.

Примечательно то, что **в живом организме форма и размеры исходных белковых наноблоков более строго определяют форму и структуру надмолекулярных комплексов, чем в искусственных условиях.** Это обстоятельство заинтересовало наноконструкторов и нанотехнологов. Используя такие отличия поведения белковых молекул в искусственных условиях, можно получать практически любые необходимые наноструктуры (наноконструкции) на основе белка. Даже такие, которые никогда не возникают в живых организмах.

Получаемые белковые наноструктуры можно выделять из среды, очищать и кристаллизовать. Затем их можно изучать, используя весь арсенал физических и химических методов, включая оптическую, ультрафиолетовую, инфракрасную спектроскопию с высоким временным разрешением. Результаты изучения белковых надмолекулярных структур используются при конструировании наноконструкций и наноагрегатов в лабораторных и производственных условиях. Рассмотрим первые достижения подобных работ.

Можно ли с помощью белковых молекул наладить автоматическую сборку наночастиц? Первыми утвердительный ответ на этот вопрос дали рос-

сийские ученые из Института биоорганической химии РАН. Они разработали технологию автоматической сборки наночастиц с помощью молекул белков барнас и барстар. Упомянутые белки были выделены из палочкообразных бактерий. Этим двум видам белков была отведена роль «роботов» на сборочной линии. Наночастицы, собранные таким образом, представляют интерес как для медицины, так и для новых биотехнологий. К наночастицам можно присоединять молекулы лекарственных препаратов, радиоактивные изотопы для диагностики и лечения раковых заболеваний. В наночастицу можно вмонтировать радиоактивный изотоп, флуоресцентную частицу, лекарства, токсины.

Как белковыми наночастицами заменить антибиотики? В первую очередь те антибиотики, к которым у микроорганизмов уже выработалась устойчивость?

К решению такой проблемы первыми приступили исследователи из Института биоинженерии и нанотехнологий Сингапура. Они обратили внимание на **катионные белки – белки, которые в растворе обретают положительный заряд.** На основе молекул этих белков исследователи создали самособирающиеся наночастицы (рис. 28). Такие наночастицы обладают антимикробным действием и могут заменять традиционные антибиотики. При этом белковые наночастицы действуют сразу на множество микроорганизмов и уничтожают даже те, которые выработали устойчивость против большинства современных антибиотиков.

Каков механизм действия антимикробных белковых наночастиц? Белковые наночастицы прорывают оболочку бактерий во многих местах и такие микроорганизмы с обнаженной цитоплазмой незамедлительно погибают. В сравнении с антибиотиками белковые наночастицы обладают двумя несомненными преимуществами: 1) проникают через клеточные и тканевые барьеры, «сооружаемые» организмом вокруг органов, в том числе и больных органов; 2) не дают нежелательных побочных эффектов при их применении. Антимикробные белковые наночастицы успешно прошли лабораторные испытания на подопытных животных.

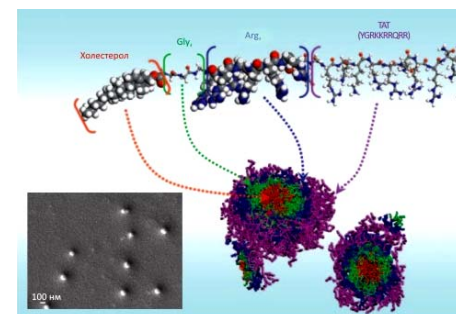


Рис.28. Образование белковой наночастицы с антимикробными свойствами: холестерол образует гидрофобное ядро (красного цвета), а положительно заряженные в растворе белки (показаны зеленым, синим и сиреневым цветами) окружают его. На врезке (в левом нижнем углу) – электронная микрофотография, позволяющая оценить размер образующихся наночастиц (≈ 100 – 150 нм)

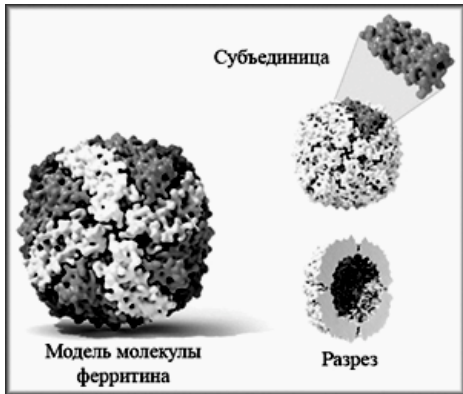


Рис. 29. Схема строения молекулы белка ферритина

Внимание ученых, разрабатывающих наноконструкции на основе белков, привлек ферритин. Этот белок обеспечивает хранение железа в организме. Молекула ферритина имеет форму шара диаметром 12 нм, составленного из 24 полипептидных субъединиц (рис. 29). Внутри шара имеется полость диаметром 8 нм, заполненная наночастицами оксигидроксида железа (FeOOH).

Одна молекула ферритина удерживает в полости более 4000 атомов железа. При необходимости через поры, имеющиеся внутри белковой оболочки, наночастицы оксигидроксида железа размером 5 нм выходят наружу. Попадая в кровь, они расходуются на синтез гемоглобина. Моделируя строение и свойства ферритина, ученые разрабатывают искусственные наноматериалы. В них частицы оксигидроксида железа включаются в состав пористых матриц.

Как следует из изложенного в этой главе, белки и особенно сложные белки стали одним из самых распространенных объектов манипуляций специалистов в области нанобиотехнологий. А **можно ли найти применение в нанотехнологиях самым простым белковым структурам – пептидам?** Первыми утвердительно ответили на этот вопрос ученые из Тель-Авивского университета (Израиль). Они разработали способ создания на поверхности стекла решеток из пептидных нанотрубок (рис. 30). При этом исследователями была **использована способность пептидов к самосборке**. Получаемые пептидные нанотрубки представляют собой структуры, собранные из двух видов аминокислот. Создаваемые из пептидных нанотрубок материалы проявляют гидрофобность (свойство отталкивать воду). Отталкивая воду, а вместе с ней



Рис. 30. Самособирающиеся пептидные нанотрубки

и механические пылевые частицы, они сохраняют поверхность всегда чистой.

Материалы из пептидных нанотрубок заинтересовали специалистов в области солнечной энергетики. Благодаря им поверхность солнечных батарей будет всегда

оставаться сухой и чистой. Это, в свою очередь, позволит повысить эффективность солнечных энергостанций и значительно снизить затраты на их эксплуатацию.

Ученые также полагают, что решетки из пептидных нанотрубок можно будет использовать для создания суперконденсаторов. Обладая уникальными электрическими характеристиками, такие конденсаторы смогут заменить современные аккумуляторные батареи.

2.8. Транспортные белки: особенности расположения и функционирования в клетке

Липидный слой плазмалеммы (клеточной мембраны) является непроницаемым для полярных молекул. Благодаря этому он надежно охраняет полезные для клетки вещества, предотвращая их утечку из цитоплазмы. Вместе с тем, липидный слой серьезно затрудняет поступление в клетку необходимых для ее жизнедеятельности полярных веществ из внешней среды. **Каким же образом Природа решила проблему поступления полярных веществ внутрь клетки?**

В ходе эволюции сформировались специальные механизмы транспорта полярных веществ через клеточную мембрану. Основу таких механизмов составили транспортные белки. Они расположены в клеточной мембране так, что их полипептидная цепь пронизывает бимолекулярный слой липидов несколько раз (рис. 31). Поэтому транспортные белки являются трансмембранными белками.

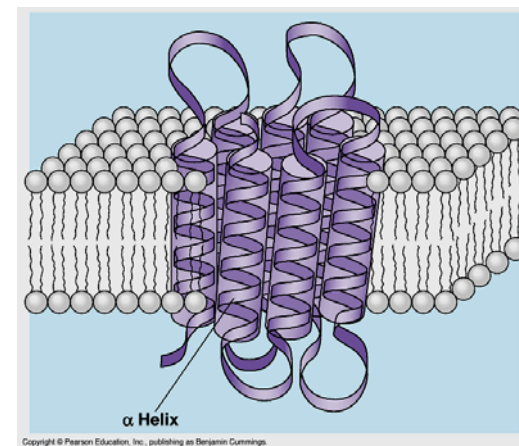


Рис. 31. Расположение полипептидной цепи транспортного белка в бимолекулярном слое липидов клеточной мембраны

Трансмембранные белки разделяются на две группы: белки-переносчики и каналообразующие белки (рис. 32). **Белки-переносчики транспортируют молекулы веществ через липидный слой.** Вначале молекула белка-переносчика специфически связывается с молекулой транспортируемого вещества. В молекулах белков-переносчиков всех типов имеются определенные участки для связывания транспортируемой молекулы. Затем молекула переносчика изменяет свою конфигурацию (трехмерную структуру) таким образом, что осуществляет перенос молекулы связанного с ней вещества сквозь липидный слой мембраны. Они работают в механизмах как пассивного, так и активного мембранного транспорта, выступая в этом процессе как связанные с мембраной ферменты. **Каналообразующие белки формируют при изменении конформации каналы (поры), сквозь которые проникают ионы и другие неорганические вещества** (рис. 33).

А каким образом в клетку поступает самое распространенное в ней вещество – вода? Она свободно проникает через гидрофобный липидный слой по двум причинам: 1) из-за отсутствия электрического заряда молекул; 2) благодаря небольшому размеру молекул.

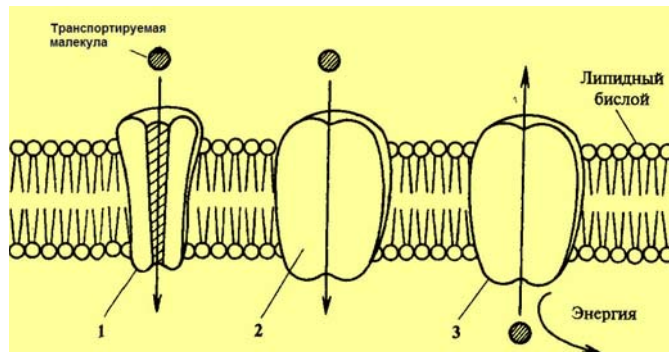


Рис. 32. Транспортные белки клеточной мембраны: 1 – каналообразующие белки; 2, 3 – белки-переносчики

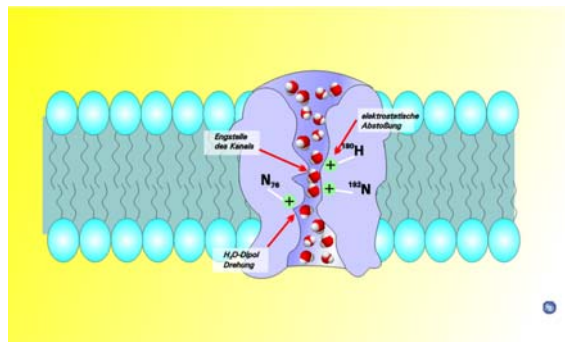


Рис. 33. Молекула каналообразующего белка в бимолекулярном слое липидов клеточной мембраны

Транспорт с участием транспортных белков происходит чаще всего с затратой энергии, источником которой является АТФ. Примером белка-переносчика, использующего энергию АТФ для перекачивания ионов, служит натрий-калиевый насос. Он играет решающую роль в образовании мембранного потенциала на плазматических мембранах животных клеток.

2.9. Строение, расположение в клетке и функции белков-рецепторов

Клетка живого организма самостоятельно реагирует на внешний сигнал или раздражитель. Функцию рецепции (восприятия сигнала) выполняют клеточные рецепторы – белковые молекулы, расположенные на поверхности клетки или клеточного органоида.

Каким образом молекула белка выполняет сложнейшую функцию клеточного рецептора? Молекула белка (рецептор) изменяет свою пространственную конфигурацию при присоединении к нему молекулы гормона или другого сигнального вещества (лекарства, яда и т.п.). Вещество, специфически соединяющееся с рецептором, называется лигандом этого рецептора (рис. 34). Лиганд передает внешний регуляторный сигнал рецептору.

Любой белок-рецептор состоит как минимум из двух участков: первый обеспечивает узнавание лиганда, второй – преобразование и передачу полученного сигнала в клетку.

Процесс связывания рецептора с лигандом похож на процесс связывания фермента с субстратом и определяется степенью сродства рецептора и лиганда. Между молекулой специфического химического вещества и рецептором

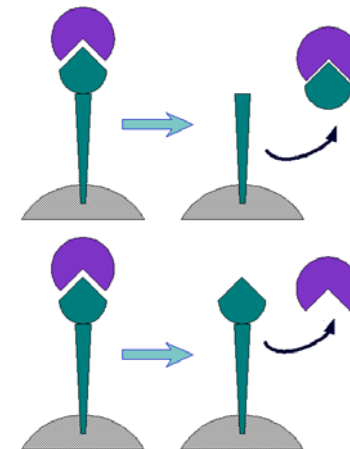


Рис. 34. Комплементарность (соответствие) лиганда (сиреневого цвета) структуре белка рецептора (голубого цвета) – основное условие образования между ними временной связи

происходят электростатические и гидрофобные взаимодействия. Они вызывают изменения пространственной конфигурации белка-рецептора, вследствие которых активируется комплекс лиганда с белком-рецептором. В активном состоянии белок-рецептор может вызывать ответные реакции клетки на принятый сигнал.

Рецепторы, чувствительные к строго определенным веществам, разбросаны по поверхности клетки или собраны в небольшие зоны. В клеточной мембране обычно имеется около 100 различных разновидностей рецепторов, и каждый из

них «узнает» определенный лиганд. Роль клеточных рецепторов заключается не только в связывании специфических веществ, но и в передаче сигналов с поверхности внутрь клетки или ее органоида. Разнообразие и специфичность рецепторов поверхности клеток формирует сложную систему своеобразных «маркеров», позволяющих клеткам отличать «своих» от «чужих».

Различают два основных вида клеточных рецепторов: 1) мембранные рецепторы (рис. 35), локализованные в клеточной мембране; 2) внутриклеточные рецепторы, расположенные на поверхности клеточного органоида.

Среди мембранных рецепторов выделяют ионотропные рецепторы и метаботропные рецепторы (рис. 35). Ионотропные рецепторы представляют собой мембранные каналы, открываемые при связывании с лигандом. Возникающие при этом ионные токи изменяют возбудимость клетки, концентрацию ионов в цитоплазме и активируют определенные внутриклеточные структуры. **Метаботропные рецепторы** связаны с внутриклеточными посредниками, обеспечивающими распространение сигнала внутри клетки



Рис. 35. Разновидности мембранных рецепторов клетки: ионотропный рецептор (ионный канал) и метаботропный рецептор (рецептор). В передаче сигнала «рецептор – клеточное ядро» участвуют вторичные посредники

Многие из мембранных рецепторов связываются с углеводными цепочками, образуя гликопротеины. Обращенные в межклеточное пространство свободные концы таких рецепторов содержат несколько остатков моносахаридов. Последние имеют разнообразную разветвленную форму, напоминающую антенны (рис. 36). Функция таких «антенн» – распознавание внешних сигналов. Распознающие «антенны» двух соседних клеток могут связываться друг с другом, обеспечивая сцепление клеток.

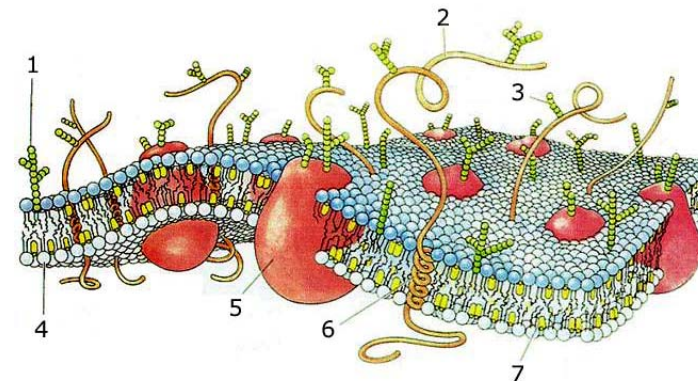


Рис. 36. Мембранные рецепторы в структуре клеточной мембраны (плазмалеммы). 1 – углеводы, связанные с липидами мембраны (гликолипиды); 2 – свободные концы рецепторов гликопротеиновой природы; 3 – «антенны»; 4 – гидрофильные участки бимолекулярного слоя липидов; 5,6 – рецепторы; 7 – гидрофобные участки бимолекулярного слоя липидов

2.10. Изучение рецепторной функции мембраны и разработка новых нанобиотехнологий

В исследованиях рецепторной функции клеточной мембраны особо перспективным является изучение рецепторов, формируемых трансмембранными белками под названием GPCR. Это обусловлено тем, что около трети всех производимых лекарств оказывают воздействие на клетки лишь после того, как провзаимодействуют с их белками-рецепторами GPCR. Поэтому эффективность применения многих лекарств зависит от того, смогут ли они связаться с локализованными в клеточных мембранах белками GPCR.

Как обеспечить связывание создаваемого лекарственного препарата с белками-рецепторами GPCR? Решение проблемы поначалу казалось неслучным. Поскольку лекарство будет выступать в роли лиганда, необходимо добиться максимального соответствия между ним и участком узнавания лиганда, имеющимся у рецептора. Для этого необходимо знать пространственную структуру белка-рецептора.

Однако изучение конфигурации белков-рецепторов оказалось очень трудным и безрезультатным: после извлечения из клеточной мембраны трансмембранные белки-рецепторы сразу же утрачивали свою естественную конфигурацию. Те немногие белки-рецепторы, трехмерную структуру которых все же удалось определить, оказались неподходящими рецепторами для молекул лекарственных препаратов. **Возможен ли иной подход к решению проблемы определения пространственной конфигурации белка-рецептора?**

Он был найден в лаборатории биологических систем Технологического института штата Джорджия (США). Группа исследователей под руководством Джеффри Скольника просто смоделировала структуру белков-рецепторов, используя компьютер. Для этого была применена специальная компьютерная программа TASSER, разработанная исследователями в 2004 году.

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

2.11. Нанобиосенсоры, их применение в диагностике и лечении заболеваний

На основе механизмов функционирования белков-переносчиков и белков-рецепторов учеными разработаны нанобиосенсоры. Они позволяют осуществлять высокочувствительное выявление специфических белков, вирусов или ДНК в органах, тканях, клетках и биологических жидкостях.

Конструктивно нанобиосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей – биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом (рис. 37).

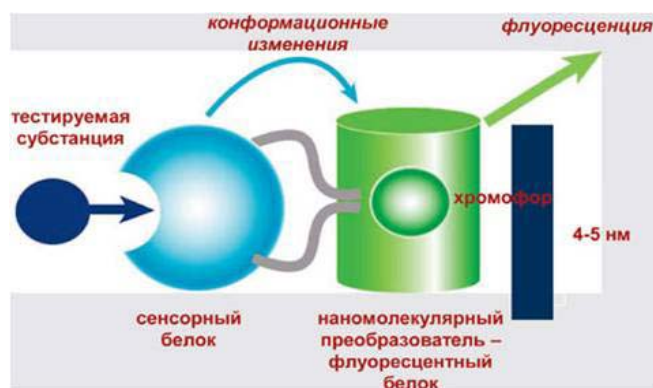


Рис. 37. Схема конструкции нанобиосенсора. Биохимический преобразователь представлен сенсорным белком (белком-рецептором). С ним взаимодействует тестируемая субстанция (анализируемое вещество), в результате чего происходят конформационные изменения (изменения пространственной структуры) белка-рецептора. Последние вызывают изменения в физическом преобразователе, который включает флуоресцентный белок. По интенсивности флуоресценции определяется наличие (количество) искомого вещества в тестируемой субстанции

Нанобиосенсоры могут быть запрограммированы на обнаружение в биологических жидкостях (слюна, кровь и др.) комплекса белков, являющихся индикаторами развития тех или иных заболеваний. Ученые полагают, что нанобиосенсоры способны внести революционные изменения в медицинскую диагностику заболеваний.

Какие же свойства белков способствовали их применению в создаваемых нанобиосенсорах?

Исследователи из наноцентра в Вене (Австрия) обратили внимание на свойство некоторых белков образовывать регулярные структуры в виде кристаллических решеток (рис. 37). Многие бактерии, в частности, формируют на своей поверхности одномолекулярные слои кристаллического белка (рис. 37), называемые S-слоями.

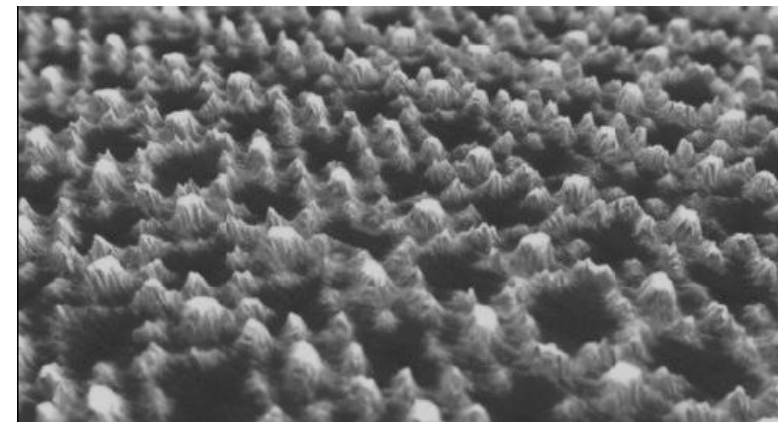


Рис. 37. Фотография рельефа кристаллизованного белка CCM2177, синтезируемого бактерией, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Расстояния между центрами решетки составляют 13,1 нм

Каким образом кристаллический белок можно применить в нанобиосенсорах? Исследователи удалили белковый S-слой с поверхности бактерии и разбили его на «субъединицы». Поместив затем субъединицы в раствор, они добились объединения их в кристаллическую решетку, формируемую уже на кремниевых, металлических и синтетических подложках. К помещенному на подложку S-слою были добавлены специальные сенсорные молекулы, которые вместе со слоем сформировали точный биоаналитический сенсор.

Подобным образом австрийскими исследователями был создан сенсор глюкозы на основе S-слоя и молекулы фермента оксидазы глюкозы. Во время реакции фермента с глюкозой, через нанобиосенсор проходит электрический ток. Измеряемая величина тока характеризует содержание глюкозы.

Как скажется на свойствах нанопровода размещение на его поверхности белков-рецепторов? Поиск ответа на этот вопрос завершился созданием нанобиосенсоров иного типа (рис. 38). В таком нанобиосенсоре

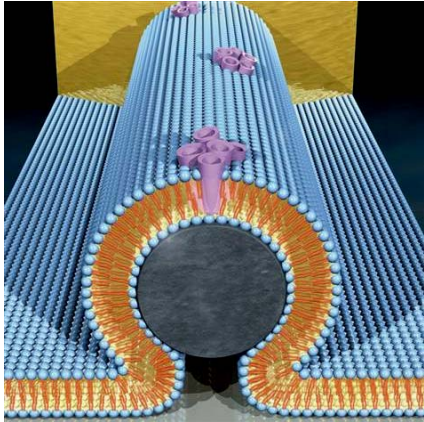


Рис. 38. Нанопровод (темно-серого цвета) с изоляцией на основе бимолекулярного слоя липидов клеточной мембраны (оранжево-голубого цвета) и молекулами белков-рецепторов (сиреневого цвета)

на поверхность нанопровода нанесен слой специальных белков-рецепторов (сенсорных молекул). Последние обладают способностью специфически связываться с биологическими макромолекулами. В результате образования такой связи изменяется электрическая проводимость нанопровода. Эти изменения сигнализируют о выявлении определенного вещества.

В настоящее время на основе нанопроводов создан уникальный нанобиосенсор, позволяющий выявлять единичные вирусы. Связывание вируса со специфическим белком-

рецептором (антителом), нанесенным на поверхность нанопровода, вызывает значимое изменение электрической проводимости.

Однако на этом исследователи не остановились. **Можно ли сконструировать нанобиосенсор, способный одновременно выявлять сразу несколько видов вирусов?** Ученые разместили на поверхности одного нанопровода несколько различных белков-рецепторов (антител), чувствительных к различным видам вирусов. При связывании с белками-рецепторами любого из этих вирусов регистрируется изменение проводимости нанопровода. Тем самым определяется присутствие вируса. Такие устройства, несомненно, найдут широкое применение в медицинской диагностике.

Особого внимания заслуживают наносенсоры, которые выявляют последовательность нуклеотидов в ДНК. В одном из таких уже созданных устройств рецепторы, нанесенные на нанопровода, способны обнаруживать мутантные гены, вызывающие заболевание муковисцидоз.

Всем известно значение как можно более раннего выявления раковых заболеваний. Для успешного их лечения важно выявить первые появившиеся раковые клетки в органе. **Возможно ли обнаружение единичных злокачественных клеток с помощью нанобиосенсоров?**

Ответом на этот вопрос стало создание нанобиосенсоров на основе углеродных нанотрубок. Известно, что в ответ на появление в организме чужеродных веществ, называемых антигенами, иммунная система вырабатывает антитела. Последние представляют собой специфические глобулярные белки. **Каждый вид антител избирательно взаимодействует с определенным антигеном (белковым рецептором).** Ученые попытались применить антитела, специфичные к рецепторам (антигенам) мембраны раковых клеток. Ими они

покрыли углеродные нанотрубки. Получившиеся нанобиосенсоры способны обнаруживать злокачественные клетки в организме и определять вид опухоли.

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

Таким образом, **наибольший интерес для медицины представляют два направления использования нанобиосенсоров** в совокупности с наноконтейнерами: 1) **обнаружение антител**, специфичных к антигенам больных клеток; 2) **избирательная доставки лекарственных средств** непосредственно к больным клеткам. Использование медикаментозных препаратов, заключенных в наночастицы, сводит до минимума их разрушение и утрату активности по пути к больному органу. При этом предотвращается возникновение нежелательных побочных явлений, а также возрастает эффективность применения препарата.

2.12. Белковые «наномоторы» в живых клетках

Трудно поверить в то, что в клетках живущих сейчас организмов работают наномоторы, сконструированные Природой более 3 млрд лет тому назад. Белковые «моторы» участвуют в протекающих в клетках естественных нанопроцессах. Так, синтез универсального источника энергии в клетке – АТФ протекает с участием белковой наноструктуры – фермента АТФ-синтазы. Этот фермент представляет собой механическое устройство, образованное двумя совместно работающими роторными наномоторами. Механическая энергия, сообщаемая моторами, используется при синтезе молекул АТФ.

Кроме роторных моторов в клетках живых организмов встречается более сотни наномоторов, обеспечивающих прямолинейное движение. Эти моторы расположены в различных частях клетки, существенно различаясь по своим функциям. Некоторые из наномоторов осуществляют сложные действия, состоящие из нескольких сотен шагов, а некоторые предназначены для выполнения только одиночных действий. Белковые моторы существенно различаются не только по своим действиям, но и по массе. В настоящее время активно изуча-

ются белковые моторы линейного движения, относящиеся к трем большим семействам белков: миозин, динеин, кинезин. Белок миозин известен биологам с 1864 года. Однако только во второй половине XX века было установлено использование им механической энергии. **Молекула миозина представляет собой по сути простейшую механическую руку, осуществляющую один цикл по перемещению и выходящую из процесса движения** (рис. 39).

При этом она может несколько раз принимать участие в процессе движения. Несмотря на полуторавековую историю изучения миозина, ученые так и не выяснили, что принуждает белок принимать участие в движении.

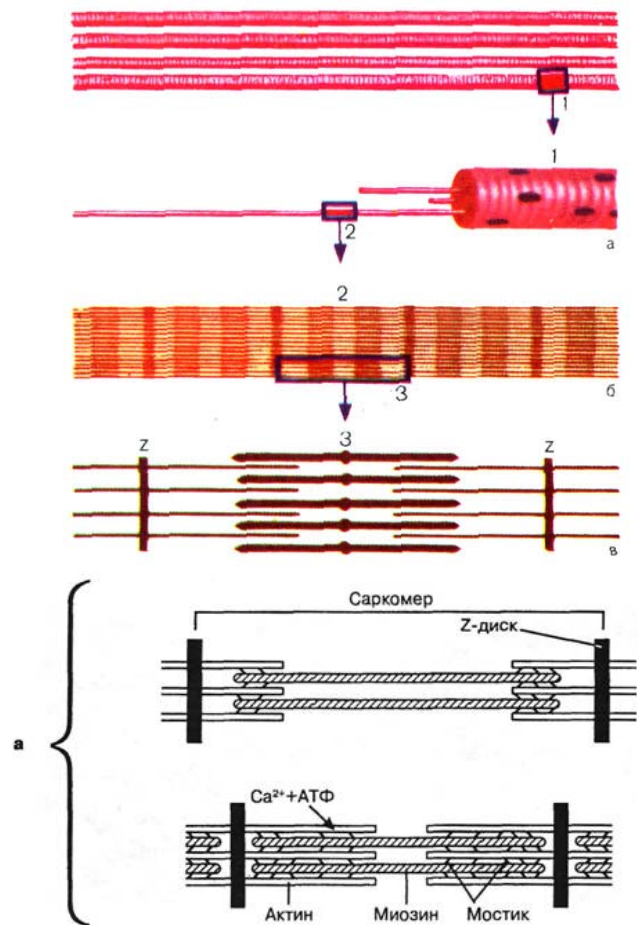


Рис. 39. Схема мышечного сокращения, в котором участвует белковый мотор линейного движения на основе белка миозина: 1 – мышечное волокно; 2 – фрагмент специального органоида мышечного волокна – миофибриллы; 3 – молекулы миозина; на нижней (черно-белой) части рисунка показана ½ цикла прямолинейного перемещения молекул миозина по отношению к молекулам актина так, что степень взаимного «перекрывтия» молекул с образованием временных связей (мостиков) увеличивается

Белок **кинезин можно рассматривать как наноробот, располагающий двумя конечностями, при помощи которых он идет по направляющей**. Направляющая является белковой последовательностью. Эта последовательность поляризована на концах. Кинезин движется по ней от отрицательного полюса к положительному. Кинезиновые нанороботы встречаются в клетках различных типов в большом количестве.

В бактериальных организмах, например, в кишечной палочке (рис. 40) встречается еще один интересный пример механических белковых нанороботов. Это группа механических роботов, которые перемещением своих конечностей обеспечивают процесс плавания клетки.

Размер этих роботов составляет примерно 45 нм в диаметре. Их деятельность обеспечивает жизненно важную функцию, поскольку перемещение из менее благоприятной среды в более благоприятную является основой

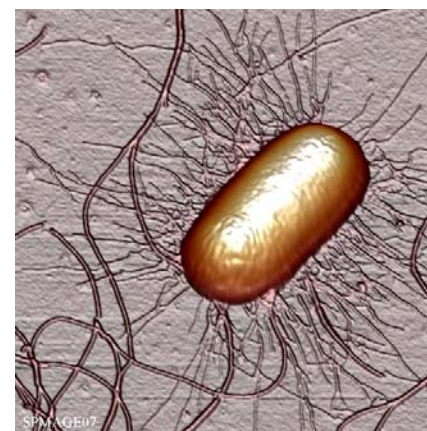


Рис. 40. Бактерия кишечная палочка. Приводящими устройствами органов движения – жгутиков являются роторные наномоторы

выживания таких организмов как кишечная палочка. Ученые выяснили, что основным приводящим устройством у механических роботов является роторный наномотор. При этом в состав роботов входят другие крайне загадочные механизмы, например, счетчики частиц, измерительные приборы. Много предстоит сделать в изучении структуры этих роботов и, прежде всего, чтобы выяснить, как взаимодействуют около 20 типов белков, формирующих такой наноробот.

Словарь основных терминов

Агрегация белков – взаимодействие белковых молекул посредством вторичных структур (участков правозакрученных альфа-спиралей) с образованием надмолекулярных агрегатов.

Белок – высокомолекулярное органическое соединение, построенное из остатков аминокислот и играющее первостепенную роль в процессах жизнедеятельности всех живых организмов.

Белок-переносчик – трансмембранный белок, который, изменяя свою пространственную структуру, осуществляет перенос молекулы вещества через липидный слой мембраны.

Белок-рецептор – специфический белок, находящийся в клеточной мембране и способный, связываясь с сигнальными веществами (лигандами), воспринимать передаваемый ими внешний сигнал.

Биополимеры – высокомолекулярные природные соединения (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и их производные), которые состоят из повторяющихся, сходных по структуре низкомолекулярных соединений (мономеров), являются структурными частями живых организмов и играют важную роль в процессах жизнедеятельности.

Каналообразующие белки – белки, которые формируют при изменении своей пространственной структуры каналы (поры), сквозь которые проникают ионы и другие неорганические вещества.

Модификация белков – химические превращения полипептида: разрезание молекулы на фрагменты; сшивание отдельных фрагментов полипептида в новую молекулу; соединение простых белков с разнообразными веществами с образованием сложных белков – гликопротеинов, липопротеинов, металлопротеинов и др.; химические превращения отдельных аминокислот в составе полипептида (окисление, образование дисульфидных и водородных связей).

Мономеры – низкомолекулярные соединения, сходные по структуре и способные реагировать между собой с образованием высокомолекулярного соединения – полимера.

Нанобиосенсор – искусственное наноустройство, в котором чувствительный слой, содержащий рецепторы (антитела, ферменты и т.п.) непосредственно реагирует на присутствие в биологическом материале определяемого компонента. При этом он генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно нанобиосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей – биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом.

Нуклеиновые кислоты – полинуклеотиды, фосфоросодержащие высокомолекулярные органические соединения, образованные остатками нуклеотидов; обеспечивают хранение, реализацию и передачу наследственной информации, «записанной» в виде последовательности нуклеотидов.

Нуклеотиды – нуклеозидфосфаты, соединения, из которых состоят **нуклеиновые кислоты**, многие **коферменты** и другие биологически активные соединения; каждый нуклеотид построен из азотистого основания (пуринового или пиримидинового), углевода (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты.

Олигомеризация белков – процесс объединения полипептидов (протомеров, субъединиц) в олигомерную структуру (олигомерную молекулу).

Полипептид – полимер, образованный в результате соединения множества аминокислот (мономеров) посредством пептидных (азот-углеродных) связей.

Рецепторы мембранные – рецепторы, локализованные в клеточной мембране;

Рецепторы внутриклеточные – рецепторы, расположенные на поверхности клеточного органоида.

Самоорганизация белка – самосборка и самоукладка молекулы белка в естественную (нативную) трехмерную структуру.

Сенсорный белок – белок, выполняющий функцию восприятия сигнала, чаще всего это белок-рецептор, расположенный в клеточной мембране.

Трансмембранный белок – белок, молекула которого пронизывает клеточную мембрану.

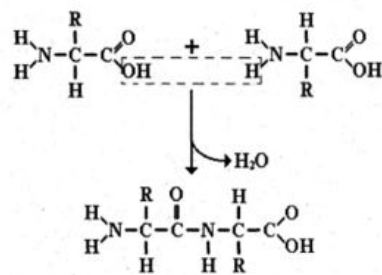
Вопросы для повторения

1. Что представляют собой биомакромолекулы?
2. Охарактеризуйте мономеры известных вам биомакромолекул.
3. Какие макромолекулы ответственны за хранение и использование генетической информации в клетке?
4. Объясните строение молекулы ДНК.
5. Какая часть молекулы ДНК может быть названа геном?
6. Последовательность остатков молекул каких веществ определяет генетический код ДНК?
7. Каковы структурные особенности молекулы РНК?
8. Какие виды РНК вам известны? Какова их биологическая роль в клетке?
9. Охарактеризуйте химический состав белка. Каков механизм образования пептидной связи?
10. Какие функции выполняют белки в клетке?
11. Что представляют собой вторичная, третичная и четвертичная структуры белков?
12. В чем заключается сущность самоорганизации белков?
13. Чем обуславливается чрезвычайно большое количество возможных пространственных конфигураций, которые может приобретать молекула одного и того же полипептида?
14. Какие этапы самоорганизации глобулярных белков вам известны?
15. Приведите примеры модификации белков.
16. Объясните сущность олигомеризации белков.
17. Почему олигомерные белковые комплексы легко распадаются на исходные протомеры?
18. Что представляет собой процесс агрегации белков?
19. Укажите различия между надмолекулярными белковыми агрегатами и олигомерными белковыми комплексами.

20. В каких клетках (покоящихся или активных) процесс агрегации белков протекает значительно интенсивнее?
21. Чем различаются естественная и патологическая (неестественная) агрегация белков?
22. Что можно отнести к естественным белковым наноконструкциям?
23. Какие свойства клеточной мембраны стали причиной возникновения в ходе эволюции специальных механизмов транспорта через нее?
24. Какова роль трансмембранных белков в составе плазматической мембраны?
25. Укажите особенности расположения транспортных белков в клеточной мембране.
26. Опишите особенности функционирования белков-переносчиков.
27. Какова роль в клетке каналообразующих транспортных белков?
28. Как устроены белки-рецепторы?
29. Чем различаются мембранные и внутриклеточные белки-рецепторы?
30. Какое вещество может быть названо лигандом данного рецептора?
31. Охарактеризуйте особенности функции ионотропных и метаболотропных рецепторов.
32. Какие подходы применяли ученые для изучения пространственной конфигурации (трехмерной структуры) белков-рецепторов клеточной мембраны?
33. На каких особенностях строения и функционирования белков-переносчиков и белков-рецепторов основана работа нанобиосенсоров?
34. Каким образом применяют нанобиосенсоры для диагностики заболеваний?
35. На чем основан направленный транспорт лекарственных веществ?

ЗАДАНИЯ

Задание № 1. Зарисуйте приведенную схему превращения и обведите квадратиком пептидную связь. Молекулы каких исходных веществ вступили во взаимодействие? Как правильно назвать вещество, молекула которого изображена внизу (дипептид, олигопептид, полипептид)? Какие исходные вещества вступили в реакцию (их молекулы изображены вверху)? Какое максимальное количество исходных молекул может вступить в реакцию такого типа?

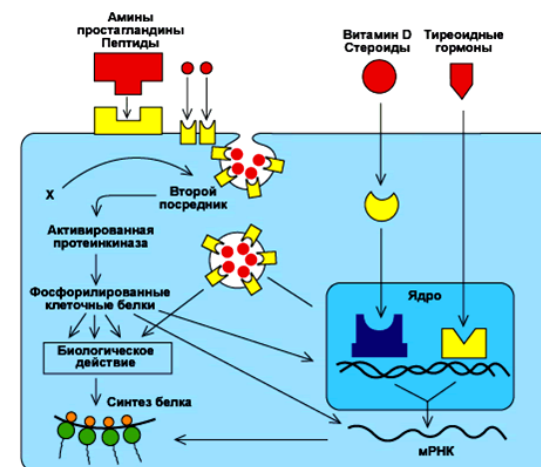


Задание № 2. Впишите указанные названия преобразований белковой молекулы в соответствующие (правую или левую) колонки таблицы: разрезание молекулы полипептида на фрагменты; сшивание фрагментов молекулы полипептида; фосфорилирование полипептида, формирование правозакрученной альфа-спирали; соединение молекулы полипептида с молекулой липида; формирование выпячиваний полипептида в виде бета-шпилек; соединение молекулы полипептида с атомами металлов; слипание альфа-спиралей и бета-шпилек в первичную глобулу; соединение молекулы полипептида с молекулой углевода; формирование окончательной (естественной для данного белка) глобулы.

Сравните оба типа преобразований белковой молекулы. Проанализируйте различия между ними. Дайте свою оценку роли каждого типа преобразований белковой молекулы в жизнедеятельности клетки.

САМООРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ включает:	МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ включает:

Задание № 3. Перерисуйте схему клетки в тетрадь и укажите на ней все перечисленные структуры: 1 – мембранные рецепторы; 2 – внутриклеточные рецепторы; 3 – лиганды. С какой частью рецептора взаимодействует лиганд?



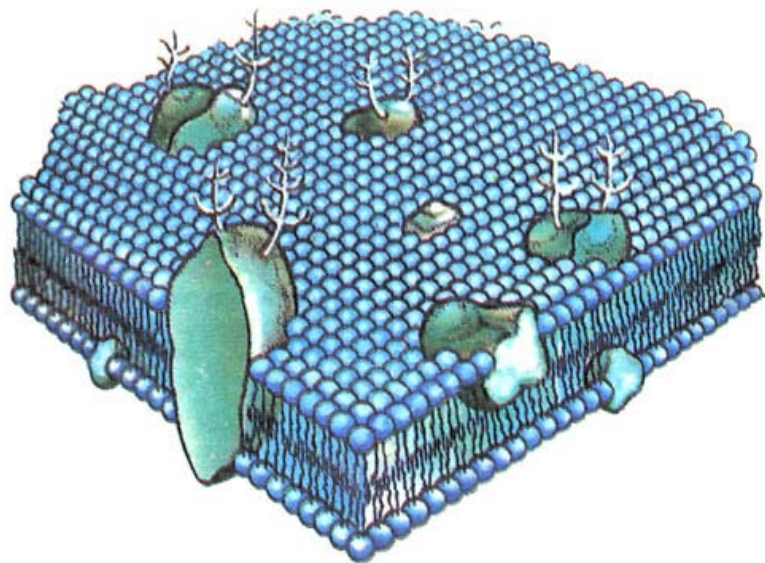
Задание № 4. Молекулы белков, выполняющих функцию клеточных рецепторов, локализируются в клеточной мембране. Объясните уже известные вам трудности в изучении первичной, вторичной и третичной структуры молекул белков-рецепторов клеточной мембраны. Предложите свое решение проблемы преодоления этих трудностей. Обоснуйте ваше предложение.

Задание № 5. Заполните таблицу «Сравнительная характеристика ДНК и РНК».

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК И РНК

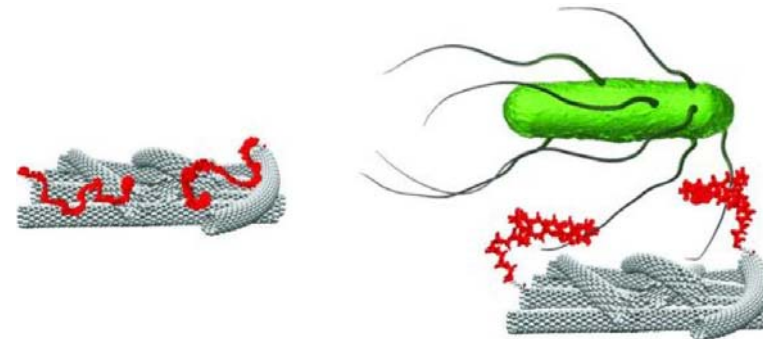
Особенности структуры, локализации и функции	ДНК	РНК
Азотистые основания		
Тип углевода		
Количество полинуклеотидных цепочек		
Локализация в клетке		
Биологическая роль в клетке		

Задание № 6. Зарисуйте в тетрадь рисунок «ФРАГМЕНТ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ» и обозначьте с помощью указательных линий и цифр изображенные на нем структуры. Определите различия между трансмембранными белками и белками-рецепторами клеточной мембраны.

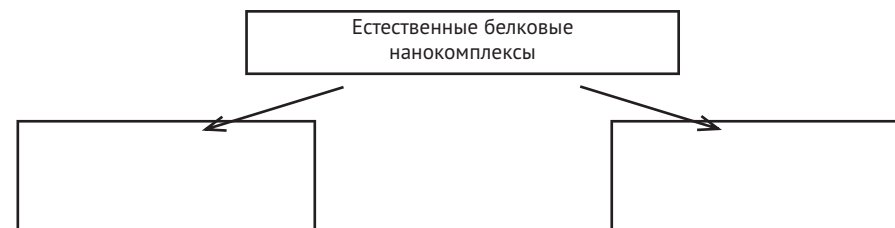


Задание № 7. Сравните два биологических явления – олигомеризацию и агрегацию белков. Укажите сходство и различие между ними. Представьте, что перед вами поставлена задача получить надмолекулярные белковые агрегаты. В вашем распоряжении имеются только белковые олигомерные комплексы, каждый из которых образован 4-мя молекулами глобулярного белка. Составьте план ваших действий по созданию белковых агрегатов.

Задание № 8. Какой процесс изображен на схеме? Объясните, какая наноконструкция в нем участвует, принимая во внимание то, что красным цветом изображены белки-рецепторы (сенсорные белки). Почему на рисунке справа белки-рецепторы имеют иную пространственную структуру (конформацию), по сравнению с той, которая изображена на рисунке слева? Какая часть наноконструкции отсутствует на схеме? Зарисуйте рисунок в тетрадь и дорисуйте недостающую часть наноконструкции.



Задание № 9. Завершите выполнение приведенной ниже схемы:



Задание № 10. Изобразите на схеме, используя названия процессов и стрелки (синтез тетрапептида → синтез полипептида →), последовательность во времени указанных процессов (преобразований): модификация белка, синтез полипептида, формирование альфа-спирали молекулы белка, синтез дипептида, олигомеризация белка, формирование белковой глобулы, синтез трипептида.

Задание № 11. Пред вами поставлена задача построить модель конфигурации (третичной структуры) глобулярного белка. Исследовать конфигурацию лабораторными методами невозможно. В лаборатории изучена только первичная структура молекулы. Единственным вариантом остается построе-

ние компьютерной модели. Какие характеристики (исходные данные) вы запросите в лаборатории для того, чтобы приступить к построению модели третичной структуры белка?

Задание № 12. Создайте информационную базу о наноконструкциях и нанотехнологиях, разрабатываемых на основе белков и белковых наноконструкций.

Литература

Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

Грин Н. Биология: в 3 т.: пер. с англ. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор; под ред. Р. Сопера. – М.: Мир, 1996.

Говорун В.М. «Системный подход» к живому / В.М. Говорун (режим доступа <http://nanosvit.com/publ/15-1-0-113>).

Евдокимов Ю.М. Нуклеиновые кислоты, жидкие кристаллы и секреты наноконструирования / Ю.М. Евдокимов // Наука и жизнь. – 2005. – № 4 (режим доступа <http://www.nkj.ru/archive/articles/604>).

Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 208 с.

Кирпичников М.П. О развитии нанобиотехнологии / М.П. Кирпичников, К.В. Шайтан // Инновации. – 2007. – № 12 (режим доступа http://www.vechnayamolodost.ru/article_nanotehnologii/0/o_razvitiu__nanobiotehnologii.html).

Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию: пер. с яп. / Н. Кобаяси. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 134 с.

Коницев А.С. Молекулярная биология / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2005. – 400 с.

Нанотехнологии. Азбука для всех / под ред. акад. Ю.Д. Третьякова. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008. – 368 с.

Сыч В.Ф. Основы биологической терминологии / В.Ф. Сыч. – Ульяновск: УлГУ, 2003. – 456 с.

Сыч В.Ф. Структурно-функциональная организация эукариотической клетки / В.Ф. Сыч, Н.А. Цыганова, Г.В. Абдулкин. – Ульяновск: УлГУ, 2006. – 84 с.

Сыч В.Ф. Общая биология: учебник для высшей школы / В.Ф. Сыч. – М.: Академический Проект, 2007. – 330 с.

Сыч В.Ф. Введение в нанотехнологии. Элективный курс в программу биологии: учебное пособие для 10-11 классов средней общеобразова-

тельной школы / Сыч В.Ф., Дрождина Е.П., Курносова Н.А. и др. – Ульяновск: УлГУ, 2008. – 100 с.

Хартманн У. Очарование нанотехнологии: пер. с нем. / У. Хартманн. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 173 с.

Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с.

Интернет-сайты

www.nkj.ru/archive/articles/604

nanosvit.com/publ/15-1-0-113

www.critical.ru/ThyreoSchool/content/doctors/1/c_1_02_02.php

woman.mobus.com/zdorovie/mednews/835.html?archiveDate=

www.critical.ru/ThyreoSchool/content/doctors/1/c_1_02_02.php

gusarovda.ucoz.ru/publ/1-1-0-33

ru.wikipedia.org/wiki/Аквапорин_2

www.fizrast.ru/fiziol-kletka/postuplenie-veshestv/etapy-postupleniya.html?start=2

www.science.uva.nl/research/its/molsim/research/

www.xumuk.ru>Биологическая химия>046.html

festival.1september.ru/articles/522155/

900igr.net/kartinki/fizika/CHastitsy/043-Struktura-nekotorykh-ribosomnykh-belkov-30S-subchastitsy-T-Th.html

gerontology-explorer.narod.ru/e0a5db41-daa4-47ea-8a13-b42d56293098.html

ГЛАВА 3. Нанобиотехнологии на основе структуры и свойств молекул ДНК

3.1. Свойства ДНК, используемые в нанотехнологиях. Самоудвоение (аутореplikация) ДНК

Два основополагающих атрибута живых организмов – наследственность и изменчивость основываются на уникальных свойствах ДНК. **Каковы же эти свойства ДНК?**

Во-первых, **молекула ДНК обладает способностью к самовоспроизводству**. Единственный вид биологических макромолекул, которые могут воспроизводить себя путем самоудвоения – это молекулы ДНК. Благодаря этому ДНК выполняет ответственнейшую миссию носителя наследственной информации во всех клеточных формах жизни.

Во-вторых, **молекулы ДНК разных видов способны к гибридизации** – слиянию отдельных цепочек ДНК от разных видов в единую двухцепочечную молекулу ДНК.

Эти свойства ДНК не могли не привлечь внимание исследователей и инженеров, разрабатывающих нанотехнологии. Все они были поражены поведением молекул ДНК не только в живых клетках, но и за их пределами – в лабораторных условиях или, по-другому, *in vitro*. В основе такого поведения ДНК лежали осуществляемые в строгой последовательности сложные процессы и явления. Без проникновения в сущность последних невозможно их смоделировать, воспроизвести *in vitro* и в производственных масштабах.

Каким же образом Природа решила проблему самовоспроизведения живых существ? **Как молекула ДНК может воспроизвести себя**, или, другими словами, **как материнская молекула может «породить» дочернюю молекулу?**

В основе такого самовоспроизведения лежит самоудвоение (ауторепликация) ДНК. Она происходит следующим образом (рис. 42).

Специальные ферменты (топоизомераза и хеликаза) раскручивает исходную (материнскую) молекулу ДНК и разъединяют ее на две полинуклеотидные цепи. **Каждая цепь материнской ДНК служит матрицей для сборки с помощью фермента ДНК-полимеразы новой или дочерней цепи ДНК.** Последняя является комплементарной материнской цепи.

Особенность работы ДНК-полимеразы состоит в том, что она не может начать синтез дочерней ДНК с нуля. ДНК-полимераза способна наращивать нуклеотиды только на уже имеющийся свободный 3'-конец полинуклеотидной цепи. Поэтому сначала другой фермент РНК-праймаза строит РНК-затравку, на которую ДНК-полимераза наращивает дочернюю цепь. При этом одна дочерняя цепь (лидирующая) синтезируется непрерывно (рис. 42). Другая дочерняя цепь (отстающая) собирается из небольших фрагментов (фрагментов Оказаки). Затем происходит объединение одной дочерней и одной материнской цепей ДНК в дочернюю молекулу ДНК.

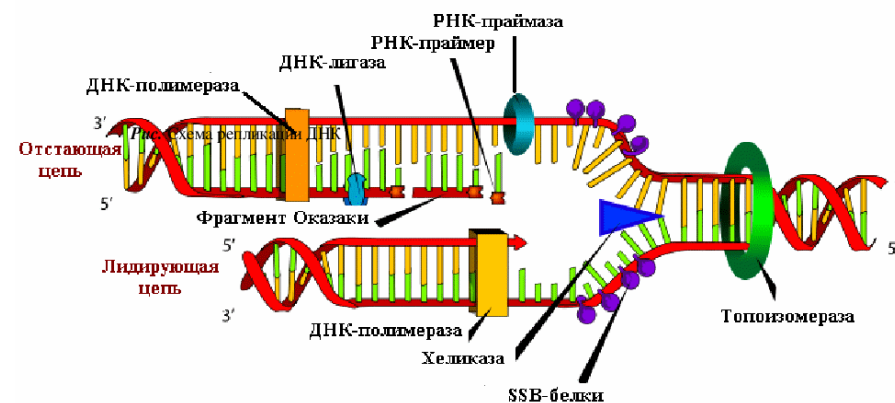


Рис. 42. Схема самоудвоения (аутореplikации) ДНК (описание в тексте)

В конечном итоге образуются две дочерние двухцепочечные молекулы, неотличимые по строению от материнской ДНК. Каждая из них состоит из одной цепи исходной материнской молекулы ДНК и одной вновь синтезированной дочерней цепи (рис. 42). Такой механизм репликации ДНК, при котором от одного поколения к другому передается лишь одна из двух материнских цепей молекулы ДНК, получил название полуконсервативного.

3.2. Гибридизация нуклеиновых кислот, ее практическое применение

Второе уникальное свойство молекул ДНК – способность к гибридизации – основана на особенностях ее структуры (см. главу 2). **Гибридизацией называют слияние двух отдельных цепей ДНК от разных видов (организмов) в единую двухцепочечную молекулу ДНК.** При комплементарности всех нуклеотидов обеих цепей (полной комплементарности) слияние происходит легко и быстро. В случае неполной комплементарности слияние цепей в единую двухцепочечную молекулу (дуплекс) замедляется. На основании оценки скорости этого слияния делают вывод о степени комплементарности исходных цепей.

Поскольку во всех живых организмах функционируют только двухцепочечные ДНК, возникает вопрос: **«Где и при каких условиях может образоваться одна цепь ДНК?»**

Отдельные цепи ДНК были получены исследователями в эксперименте *in vitro*. Молекулы ДНК разогрели в буферном растворе до 100° С. При этом водородные связи между комплементарными основаниями разрушились и молекулы ДНК разделились на отдельные полинуклеотидные цепи (рис. 43). Этот процесс назван денатурацией («плавлением») ДНК.

После смешивания цепей ДНК двух разных видов раствор охлаждали и выдерживали при температуре 65° С. В таких условиях цепи воссоединялись в молекулы ДНК. Происходило восстановление структуры двойной спирали (гибридизация, или «отжиг»). При этом формировались как гибридные молекулы (дуплексы), так и специфичные для каждого исходного вида молекулы (рис. 43). **Анализ скорости отжига одноцепочечных ДНК позволяет оценивать сходства и различия в нуклеотидных последовательностях исходных ДНК.**

Описанным методом можно сформировать дуплексы как типа «ДНК-ДНК», так и соединения типа «ДНК-РНК» (рис. 44). Подобный анализ результатов гибридизации ДНК/РНК позволил У.Гилберту выявить мозаичное строение генов, что стало одним из крупнейших открытий в молекулярной биологии XX века.

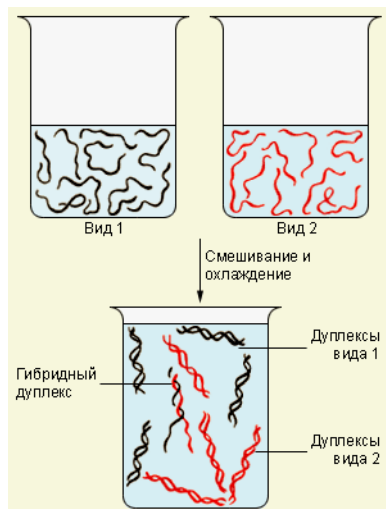


Рис. 43. Схема опыта по гибридизации ДНК

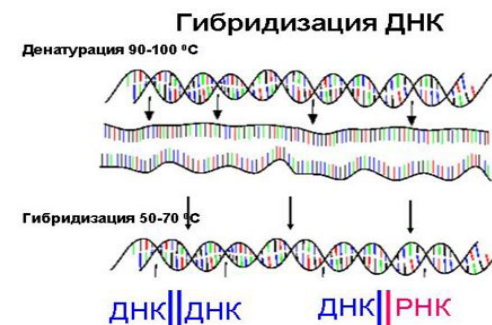


Рис. 44. Схема гибридизации ДНК (описание в тексте)

Как практически могут быть использованы описанные уникальные свойства ДНК – самоудвоение и гибридизация? К настоящему времени они уже используются:

- для нахождения числа определенных нуклеотидных последовательностей (генов) в ДНК;
- для выявления с высокой степенью точности одного (единственного) гена в клетке;
- для определения отдельных видов матричной РНК в клетках;
- для изучения избирательной активности генов в ходе развития зародыша;
- для выявления считываемых (транскрибируемых) и нечитываемых (нетранскрибируемых) последовательностей нуклеотидов в ДНК.

На основе способности ДНК к репликации и гибридизации учеными разработан метод амплификации (многократного копирования) ДНК, получивший широкое практическое применение.

3.3. Амплификация молекул нуклеиновых кислот, ее практическое применение

Определение структуры (нуклеотидных последовательностей) ДНК все более широко используется в биологии, медицине, сельском хозяйстве, археологии, палеонтологии, криминалистике. Оно проводится с помощью специальных лабораторных методов, которые требуют в качестве исходного объекта исследования большое количество молекул ДНК от одного организма.

Как же быть в тех случаях, когда в распоряжении исследователей имеются несколько или одна единственная молекула ДНК? До 1983 года проблема изучения их структуры оставалась неразрешенной. В упомянутом году проблему решил американский ученый К. Мюллис, использовавший уникальные свойства ДНК к самоудвоению и гибридизации. К. Мюллис

осуществил **полимеразную цепную реакцию (ПЦР)**, на основе которой был разработан метод «копирования» молекул ДНК. Научное название метода – метод амплификации (увеличения числа копий) нуклеиновых кислот. Этим методом можно в течение нескольких часов получить миллионы копий молекул (генов, фрагментов ДНК). Последние легко обнаруживаются и изучаются с помощью обычных лабораторных методов.

Попытаемся воспроизвести опыт-открытие американского ученого К. Мюллера – полимеразную цепную реакцию. Какие исходные компоненты необходимо для этого приготовить? В число обязательных компонентов входят:

- 1) ДНК-матрица – молекула ДНК или ее часть (это может быть всего одна единственная молекула ДНК вируса или бактерии, оказавшаяся в пробе для анализа);
- 2) праймеры (небольшие фрагменты из 20-30 нуклеотидных пар), которые комплементарны последовательностям нуклеотидов на концах искомого гена. Праймеры служат для двух целей: во-первых, запускают работу ДНК-полимеразы, предоставляя ей свободный 3'-конец; во-вторых, как бы «застопоривают» фермент в рамках выбранного для копирования участка ДНК, ограничивая его с двух сторон;
- 3) смесь нуклеотидов, являющаяся материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК;
- 4) фермент ДНК-полимераза;
- 5) буферный раствор (реакционная среда, содержащая ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания активности фермента).

Каким же образом в смеси перечисленных компонентов из одной молекулы ДНК в течение 4-5 часов образуются триллионы копий ДНК?

Полимеразная цепная реакция протекает в виде множества сходных циклов (повторов). Каждый цикл протекает в 3 этапа (рис. 45).

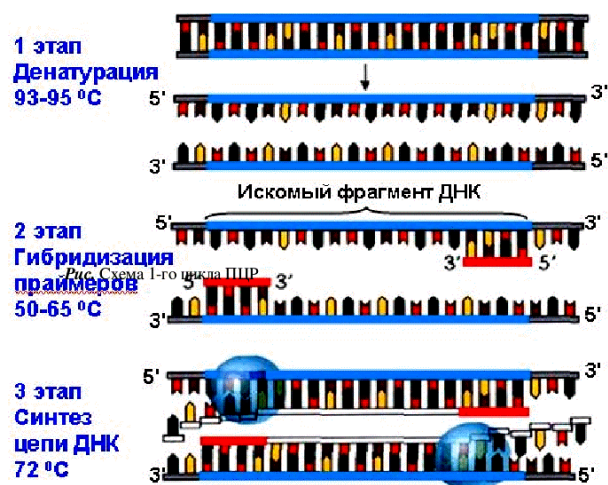


Рис. 45. Схема первого цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР)

1 этап. Денатурация ДНК (разделение двойной спирали на отдельные полинуклеотидные цепи). Осуществляется при 93-95 °C в течение 30-40 сек. Под воздействием температуры разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями и цепи ДНК разъединяются.

2 этап. Присоединение праймеров (гибридизация). Температуру снижают, и праймеры соединяются с комплементарными им участками ДНК на границах искомого гена. Время гибридизации – от 20 до 60 сек.

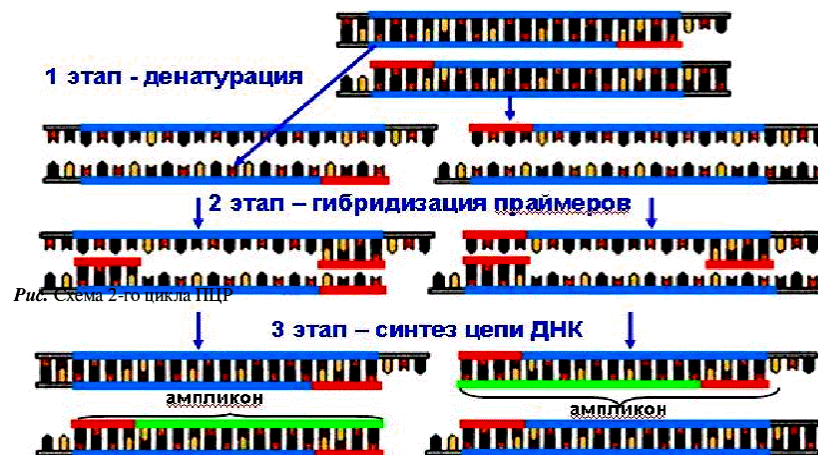


Рис. 46. Схема второго цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР)

3 этап. Синтез цепей ДНК. Осуществляется с помощью ДНК-полимеразы. В качестве затравки этот фермент использует 3'-конец праймера. ДНК-полимераза всегда достраивает цепь в направлении от 5' к 3'-концу. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор нуклеотиды. Процесс протекает при температуре 70-72 °C. Время синтеза составляет 20-40 сек.

В конце 1-го цикла ПЦР в растворе содержится два двухцепочечных фрагмента ДНК. Каждый из них содержит одну исходную цепь и одну вновь образованную, соединенную с праймером.

При **втором цикле** амплификации все описанные выше 3 этапа повторяются. Происходит денатурация цепей ДНК. Затем каждая из 4 цепей снова взаимодействует с праймерами и, в конечном итоге, появляются фрагменты, соответствующие искомому гену, ограниченные с двух сторон праймерами. Эти фрагменты названы ампликонами (рис. 46). К концу 2-го цикла ПЦР появляется 2 ампликона.

Процесс ПЦР отличается цепным характером: синтезированные ампликоны в дальнейшем сами служат матрицами, на которых протекает процесс копирования. Вследствие этого, с каждым новым циклом число копий ДНК увеличивается в геометрической прогрессии (рис. 46).

Поэтому, если в исходном растворе первоначально находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК (например, ДНК какого-либо вируса), то за 30-40 циклов (а это займет всего 4-5 часов) в растворе накопится достаточно много копий. Это даст возможность изучать их (обнаруживать искомые гены) с помощью обычных лабораторных методов.

В настоящее время ПЦР проводят в специальной лаборатории (рис. 48), в особом программируемом термостате (амплификаторе). По заданной программе термостат автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.

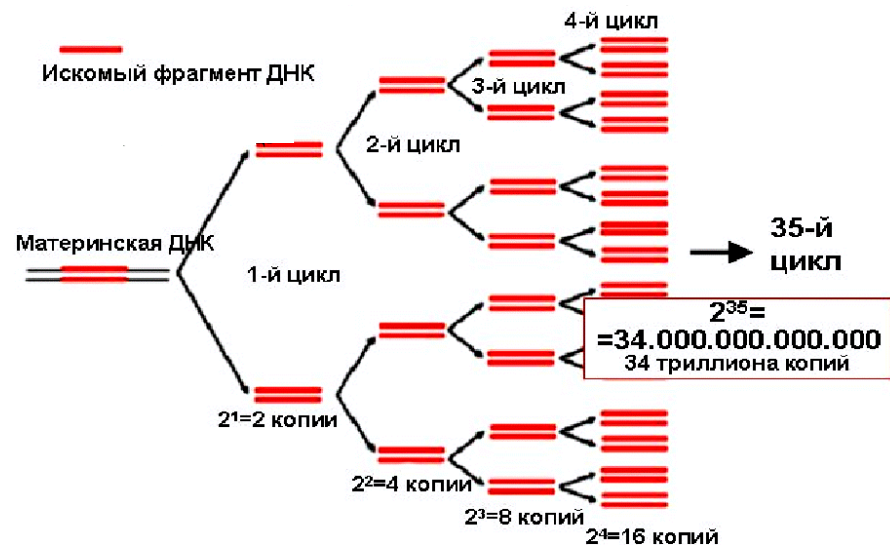


Рис. 47. Общая схема полимеразной цепной реакции (ПЦР)



Рис. 48. Лаборатория для проведения ПЦР

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

3.4. Основные подходы к созданию наноконструкций на основе нуклеиновых кислот

В процессе эволюции биологические молекулы (биомолекулы) приобрели свойства, которые делают их удобным материалом для создания структур нанометрового размера. Во-первых, многие **биомолекулы способны к спонтанному образованию (самосборке) сложных надмолекулярных структур**. Во-вторых, **формирование (самосборка) таких биологических структур подвергается тонкой регуляции**. Последнее позволяет направлять самосборку по различным путям, что открывает широкие возможности для создания самых разнообразных наноконструкций и наноматериалов.

Среди разнообразия биологических соединений выделяются нуклеиновые кислоты, рассматриваемые наиболее привлекательными биополимерами для целей наносборки. Короткие (длиной 50-100 нм) двухцепочечные молекулы ДНК имеют при толщине в 1-2 нм довольно высокую жесткость. Поэтому их удобно использовать в качестве «строительных блоков». В то же время одноцепочечная нуклеиновая кислота сохраняет гибкость и, кроме того, обладает способностью узнавать комплементарную ей цепочку. Две такие цепочки легко соединяются вместе в двухцепочечную структуру (молекулу ДНК) благодаря образованию между ними водородных связей.

Проблематичным оказалось соединение двухцепочечных молекул ДНК или их фрагментов в линейном порядке. Без этого возможности наноконструирования на основе ДНК резко сужаются. **А как осуществить разветвление двухцепочечной ДНК, или ответвление от нее в строго определенном месте фрагмента ДНК?** Разнообразие трехмерной организации наноструктур без таких ответвлений немыслимо.

Оригинальное решение проблемы предложили ученые-биологи. Они использовали все ту же (указанную выше) способность цепей ДНК соединяться посредством водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями. Для этого концы двухцепочечных молекул ДНК необходимо «оснастить» короткими одноцепочечными «хвостиками». Впоследствии такие

«хвостики» были названы «липкими концами» молекул ДНК. Если у двухцепочечных молекул ДНК на концах имеются одноцепочечные «хвостики» то можно присоединять другие цепочки и формировать места разветвления. Это позволяет создавать плоские решетки и сложные пространственные структуры. Свойства двумерных и трехмерных структур из нуклеиновых кислот легко регулировать, изменяя растворители, в которых происходит самосборка.

К настоящему времени оформились **два основных направления создания наноконструкций на основе нуклеиновых кислот**: конструирование «шаг за шагом» и конструирование по типу «все сразу».

Конструирование «шаг за шагом» – подход, основанный на последовательной модификации исходной молекулы ДНК или синтезированного полинуклеотида. Этот подход был теоретически обоснован в 1982 году американским ученым Н. Симаном. Первый шаг сборки – получение фрагментов ДНК с одноцепочечными «липкими» концами. Второй шаг – склеивание «липких» концов разных фрагментов ДНК посредством водородных связей комплементарных азотистых оснований (рис. 49).

Подбирая определенную последовательность нуклеотидов в цепочке ДНК, можно создавать «точки ветвления» молекул. Последние позволяют сформировать крестообразную пространственную структуру ДНК (рис. 49). Такую искусственно созданную крестообразную молекулу ДНК можно снабдить «липкими» концами. В результате последовательного сшивания крестообразных ДНК посредством «липких» концов образуется плоская нанорешетка.

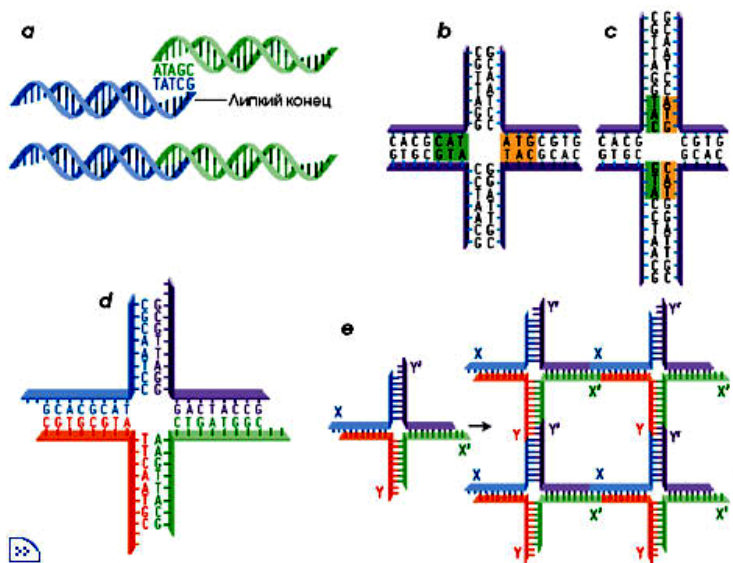


Рис. 49. Схема конструирования наноструктур по типу «шаг за шагом»: а – соединение фрагментов молекул ДНК посредством «липких концов»; б,с,д – формирование крестообразных структур ДНК; е – соединение крестообразных молекул ДНК в плоскую решетку

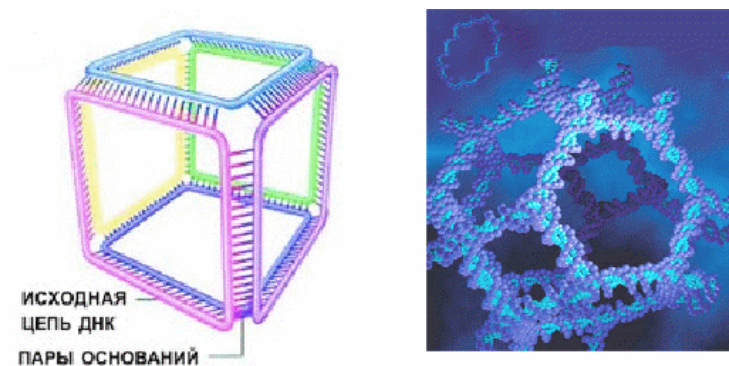


Рис. 50. Наноструктуры на основе ДНК, созданные Н.Симаном (слева – структура в форме упрощенного куба, справа – в форме октаэдра)

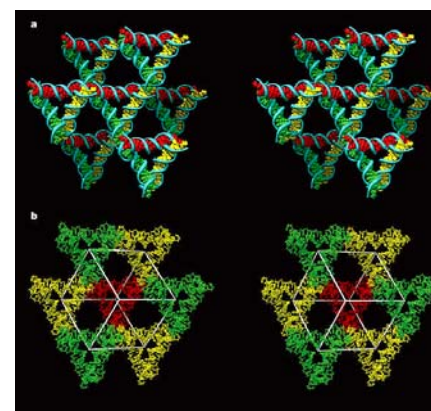


Рис. 51. Конструкции из треугольных структур ДНК

«Точки ветвления» повлияли на свойства молекулы ДНК таким образом, что предоставили еще одну возможность в конструировании – возможность сгибать плоские нанорешетки. **Из-за подвижности молекулы ДНК жесткость нанорешетки в точках ветвления снижается.** Благодаря этому такую решетку можно легко сгибать. В 1991 году Н.Симан получил из молекул ДНК наноструктуры, имеющие форму куба с ребрами, а также форму сцепленных октаэдров (рис. 50). При соединении плоских треугольных структур ДНК, из вершин которых выступают «липкие» концы, можно получить трехмерные кристаллические наноструктуры (рис. 51).

В последние годы активизировались работы над технологиями получения трехмерных структур на основе ДНК. Одним из недавних прорывов в области ДНК-конструирования стали коробочки из ДНК с крышкой, которые можно закрыть на ДНК-ключ. В перспективе такие трехмерные структуры из ДНК могут быть использованы для создания электронных устройств наноразмеров и конструирования систем доставки лекарств в организм.

Первые попытки практического применения наноконструкций на основе ДНК столкнулись с непредвиденно узкими его возможностями. Для его расширения **требовалась разработка способов встраивания молекул или атомов других веществ («гостей») в состав исходных цепочек ДНК или в уже готовую наноструктуру** (рис. 52). Из таких сложных наноконструкций можно создавать биодатчики, которые регистрируют определенные вещества, узнавая их молекулы.

В 1996 году были получены первые обнадеживающие результаты. Исследователи успешно применили в качестве «строительных блоков» синтетические одноцепочечные фрагменты ДНК, присоединенные к наночастицам коллоидного золота. Из таких «блоков» удалось получить наноструктуры, в которых частицы золота располагались на строго фиксированном расстоянии друг от друга. Например, на расстоянии, кратном длине витка двойной спирали ДНК (3,4 нм). При объединении наночастиц золота сразу с несколькими фрагментами ДНК можно создавать трехмерные наноструктуры с регулярным чередованием атомов золота.

Внутри наноструктур из ДНК можно встраивать не только золото, но и другие металлы, например, серебро. Такие включения металлов обеспечивают электропроводность нано-конструкций на основе ДНК. Это свойство позволит использовать наноконструкции на основе ДНК в биодатчиках и других электронных устройствах.

Из ДНК можно формировать трубкообразные структуры – нанотрубки.

До недавнего времени они создавались только цилиндрической формы. Их стенка состояла из достаточно жестких двухцепочечных молекул ДНК.

Можно ли получить менее жесткие (более эластичные) нанотрубки, причем не только цилиндрической, но и любой другой формы? Очертив для себя такую проблему, ученые из Монреаля (Канада) незамедлительно приступили к ее решению.

Спустя некоторое время ими был найден способ получения более эластичных нанотрубок. Для этого они использовали не двухцепочечную, а одноцепочечную ДНК, обладающую меньшей жесткостью. Наряду с этим они смогли создать нанотрубки треугольного и квадратного сечений.

Возможность варьировать форму и количество цепочек в нанотрубках из ДНК значительно расширяет границы их применения. Например, при наращивании нанопровода можно контролировать его форму. Нанотрубки из ДНК могут использоваться для ориентирования трансмембранных белков при их анализе, а также в качестве наноразмерного переносчика лекарств.

Передвигающиеся и изменяющие форму наноустройства. Преуспев в конструировании неподвижных (статичных) наноструктур из ДНК, исследователи задумались над возможностью создания передвигающихся наноконструкций. Первыми о создании наноконструкций на основе ДНК, которые изменяют форму и передвигаются (рис. 53) сообщили ученые Гарвардского университета (США).

Каждое устройство изготавливается из длинной замкнутой молекулы ДНК, которая при смешивании с более короткими молекулами ДНК, связы-

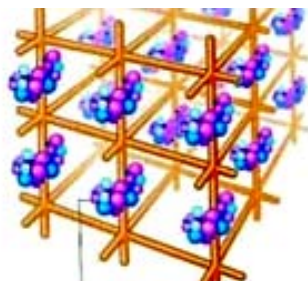


Рис. 52. Молекулы других веществ («гостей») в составе трехмерной наноструктуры

вается с ними. Связывание происходит таким образом, что короткие молекулы используются в качестве «распорок». Варьируя длину коротких молекул (распорок), можно придать длинной молекуле ДНК запрограммированную трехмерную структуру (рис. 53). Изменяя длину коротких молекул ДНК, можно также изменять трехмерную конфигурацию всего наноустройства, вынуждая его перемещаться в пространстве.

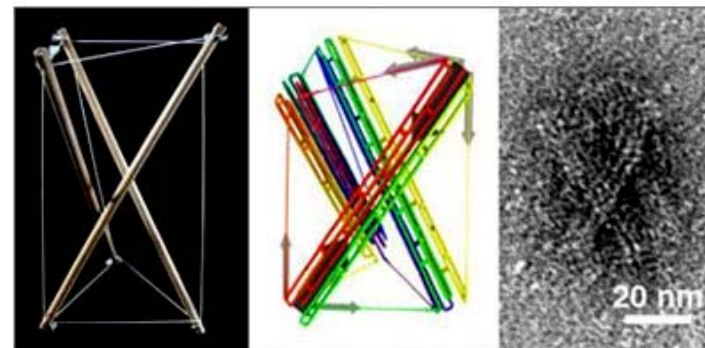


Рис. 53. Самособирающиеся наноустройства на основе ДНК могут перемещаться и при необходимости изменять свою форму

Такая особенность делает эти наноустройства одними из главных кандидатов на использование в области наномедицины. Во-первых, потому, что ДНК биологически совместима с живыми организмами, во-вторых, благодаря тому, что ДНК может быстро разлагаться. При этом она не выделяет в процессе разложения токсичных или опасных веществ.

Эта технология самособирающихся наноустройств может привести к появлению систем доставки лекарственных препаратов, имитирующих поведение вирусов. Благодаря подвижности молекулы ДНК такие наноустройства способны реагировать на сигнал, передаваемый механическим или химическим путем. Это позволит доставлять лекарственный препарат исключительно в необходимую клетку и высвободить его «по команде» в нужный момент времени. Передвигающиеся наноустройства могут быть использованы также для переноса и программирования стволовых клеток, с помощью которых будут восстанавливаться поврежденные органы.

Молекулярная «динамо-машина» (наноактуатор). Ученые из университета Портсмута (Англия) под руководством К. Фермена успешно продолжили эксперименты по созданию передвигающихся наноустройств на основе ДНК. Однако ими был применен подход, существенно отличающийся от вышеописанного. В чем заключается его особенность?

Создавая молекулярную «динамо-машину» или наноактуатор, исследователи использовали натянутую молекулу ДНК в качестве своеобразного монорельсового пути. На молекулу ДНК они поместили миниатюрный двигатель из крошечной магнитной бусины (рис. 54). **Однако в качестве новой**

проблемы перед учеными встал поиск топлива (источника энергии) для такой несложной «динамо-машины». Выручили миниатюрность наноконструкции, с одной стороны, и универсализм клеточного топлива – АТФ, с другой. Они оказались довольно удачным сочетанием, предопределившим выбор ученых. «Динамо-машина» использует энергию АТФ живых клеток. При переработке АТФ генерируется электрический ток. С перемещением мини-двигателя (бусины) по ДНК возникают электрические сигналы, которые затем передаются на обработку в компьютер.

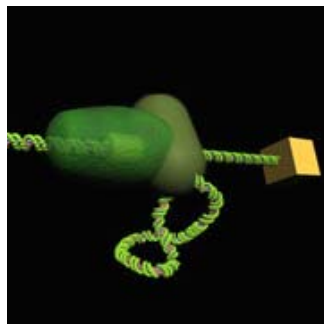


Рис. 54. Компьютерное изображение наноактуатора на молекуле ДНК

Исследователи предлагают использовать наноактуатор в экологическом мониторинге, в частности, для регистрации токсинов и патогенных микроорганизмов в воздухе. Другая перспективная сфера применения – компьютерное управление искусственными конечностями. На приспособление устройства для решения этой задачи может потребоваться, однако, от 20 до 30 лет.

Конструирование по типу «все сразу».

Ученые Института молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта **задались целью ускорить процесс наноконструирования на**

основе ДНК. При этом ускорить до такой степени, чтобы получать упорядоченную трехмерную структуру за один прием.

Для решения проблемы ускорения наноконструирования ими был избран оригинальный подход. Исследователи отказались от кропотливой работы с единичными молекулами ДНК и решили использовать жидкокристаллические дисперсии ДНК. Формирующиеся в них жидкокристаллические «капельки» размером около 0,5 мкм включают примерно десять тысяч молекул ДНК. В пределах капельки молекулы располагаются ровными рядами на расстоянии 3-5 нм. Такая упорядоченность придает частицам свойства кристалла. При этом соседние молекулы образуют в таком кристалле подвижные слои, то есть сохраняют свойства жидкости. Это означает, что получившаяся структура представляет собой жидкий кристалл.

Работая с такими жидкими кристаллами, исследователи обратили внимание на важное для решения всей проблемы обстоятельство: **при образовании жидкокристаллической дисперсии молекулы ДНК сохраняют способность образовывать химические соединения с другими веществами.** Это свойство ДНК в жидких кристаллах они успешно использовали для стабилизации трехмерных структур ДНК. Были подобраны химические вещества, которые способны симметрично встраиваться между соседними молекулами ДНК, выполняя роль своего рода «наномостиков» (рис. 55). Последние придают всей конструкции жесткость, резко уменьшая подвижность соседних молекул ДНК. Формирующиеся при участии «наномостиков» наноконструкции стабильны и не распадаются в водно-солевом растворе.

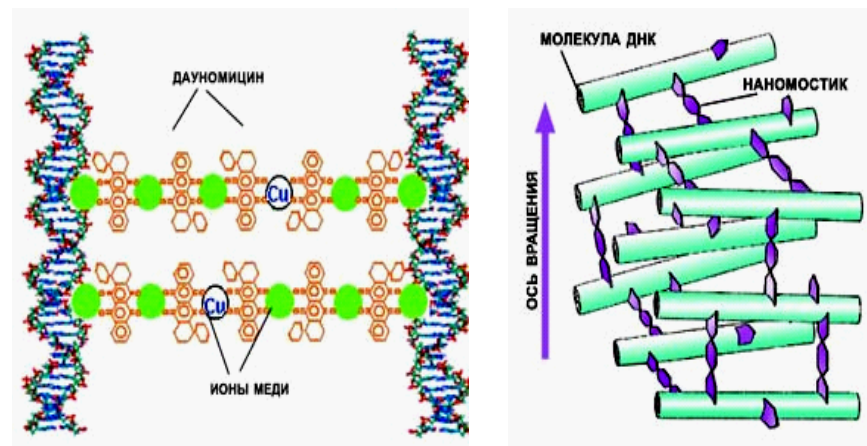


Рис. 55. Наномостики между молекулами ДНК

Рассмотренные наноструктуры могут использоваться в качестве носителей генетического материала или биологически активных соединений. Когда «нанопосылка» попадает в клетку, наномостики, скрепляющие конструкцию, разрушаются, и содержимое (например, молекулы антибиотика) высвобождается. Управляемое разрушение наномостиков происходит под действием некоторых белков (инсулин, пепсин), а также других соединений.

Трехмерные наноструктуры на основе нуклеиновых кислот привлекли внимание наноконструкторов, работающих над созданием оптических сенсорных устройств. **Можно ли трехмерные структуры на основе ДНК использовать для создания чувствительных элементов сенсорных устройств?** Вскоре на этот вопрос был дан утвердительный ответ.

В наномостик трехмерной наноструктуры была встроена своеобразная «мини-ловушка» – химическое соединение, которое разрушается при контакте с анализируемым веществом. После разрушения наномостика наблюдается снижение аномальной оптической активности, величина которой измеряется. По величине этого показателя можно определять концентрацию химического (биологически активного) соединения, разрушающего наномостик.

В настоящее время ученые разрабатывают способы получения трехмерных наноструктур на основе ДНК с управляемыми физико-химическими свойствами. При введении их в состав полимерных пленок можно получать полимерные матрицы. Последние смогут найти применение в фотонике в качестве оптических фильтров с регулируемыми параметрами.

3.5. Наноконструкции на основе ДНК и белков

Можно ли создать из ДНК наноробот? К тому же автономно (самостоятельно) передвигающийся и останавливающийся?

Утвердительный ответ был дан группой ученых из Колумбийского университета (США). Им удалось создать автономный молекулярный робот из ДНК и белка, способный перемещаться, менять направление движения и останавливаться. Эта разработка получила название наноробот «Паук» (рис. 56).

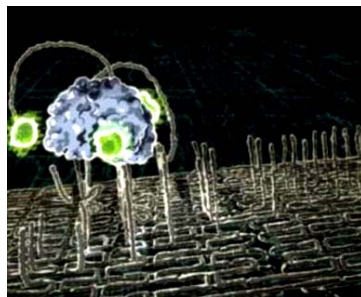


Рис. 56. Наноробот «Паук», построенный из ДНК и белка

Каким же образом была решена проблема автономного передвижения наноробота? Исследователи использовали свойство полинуклеотидной цепочки ДНК связываться посредством водородных связей с другой комплементарной ей цепочкой. Поэтому ходильные конечности (ноги) наноробота были сконструированы из ДНК (рис. 57) Тело наноробота «Паук» формировалось из белка под названием «стрептавидин». Длина наноробота составила 4 нанометра (рис. 56).

Три из четырех ног «Паука» сделаны из молекул ДНК, способных связываться с определенной последовательностью другой молекулы ДНК и вырезать ее. Четвертая нога представляет собой своеобразный якорь, который привязывается к начальной точке на треке. Робот запускается с места своего старта специальной цепочкой ДНК. Связывая и затем вырезая участки ДНК, находящиеся за пределами основной цепочки, робот передвигается по треку.

Несмотря на то, что первые подобные нанороботы появились еще несколько лет назад, им не удавалось сделать более 3 шагов. Наноробот «Паук» может пройти примерно 100 нанометров (25 размеров самого паука или 50 его шагов). Это расстояние он проходит за 30-60 минут.

За «Пауком» ученые смогли наблюдать благодаря атомно-силовым микроскопам. С помощью таких микроскопов было установлено, что нанороботов можно отправлять по четырем различным направлениям.

В настоящее время **исследователи приступили к решению самой серьезной проблемы в рамках их многолетнего проекта: научиться управлять поведением нанороботов и «научить» несколько «Пауков» работать вместе, взаимодействуя друг с другом.** В отдаленной перспективе подобные нанороботы смогут, по мнению ученых, очищать мельчайшие капилляры и уничтожать раковые клетки в живом организме.

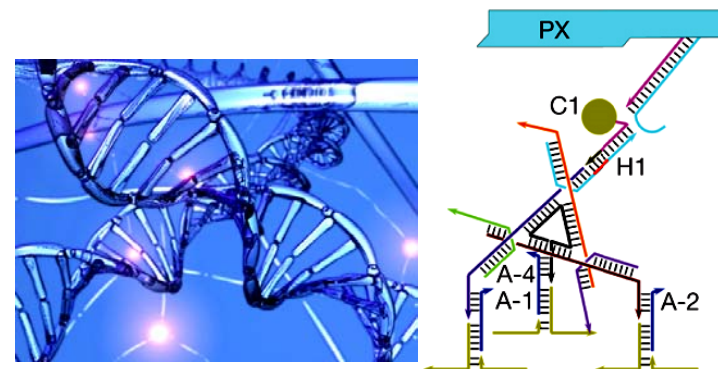


Рис. 57. Конечности (ноги) наноробота «Паук» построены из молекул ДНК

3.6. Искусственные наноматериалы на основе ДНК

Все возрастающие масштабы пересадки (трансплантации) привели к острому дефициту донорских органов и биологических тканей. Как никогда ранее стала актуальной **проблема создания совершенных искусственных биологических тканей, свойства которых были бы максимально близки к природным.**

Труднейшей задачей в решении упомянутой проблемы оказалась следующая: **каким образом обеспечить в пересаживаемых в живой организм органах (имплантатах) сочетание высокой прочности с эластичностью?** Эластичность призвана предотвращать воспалительные процессы при высоких механических нагрузках на имплантант. Воспроизвести характерное для тканей живого организма сочетание прочности с эластичностью в искусственных материалах оказалось практически невозможным.

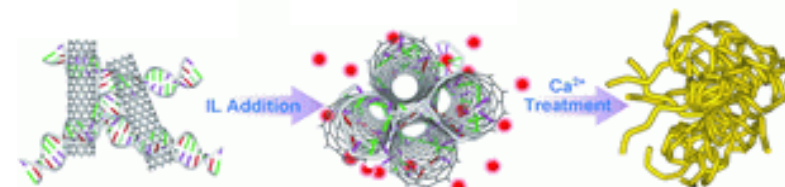


Рис. 58. Схема получения искусственных нановолокон (на рисунке справа) из углеродных нанотрубок и молекул ДНК (на рисунке слева)

Группе исследователей из Австралии и Кореи под руководством Д.Спинкса удалось найти один из вариантов решения задачи. Они разработали для целей трансплантации новый материал, механические свойства которого подобны свойствам биологических тканей.

Созданный материал представляет собой прочную композитную систему из спиралей ДНК и углеродных нанотрубок (рис. 58). Спиральями ДНК полностью «обертывают» углеродные нанотрубки и помещают их в специальную жидкость, содержащую ионы кальция. В такой жидкости из обернутых спиральями ДНК углеродных нанотрубок формируется гелеобразная масса.

Полученный гель можно спрять в волокна так же, как прядут синтетические волокна. После высушивания волокна из нанотрубок и ДНК обретают форму сети из скрученных нановолокон толщиной 50 нанометров (рис. 58). Каждое волокно имеет при этом пористую губкообразную структуру.

Однако **потребовались более плотные и прочные нановолокна. Как изменять эти характеристики волокон?** И эта задача была успешно решена. Исследователи нашли способ дальнейшего регулирования плотности и прочности нановолокон. Высушенные волокна замачивают в растворе хлорида кальция, где происходит дальнейшее «сшивание» молекул ДНК. В результате нановолокна уплотняются и упрочняются.

Получаемые искусственные нановолокна близки по своим свойствам к белковым волокнам, обеспечивающим прочность и эластичность таких органов как сухожилия, мышцы, артерии, кожа. Поэтому искусственные нановолокна из ДНК и углеродных нанотрубок несомненно найдут широкое применение при изготовлении самых разнообразных искусственных имплантатов.

3.7. Биочипы, их применение в исследованиях структуры ДНК

Количество генов у эукариотических организмов чрезвычайно большое: от 6200 у дрожжей до более 100000 у человека. При этом не все гены организма проявляют активность одновременно. Одни гены функционируют, другие блокируются, полностью выключаясь из работы. Очень часто возникает необходимость знать, **в каком состоянии находится в данный момент ген, несколько или даже множество генов. Активны ли они? Или блокированы и неактивны?**

Проблему контроля за активностью генов решили в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Коллектив ученых под руководством академика А.Д. Мирзабекова разработал технологию создания биочипов. Биочип – это матрица размером несколько сантиметров, с помощью которой можно получить данные о функциональной активности многих (если не всех) генов организма.

При создании биочипа на специальную (стеклянную) подложку наносят образцы молекулы ДНК. Они представляют собой либо отдельные гены, либо молекулы ДНК, полученные в результате полимеразной цепной реакции. Для проведения анализа образец ткани (например, кровь) подвергается предварительной обработке. Последняя включает мечение флуоресцентным веществом молекул ДНК, присутствующих в образце. Затем образец ткани наносится на биочип, помещенный в специальную микрокамеру (рис. 59).



Рис. 59. Схема анализа с применением биочипа

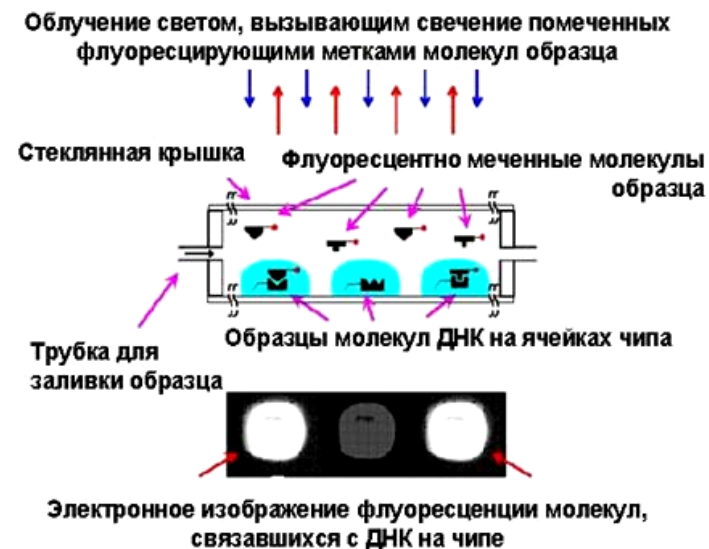


Рис. 60. Схема механизма работы биочипа

После этого проводят гибридизацию между содержащимися на чипах генами, с одной стороны, и содержащимися в пробе флуоресцирующими ДНК или РНК, с другой. **Молекулы образца взаимодействуют по принципу комплементарности с соответствующими генами на чипе.** При облучении биочипа светом определенной длины волны появляется флуоресцентное свечение (рис. 60). **По картине свечения (рис. 61) прибор-анализатор количественно определяет наличие характерных последовательностей в ДНК (РНК).**

Использование биочипов перспективно, прежде всего, для выявления генов, реагирующих на негативное воздействие окружающей среды и контролирующих защитные функции в организме. Применение биочипов позволяет быстро обнаруживать и определять бактерии и вирусы. С помощью биочипа можно изучать индивидуальные генетические особенности человека, определять предрасположенность его к наследственным и онкологическим заболеваниям.

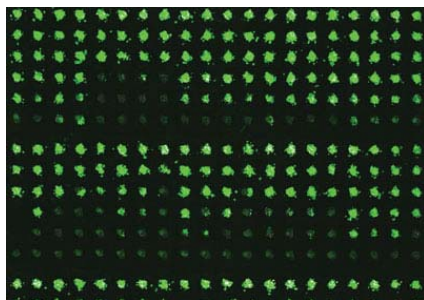


Рис. 61. Картина свечения ячеек является строго индивидуальной для исследуемого организма

3.8. Секвенирование ДНК с применением нанопор

Многие биотехнологии основываются на **определении последовательности нуклеотидов в ДНК (секвенировании ДНК).** Для ее осуществления необходимы точные и (с учетом большой длины ДНК) быстрые ДНК-секвенаторы. Однако секвенация ДНК одного человека с помощью существующей техники (рис. 62) является очень дорогостоящей и занимает несколько месяцев.

Как обеспечить менее затратную и быструю секвенацию ДНК? С 2005 года к решению этой проблемы подключились наноконструкторы. Они приступили к созданию сверхточного и быстрого ДНК-секвенатора на основе нанопор. Новое нанопорное устройство будет способно контролировать положение молекулы ДНК в нанопоре с точностью до одного нуклеотида. Новый ДНК-секвенатор позволит расшифровывать геном человека всего за несколько часов.

Сущность нового метода основывается на изменении электрического потенциала при прохождении ДНК через нанопору (рис. 63). В настоящее время учеными разработана математическая модель наносеквенатора, определяющего отдельные нуклеотиды ДНК. Он сможет устанавливать наличие той или иной мутации в геноме.



Рис. 62. Используемый в настоящее время ДНК-секвенатор

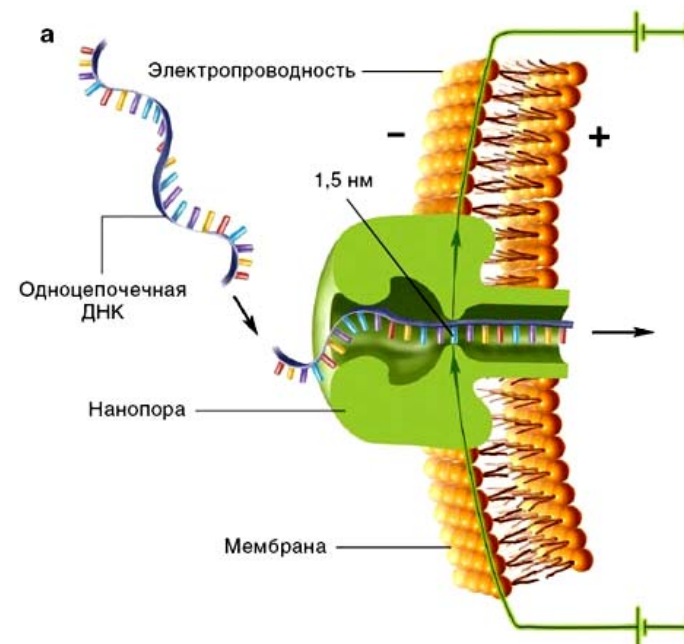


Рис. 63. Схема функционирования ДНК-секвенатора на основе нанопоры

Одновременно начаты работы по созданию ДНК-транзистора, применение которого позволит более эффективно секвенировать геном. **ДНК-транзистор – это достаточно длинная нанопора с рядом полупроводниковых и диэлектрических добавок.** Электрические заряды внутри нанопоры сравнимы с зарядами одиночных электронов. Нанопору диаметром в несколько нанометров пронизывает длинная молекула ДНК (рис. 64).

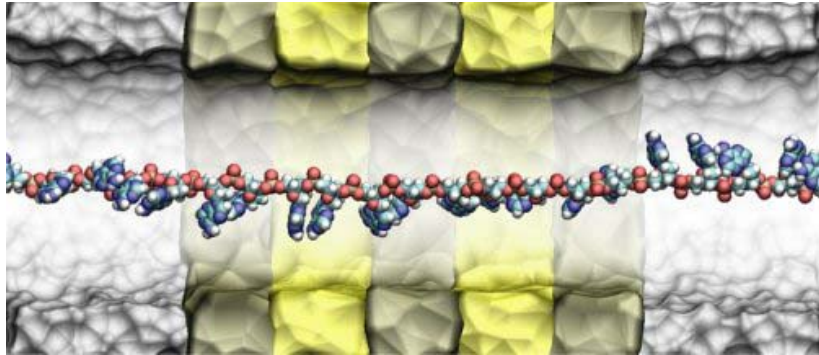


Рис. 64. Схема ДНК-транзистора. Нанопора содержит металлические контакты (темно-серого цвета), разделенные диэлектриком (желтого цвета). Такая «слоеная» структура позволяет создавать локальные (местные) электрические поля внутри нанопоры и управлять скоростью прохождения через нее ДНК (цепочка красно-синего цвета)

Подача переменного напряжения на электроды приведет к движению молекулы ДНК внутри поры с задаваемой точностью до одного нуклеотида. Осуществить нечто подобное ранее никак не удавалось. Такая **наноконструкция позволит определять каждый нуклеотид в составе ДНК**. Нанопоры для ДНК-транзисторов можно будет изготавливать в больших количествах с помощью современных методов микроэлектронного производства.

Нанотехнологии с применением ДНК-секвенатора и ДНК-транзистора позволят изучать геномы пациентов с целью диагностики и лечения генетических болезней. Создание массового производства описанного устройства быстрого секвенирования сделает анализ ДНК вполне обычной клинической процедурой. К тому же ее можно будет проводить в любом лечебном учреждении. Это, бесспорно, станет знаменательной вехой в развитии медицины.

Каждый человек сможет обзавестись «личной картой генома». Больному можно будет создавать лекарство, учитывающее генетические особенности его личности. Грядущая **эра «персональной медицины» станет возможной благодаря быстрым и дешевым наносеквенаторам ДНК**.

Словарь основных терминов

Ампликон – единица амплификации, синтезированная копия гена (фрагмента ДНК), ограниченная с двух сторон праймерами.

Амплификация – последовательное многократное копирование гена (молекулы ДНК или ее фрагмента).

Ауторепликация (репликация) ДНК – самоудвоение ДНК, образование из одной материнской молекулы двух дочерних молекул.

Биочип – матрица размером несколько сантиметров, с помощью которой можно получить данные о функциональной активности генов организма.

Гибридизация ДНК – образование в опыте двухцепочечной ДНК из двух отдельных цепей ДНК.

Денатурация ДНК – разрушение водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями и распад молекулы ДНК на две полинуклеотидные цепочки при нагревании до 93-95 градусов.

Имплантант – биологическая структура (орган, ткань и т.п.), природного или искусственного происхождения, которая пересаживается (внедряется) в живой организм.

Комплементарность – свойство азотистых оснований образовывать с помощью водородных связей парные комплексы (аденин-тимин или аденин-урацил, гуанин-цитозин) при взаимодействии цепей нуклеиновых кислот.

Липкие концы – одноцепочечные участки ДНК, расположенные на концах молекул ДНК.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод, позволяющий значительно увеличивать малые концентрации определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Полимеразы – ферменты, катализирующие матричный синтез нуклеиновых кислот.

Праймер – короткий (18-30 нуклеотидов) олигонуклеотид комплементарный одной из цепей двухцепочечной матрицы ДНК; праймер обрамляет начало или конец амплифицируемого участка.

Рекомбинантная ДНК – молекула ДНК, образовавшаяся в результате гибридизации ДНК.

Секвенирование – установление последовательности звеньев (нуклеотидов, аминокислот) в молекулах нуклеиновых кислот или белков.

Транскрибируемые последовательности – последовательности нуклеотидов в ДНК, с которых считывается информация.

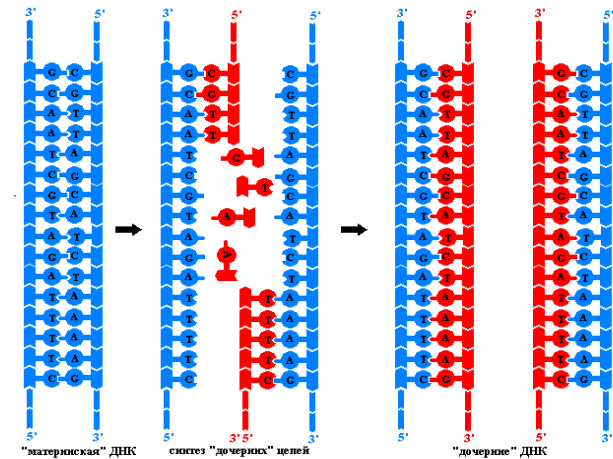
Вопросы для повторения

1. На каких уникальных свойствах ДНК основываются такие атрибуты живых организмов как наследственность и изменчивость?
2. Какие свойства ДНК представляют интерес для разработчиков нанотехнологий?
3. Какова роль ферментов ДНК-полимеразы и РНК-праймазы в процессах самоудвоения ДНК?
4. Чем различаются лидирующая и отстающая цепи самоудваивающейся ДНК?
5. Почему способ репликации ДНК получил название полуконсервативного?

- Что лежит в основе метода гибридизации нуклеиновых кислот?
- Каким образом можно получить отдельную полинуклеотидную цепь ДНК в лабораторных условиях?
- Где может найти применение метод гибридизации нуклеиновых кислот?
- Охарактеризуйте этапы первого цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- Укажите различия между первым и вторым циклами полимеразной цепной реакции.
- Объясните сущность цепного характера полимеразной цепной реакции.
- С какой целью метод полимеразной цепной реакции используется в медицине?
- Какие свойства биомолекул делают их удобным исходным материалом для наноконструкций?
- Какова роль «липких концов» молекул ДНК в создании наноконструкций?
- Каким образом «точки ветвления» влияют на свойства молекул ДНК?
- Какие встраивания в наноструктуры на основе ДНК расширили возможности их применения?
- Из молекул каких биополимеров был создан наноробот «Паук»?
- Объясните особенности передвижения наноробота «Паук».
- Каким образом была создана молекулярная «динамо-машина» (наноактуатор)? Где она может найти практическое применение?
- Какие структуры были созданы учеными из углеродных нанотрубок и молекул ДНК? Для каких целей они понадобились?
- Определите понятие «биочип».
- На чем основан принцип работы биочипа?
- Что представляет собой секвенирование ДНК?
- Каковы особенности ДНК-секвенатора на основе нанопор?
- Какие наноконструкции можно использовать для диагностики генных мутаций?
- Охарактеризуйте возможные перспективы применения ДНК-секвенатора на основе нанопор?

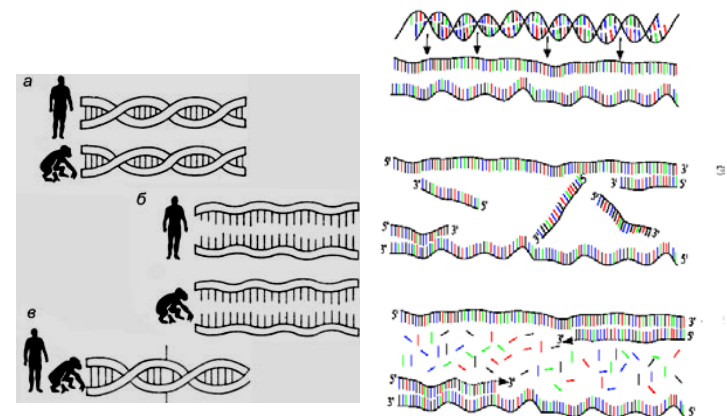
ЗАДАНИЯ

Задание № 1. Зарисуйте приведенную схему в тетради и: 1) напишите под рисунком название процесса, изображенного на схеме; 2) обозначьте на схеме все известные вам структуры (химические соединения). Какое фундаментальное свойство живых организмов основывается на процессе, изображенном на рисунке?

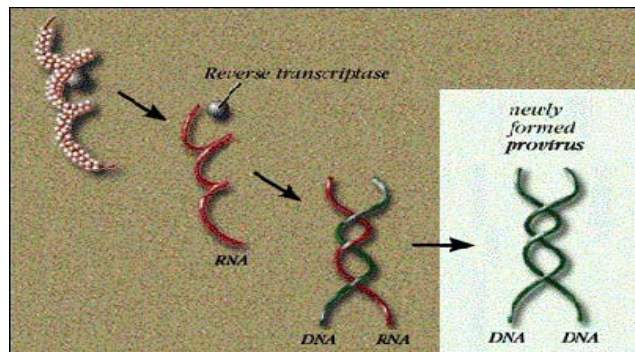


Задание № 2. Напишите приведенные ниже названия этапов репликации (ауторепликации) ДНК в порядке их осуществления: синтез РНК-затравки; раскручивание ДНК и разъединение ее на две полинуклеотидные цепи; сшивание фрагментов Оказаки в единую полинуклеотидную цепь; объединение материнской и дочерней цепи ДНК в молекулу ДНК; синтез фрагментов Оказаки.

Задание № 3. Какие два процесса схематично изображены на приведенных внизу рисунках? Напишите названия этапов каждого процесса. Сравните этапы обоих процессов между собой. Укажите сходства и различия между этапами двух процессов. Объясните принципиальное различие между молекулами, образующимися на последнем этапе каждого процесса. Какое открытие в молекулярной биологии XX века было сделано с использованием процесса (метода), схема которого изображена на рисунке слева?



Задание № 4. Некоторые вирусы (ретровирусы) содержат в качестве наследственного материала не молекулу ДНК, а молекулу РНК. Молекула РНК не способна к самоудвоению. Каким образом Природа могла «решить проблему» размножения ретровирусов? Представьте свои варианты возможного решения проблемы размножения ретровирусов, которые содержат фермент обратную ревертазу. Этот фермент катализирует обратную транскрипцию – синтез ДНК, в котором в роли матрицы выступает РНК (схема обратной транскрипции изображена ниже).



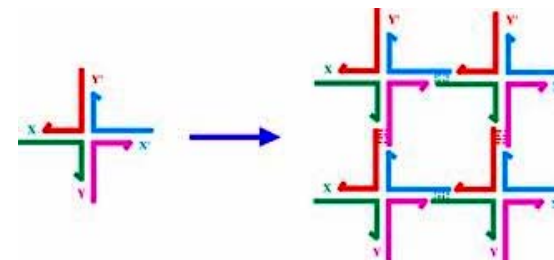
Задание № 5. Повторите материал раздела 3.1. Сравните два биологических явления: самоудвоение ДНК и гибридизацию ДНК. Проанализируйте процессы, лежащие в основе первого и второго явления. В каких состояниях находится в этих процессах молекула ДНК? Используя результаты проведенного сравнительного анализа, заполните приведенную ниже таблицу. Дайте свою оценку степени сходства двух биологических явлений, которые вы сравнивали и анализировали.

Таблица: «Сходство и различия между самоудвоением ДНК и гибридизацией ДНК»

	Сходство состояний ДНК и процессов (отметить знаком «+»)	Различия состояний ДНК и процессов (отметить знаком «-»)
Исходное состояние ДНК		
Состояние ДНК по завершении явления		
Состояние ДНК в ходе явления:		
а) первое состояние		
б) второе состояние		
Первый процесс (превращение)		
Второй процесс (превращение)		

Задание № 6. Расположите названия этапов конструирования наноструктур в порядке их осуществления: формирование крестообразной пространственной структуры ДНК; склеивание «липких концов» фрагментов ДНК; сгибание нанорешетки в кубическую структуру; получение фрагментов ДНК с «липкими концами»; последовательное сшивание крестообразных ДНК в плоскую нанорешетку.

Задание № 7. На рисунке изображен один из этапов наноконструирования на основе молекул ДНК. Дайте свое объяснение сущности этого этапа. Какое название, на ваш взгляд, наиболее подходит для этого этапа? Какова особенность молекул (фрагментов ДНК), формирующих исходную структуру (на рисунке изображена слева)? Каким образом можно получить такие молекулы ДНК? Составьте свой план перехода к этапу конструирования трехмерных наноструктур на основе изображенных двумерных (плоских) наноструктур.



Задание № 8. На микрофотографии изображена пирамидальная наноконструкция из ДНК. Она состоит из 4-х отдельных фрагментов ДНК, которые выделены на рисунке разными цветами. Представьте себе, что эта наноконструкция является желанным конечным результатом вашей личной конструкторской работы. Опишите последовательность ваших действий, направленных на ее создание.

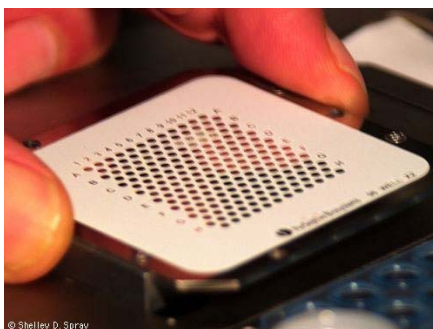


Задание № 9. Используя материал разделов 3.4 и 3.5 проведите сравнение двух передвигающихся наноустройств: наноустройства, построенного из ДНК (разработка ученых Гарвардского университета) и наноробота «Паук» (разработка ученых Колумбийского университета). Различаются ли эти устройства химическим составом образующих их веществ? Имеется ли сходство между ходильными конечностями («ногами») этих устройств? Как бы вы оценили скоростные качества этих устройств (в сравнении друг с другом)? Обоснуйте вашу оценку, используя информацию о молекулярных механизмах передвижения каждого устройства. Используя результаты сравнительного анализа двух наноустройств, предскажите возможные, на ваш

взгляд, новые сферы применения каждого из них. С учетом последнего дайте ваши личные рекомендации по конструкторской «доработке» каждого наноустройства.

Задание № 10. Используя материал раздела 3.4, определите собственный фактор оценки важности (значимости) наноконструкций, созданных с использованием ДНК. Составьте собственный ранжированный список наноконструкций. Подготовьте объяснение способа (принципа) построения составленного вами списка.

Задание № 11. На рисунке изображено устройство, используемое в ходе экспериментального исследования. Что это за устройство? В каком исследовании оно используется? Охарактеризуйте этап исследования, которому соответствует рисунок.



Задание № 12. Завершите выполнение приведенной ниже схемы. Составьте свой прогноз расширения сфер практического применения биочипов. Выделите: 1) наиболее важную, на ваш взгляд, уже существующую сферу практического применения биочипов; 2) наиболее важную из перспективных сфер практического применения биочипов. Составьте новую схему, которая включала бы результаты всех предыдущих этапов выполнения этого задания.



Задание № 13. Создайте информационную базу о наноконструкциях и нанотехнологиях, разрабатываемых на основе (с применением) нуклеиновых кислот.

Литература

Белая книга по нанотехнологиям / под ред. В.И. Аржанцева и др. – М.: Изд-во ЛКИ, 2008. – 344 с.

Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств / Г.К. Будников // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 12. – С. 26-32.

Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

Евдокимов Ю.М. Нуклеиновые кислоты, жидкие кристаллы и секреты наноконструирования / Ю.М. Евдокимов // Наука и жизнь. – 2005. – № 4 (режим доступа <http://www.nkj.ru/archive/articles/604>).

Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 208 с.

Коничев А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2005. – 400 с.

Нанотехнологии. Азбука для всех / под ред. акад. Ю.Д. Третьякова. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008. – 368 с.

Симан Н. Нанотехнология и двойная спираль / Н. Симан // В мире науки. – 2004. – № 9. (режим доступа <http://www.sciam.ru/2004/9/nano>).

Сыч В.Ф. Основы биологической терминологии / В.Ф. Сыч. – Ульяновск: УлГУ, 2003. – 456 с.

Сыч В.Ф. Структурно-функциональная организация эукариотической клетки / В.Ф. Сыч, Н.А. Цыганова, Г.В. Абдулкин. – Ульяновск: УлГУ, 2006. – 84 с.

Сыч В.Ф. Общая биология: учебник для высшей школы / В.Ф. Сыч. – М.: Академический Проект, 2007. – 330 с.

Сыч В.Ф. Введение в нанотехнологии. Элективный курс в программу биологии: учебное пособие для 10-11 классов средней общеобразовательной школы / Сыч В.Ф., Дрожжина Е.П., Курносова Н.А. и др. – Ульяновск: УлГУ, 2008. – 100 с.

Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию: учебник для вузов / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. ун-в. изд-во, 2004. – 496 с.

Хартманн У. Очарование нанотехнологии: пер. с нем. / У. Хартманн. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 173 с.

Интернет-сайты:

edu.dvgups.ru
referraty.at.ua/publ/biologoiija/geny_i_khromosomy/3-1-0-41
www.intuit.ru/department/hardware/intensors/22/2.html
www.intuit.ru/department/hardware/intensors/22/2.html
www.vgkrd-1.by/?page_id=183
www.nanonewsnet.ru/articles/2009/uchenye-iz-ibm-sozdali-prototip
nanorazmernogo-dnk-sekvenatora
www.sciencenews.org
www.biochemistry.ru
www.bionet.nsc.ru
www.lohovnet.ru
www.sbras.nsc.ru
www.genetics.timacad.ru
www.gmpua.com
vivovoco.rsl.ru
www.petsinform.com
www.vgkrd-1.by/?page_id=183
www.sciam.ru/2004/9/nano).
www.datenews.php.htm

ГЛАВА 4. Нанобиотехнологии на основе метода генетической инженерии

4.1. Генетическая инженерия как одно из направлений нанобиотехнологий

Современные биотехнологии трудно представить без создания новых форм организмов с желательными для человека свойствами. **Каким образом можно изменить признаки и свойства живого организма (его фенотип), чтобы они сохранялись также у его потомков?** Это возможно осуществить только изменяя генотип организма, т.е. его наследственный материал. **Целенаправленное изменение и конструирование наследственного материала (ДНК) живых организмом является предметом генетической инженерии.**

Молекулы ДНК, создаваемые методами генетической инженерии, называют рекомбинантными. Раздел молекулярной биологии, связанный с созданием новых комбинаций генетического материала, способного обеспечивать биосинтез продуктов обмена веществ, получил название **генетической инженерии.**

Кем и когда были заложены основы метода генетической инженерии? Начало генетической инженерии было положено в 1972 году, когда американский ученый П. Берг в лабораторных условиях впервые создал рекомбинантную ДНК. Последняя соединила в себе фрагменты ДНК трех организмов: вируса «SV 40», бактериофага «лямбда» и бактерии «кишечная палочка».

Опыт П. Берга был бы невозможен, если бы ранее не удалось открыть два уникальных типа ферментов: 1) рестриктазы, разрезающие молекулу ДНК в строго определенных участках; 2) лигазы, соединяющие отрезки различных молекул ДНК друг с другом. Рестриктазы получили весьма удачное образное название «биологических ножей», которыми манипулируют генные инженеры, разрезая молекулы ДНК на фрагменты.

Вторым **необходимым условием успешного проведения опытов по генетической инженерии стало использование «векторов»**. Векторы представляют собой вирусы или получаемые из бактерий короткие внехромосомные фрагменты их ДНК – плазмиды. С помощью рестриктаз и лигаз ученые встраивают в векторы необходимый фрагмент ДНК (ген). **Задача вектора – внести новую ДНК (ген) в клетку и встроить ее в ДНК организма-хозяина.**

Совершенствование методов генетической инженерии позволило объединять генетическую информацию неродственных организмов, в том числе стоящих на разных ступенях эволюции. Кроме того, «в пробирке» (in vitro) можно управлять процессом создания рекомбинантной ДНК так, чтобы обходить запрещающие механизмы живого организма. Методы генетической инженерии успешно внедряются в производство лекарственных препаратов. На их основе уже производятся в широких масштабах инсулин, интерферон и интерлейкин.

На основе генетической инженерии разработаны технологии получения трансгенных растений (рис. 65) и животных, отличающихся не только высокой урожайностью (плодовитостью), но одновременно и повышенной устойчивостью к болезням и паразитам. Так, в Бельгии и США выведены сорта картофеля и томатов, которые устойчивы к колорадскому жуку и позволяют на 40-60% сократить применение инсектицидов.



Рис. 65. Новые сорта кукурузы, полученные методом генетической инженерии

Какие конкретные задачи необходимо решить экспериментатору, чтобы успешно осуществить опыт по генетической инженерии? Выполнение конкретной генно-инженерной работы требует решения трех задач: 1) создать рекомбинантную ДНК, пригодную для переноса в клетку; 2) разработать метод введения рекомбинантной ДНК в клетку; 3) создать условия для нормального функционирования генов, введенных в клетку организма-хозяина.

Каждая работа в области генетической инженерии выполняется в несколько этапов: 1) необходимый ген выделяют из естественных источников или синтезируют химическим путем; 2) подбирают вектор (молекулу ДНК, пе-

реносящую необходимый ген в клетку); 3) вектор и переносимый ген объединяют (рис. 66) в единую структуру (рекомбинантную молекулу ДНК); 4) единую структуру, содержащую вектор и ген, вводят в клетку организма-хозяина.

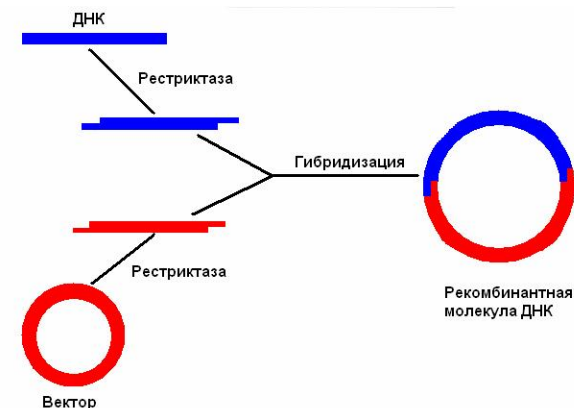


Рис. 66. Создание рекомбинантной (гибридной) ДНК (описание в тексте)

4.2. Способы получения генов для введения в другой организм

Новые генетические конструкции получают путем встраивания в молекулу ДНК нового гена (фрагмента ДНК организма-донора). **Как можно получить необходимый для такой «трансплантации» ген?**

К настоящему времени оформились **три основных методических подхода к решению проблемы получения необходимых для генно-инженерной работы генов.**

1. В связи с тем, что выделить ген гораздо сложнее, чем соответствующую мРНК, можно **использовать реакцию обратной транскрипции**. Сущность ее заключается в том, что фермент ревертаза синтезирует ДНК, используя в качестве матрицы молекулу РНК. С помощью ревертазы можно синтезировать практически любой ген, когда выделена и предоставлена исследователям соответствующая мРНК. Таким способом получены гены, кодирующие синтез белка хрусталика глаза человека, яичного белка, фиброина шелка и др.

2. **Можно осуществить искусственный химический синтез гена.** Впервые такой синтез осуществил научный коллектив Г. Кораны в 1969 г. Поскольку синтезированный ген оказался неактивным, коллектив продолжил опыты и спустя некоторое время достиг желаемого результата – синтезировал первый функционально активный ген. Он кодировал тРНК кишечной палочки. В настоящее время осуществляется химический синтез многих генов,

кодирующих образование таких гормонов человека, как инсулин, соматостатин, соматотропин и др.

3. **Выделить ген из естественного источника** – организма-донора. Выделение генов из естественных источников является сложнейшей задачей: из многих тысяч генов клетки нужно выделить единственный ген, контролирующий развитие конкретного признака. Для этого необходимо точно знать расположение гена в молекуле ДНК и произвести его вырезание при помощи ферментов. Чтобы определить место расположения необходимого гена, используют плазмиду. Последняя, встраиваясь в различные гены, вызывает их мутации. По мутантному признаку определяют вставку в нужный ген и отделяют его от плазмиды.

Долгое время работы по поиску в ДНК нужного гена и его вырезанию оставались очень трудным занятием. Запутанные спирали ДНК, длина которых может варьировать от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров, сворачиваются в кольца и всячески «скрывают» свои гены. Хрупкие молекулы диаметром 1-2 нанометра легко рвутся при любой попытке распутать и выровнять спираль. Поиск необходимого гена чаще всего завершается неудачей. **Проблема выделения необходимого гена из ДНК не находила эффективного решения более двух десятилетий.**

Лишь на рубеже XX и XXI веков учёные из университета Киото (Япония) разработали **способ растягивания спирали ДНК с помощью «оптических щипцов»**. Последние иногда называют «оптической ловушкой» или «лазерным пинцетом». Оптические щипцы представляют собой остросфокусированные лазерные лучи (рис. 67), которые удерживают молекулу. Часто на конце исследуемой молекулы химическими методами закрепляют диэлектрическую прозрачную «бусину» из какого-либо полимера с коэффициентом преломления выше, чем у среды. Результирующая сила втягивает бусину в зону максимальной интенсивности лазерного луча, то есть в его центр.

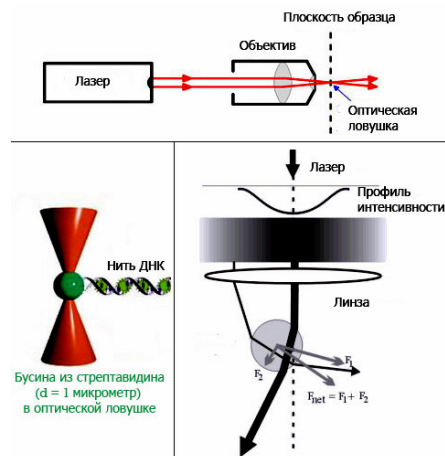


Рис. 67. Схема растягивания молекулы ДНК с помощью «оптических щипцов» («оптической ловушки») (описание в тексте)

В проведенном учеными из Японии исследовании бусины были заменены на микрокрючок в форме буквы «Z» и бобины (рис. 68).

С помощью лазеров ученые смогли подцепить спираль хромосомной ДНК делящихся дрожжей микрокрючком, не повреждая, растянуть её, а затем намотать на две микробобины как на катушку для ниток (рис. 68). В таком положении, когда молекула ДНК растянута, определить положение нужного гена в трёхмерном пространстве гораздо проще.

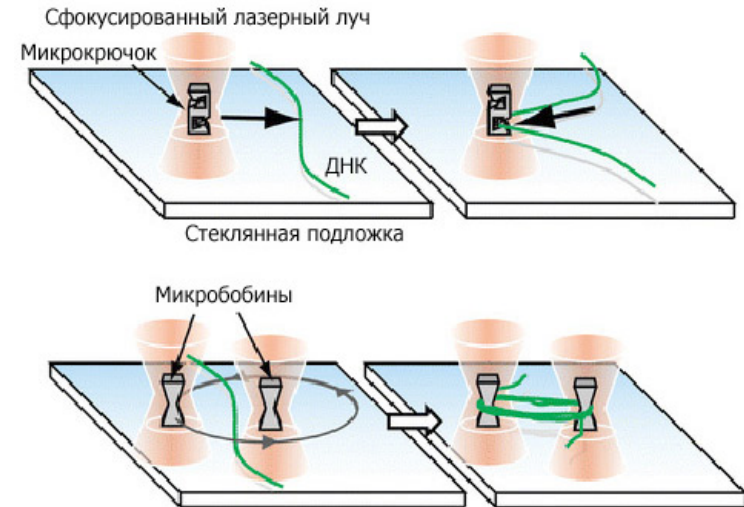


Рис. 68. Схематическое изображение захватывания спирали ДНК микрокрючком с последующим растягиванием и наматыванием молекулы на микробобины. Микрокрючок позволяет исследовать именно тот участок спирали, который интересует учёных

4.3. Технологии переноса генов в клетку

Выделенный или синтезированный фрагмент ДНК (ген) не может самостоятельно встраиваться в ДНК клетки организма-хозяина. Тем более начинать самостоятельно в ней функционировать. Как выяснили исследователи, для осуществления переноса гена и его последующего функционирования необходима вспомогательная наноконструкция на основе ДНК другого организма. **Каким образом создается вспомогательная наноконструкция из другой ДНК ?**

Вспомогательная конструкция, создающаяся из ДНК другого организма, получила название «вектор». Вектор содержит переносимый ген и обладает способностью встраиваться в ДНК клетки организма-хозяина. Его часто маркируют для удобства последующего обнаружения. Векторы создают на основе ДНК плазмид и вирусов.

Простейший плазмидный **вектор** включает следующие компоненты: 1) ген, встраиваемый (вносимый) в ДНК клетки-хозяина; 2) участок, обеспечивающий репликацию плазмиды и перенесенного гена; 3) маркер, позволяющий определить клетку, несущую плазмиду со встроенным геном; 4) ДНК плазмиды.

В клетке живого организма процесс рекомбинации происходит только между гомологичными (однородными) молекулами ДНК. Вне организма рекомбинация возможна между молекулами ДНК, имеющими различное происхождение. Это значительно расширяет возможности метода генетической инженерии. **Что необходимо для осуществления рекомбинации за пределами организма?**

У каждой из молекул ДНК на обоих концах должны быть короткие (от 4 до 20 нуклеотидов) одноцепочечные участки – «липкие концы». Они позволяют соединяться различным фрагментам ДНК посредством образования водородных связей между одноцепочечными участками (рис. 69). **Как «заострить» молекулу ДНК, снабдив ее двумя одноцепочечными «липкими концами»?**

Для решения этой задачи исследователи использовали «биологические ножи» – ферменты рестриктазы. После обработки ДНК плазмиды и ДНК вводимого гена рестриктазой обе ДНК обретают «липкие» концы (одноцепочечные участки).

Затем в смесь ДНК плазмиды и вводимого (чужеродного) гена добавляют фермент лигазу. Этот фермент встраивает чужеродный ген в ДНК плазмиды (рис. 69).

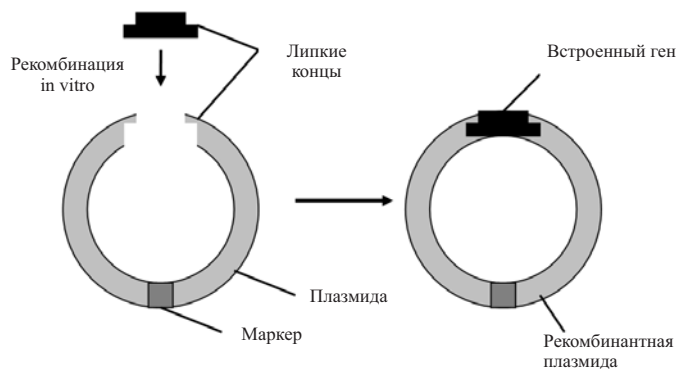


Рис. 69. Соединение ДНК плазмиды (содержащей маркер) и ДНК вводимого гена посредством «липких концов»

После создания вектора исследователям необходимо «доставить» его в клетку другого организма (организма-хозяина). Причем не только ввести в нее вектор, но и встроить его в молекулу ДНК клетки организма-хозяина.

4.4. Способы введения ДНК в клетку организма-хозяина

Чужеродную ДНК (ген) вводят в бактерии, эмбриональные клетки животных и растений, ядра клеток животных, изолированные клетки, ткани и споры растений. **Каким образом осуществляют введение чужеродной ДНК в клетку организма-хозяина?**

Учеными разработаны несколько способов.

1. **Микроинъекция.** При помощи тончайших стеклянных трубочек (микропипеток) диаметром около 100 нм и микроманипулятора вектор можно ввести прямо в клеточное ядро (рис. 70). За одну инъекцию вводят от 100 до 300000 векторов.

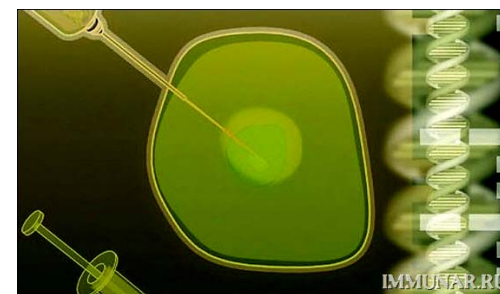


Рис. 70. Микроинъекция ДНК (вектора) в ядро клетки

2. **Упаковка в липосомы.** Липосомы – сферические мембранные пузырьки, стенка которых образована липидами. Полость липосом заполняют векторами. Липосомы проникают в бислой липидов клеточной мембраны, растворяются в нем, а их содержимое (векторы) оказывается в цитоплазме клетки.

3. **Трансфекция.** Векторы обрабатывают ионами кальция. Образующиеся наноконтакты ионов и вектора окружаются отделяющимися от клеточной мембраны фрагментами. Упакованные в мембраны наноконтакты вектора и ионов кальция проникают в виде микропузырьков в цитоплазму клетки. Метод применяют для внедрения векторов в эукариотические клетки.

4. **Электропорация.** При воздействии на клетки импульсами высокого напряжения (200-350 вольт, длительность 54 мс) можно увеличить проницаемость клеточных мембран. Через образующиеся на короткое время в мембране микропоры векторы проникают из окружающей среды (раствора) в цитоплазму клетки.

5. **Бомбардирование микрочастицами.** Это один из самых эффективных методов в генной инженерии растений. Для внедрения используют

незрелые зародыши семян. Их подвергают бомбардированию частицами золота или вольфрама (диаметр около 600 нм), на которые нанесено покрытие из векторов. Этими частицами заряжают «генные пушки», после выстрелов из которых частицы проникают в растительные клетки. Клетки, расположенные в центре направления выстрела, обычно погибают. Однако клетки, расположенные на удалении 0,6-1 см от центра, наиболее пригодны для внедрения векторов. Оригинальную простую конструкцию «генной пушки» предложил отечественный ученый Р.К. Салаев (рис. 71). Золотые шарики, на которые нанесены векторы, прикрепляются на фронтальную сторону тефлоновой пульки от духового ружья. На свободный конец ствола надевается специальная насадка.

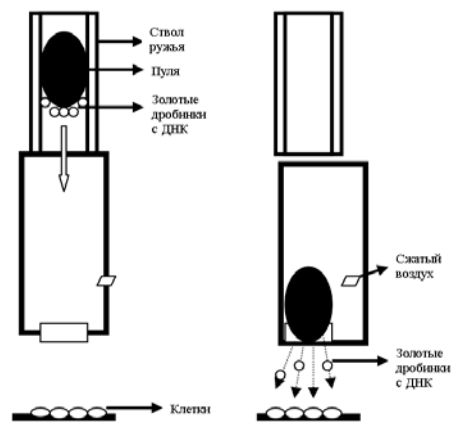


Рис.71. Генная пушка Р.К. Салаева (описание в тексте)

предложил отечественный ученый Р.К. Салаев (рис. 71). Золотые шарики, на которые нанесены векторы, прикрепляются на фронтальную сторону тефлоновой пульки от духового ружья. На свободный конец ствола надевается специальная насадка.

После выстрела пуля вылетает из ствола и застревает в отверстии насадки. Золотые шарики с прикрепленными векторами в силу инерции отрываються и летят к растительным клеткам, находящимся в 10-15 см от конца насадки. Пронизывая клетки и их ядра, они доставляют векторы к молекулам ДНК растительных клеток.

4.5. Генетическая инженерия бактериофагов в создании гибридных материалов

Бактериофаги (вирусы, паразитирующие на бактериях) обратили на себя внимание наноконструкторов и нанотехнологов по двум причинам: 1) они являются широко распространенными природными наноструктурами; 2) они удобны для манипуляций с применением метода генетической инженерии.

Можно ли использовать бактериофаги при создании новых наноматериалов, причем уникальных наноматериалов, не существующих в природе? Первым отважился приступить к решению подобной проблемы коллектив исследователей из Массачусетского технологического института (США). В основу такого конструирования исследователи положили метод генетической инженерии бактериофагов. Для этого молекула ДНК, кодирующая различные белки, была включена в состав ДНК бактериофага (вируса, по-

ражающего бактерии). Генную инженерию бактериофага ученые осуществили таким образом, что новая ДНК была введена в тот участок ДНК бактериофага, который отвечает за синтез поверхностных белков вируса (рис. 72).

Колония таких (полученных методом генной инженерии) бактериофагов была помещена в специальную среду. В ней исследователи наблюдали прилипание поверхностных белков бактериофага к субстрату. После промывания поверхности субстрата на нем остались «приклеенными» только те бактериофаги, которые содержали приклеивающиеся к субстрату белки. Приклеивающихся бактериофагов отобрали, перенесли в новую среду и добились роста их колонии.

Таким путем были созданы бактериофаги, которые соединяются с различными веществами (субстратами), образуя новые сложные структуры. Исследователи надеются создать «библиотеку» бактериофагов, производящих белки, адгезивные (приклеивающиеся) к золоту, платине, серебру, оксиду цинка, арсениду галлия и др. На основе таких гибридов белков и неорганических веществ можно конструировать новые наноматериалы и наноструктуры, представляющие интерес для создания наномашин и нанoeлектронных устройств.

В одном из последующих опытов исследователи обнаружили, что бактериофаги «собираются» в длинные нити. Их поверхностные белки, соединенные с сульфидом цинка, образуют длинные электропроводящие нанонити диаметром 20 нм. При нагревании полученной структуры до 350 градусов бактериофаги удаляются, оставляя одну тончайшую металлическую нить. Подобным образом можно получать другие оригинальные наноструктуры из органических и неорганических веществ. Использованные учеными в первых опытах бактериофаги состояли всего из шести видов белков, два из которых соединяются с неорганическими веществами. Исследователи планируют продолжить эксперименты с более сложными по составу белков бактериофагами для того, чтобы получить трехмерные проводящие структуры.

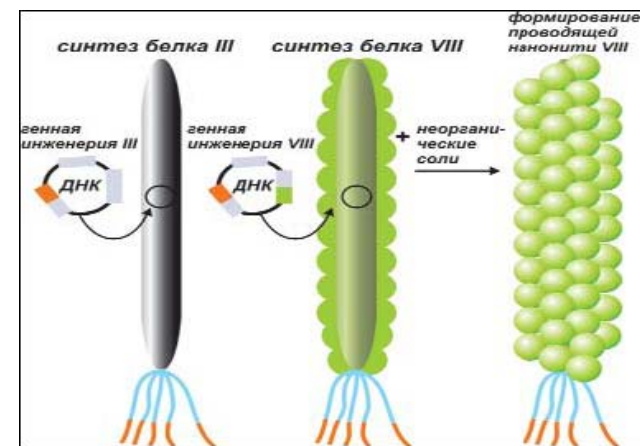


Рис. 72. Фрагменты ДНК, кодирующие различные белки, внедряют в ДНК бактериофага, который синтезирует эти белки и располагает их на своей поверхности

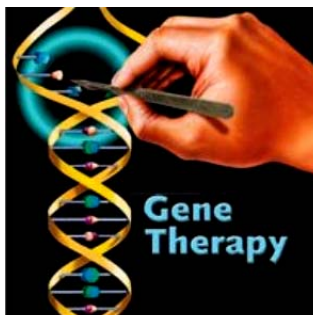
4.6. Генная терапия и генный таргетинг

К настоящему времени описано более 2000 наследственных заболеваний человека. При этом лишь незначительная часть этих недугов человечества поддается лечению традиционными методами. **Каковы возможности генетической инженерии в лечении наследственных заболеваний?**

Исследования по обоснованию использования метода генетической инженерии в медицине активно ведутся на протяжении последних трех десятилетий во многих странах мира. Тем не менее, достигнутые успехи представляются достаточно скромными. Это обусловлено, главным образом, чрезвычайной сложностью проблемы.

Наиболее обнадеживающие результаты оказываются в тех случаях, когда заболевание обусловлено дефектом одного гена. В таких случаях возможно **прицельное введение нормального гена в то место хромосомы (ДНК) больных клеток, где находится дефектный ген.**

Нормальный ген обеспечит синтез необходимых клетке белков (ферментов или др. веществ), а нормализация функции клеток больного органа приведет к выздоровлению организма. Этот способ лечения наследственного заболевания, основанный на оригинальной нанобиотехнологии, получил название **генной терапии**. Такой однократной процедуры генной терапии может быть достаточно, чтобы полностью излечить наследственную болезнь.



Многие наследственные заболевания связаны с появлением в ДНК хромосомы измененного («ненормального») гена. Функционирование такого гена приносит организму только вред. **Как можно «выключить» вредную для организма функцию гена?**

Для таких случаев учеными разработан оригинальный способ лечения, получивший название **генного таргетинга** или генного «нокаута». Он заключается в полном подавлении (выключении) функции определенного гена. Для этой цели используется уникальная нанобиотехнология, обеспечивающая замену нормального гена в зародышевой клетке на «сломанную» копию. В «сломанную» копию гена исследователи включают специальную вставку из нуклеотидов. Только такой вставкой и отличается «сломанная» копия от нормального гена. Вставка сдвигает рамку считывания наследственной информации, которую содержит «сломанная» копия. Из-за этого белок, который кодируется этим геном, не синтезируется (т.е. ген не функционирует), а заболевание, следовательно, не проявляется. В настоящее время уже сотни болезней человека поддаются излечению с помощью генной терапии и генного таргетинга.

Словарь основных терминов

Бактериофаги – вирусы, поражающие бактерии.

Биодатчик – наноструктура на основе нуклеиновых кислот, которая может служить чувствительным элементом сенсорных устройств, реагирующих на присутствие биологически активных соединений.

Бомбардирование микрочастицами – метод внедрения чужеродной ДНК в клетку. Заключается во введении в клетку частиц золота или вольфрама, покрытых тонким слоем векторов (ДНК). Этими частицами заряжают «генные пушки», после выстрелов из которых частицы проникают в клетки.

Вектор – молекула ДНК вирусов или плазмид, переносящая ген (фрагмент ДНК) в клетку организма-хозяина.

Генетическая (генная) инженерия – раздел биологии, задачей которого является создание новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке организма хозяина и изменять ее обмен веществ.

Генная терапия – лечение заболеваний путем замещения в клетке дефектного гена на вводимый в нее нормальный ген.

Генный таргетинг – искусственное блокирование (выключение функции) определенного гена.

Лигазы – группа ферментов, сшивающих фрагменты различных молекул ДНК друг с другом.

«Липкие концы» ДНК – короткие (от 4 до 20 нуклеотидов) одноцепочечные участки на концах молекул ДНК, которые позволяют соединяться («слипаться») различным фрагментам ДНК. Соединение происходит за счет образования водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями одноцепочечных концов ДНК.

Липосомы – сферические образования, способные проникать в клетку вследствие растворения их липидной стенки в липидах клеточной мембраны (плазмалеммы).

Микроинъекция – способ введения чужеродной ДНК в ядро клетки при помощи тончайших стеклянных трубочек и микроманипулятора.

Плаزمид – внехромосомная ДНК бактерий, способная самостоятельно размножаться.

Реакция обратной транскрипции – синтез молекулы ДНК, в котором матрицей служит молекула РНК.

Ревертазы – группа ферментов, катализирующих реакции обратной транскрипции.

Рекомбинантная (гибридная) ДНК – искусственно созданная из двух или более фрагментов молекула ДНК.

Рестриктазы – группа ферментов, разрезающих молекулу ДНК на фрагменты.

Трансгенные растения – растения, содержащие чужеродные гены.

Трансплантация генов (трансгенез) – встраивание новых генов в ДНК организма-хозяина (организма-реципиента).

Трансфекция – способ введения в клетку чужеродных генов путем обработки векторов ионами кальция. Образующиеся наноконструкции ионных комплексов и вектора проникают в клетку, окружая себя фрагментами клеточной мембраны.

Трансформация клетки – изменение свойств клетки, в основе которого лежит изменение структуры ее ДНК.

Электропорация – способ введения чужеродных генов при воздействии на плазмалемму импульсами высокого напряжения. Формирующиеся при этом на короткое время микропоры плазмалеммы пропускают ДНК из окружающей среды в клетку.

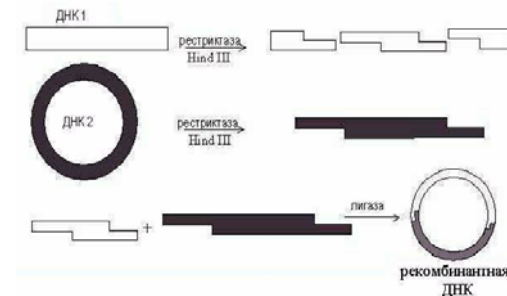
Вопросы для повторения:

1. Что представляет собой генетическая (генная) инженерия как раздел молекулярной биологии?
2. Кратко охарактеризуйте эксперимент, положивший начало генетической инженерии?
3. Какие ферменты названы «биологическими ножами»?
4. Какие задачи необходимо решить исследователю, чтобы провести опыт (работу) по генетической инженерии?
5. Объясните основные этапы выполнения генно-инженерной работы.
6. Каким образом можно получить гены для внедрения в ДНК клетки организма-хозяина (организма-реципиента)?
7. Какое решение проблемы точного нахождения гена в естественной ДНК для последующего его вырезания предложили японские ученые?
8. Охарактеризуйте роль вектора в опытах (работах) по генетической инженерии.
9. Назовите составные части вектора как генетической наноконструкции.
10. Какова роль «липких концов» ДНК в образовании вектора?
11. Кратко охарактеризуйте основные способы введения чужеродной ДНК в клетку организма-хозяина (организма-реципиента).
12. Объясните сущность трансфекции и электропорации как способов внедрения чужеродной ДНК в клетку организма-хозяина.
13. Как осуществляют бомбардирование микрочастицами, чтобы внедрить чужеродную ДНК в клетку?
14. Почему бактериофаги привлекли внимание наноконструкторов и нанотехнологов?
15. Объясните, как ученые «приклеивали» бактериофагов к субстрату.

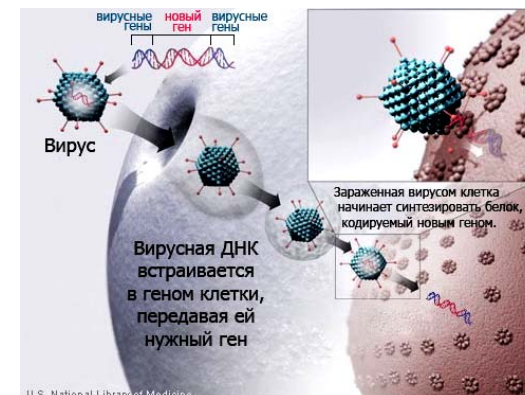
16. Опишите последовательность создания гибридных наноматериалов (белок + неорганическое вещество) путем генетической инженерии бактериофага.
17. Объясните, как бактериофаги образуют электропроводящую нанонить?
18. Что представляет собой генная терапия? С какой целью она применяется в медицине?
19. В чем заключается сущность генного таргетинга (генного нокаута)?
20. С какой целью метод генетической инженерии применяют в растениеводстве и животноводстве?

ЗАДАНИЯ

Задание №1. Зарисуйте приведенную ниже схему в тетради. Напишите название этапа работ по генетической инженерии, который изображен на схеме. Какая из изображенных структур может использоваться в последующем в качестве вектора? Объясните, почему эта структура может служить вектором.



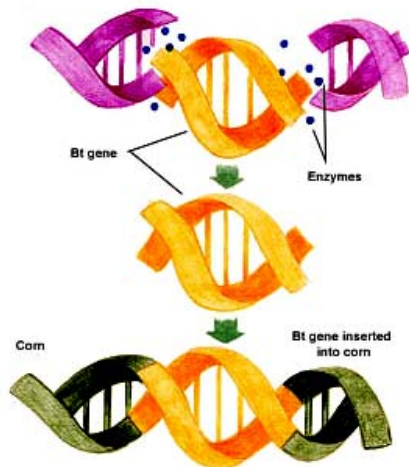
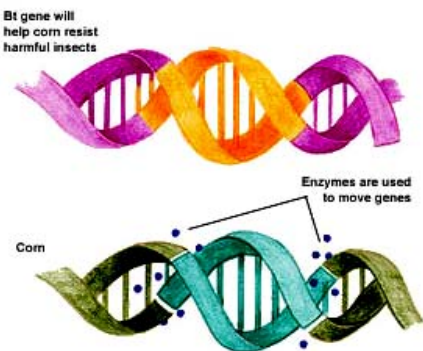
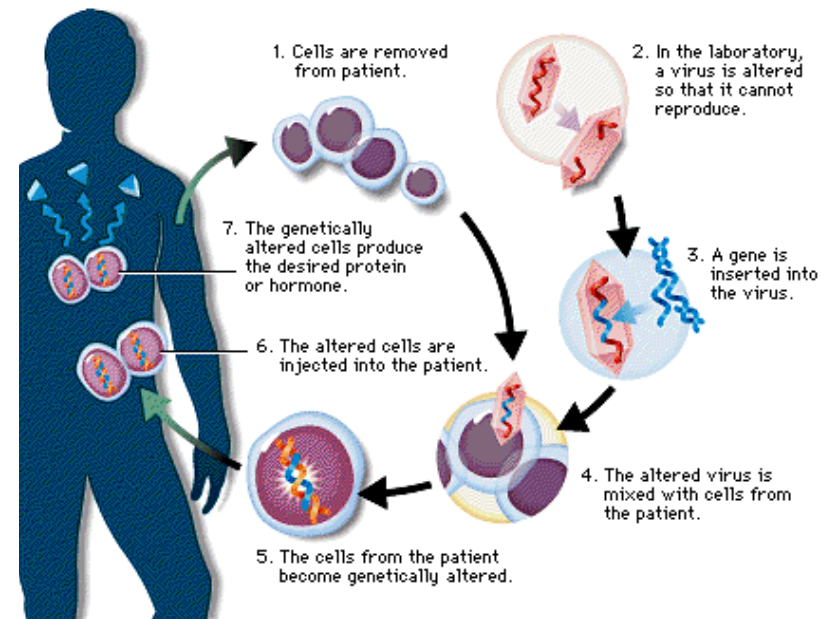
Задание №2. Какой процесс изображен на рисунке с учетом того, что вирус может являться бактериофагом (вирусом бактерий). Найдите на рисунке схему вектора и зарисуйте ее в тетради. Какой еще участок, кроме указанных на рисунке, может содержать вектор? Дорисуйте его на схеме в тетради и обозначьте.



Задание №3. Завершите выполнение приведенной ниже схемы. Какой метод она иллюстрирует? Какой этап этого метода может осуществляться несколькими путями? Результат какого из этапов этого метода является, на ваш взгляд, наиболее трудно предсказуемым для экспериментатора? Если бы вы стали исследователем в области селекции растений, для каких целей вы использовали бы обсуждаемый метод? Выделите среди них близкие (более реальные) и отдаленные (менее реальные) цели. Ответы аргументируйте.

Выделение гена → Подбор вектора →

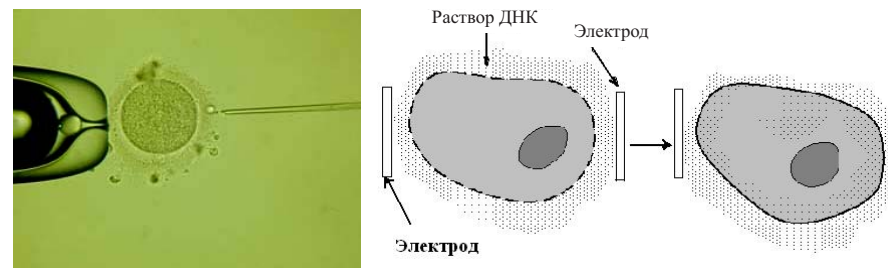
Задание №4. На рисунке изображена схема нанобиотехнологии (генно-инженерной манипуляции), на которой основан способ лечения наследственного заболевания человека. Фрагменты ДНК, изображенные оранжевым и голубым цветами, соответствуют генам. Как называется способ лечения наследственного заболевания, основанный на изображенной генно-инженерной манипуляции? Какие ферменты используются в этой генно-инженерной манипуляции? Почему ген, изображенный голубым цветом, после вырезания из ДНК в дальнейших процессах не участвует? Объясните, зачем новый ген (изображен оранжевым цветом) встраивается в ДНК вместо удаленного гена? Дайте свою оценку перспектив использования генно-инженерной манипуляции, которая проиллюстрирована приведенной на рисунке схемой.



Задание №5. Какой способ лечения наследственных заболеваний человека изображен на следующей схеме? Найдите на схеме этапы, на которых применяется метод генетической инженерии. Зарисуйте эти этапы в тетради и объясните их.

Задание №6. Представьте себя ученым в области изучения вирусов и бактерий человека. Как бы вы использовали метод генетической инженерии в своих исследованиях? Сформулируйте задачи, которые вы могли бы решить, используя метод генетической инженерии. Ответ объясните.

Задание №7. Кратко охарактеризуйте методы внедрения чужеродной ДНК в клетку, которые изображены на приведенных ниже рисунках. Какие другие методы внедрения чужеродной ДНК в клетку вам известны? Какой из этих методов, по вашему мнению, наиболее надежен? Какой из методов представляется вам наименее надежным для обеспечения желаемого результата? Ответы аргументируйте.



Задание № 8. Представьте себя исследователем, перед которым поставлена задача создать рекомбинантную ДНК вне организма (в лабораторных условиях). Исходным материалом для опыта должны послужить два разнородных фрагмента ДНК. Каждый из них состоит из двух полинуклеотидных цепочек, закрученных в спираль. Что вам необходимо приготовить для опыта по соединению этих разнородных фрагментов в единую наноструктуру – рекомбинантную ДНК? Какие ферменты и в какой последовательности вы будете применять в ходе опыта? Как изменится длина рекомбинантной молекулы ДНК по отношению к суммарной длине исходных фрагментов двухцепочечных ДНК? Ответ объясните.

Задание № 9. Создайте информационную базу об использовании метода генетической инженерии в нанотехнологиях.

Литература

- Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века / В.С. Баранов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 3. – С. 63-68.
- Белая книга по нанотехнологиям / под ред. В.И. Аржанцева и др. – М.: Издательство ЛКИ, 2008. – 344 с.
- Биотехнология / под ред. А.А. Баева. – М.: Наука, 1984.
- Верма А.М. Генотерапия / А.М. Верма // В мире науки. – 1991. – № 1. – С. 26-34.
- Гассер И.С. Трансгенные культурные растения / И.С. Гассер, Р.Т. Фрейли // В мире науки. – 1992. – № 8. – С. 24-30.
- Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений / Ю.Ю. Глеба // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 6. – С. 3-8.
- Евдокимов Ю.М. Пространственно упорядоченные формы ДНК и ее комплексов – основа для создания наноконструкций для медицины и биотехнологии / Ю.М. Евдокимов // Российские нанотехнологии. – 2006. – № 1-2. – С. 256-264 (режим доступа <http://www.nanorf.ru>).
- Евдокимов Ю.М. Нуклеиновые кислоты, жидкие кристаллы и секреты наноконструирования / Ю.М. Евдокимов // Наука и жизнь. – 2005. – № 4 (режим доступа <http://www.nkj.ru/archive/articles/604>).
- Евдокимов Ю.М. Жидкокристаллические формы нуклеиновых кислот / Ю.М. Евдокимов // Вестник Российской академии наук. – 2003. – № 8. – С. 712-721.
- Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2006. – 479 с.
- Зеленин А.В. Генная терапия: этические аспекты и проблемы генетической безопасности / А.В. Зеленин // Генетика. – 1999. – Т. 35. – С. 1605-1612.

- Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология / П. Зенгбуш. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 367 с.
- Коницев А.С. Молекулярная биология / А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2005. – 400 с.
- Корочкин Л.И. Клонирование животных / Л.И. Корочкин // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 4. – С. 10-16.
- Лещинская И.Б. Генетическая инженерия / И.Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 1. – С. 32-39.
- Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды / Л.А. Лутова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 10. – С. 10-17.
- Льюин Б. Гены / Б. Льюин. – М.: Мир, 1987.
- Сассон А. Биотехнология / А. Сассон. – М.: Мир, 1987.
- Семенова М.Л. Зачем нужны трансгенные животные / М.Л. Семенова // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 4. – С. 13-20.
- Симан Н. Нанотехнология и двойная спираль / Н. Симан // В мире науки. – 2004. – № 9 (режим доступа <http://www.sciam.ru/2004/9/nano>).
- Сыч В.Ф. Основы биологической терминологии / В.Ф. Сыч. – Ульяновск: УлГУ, 2003. – 456 с.
- Сыч В.Ф. Общая биология: учебник для высшей школы / В.Ф. Сыч. – М.: Академический Проект, 2007. – 330 с.
- Сыч В.Ф. Введение в нанотехнологии. Элективный курс в программу биологии: учебное пособие для 10-11 классов средней общеобразовательной школы / Сыч В.Ф., Дрожжина Е.П., Курносова Н.А. и др. – Ульяновск: УлГУ, 2008. – 100 с..
24. Фаворова О.О. Лечение генами – фантастика или реальность? / О.О. Фаворова // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 21.
- Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет-сайты:

- www.sciam.ru/2004/9/nano
www.nkj.ru/archive/articles/604
www.nanorf.ru
www.biochemistry.ru
referraty.at.ua/publ/biologoiija/geny_i_khromosomy/3-1-0-41
habrahabr.ru/blogs/the_future_is_here/21105/
forum.ateist.ru/topic849-15.html
vladmedicina.ru/articles/popular/2010-01-13-geneticheski.htm
dic.academic.ru/dic.nsf/enc_biology/1288/Биосинтез

ГЛАВА 5. Нанобиотехнологии надмолекулярного (субклеточного) уровня организации ЖИВЫХ СИСТЕМ

5.1. Структурная организация плазмалеммы (клеточной мембраны)

Структурно-функциональной единицей надмолекулярного (субклеточного) уровня организации живого являются биологические мембраны, органоиды и их части. Биологические мембраны отделяют содержимое клетки от внешней среды, формируют ее органоиды. Они обладают сложным составом и строением.

Длившееся около полувека изучение структуры и функции биологических мембран стало результативным только с применением электронной микроскопии плазмалеммы (клеточной мембраны). Эти исследования завершили в 1972 году С. Зингер и Г. Николсон, разработавшие жидкостно-мозаичную модель строения плазмалеммы. **Что же представляет собой плазмалемма согласно жидкостно-мозаичной модели строения?**

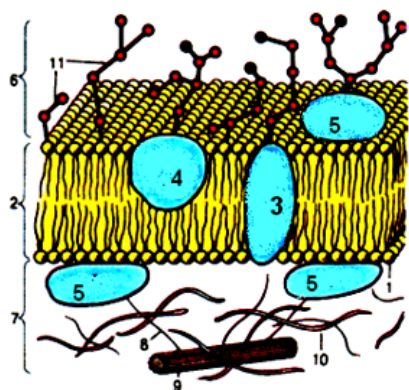


Рис. 73. Схема строения плазмалеммы:
1 – молекулы липидов; 2 – липидный бислой; 3 – интегральный белок;
4 – полуинтегральный белок;
5 – периферические белки;
6 – гликокаликс; 7 – субмембранный слой;
8 – актиновые микрофиламенты;
9 – микротрубочка; 10 – промежуточные филаменты; 11 – углеводные части молекул гликопротеинов и гликолипидов

Плазмалемма (клеточная мембрана) – это поверхностная структура (рис. 73), ограничивающая клетку снаружи. Она осуществляет непосредственную связь клетки с внеклеточной средой, ее контакты со всеми веществами и раздражителями среды. Толщина плазмалеммы составляет 5-10 нм.

Плазматическая мембрана образована в основном белками и липидами в количественном соотношении примерно 1:1. Основу мембраны составляет липидный бислой. Он формируется двумя слоями молекул липидов, состоящими из гидрофильной (полярной) головки и гидрофобного (неполярного) хвоста (рис. 73). Гидрофобные хвосты обращены внутрь липидного бислоя, а гидрофильные головки – наружу. Липиды и белки плазмалеммы образуют гелеобразную консистенцию.

5.2. Типы мембранных белков

Мембранные белки обеспечивают специфические свойства мембраны и играют различную биологическую роль (переносчиков, ферментов, структурных молекул и др.). Белковые молекулы распределены в липидном бислое мозаично, свободно перемещаясь в его пределах. **Каким же образом молекулы белков удерживаются в липидном бислое, сохраняя целостность структуры клеточной мембраны?**

Молекулы белков удерживаются в липидном бислое посредством гидрофобных, электростатических и других межмолекулярных взаимодействий с полярными и неполярными частями липидных молекул. Поэтому, несмотря на свободное перемещение белков в толще липидного бислоя, конструкция плазмалеммы обладает достаточной прочностью.

Исследователей поразило разнообразие мембранных белков, причем не только по строению и функции, но даже по расположению. По своему расположению относительно липидного бислоя **мембранные белки разделяются на две разновидности: периферические (внешние) и интегральные (погруженные)**. Периферические (внешние) белки связаны электростатическими взаимодействиями с полярными головками липидных молекул (рис. 74). Основную роль в организации мембраны играют интегральные (погруженные) белки, которые погружены в мембрану (рис. 74) либо полностью (собственно интегральные белки), либо частично (полуинтегральные белки). Часть белков пронизывает всю мембрану (пронзающие или трансмембранные белки).

Третий компонент клеточной мембраны – углеводы. Они представляют собой в основном олигосахариды и полисахариды. **Какова биологическая роль углеводов клеточной мембраны?** Углеводы плазматической мембраны (рис. 73) находятся в соединениях с белками (гликопротеины) и липидами (гликолипиды). Они образуют на поверхности клеточных мембран основу надмембранного слоя, названного гликокаликсом (рис. 73).

Гликокаликс осуществляет межклеточные взаимодействия, участвует в механизмах биологической защиты клетки, обеспечивает стабильность белковых молекул в мембранах.

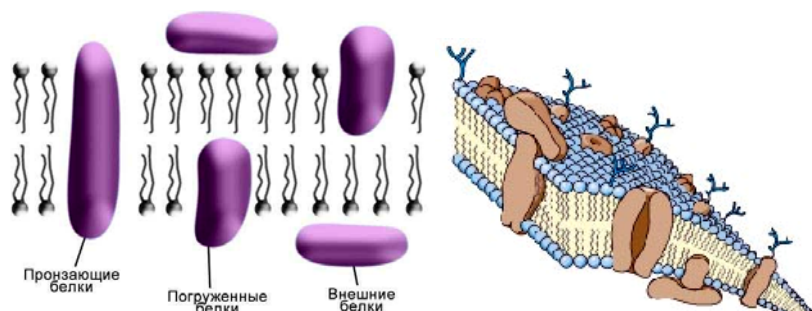


Рис. 74. Мембранные белки плазматической (клеточной) мембраны (описание в тексте)

5.3. Функции плазмалеммы

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

- барьерная функция заключается в механическом разграничении цитоплазмы и среды, окружающей клетку;
- функция транспорта веществ и частиц (избирательный, регулируемый, пассивный и активный транспорт) обеспечивает связь клетки с внешней средой;
- рецепторная функция заключается в распознавании данной клеткой других клеток и межклеточного вещества; в ее осуществлении участвуют специфические рецепторы к сигнальным молекулам (гормонам и др.), расположенные на поверхности плазмалеммы.

Традиционные методы исследований оказались недостаточно эффективными для глубокого и всестороннего изучения отдельных функций плазмалеммы живых клеток. **Как повысить результативность глубоких исследований функций плазмалеммы?**

Неожиданное решение проблемы предложила группа ученых из университета Пенсильвании (США). Для более глубокого изучения роли плазмалеммы в жизнедеятельности клетки исследователи изготовили простейшую

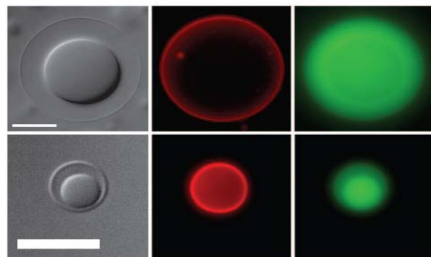


Рис. 75. Микрофотографии простейших искусственных клеток, изготовленные с помощью обычного оптического (слева) и люминесцентного (в центре и справа) микроскопов. Длина шкалы равна 10 мкм

искусственную клетку (рис. 75). В качестве цитоплазмы они использовали раствор двух полимеров – полиэтиленгликоля и декстрана. Эти вещества не смешиваются друг с другом. Клеточная мембрана формировалась из липидного бислоя. Помещая такие клетки в разные среды, ученые исследовали барьерную и транспортную функции клеточной мембраны. В определенных средах ученым удалось наблюдать процесс почкования искусственных клеток, в котором активно участвовали их клеточные мембраны.

5.4. Понятие об элементарной биологической мембране

Широкое распространение структур, подобных плазмалемме (клеточной мембране), в клетке, универсальность их строения послужили основанием для введения понятия «элементарная биологическая мембрана». **Основу элементарной биологической мембраны составляет двойной молекулярный слой липидов (липидный бислой), по обе стороны и в толще которого находятся белки.** Структурные части клетки подразделяют на мембранные и немембранные органоиды (органеллы). Органоидами называют постоянные части клетки, имеющие определенное строение и выполняющие специфические функции. В составе мембранных органоидов присутствуют биологические мембраны (рис. 76, 77). **К мембранным органоидам относят клеточную (плазматическую) мембрану, ядро клетки, эндоплазматическую сеть, пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи), митохондрии, лизосомы, пероксисомы, хлоропласты, микроворсинки.**

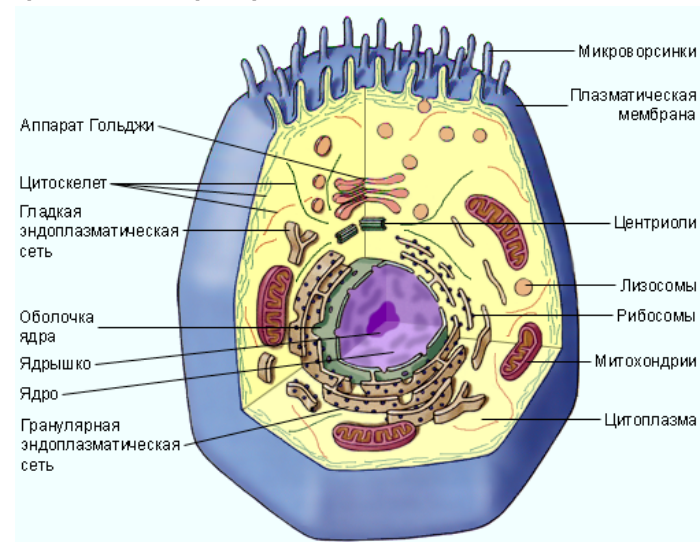


Рис. 76. Мембранные и немембранные органоиды животной клетки (описание в тексте)

Немембранные органоиды, которые не имеют собственной замкнутой мембраны (рис. 76, 77), представлены рибосомами, центриолями клеточного центра, микротрубочками и микрофиламентами (цитоскелетом).

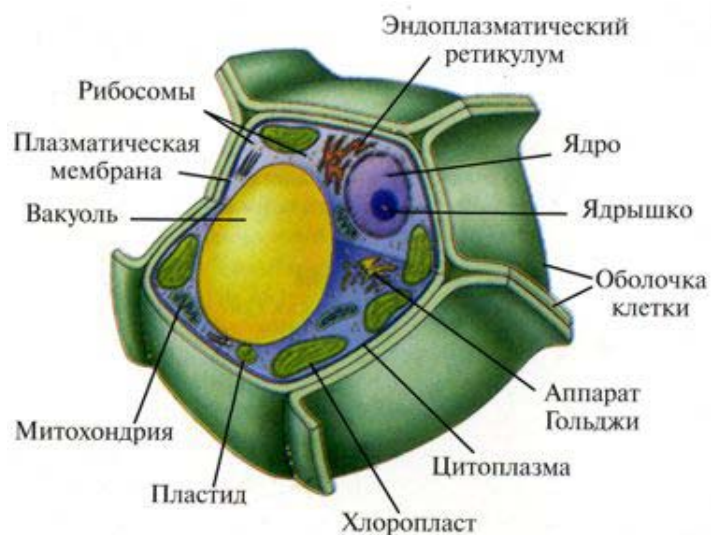


Рис. 77. Мембранные и немембранные органоиды растительной клетки (описание в тексте)

5.5 Конструирование наноструктур на основе биологических мембран

Уникальные свойства бислоя липидов элементарных биологических мембран заинтересовали ученых и инженеров-конструкторов, работающих в самых различных направлениях биотехнологий, медицины и промышленного производства. **Можно ли использовать эту универсальную наноструктуру живых систем в создании искусственных наноконструкций?**

Исследователи обратили внимание на ориентацию молекул липидов в бислое. Они располагаются так, что неполярные (гидрофобные) хвосты молекул направлены внутрь слоя навстречу хвостам другого слоя. Полярные (гидрофильные) головки молекул липидов направлены наружу. **Как поведут себя фрагменты бислоя в воде?**

Поместив фрагменты бислоя в воду, ученые добились формирования мельчайших сферических пузырьков. Стенка пузырьков состояла из бислоя липидов, в котором полярные головки молекул граничили, с одной стороны, с водной средой, а с другой стороны, с внутренней полостью пузырька (рис. 78).

Такие сферические пузырьки, стенка которых образована липидами получили название **липосом** (в переводе с греческого – жировые тела). Из-

меня условия при формировании липосом, ученые смогли заключать в полость липосом лекарственный препарат, фрагмент ДНК и другие вещества.

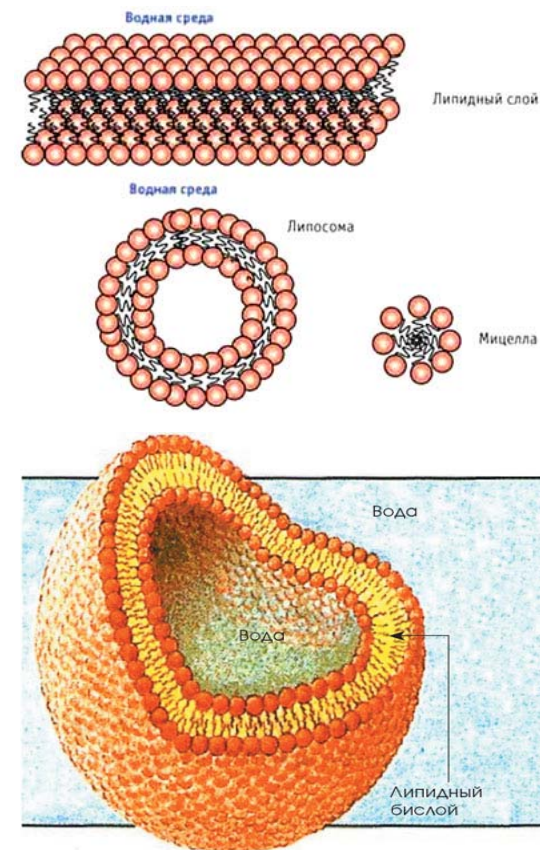


Рис. 78. Формирование липосомы из липидного бислоя в водной среде

Принимая во внимание структурное сходство стенки липосомы с плазмалеммой, ученые поставили задачу исследовать их взаимодействие в специальных опытах. Результаты опытов превзошли их ожидания: липосомы оказались не только не токсичными для живых клеток, но и проявили свойство сливаться с клеточными мембранами (рис. 79). Еще более интересным в плане практического применения липосом оказался следующий установленный в ходе опыта факт: при слиянии липосомы с клеточной мембраной содержимое липосомы проникает в цитоплазму клетки. Следовательно, липосома может доставить внутрь клетки-мишени лекарственный препарат или вводимый в нее новый ген. Это свойство липосом уже находит широкое применение в медицине и генной инженерии.

Вернемся, однако, к опытам ученых по изучению поведения липидных молекул в водной среде. При определенных условиях молекулы формировали, наряду с липосомами, второй тип липидных наноструктур – наносомы (мицеллы).

Они представляют собой мельчайшие сферы, состоящие из липидов, которые отличаются от липосом двумя структурными особенностями: 1) лишены внутренней полости (водного резервуара); 2) от внешней водной среды наносомы (мицеллы) отделены однослойной липидной стенкой (рис. 78).

В ходе последующих исследований ученые установили, что липидные мембраны заряжены обычно положительно в отличие от других клеточных наноструктур – микротрубочек. Последние представляют собой полые цилиндры диаметром 24-25 нм. Микротрубочки, формирующиеся глобулярным белком тубулином, заряжены отрицательно. **Как поведут себя липидные мембраны и микротрубочки при взаимодействии?**

Для ответа на поставленный вопрос ученые осуществили ряд опытов. В ходе них было обнаружено, что в определенных условиях путем самосборки формируются белково-липидные нанотрубки. Это происходит следующим образом. Микротрубочка из белка тубулина формирует остов нанотрубки (рис. 80). Тубулиновый остов покрывается липидным бислоем. Последний, в свою очередь, окружается снаружи кольцами или спиральями из белка тубулина.

Важным достижением нанобиотехнологий стало создание **управляемых белково-липидных нанотрубок**. Изменяя электрический заряд липидного бислоя мембран и микротрубочек, наноконструкторы создают **открытые** или **закрытые нанотрубки** (рис. 80). Это позволяет управлять заключением в нанотрубки или освобождением из них веществ, предназначенных для направленной доставки. В настоящее время разрабатываются конструкции таких нанотрубок, во внутреннюю полость которых можно было бы помещать лекарства или гены для доставки в определенные участки организма. Подобно липосомам, управляемые белково-липидные нанотрубки позволят доставлять необходимые вещества через плазматическую мембрану в конкретные участки живой клетки.

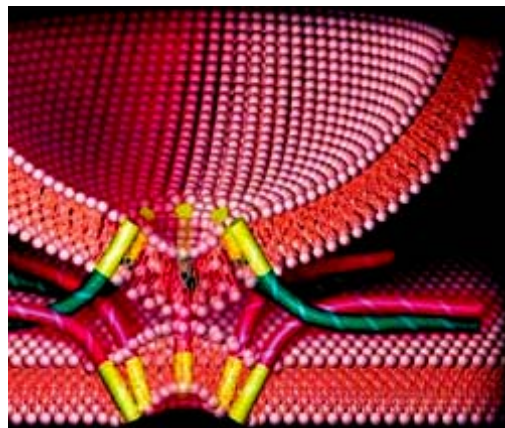


Рис. 79. Липосома (часть ее в виде полусферы изображена вверху) в процессе слияния с клеточной мембраной (плоская структура внизу)

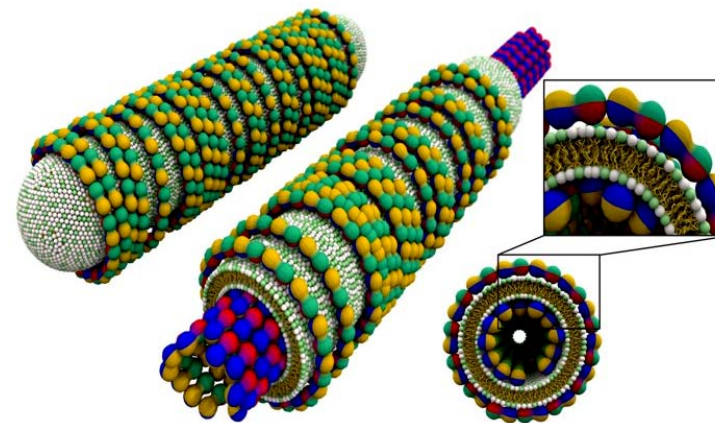


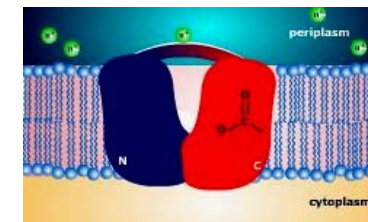
Рис. 80. Схема липидно-белковых нанотрубок: в центре – нанотрубка с открытыми концами; слева – нанотрубка с закрытыми посредством липидных шапочек концами; справа – горизонтальная проекция нанотрубки и ее увеличенный фрагмент. Контролируя относительное количество липидов и белков, можно изменять состояния нанотрубок: либо с открытыми концами, либо с концами, закрытыми липидными шапочками

5.6. Биологические мембраны в нанотехнологиях

Размах и разнообразие применения биологических мембран в наноконструкциях вдохновили исследователей на постановку более сложных задач. **Помогут ли биологические мембраны осуществить нанопечать?**

Первым к решению такой задачи приступил международный коллектив исследователей из США и Германии. Он разработал оригинальный метод нанопечати или нанолитографии. **Какое же место в методе нанопечати отведено клеточным мембранам?**

Липиды, подобные тем, которые образуют клеточные мембраны, были использованы в качестве «чернил». Чтобы наносить на кремниевую пластинку или стекло отдельные молекулы липидов, исследователи применили атомно-силовой микроскоп. Для этой цели подбирались особые экспериментальные условия. Контролируя влажность среды и скорость построения нанообраза, экспериментаторы осаждали несколько слоев липидов с соблюдением определенной последовательности. При осаждении на поверхность субстрата липиды образовывали липидный бислой. Межмолекулярные взаимодействия в этом



двойном слое липидов практически воспроизводили межмолекулярные взаимодействия, характерные для клеточных мембран. Нанообразы из липидов были напечатаны на различных материалах (кремний, полистирол и др.).

При необходимости методом нанопечати можно быстро получать большое количество клеточных мембран. Метод нанопечати, по мнению экспериментаторов, сможет приблизить понимание того, как в действительности функционируют клеточные мембраны. На его основе возможна также разработка новых способов доставки лекарственных препаратов непосредственно в клетки организма.

5.7. Модели биологических мембран, их использование в качестве биофильтров

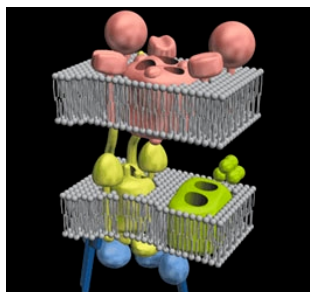
Важность функций, надежно выполняемых биологическими мембранами, привлекла внимание исследователей и инженеров, работающих в области технического моделирования. **Возможно ли создание технических моделей (аналогов) биологических мембран?**

Учеными были проведены глубокие исследования структуры и принципов функционирования биологических мембран. Результаты этих исследований позволили создать технические модели мембран. Созданные модели обладают, подобно биологическим мембранам: 1) высокой проницаемостью; 2) избирательностью пропускаемых частиц; 3) эффективностью разделения веществ; 4) стабильностью функциональных характеристик.

Специально созданные мембраны с порами конструкторы дополнительно оснастили «умными» полимерами – наносенсорами. Такие мембраны обеспечивают разделение и очистку веществ на уровне молекул и наночастиц.

Подобные модели (устройства) с успехом могут быть использованы для создания искусственных органов, выполняющих роль биологических фильтров, например, «искусственной печени» или «искусственной почки». Это позволит в перспективе уменьшить зависимость больных от острого дефицита донорских органов.

Искусственные мембраны, создаваемые как аналоги биологических мембран, могут применяться для фильтрации и очистки жидкостей организма от вредных веществ и вирусов. С их помощью можно будет также выделять из живых организмов и очищать биологически активные вещества – гормоны, витамины и др.



5.8. Нанобиотехнологии на основе тилакоидных мембран хлоропластов

Клетки высших растений содержат мембранные органоиды чечевицеобразной формы – хлоропласты (рис. 71). В одной клетке может содержаться около 10-200 хлоропластов величиной 3-10 мкм.

Своим строением хлоропласты несколько напоминают мембранные органоиды животных клеток – митохондрии.

Оболочка хлоропласта состоит из двух мембран, окружающих бесцветное содержимое органоида – строму. Наружная мембрана гладкая, внутренняя мембрана образует выросты, которые заканчиваются утолщениями в виде плоских цистерн – тилакоидов.

Тилакоиды располагаются в виде своеобразных стопок (наподобие стопки монет), которые названы гранами (рис. 71). В мембранах гран находятся молекулы пигмента хлорофилла, придающего гранам и хлоропластам в целом зеленый цвет.

В строме (жидкой части хлоропласта) располагается кольцевая молекула ДНК, рибосомы, запасные питательные вещества.

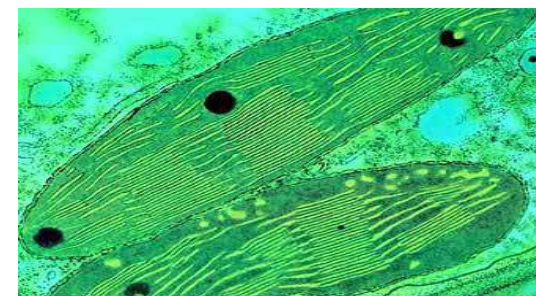


Рис. 71. Схема строения (вверху) и микрофотография (внизу) хлоропласта (описание в тексте)

Хлоропласт – основной органоид клеток растений, в котором происходит фотосинтез, т. е. образование органических веществ из неорганических соединений (CO_2 и H_2O). При этом используется энергия солнечного света, поглощение которой осуществляется хлорофиллом. Благодаря этому хлоропласты растений обеспечивают пищей все живые организмы планеты.

В ходе исследований хлоропластов было обнаружено, что **наружная поверхность мембран тилакоидов заряжена отрицательно. Можно ли эту особенность мембран тилакоидов использовать в нанобиотехнологиях?**

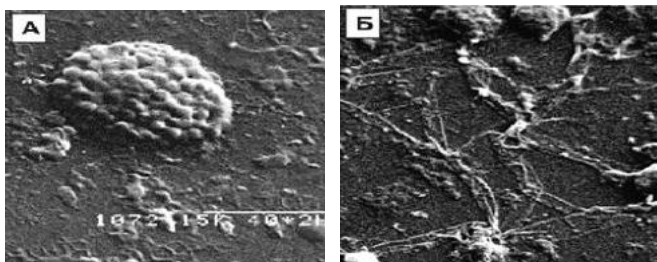


Рис. 72. А – тилакоид на поверхности кремниевой подложки. Б – тилакоиды, покрытые четырьмя слоями полиэлектрона. Микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа

Группа исследователей попыталась создать из тилакоидов и синтетического полиэлектrolита гибридный нанокomплекс. Для этого в водной среде тилакоиды иммобилизовались (закреплялись) на поверхности кремниевой подложки. На поверхность тилакоидов, в свою очередь, последовательно осаждались молекулы полиэлектrolитов. Опыты завершились успешно: были созданы и изучены **гибридные надмолекулярные комплексы из тилакоида и синтетического полиэлектrolита**. Они представляли собой закрепленные на поверхности кремниевой подложки тилакоиды, которые были покрыты четырехслойной нанопленкой полиэлектrolитного комплекса.

Полученные комплексы были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 72). Установлено, что полиэлектrolитные комплексы не оказывают существенного влияния на структуру и функции встроенных в них тилакоидных мембран хлоропластов. Это открывает возможности для использования таких композитных структур: 1) в биосенсорах; 2) в биокаталитических системах; 3) в процессах биологического синтеза.

5.9. Мембранные нанокomпозитные материалы, «пораженные» вирусами

Трудно поверить в то, что вирусы сейчас рассматриваются не только как угроза здоровью человека, но и как полезные строительные блоки для создания новых наноматериалов.

На поверхности любого вируса имеются белки-рецепторы, позволяющие ему взаимодействовать с клеткой-хозяином (рис. 73).

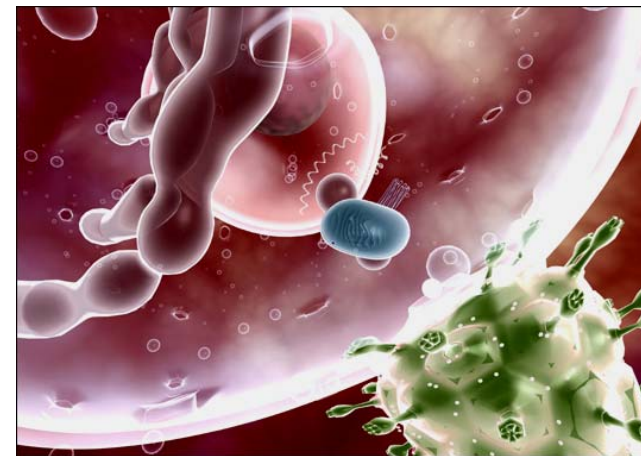


Рис. 73. Взаимодействие вируса (в правом нижнем углу рисунка) с клеточной мембраной

Основным этапом проникновения вируса в клетку является слияние вируса с плазмалеммой клетки. Оно происходит при участии гидрофобных белков поверхности вируса, активированных кислой средой. **Каким образом оригинальный механизм этого природного явления применить в создании новых композитных наноматериалов?**

Первое решение проблемы представили ученые Института биофизики и вирусологии г. Лейпцига (Германия). Для этой цели они создали многослойный полиэлектrolит, который синтезировался послойным методом. На нем сформировали липидный бислой, подобный бислою плазмалеммы. Он формировался из липидных пузырьков, которые осаждались на многослойном электrolите.

Этот композитный материал исследователи поместили в кислую среду, которая «заражалась» (инкубировалась) вирусом. Затем композитный материал промывали водой, чтобы удалить вирусы, не внедрившиеся в липидный бислой. Внедрившиеся в бислой вирусы удерживались там достаточно прочно: они не отрывались при промывании и изменении кислой среды на нейтральную.

В итоге ученые получили **композитные наноматериалы с контролируемыми биологическими свойствами. Их характеристиками можно варьировать, используя разные вирусы и полиэлектrolиты**. Важной отличительной характеристикой всех подобных композитных наноматериалов являются сведенные до минимума их нежелательные взаимодействия с живыми системами. Такие «пораженные» вирусами композитные наноматериалы могут быть использованы при изготовлении диагностических сенсоров для вирусоспецифичных антител, а также в других биомедицинских целях.

Словарь основных терминов

Гликокаликс – надмембранный слой плазмалеммы, основу которого образуют углеводные компоненты плазмалеммы – полисахариды и олигосахариды.

Граны – внутренние структуры хлоропластов в виде стопок уплощенных мембранных цистерн – тилакоидов. В мембранах гран располагаются молекулы хлорофилла, придающего гранам и хлоропластам в целом зеленый цвет.

Интегральные белки – белки плазмалеммы (клеточной мембраны), которые погружены в мембрану либо полностью (собственно интегральные белки), либо частично (полуинтегральные белки).

Липидный бислой – основа биологических мембран; формируется двумя слоями молекул липидов, гидрофобные цепи которых обращены внутрь липидного бислоя, а гидрофильные головки – наружу.

Липосома – сферический пузырек, стенка которого образована липидами; последние формируют обычно двойной слой – липидный бислой.

Мембранные белки – молекулы белков, расположенные в толще либо на поверхности липидного бислоя; обеспечивают специфические свойства мембраны, выполняют функции переносчиков, ферментов, структурных молекул.

Мембранные органоиды – органоиды клетки, в состав которых входит элементарная биологическая мембрана.

Наноконструктивные материалы – наноматериалы, сформированные двумя и более веществами (структурами), например, наноконструктивный материал, получаемый из биологической мембраны и вирусов.

Наноконтейнеры – полые веретенообразные капсулы из белковых молекул, предназначенные для доставки лекарств, ДНК, РНК.

Нанолитография (нанопечать) – методика получения большого количества биологических мембран; в качестве «чернил» используются липиды, которые с помощью атомно-силового микроскопа наносятся на стекло или кремниевую пластинку.

Наносомы (мицеллы) – мельчайшие сферы, состоящие из липидов, но не имеющие, в отличие от липосом, внутренней полости; от внешней среды наносомы отделены однослойной липидной стенкой.

Нанотрубки – липидно-белковые структуры: глобулярный белок тубулин образует остов нанотрубок, который покрывается липидным бислоем; последний, в свою очередь, окружается снаружи кольцами или спиральями из тубулина.

Немембранные органоиды – органоиды, которые не имеют в своем составе элементарной биологической мембраны.

Периферические мембранные белки – белки, располагающиеся на наружной или внутренней поверхности липидного бислоя.

Плазмалемма (клеточная мембрана) – структурный элемент клетки, ограничивающий цитоплазму с органоидами от внешней среды.

Тилакоиды – выросты внутренней мембраны хлоропластов, имеющие форму уплощенных цистерн; тилакоиды располагаются в виде своеобразных стопок (наподобие стопки монет), которые названы гранами.

Тубулин – глобулярный белок, образующий путем самосборки микро-трубочки (немембранный органоид клеток).

Элементарная биологическая мембрана – универсальное название для всех биологических мембран, основу которых составляет двойной молекулярный слой липидов (липидный бислой), по обе стороны и в толще которого находятся белки; образует плазмалемму и мембранные органоиды клетки.

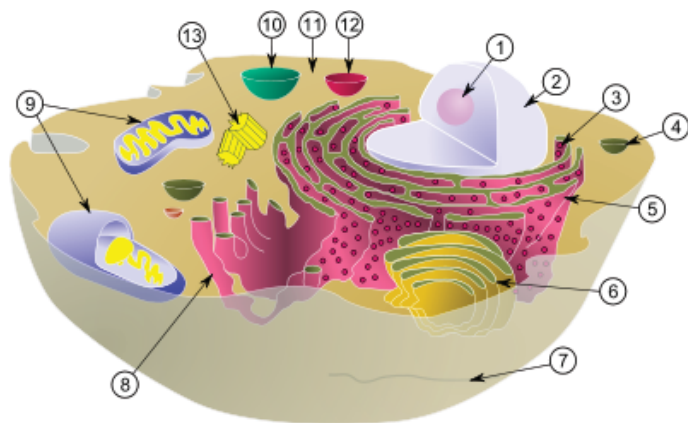
Вопросы для повторения:

1. Что является структурно-функциональной единицей надмолекулярного (субклеточного) уровня организации живых систем?
2. Какие химические вещества образуют плазмалемму (клеточную мембрану)?
3. Охарактеризуйте особенности строения плазмалеммы.
4. Назовите типы мембранных белков.
5. Чем различаются периферические и интегральные белки плазмалеммы?
6. Каким образом располагаются в плазмалемме углеводы?
7. Что представляет собой гликокаликс?
8. Какие функции выполняет плазмалемма?
9. Из каких веществ ученые университета Пенсильвании создали простейшую искусственную клетку?
10. Какое явление наблюдали ученые у искусственных клеток?
11. Как устроена элементарная биологическая мембрана?
12. Чем различаются мембранные и немембранные органоиды клетки?
13. Какие клеточные органоиды относятся к немембранным?
14. Назовите мембранные органоиды клетки.
15. Какие из органоидов присутствуют только: а) в растительных клетках; б) в животных клетках?
16. Объясните особенности строения липосомы.
17. Каким образом располагаются молекулы липидов в бислое?
18. Какие свойства липосом позволяют успешно использовать их для направленного транспорта веществ в живую клетку?
19. Как устроены белково-липидные нанотрубки?
20. Каким образом можно создавать открытые и закрытые нанотрубки?
21. Объясните сущность метода нанопечати с использованием липидов.
22. Какие искусственно создаваемые мембраны могут выполнять роль биологических фильтров, например, искусственной почки?

23. Какие органоиды животной клетки напоминают хлоропласты?
24. Объясните строение хлоропласта.
25. Какие гибридные нанокомплексы создали ученые на основе тилакоидов хлоропластов?
26. Охарактеризуйте возможное практическое применение гибридных нанокомплексов на основе тилакоидов хлоропластов.
27. Каким образом вирусы были использованы как строительные блоки в новых композитных наноматериалах?
28. Что собой представляет естественный механизм внедрения вируса в клеточную мембрану?
29. Для каких целей могут быть использованы композитные наноматериалы, создаваемые на основе мембран и вирусов?

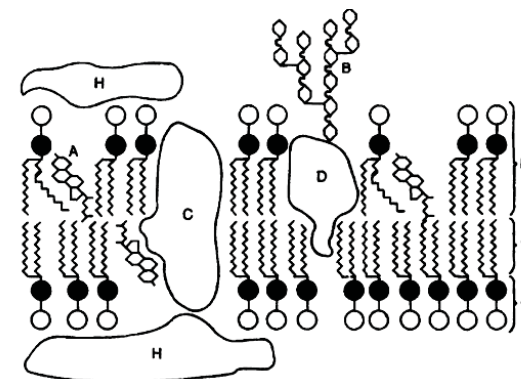
ЗАДАНИЯ

Задание № 1. Нарисуйте приведенную ниже «Схему строения эукариотической клетки» в тетради. Напишите названия указанных на рисунке цифрами органоидов клетки. Подчеркните названия мембранных органоидов. Укажите, какие из мембранных органоидов и структур используются в нанотехнологиях. Какие другие органоиды клетки представляют, на ваш взгляд, интерес для нанотехнологов? Ответ аргументируйте.

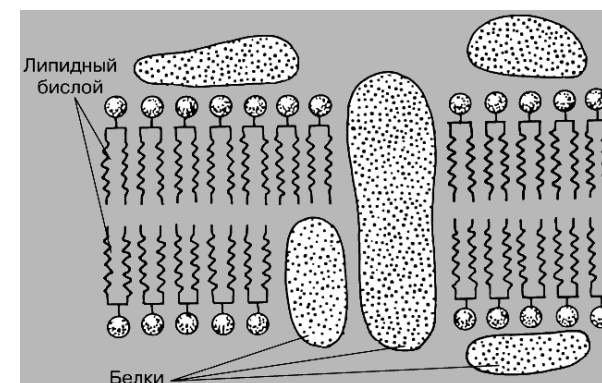


Задание № 2. Нарисуйте приведенную ниже схему строения плазмалеммы в тетради. Напишите названия образующих плазмалемму структур, которые обозначены на схеме буквами. Укажите, какие структуры образовались в результате модификации белков. Определите, где располагается наружная поверхность плазмалеммы и обозначьте ее на схеме. Сравните

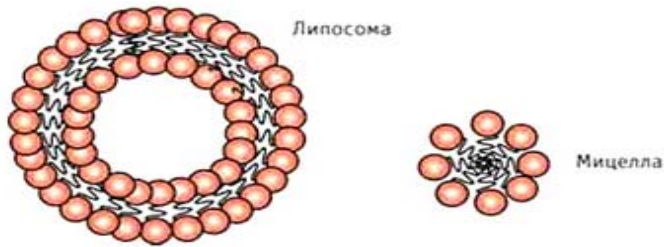
наружную поверхность плазмалеммы с внутренней и установите различия между ними. Объясните, как изменятся функции плазмалеммы в случае, когда наружная поверхность плазмалеммы утратит свое отличие и уподобится внутренней поверхности.



Задание № 3. Нарисуйте схему элементарной биологической мембраны в тетради. Обозначьте на рисунке следующие структуры: полуинтегральный белок; трансмембранный белок; поверхностный белок; гидрофильные (полярные) головки молекул липидов; гидрофобные (неполярные) хвосты молекул липидов. Какие из указанных белков могут выполнять функцию транспорта веществ через клеточную (биологическую) мембрану?

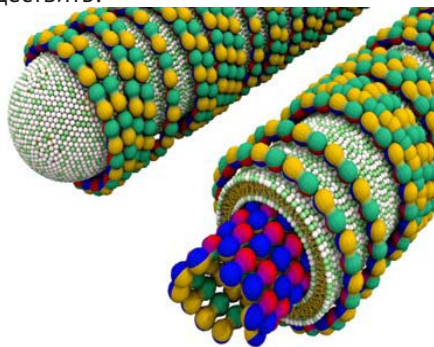


Задание № 4. Заполните таблицу сравнительной характеристики липосомы и наносомы (мицеллы), используя при этом приведенный ниже рисунок. Какие части молекул липидов обращены к внешней среде (во внутреннюю полость)? Существует ли связь между такой ориентацией молекул липидов и средой, в которой они формируются? Какие из наноструктур (липосомы или мицеллы) более широко используются в направленном транспорте веществ в клетку? Ответ объясните.



Особенности структуры	Липосома	Наносома (мицелла)
Количество слоев липидных молекул		
Ориентация молекул липидов в толще стенки		
Наличие внутренней полости		
Сравнительные размеры		

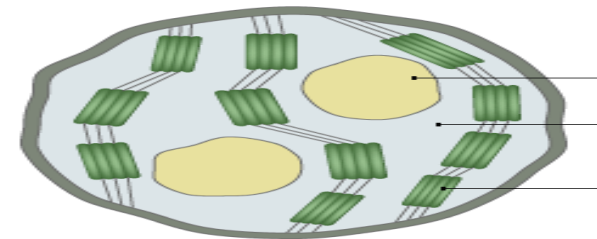
Задание № 5. Чем различаются изображенные на рисунке белково-липидные нанотрубки? Охарактеризуйте этапы их формирования. В каких структурных частях нанотрубок присутствует глобулярный белок тубулин? Возможно ли превращение нанотрубки одного типа в нанотрубку другого типа? Если такое превращение возможно, то каким образом наноконструкторы могут его осуществить?



Задание № 6. Объясните сущность нанобиотехнологии под названием «нанопечать» (нанолитография). Составьте удобную для пользователя краткую инструкцию по осуществлению нанопечати. Какая роль в этой нанобиотехнологии отведена липидам? Почему наносимые на кремниевую пластинку по одной молекуле липиды формируют в конечном итоге бислой? Изобразите с помощью схематического рисунка расположение молекул ли-

пидов в покрытии кремниевой пластинки после нанесения на нее четвертого слоя липидов. Представьте собственные предложения по практическому использованию нанопечати.

Задание № 7. Зарисуйте приведенную ниже схему строения мембранного органоида клетки в тетради. Укажите название органоида и его структурных частей. Какая структурная часть органоида была использована при создании гибридных наноконструктов? Объясните, какое свойство этой структурной части оказалось полезным для создания гибридного наноконструкта? Каким методом были изучены полученные гибридные наноконструкты? Где могут найти практическое применение гибридные наноконструкты? Могут ли они использоваться в качестве «строительных блоков» в других нанотехнологиях? Предложите свой вариант практического использования гибридных наноконструктов в отдаленной перспективе.



Задание № 8. Завершите выполнение приведенной ниже схемы создания наноконструктивных материалов на основе тилакоидов хлоропластов, используя следующие названия этапов этого процесса: покрытие тилакоидов слоем полиэлектролита; иммобилизация (закрепление) тилакоидов на кремниевой подложке; помещение тилакоидов в водную среду; формирование четырехслойной нанопленки из полиэлектролитного комплекса на поверхности тилакоидов.

СХЕМА
Выделение тилакоидов →

Задание № 9. Пользуясь текстом раздела 5.8. завершите приведенную ниже схему создания наноконструктивных материалов с использованием вирусов:

Создание многослойного полиэлектролита → Формирование на нем липидного бислоя →

Задание № 10. Проанализируйте этапы создания наноконструктивных материалов с использованием вирусов, которые вы указали при выполнении задания № 9. Почему в наноконструктивный материал из многослойного полиэлектролита и бислоя липидов самостоятельно внедрялись вирусы? Зачем композитный наноматериал помещался в кислую среду? Объясните, почему

композитный наноматериал с внедренными в него вирусами исследователи назвали композитным наноматериалом «с контролируемыми биологическими свойствами». С чем связаны минимальные нежелательные взаимодействия подобных композитных наноматериалов с живыми системами? Где могут использоваться «пораженные вирусами» композитные наноматериалы уже в настоящее время? Предложите свои варианты их практического применения в перспективе.

Задание № 11. Подготовьте устный (письменный) реферат на одну из указанных тем:

- 1) Конструирование наноструктур на основе биологических мембран.
- 2) Липосомы: способы получения и практическое применение.
- 3) Технические модели биологических мембран, их практическое применение.
- 4) Использование биологических мембран в нанотехнологиях.

Задание № 12. Создайте информационную базу об использовании биологических мембран в наноконструкциях и нанотехнологиях.

Литература

Антонов В.Ф. Биофизика мембран / В.Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 6. – С. 4-12.

Барсуков Л.И. Как собрать мембрану (солюбилизация и реконструкция мембран) / Л.И. Барсуков // Соросовский образовательный журнал. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 10-16.

Болдырев А.А. Матриксная функция мембран / А.А. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 7. – С. 2-7.

Дубяга В.П. Нанотехнологии и мембраны (обзор) // В.П. Дубяга, И.Б. Бесфамильный // Критические технологии. Мембраны. – 1999. – № 1. – С. 11-16.

Использование «управляемых» бионанотрубок для внутриклеточной доставки лекарств. Сборник новостей физики Новосибирского гос. университета. – 2005. – Вып. 3. (режим доступа <http://www.nsu.ru/asf/phnews/digest20051020/BioNanoTech.html>).

Нанобиоэлектрохимия // Российский электронный наножурнал (режим доступа http://www.nanojournal.ru/science.aspx?cat_id=718&d_no=787).

Сыч В.Ф. Общая биология: учебник для высшей школы / В.Ф. Сыч. – М.: Академический Проект, 2007. – 330 с.

Сыч В.Ф. Структурно-функциональная организация эукариотической клетки / В.Ф. Сыч, Н.А. Цыганова, Г.В. Абдулкин. – Ульяновск: УлГУ, 2006. – 84 с.

Хартманн У. Очарование нанотехнологии: пер. с нем. / У. Хартманн. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 173 с.

Чизмадзе Ю.М. Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин / Ю.М. Чизмадзе // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 2. – С. 12-17.

Школьный тур второй Всероссийской Интернет-олимпиады по нанотехнологиям «Нанотехнологии – прорыв в будущее!» (режим доступа <http://www.nanometer.ru/2008/04/06/12074371575645.html>).

12. Small, 2007, 3, 1, 1

Интернет-сайты:

www.lyceum95.ru/biolog/plastidi.htm
times.ua/story/15954/
[sc.nios.ru/dlrstore/d14cc3c1-4fcf-44d2-8a60-c315ffa4ce3/\[BOI11_metod\]_\[TM_02\].htm](http://sc.nios.ru/dlrstore/d14cc3c1-4fcf-44d2-8a60-c315ffa4ce3/[BOI11_metod]_[TM_02].htm)
estnauki.ucoz.ru/publ/6-1-0-43
www.med62.ru/metodi.php?rubrika=12, Mirkin Research Group, What's Next In Science & Technology
telstar.ote.cmu.edu/biology/animation/
www.ebio.ru/kle01.html
www.rodnik-info.ru/zelen.html
www.nsu.ru/asf/phnews/digest20051020/BioNanoTech.html
www.nanojournal.ru/science.aspx?cat_id=718&d_no=787

ГЛАВА 6. Микротрубочки и микрофиламенты клеток в нанобиоструктурах и нанотехнологиях

6.1. Цитоскелет клетки как система нановолокон

Клетки человека и животных – это, прежде всего, вода, содержание которой составляет около 80%. Плотность цитоплазмы (1,03) лишь немногим превышает плотность воды. **Почему же клетки животных не напоминают собой каплю воды?**

Разнообразные по форме клетки могут уподобиться микроскопической капельке воды только в одном случае: если будет разрушена их **опорная конструкция – клеточный скелет (цитоскелет)**. Утрачивая цитоскелет, животные клетки округляются, обретая сферическую форму. **Что представляет собой цитоскелет клетки?**

Цитоскелет клетки образуют тончайшие белковые нити – филаменты и микротрубочки (рис. 84):

- 1) **микрофиламенты** – тонкие нити (филаменты) диаметром 7 нм, состоящие преимущественно из белка актина;
- 2) **микротрубочки** – полые трубочки диаметром около 25 нм, образованные белком тубулином;
- 3) **промежуточные филаменты** – нити диаметром 10 нм, состоящие из различных белков (кератин, десмин, виментин и др.).

Элементы цитоскелета распределены в клетке неравномерно. Так, микрофиламенты преимущественно образуют слой под плазмалеммой, микротрубочки простираются от центра клетки к ее периферии, промежуточные филаменты часто повторяют расположение микротрубочек (рис. 85).

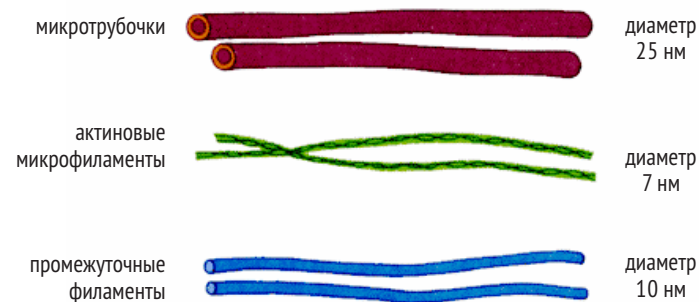


Рис. 84. Основные компоненты цитоскелета: микротрубочки, актиновые микрофиламенты, промежуточные филаменты

Цитоскелет не только определяет форму клетки. Он обеспечивает способность клетки к движению и прикреплению к субстрату, участвует в перемещении органоидов, а также в транспорте веществ в клетку и из нее. При этом **ни один из элементов цитоскелета не обладает способностью к сокращению. Каким же образом цитоскелет обеспечивает движение клетки и транспорт веществ?**

Важным свойством элементов цитоскелета является их нестабильность и способность к самосборке и саморазборке. Отдельные молекулы белков, растворенные в цитоплазме клетки, способны соединяться друг с другом. В результате такой самосборки формируются надмолекулярные агрегаты – филаменты. Самосборка может идти на обоих концах филамента, однако скорость ее различна: конец филамента, на котором самосборка протекает быстрее, называется «плюс»-концом. На противоположном «минус»-конце может проходить саморазборка – разрушение филамента с высвобождением отдельных молекул белков.

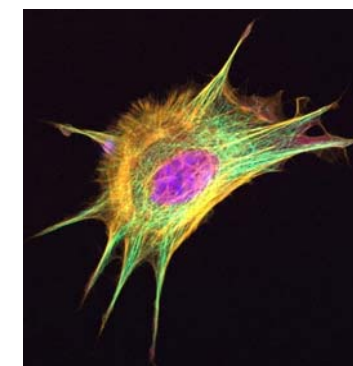


Рис.85. Астроцит мозжечка: актин окрашен в желтый цвет, микротрубочки – зеленый, клеточное ядро – розовый цвет

Примерно половина молекул актина и тубулина находится в свободном виде в цитоплазме. Вторая половина входит в состав микрофиламентов и микротрубочек. Самосборка и саморазборка филаментов лежат в основе многообразных двигательных реакций клетки: движения хромосом к полюсам клетки во время митоза, перемещения клеточных органоидов, изменения поверхности клетки и др.

6.2. Микрофиламенты: строение и роль в клетке

Микрофиламенты – тонкие нити диаметром 5-8 нм, встречающиеся практически во всех типах клеток. Они могут располагаться в цитоплазме пучками, сетевидными слоями или поодиночке. В цитоплазме подвижных клеток животных (например, фибробластов) микрофиламенты образуют поверхностный слой, располагающийся непосредственно под плазмалеммой (рис. 86). Особенно многочисленны микрофиламенты в волокнах и клетках мышечных тканей. **Как устроены микрофиламенты, чрезвычайно древние и, тем не менее, очень распространенные субклеточные наноструктуры живых организмов?**

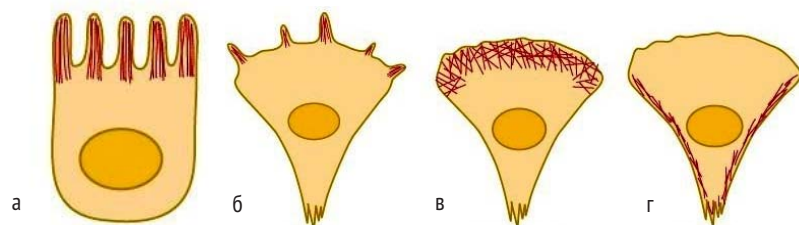


Рис. 86. Расположение актиновых микрофиламентов в клетках:
а – микроворсинки на поверхности эпителиальной клетки;
б – узкие цилиндрические выросты цитоплазмы фибробласта;
в – плоские пластинчатые выросты цитоплазмы фибробласта;
г – поверхностный слой цитоплазмы фибробласта

Микрофиламенты состоят в основном из белка актина. В клетке актин существует в двух формах: глобулярный актин (G-актин) и фибриллярный актин (F-актин). Микрофиламенты F-актина диаметром 7 нм представляют собой спиральную ленту. При достаточной концентрации молекул глобулярного актина (G-актина) начинается самопроизвольное образование актиновых микрофиламентов. Этот процесс представляет собой **естественную самосборку надмолекулярных наноструктур. Она протекает по типу конструирования «снизу вверх» и иллюстрирует переход структур из молекулярного в надмолекулярный (субклеточный) уровень организации живых систем.** Эта естественная нанотехнология возникла на Земле несколько сотен миллионов лет тому назад.

Если концентрация присутствующего G-актина снижается, то происходит саморазборка микрофиламентов F-актина с высвобождением отдельных молекул белка. В данном случае имеет место **наноконструирование по типу «сверху вниз», иллюстрирующее естественный переход структур из**

надмолекулярного (субклеточного) уровня организации живого к молекулярному уровню.

Актиновые микрофиламенты обладают полярностью. Благодаря присоединению дополнительных белков на «минус»-конце образуется структура, напоминающая наконечник стрелы. Такой «заостренный» конец удлиняется гораздо медленнее, чем противоположный «оперенный» конец (рис. 87).

Самосборка микрофиламентов сопряжена с гидролизом АТФ. Однако расщепление АТФ не является обязательным условием самосборки: образование микрофиламентов может осуществляться в присутствии АДФ или другого аналога АТФ. По мере удлинения микрофиламенты могут распадаться на фрагменты или, наоборот, соединяться друг с другом.

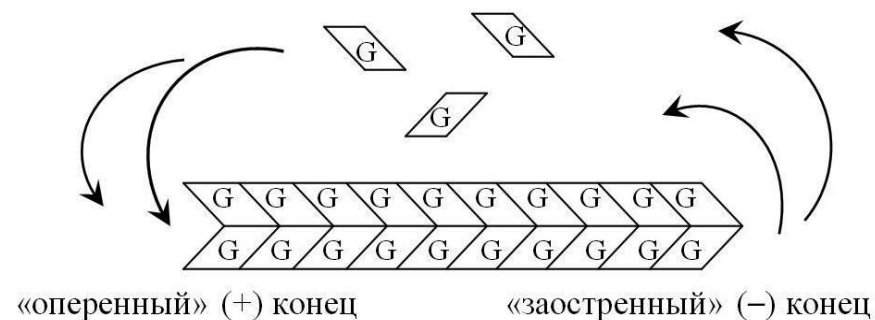


Рис.87. Полимеризация актинового микрофиламента

В растворах, содержащих так называемую критическую концентрацию G-актина, будет устанавливаться подвижное равновесие между самосборкой и саморазборкой. В результате этого поддерживается постоянная длина микрофиламентов. Таким образом, **актиновые микрофиламенты представляют собой динамичные структуры, которые могут возникать и расти, или же разбираться (укорачиваться) и исчезать.** Определяющим фактором в этих процессах является количество присутствующего глобулярного актина.

Актиновые микрофиламенты могут взаимодействовать с молекулами других белков. Последние выступают в роли стабилизаторов микрофиламентов (рис. 88), придавая им определенные свойства. Так, белок тропомиозин, взаимодействуя с микрофиламентами, увеличивает их жесткость. Белок тропонин регулирует взаимодействие актиновых микрофиламентов с миозиновыми микрофиламентами. Это взаимодействие лежит в основе мышечного сокращения. Молекулы белков филамина и α -актинина образуют поперечные связи между актиновыми микрофиламентами. Это приводит к образованию сложной трехмерной сети, придающей всей цитоплазме более вязкое гелеобразное состояние.

На важную роль микрофиламентов в жизнедеятельности клетки указывают их многочисленные функции. Среди них: 1) поддержание специфиче-

ской формы и упругости клеток животных и человека; 2) изменение вязкости цитоплазмы; 3) участие в транспорте веществ в клетку и из клетки; 4) участие в сокращении мышечных клеток и волокон; 5) обеспечение подвижности клеток; 6) изменение пространственной структуры клеточной поверхности; 7) участие в движениях хромосом и перемещениях цитоплазмы во время митотического деления клетки.

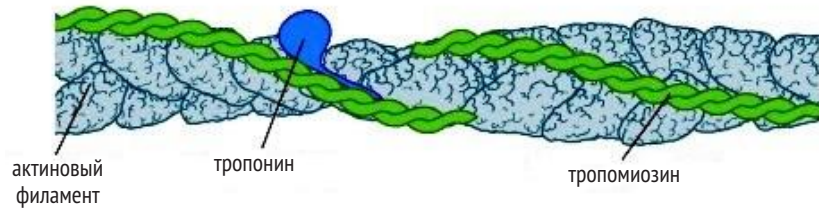


Рис.88. Актиновый микрофиламент

6.3. Промежуточные филаменты

Промежуточные филаменты наиболее часто встречаются в мышечных и эпителиальных клетках, отростках нервных клеток, а также в клетках, подвергающихся механическим воздействиям. Они локализуются преимущественно в околоядерной зоне клеток животных, в пучках, проходящих к периферии цитоплазмы и располагающихся под плазмалеммой. **Каковы особенности структуры промежуточных филаментов?**

Промежуточные филаменты представляют собой белковые нити толщиной около 10 нм. По толщине они занимают промежуточное положение между микрофиламентами и микротрубочками. В состав промежуточных филаментов входит несколько типов родственных белков: 1) кератины, встречающиеся в эпителиальных клетках; 2) специфические для аксонов нервных клеток белки; 3) белки соединительных и мышечных тканей, 4) белки ядерной ламины (пластинки), поддерживающие форму клеточного ядра и обеспечивающие перестройку ядерной оболочки в ходе деления клетки.

Молекулы белков промежуточных филаментов обладают сходной первичной структурой (последовательностью аминокислот). Фибриллярные молекулы закручены в правостороннюю α -спираль. Протяженные α -спиральные участки позволяют двум молекулам образовывать двойную спираль, формирующую палочковидный димер. Два димера, объединяясь, образуют короткий протофиламент (тетрамер) диаметром около 3 нм. Такие протофиламенты могут объединяться в более толстые и длинные фибриллы, образуя, в конечном итоге, промежуточный филамент, состоящий из 8 протофиламентов (рис. 89).

В отличие от других промежуточных филаментов, ламины при полимеризации не образуют нитчатых структур, а формируют сложные сети. Такой

решчатый слой выстилает внутреннюю мембрану ядерной оболочки, он может разбираться и вновь восстанавливаться.

Промежуточные филаменты относятся к самым стабильным элементам цитоскелета: их сборка и разборка в клетке происходит очень редко. Основными функциями промежуточных филаментов являются структурная и опорная, а также функция распределения органелл в определенных участках клетки.

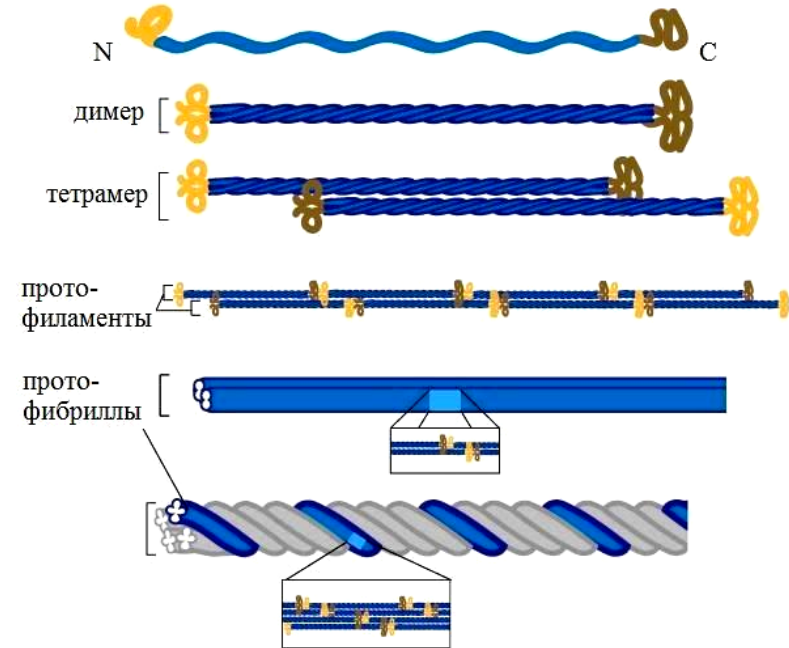


Рис.89. Схема самосборки промежуточного филамента

6.4. Микротрубочки: состав, строение, биологическая роль

В клетке микротрубочки могут располагаться следующим образом (рис. 90): в виде отдельных элементов (интерфазные микротрубочки и нити веретена деления); в пучках, в которых они связаны друг с другом поперечными мостиками (отростки нейронов); в составе дублетов (реснички и жгутики) и триплетов (центриоли и базальные тельца). Основными функциями микротрубочек являются: поддержание формы и полярности клетки; обеспечение упорядоченности расположения компонентов клетки; образование центриолей, ресничек, жгутиков; участие во внутриклеточном транспорте и в делении клетки. **Какова структура микротрубочки и как она формируется?**

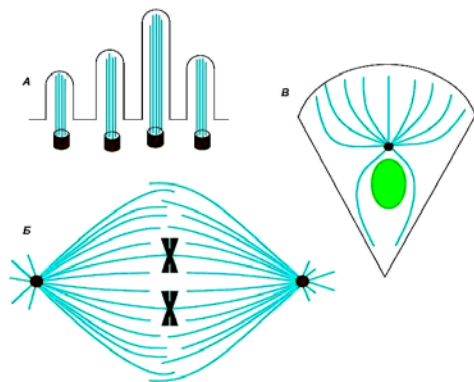


Рис.90. Структуры, образуемые микротрубочками:
 А – реснички с базальными тельцами в основании; Б – веретено деления;
 В – интерфазные микротрубочки, радиально отходящие от клеточного центра

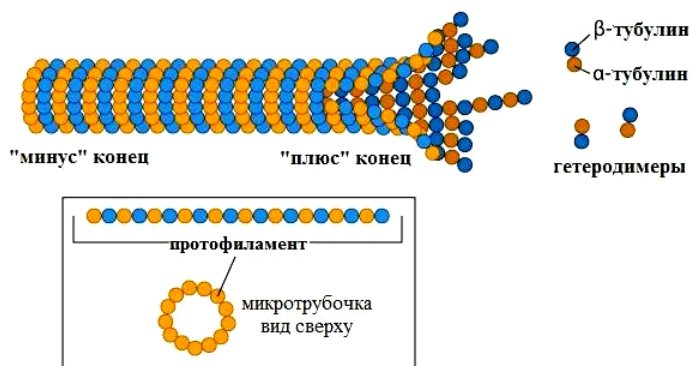


Рис. 91. Структура микротрубочки

Микротрубочки представляют собой полые цилиндрические образования с внешним диаметром 25 нм и длиной до нескольких микрометров. Стенка микротрубочек толщиной 5 нм состоит из 13 спирально уложенных нитей тубулина (протофиламентов) диаметром 5 нм. Тубулиновая нить образуется молекулами глобулярного белка тубулина, каждая из которых содержит около 440 аминокислотных остатков. Молекула тубулина является гетеродимером, так как состоит из двух различных пространственных конформаций (субъединиц): α -тубулина и β -тубулина. Последние объединяются в нитевидной структуре таким образом, что с β -субъединицей одного димера вступает в связь α -субъединица следующего димера и т.д. (рис. 91). Процесс формирования микротрубочки из субъединиц не требует затрат энергии, в связи с чем называется самосборкой. Микротрубочки могут также распадаться на отдельные субъединицы α - и β -тубулина. Между самосборкой и распадом микротрубочек поддерживается динамическое равновесие.

Микротрубочки – чрезвычайно короткоживущие органоиды клетки.

Среднее время жизни цитоплазматических микротрубочек составляет 5 минут. За 15 минут около 80% всех микротрубочек цитоплазмы обновляется. Микротрубочки в составе веретена деления клетки «живут» всего 15-20 сек. Тем не менее, полное разрушение микротрубочек приводит к исчезновению естественной формы клеток человека и животного. При этом нарушаются структура клетки и распределение в ней органоидов.

Можно ли извне повлиять на самосборку и распад микротрубочек в клетке? Уже более полувека назад ученые обнаружили, что алкалоид колхицин, выделяемый из растений, предотвращает самосборку микротрубочек. Он связывается с отдельными молекулами тубулина и лишает их способности соединяться друг с другом. При этом распад микротрубочек продолжается, и через некоторое время все они исчезают. Стабилизирующим действием на микротрубочки обладает таксол. Последний способствует самосборке микротрубочек даже при низком содержании тубулина в цитоплазме.

Микротрубочки, так же как и филаменты полярны: самосборка легче и быстрее протекает на плюс-конце. Однако в отличие от актиновых микрофиламентов, микротрубочки имеют всего 1 или 2 центра самосборки в пределах клетки. Как правило, процесс самосборки микротрубочек начинается в определенном участке клетки – центре организации микротрубочек. В качестве такого центра в клетках животных чаще всего выступает клеточный центр (центросома). **Что представляет собой центросома как субклеточная структура?**

Клеточный центр (центросома) относится к немембранным органоидам клетки. Он располагается обычно в геометрическом центре клетки, из-за чего и получил второе название – клеточный центр. **В состав** центросомы входят две центриоли, окруженные перичентриолярным материалом (рис. 92).

Две центриоли располагаются под прямым углом друг к другу, образуя диплосому. **Структурную основу центриолей составляют расположенные по окружности девять триплетов микротрубочек**, образующие полый цилиндр. Его ширина составляет около 0,15 мкм, длина – 0,3-0,5 мкм. Каждый триплет располагается под углом около 40° к радиусу центриоли. Систему микротрубочек центриоли обычно описывают формулой 9+0, или (9×3)+0, подчеркивая тем самым отсутствие микротрубочек в её центральной части.

Центриоли диплосомы различны: одна них (материнская) несет на себе дополнительные структуры в отличие от второй (дочерней). В качестве таких дополнительных структур могут выступать **спутники (сателлиты)**, располагающиеся на разных уровнях по длине центриоли. Сателлит состоит из конусовидной ножки, расположенной на стенке центриоли, и головки. Количество таких сателлитов обычно варьирует от 1 до 4. С головками сателлитов часто связаны отходящие от центросомы микротрубочки. Они образуют лучистую сферу или центросферу вокруг центриоли. «Минус»-концы микротрубочек центросферы связаны с центросомой, а «плюс»-концы ориентированы радиально к периферии клетки. Сателлиты характерны только для ин-

терфазной centrosомы. За несколько часов до митотического деления они исчезают, а их материал включается в состав тонковолокнистой структуры, окружающей centrosому в митозе.

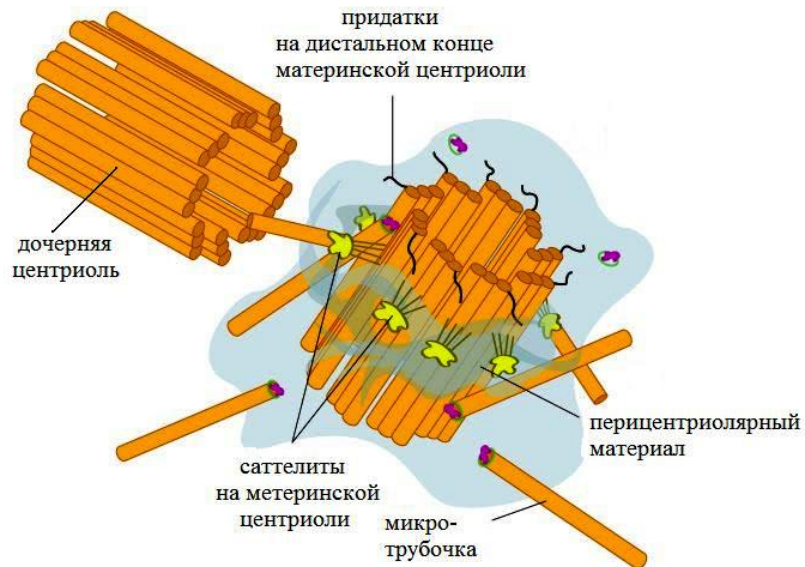


Рис.92. Строение centrosомы в неделящейся клетке

Второй тип выростов на поверхности материнской центриоли – **придатки**. Они расположены на дистальном конце каждого триплета, и потому их количество всегда равно девяти. В отличие от сателлитов, придатки не исчезают при переходе клетки из интерфазы в митоз. Поэтому они являются постоянной «меткой» более зрелой материнской центриоли.

Микротрубочками цитоплазмы и centrosомой не ограничивается распространение микротрубочек в клетке. **В каких других клеточных структурах присутствуют микротрубочки?**

Микротрубочки образуют осевую нить (аксонему) ресничек и жгутиков – специальных органоидов движения. Реснички и жгутики характерны для многих одноклеточных организмов и специализированных клеток многоклеточных организмов. **Какова биологическая роль жгутиков и ресничек?**

Один или несколько жгутиков, расположенных на переднем конце свободноживущих одноклеточных организмов, вращаясь или колеблясь, создают тягу в направлении движения. Реже наблюдается обратное: «биение» жгутика, расположенного сзади, проталкивает тело клетки (сперматозоид животных) вперед. Если же клетка лишена способности двигаться, то биение ресничек приводит в движение окружающую их жидкость. Так, реснички эпителиальных клеток трахеи и бронхов перемещают слизь вместе с осевшими на нее частицами пыли и микроорганизмами (рис. 93).

Как устроены реснички и жгутики? Структура ресничек и жгутиков сходна практически у всех эукариотических клеток. Реснички и жгутики состоят из оси (аксонемы), образованной парными микротрубочками (дублетами), и окружающей ее клеточной мембраны. Аксонема сформирована девятью периферическими и одним центральным дублетами микротрубочек (рис. 94). В центре аксонемы располагаются две центральные микротрубочки. Всю систему микротрубочек жгутика (реснички) описывают как $(9 \times 2) + 2$. В пределах каждого дублета различают А-микротрубочку, состоящую из 13 протофиламентов, и В-микротрубочку, содержащую 11 протофиламентов (рис. 94). **Как взаимосвязаны между собой дублеты?**

Микротрубочка А соединена с микротрубочкой В соседнего дублета с помощью мостика из белка нексина. От внутренней поверхности микротрубочки А по направлению к центру аксонемы отходит «радиальная спица». Кроме этого, каждая микротрубочка А несет двойной ряд боковых «ручек» длиной около 14 нм, состоящих из белка динеина и направленных к соседнему дублету. Все эти белковые выступы расположены строго упорядочено и играют ключевую роль в движении реснички или жгутика.

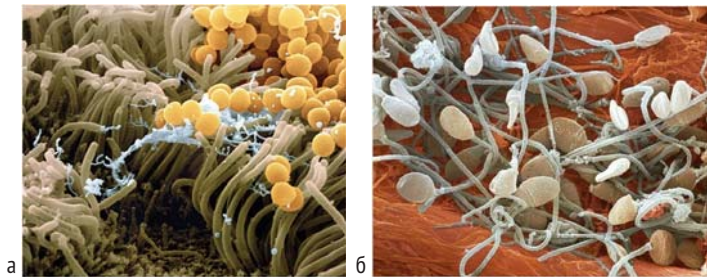


Рис. 93. Реснички и жгутики многоклеточных организмов: а) мерцательный эпителий полости носа (на его поверхности видны бактериальные клетки и слизь); б) сперматозоиды

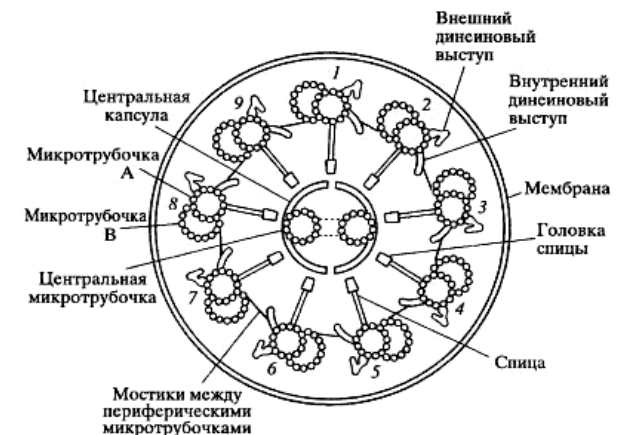


Рис.94. Схема строения жгутика (реснички) на поперечном разрезе

Центральные микротрубочки обычно длиннее, чем окружающие их периферические дублеты, поэтому конец жгутиков и ресничек обычно заострен. Нижняя часть реснички, называемая базальным тельцем, находится в цитоплазме. По структуре базальное тельце очень похоже на центриоль клеточного центра. Так же как и центриоли, базальное тельце служит центром организации микротрубочек.

Отдельные микротрубочки, подобно жгутикам и ресничкам, не способны к сокращению. **Каковы механизмы движения жгутиков и ресничек, а в ряде случаев, перемещения всей клетки?**

Подвижность ресничек и жгутиков обусловлена функционированием аксонемы. Согласно модели «скольжения», **движение жгутика или реснички связано со скольжением дублетов относительно друг друга в присутствии АТФ.** Определяющую роль в таком взаимодействии дублетов играют динеиновые «ручки».

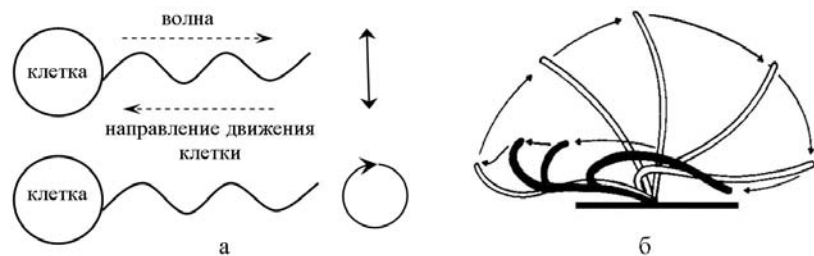


Рис.95. Схема движения жгутика (а) и реснички (б)

Несмотря на то, что реснички и жгутики имеют одинаковую структуру, они различаются по характеру движения. Движение жгутика имеет волнообразный характер и может совершаться как в одной плоскости, так и в трехмерном пространстве. В последнем случае жгутик описывает кривую, близкую к окружности (рис.95а). Движение жгутика отличается симметрией и упорядоченностью волн. В связи с тем, что волны возникают с высокой частотой (20-30 раз в секунду), вдоль жгутика обычно распространяются несколько волн. Несмотря на то, что в эксперименте движение может возникнуть в любой точке аксонемы, в естественных условиях изгиб возникает чаще всего в основании жгутика и затем распространяется вдоль него по направлению к концу.

Движение ресничек обычно называют биением. Каждый цикл биения состоит из двух фаз. В первой фазе – фазе рабочего гребного удара – ресничка резко изгибается у основания, остальная ее часть остается прямой или слегка изогнутой. При этом конец реснички описывает дугу около 90°. Во второй фазе (восстановительное движение) изгиб медленно перемещается к концу реснички. В результате восстанавливается исходное положение, с которого начинался рабочий гребок (рис. 95б).

Рабочий гребной удар создает гораздо больший поток жидкости, чем восстановительное движение. Это и определяет направление движения. Так, на поверхности мерцательного эпителия ток жидкости, создаваемый биением ресничек, направлен в ту же сторону, что и гребные удары.

В большинстве случаев реснички расположены не обособлено, а образуют функциональные группы, состоящие из тысяч органелл. В этих условиях биение ресничек строго согласовано и координировано, в результате чего на поверхности клетки формируются однонаправленно распространяющиеся волны.

6.5. Гипотеза С. Хамероффа и перспектива создания тубулиновых нанокomпьютеров

Как уже отмечалось, белок тубулин может существовать в двух пространственных конфигурациях (конформациях), представленных α - и β -субъединицами. Превращение одной субъединицы в другую осуществляется путем перехода всего лишь одного электрона, и занимает около 10^{-9} с. **Гипотеза С. Хамероффа заключается в том, что микротрубочки цитоскелета нервной клетки являются ее вычислительной системой.** Элементарные вычислительные операции в этой системе – переходы (переключения) между α - и β - конформациями тубулина (рис. 96).

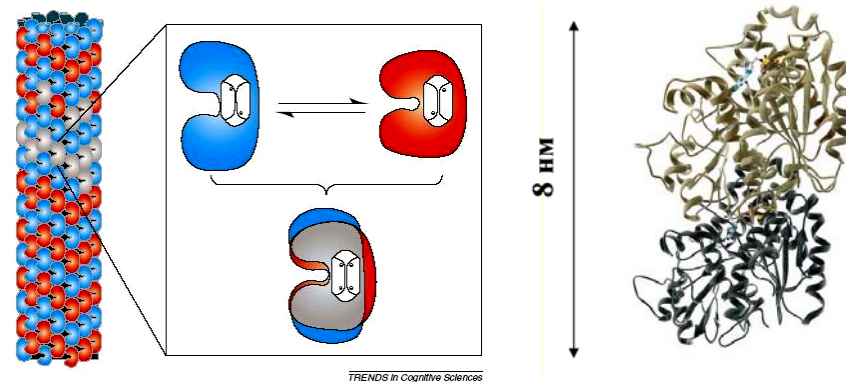


Рис.96. Переключения между α - и β -конформациями тубулина микротрубочек нервной клетк и

Рис.97. Тубулин

Из гипотезы С. Хамероффа вытекает, что нервная клетка – это квантовый компьютер. В своих работах С. Хамерофф не только обосновал гипотезу, но и предложил схему квантового вычислителя, основанного на механизме переключения между α - и β - конформациями тубулина.

Длина гетеродимера (пары из α - и β -субъединиц) тубулина составляет 8 нм (рис. 97). Поэтому процессы обработки информации в микротрубочках цитоскелета нервной клетки могут явиться ключевыми для ученых и специалистов, разрабатывающих конструкции наноконвертеров. Создание моделей в этой области крайне перспективно для всех отраслей нанотехнологической индустрии.

6.6. «Рельсы» для шагающих нанороботов

В этом разделе в центре внимания снова оказываются нервные клетки. Из них был выделен и впоследствии хорошо изучен белок кинезин. Молекулы кинезина выполняют функцию транспорта веществ внутри клетки, а также перемещения в ней микропузырьков (везикул или вакуолей). **Какую роль в этом транспорте играют «рельсы»?**

Молекулы кинезина двигаются по внутриклеточным «рельсам», которые образуются микротрубочками. Один конец молекулы кинезина прикрепляется к микропузырьку, который необходимо транспортировать, а другой конец – к микротрубочке. Микротрубочка направляет движение молекулы кинезина.

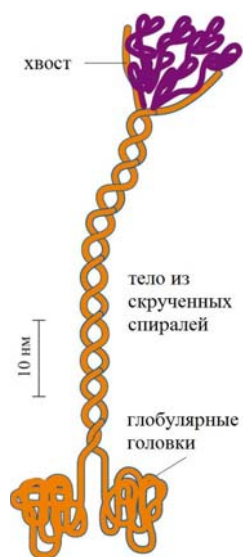


Рис. 98. Строение молекулы кинезина

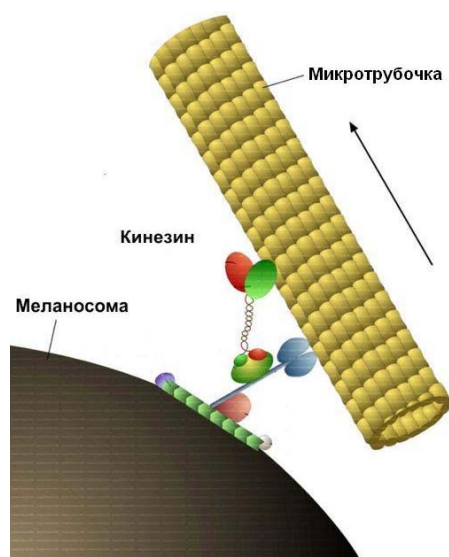


Рис.99. Перемещение кинезином меланосомы (клеточной органеллы) вдоль микротрубочки

Молекула кинезина представляет собой димер, образованный двумя одинаковыми полипептидами. Каждый полипептид кинезина состоит из гло-

булярной головки, соединенной со сравнительно длинным телом и хвостом (рис. 98). Линейные размеры головки сравнительно невелики, они составляют $7,5 \times 4,5 \times 4,5$ нм. Длина всей молекулы – 50 нм. Тела и хвосты двух полипептидов сплетены вместе, а наклоненные в разные стороны головки образуют своеобразную «рогатину». Рогатина непосредственно взаимодействует с микротрубочкой, вдоль которой перемещается кинезин.

В результате такого взаимодействия молекула кинезина «шагает» вдоль микротрубочки, делая 8-нанометровые шаги. На рисунке 99 показано, как кинезин перемещает органеллу меланосому, ответственную за синтез пигмента меланина, вдоль микротрубочки. Для того чтобы так шагнуть, молекула использует в качестве источника энергии одну молекулу АТФ. При этом сила, развиваемая одной молекулой кинезина, составляет 6 пН. Если бы такой мощностью в расчете на единицу массы обладали автомобильные моторы, то они могли бы легко разгонять машины до скоростей, существенно превышающих скорость звука. Коэффициент полезного действия кинезинового мотора (50%) также больше, чем у мотора современного автомобиля.

В процессе «ходьбы» молекула кинезина всего за одну секунду расщепляет до 100 молекул АТФ, перемещаясь на 800 нанометров. Работая в качестве индивидуального молекулярного извозчика, кинезин может совершать перемещения на очень большие расстояния (до 1 мм). Такие рабочие способности кинезина не могли не привлечь внимание ученых и наноконструкторов. **Каким образом «приручить» кинезин и заставить его работать за пределами живой клетки?**

Решить проблему первыми попытались ученые из Института им. Макса Планка (ФРГ). Для этого они покрыли молекулами кинезина гладкую стеклянную поверхность, создав что-то вроде ковра. Ворсинки ковра представляли собой молекулы кинезина. Потом исследователи разместили на этой поверхности ряд микротрубочек и микросфер. В эту среду был добавлен раствор АТФ. Если в клетке молекула кинезина шагает вдоль микротрубочки сама, то в искусственной системе она была жестко закреплена. Поэтому свободные концы молекул, «шагая» по микротрубочкам, передвигали их. В результате получился огромный «трубочный» конвейер (рис. 100).

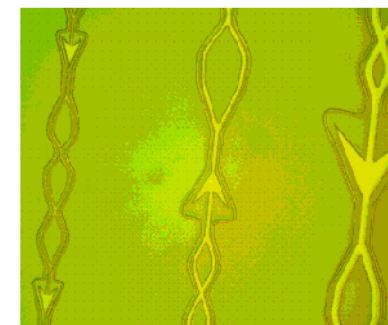
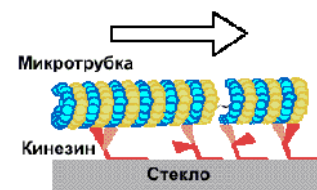


Рис. 100. Кинезиновый наноконвейер

В дальнейшем ученые планируют создать микрочипы со встроенными конвейерами, работающими в разных направлениях. Это, безусловно, станет большим вкладом в создание перспективных систем наносборки. Подобные транспортные системы будут полезны также в лабораториях-на-чипе.

6.7. Использование принципов функционирования ресничек и жгутиков в нанотехнологиях

Самоочистление искусственными наноресничками. Уникальные движения ресничек заинтересовали исследователей и наноконструкторов. Они обратили внимание на согласованный характер биения ресничек в функциональных группах. Такое биение способно обеспечивать непрерывный ток жидкости на поверхности клеток, «усеянной» ресничками. **Можно ли создать технические модели ресничек, своего рода функционирующие «нанореснички»?**

Исследователи всесторонне изучили прототип будущей модели – реснички эпителиальных клеток, выступающих изнутри трубкообразных дыхательных путей – трахею и бронхи. Биение ресничек на внутренней поверхности дыхательных путей обеспечивает перемещение (ток) слизи, покрывающей их внутреннюю поверхность. Слизь осаждаёт на себе и уносит пылевые частицы, бактерии и вирусы, способствуя очищению органов дыхания. Создавая техническую модель ресничек, конструкторы ставили задачу смоделировать также процесс самоочистления поверхности, покрытой ресничками.

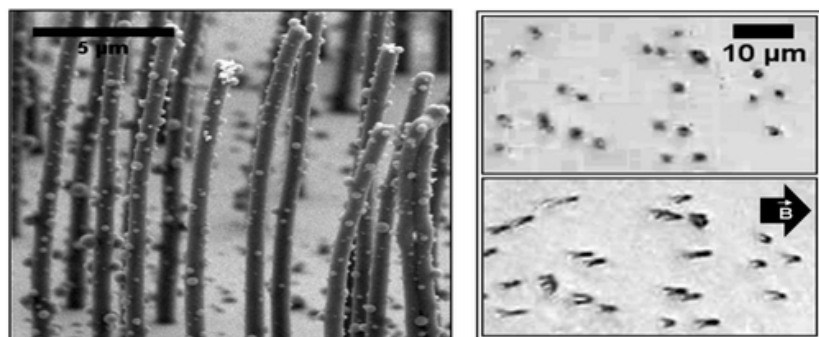


Рис.101. Железные наностержни, имитирующие биологические реснички

Искусственные нанореснички были созданы из тончайших гибких металлических наностержней диаметром 200 нм и длиной 10 мкм (рис. 101). Чтобы вызвать согласованное движение (биение) ресничек, исследователи воздействовали на них переменным магнитным полем. В качестве слизи был использован жидкий полимер. В итоге **были смоделированы не только**

реснички, но и процесс самоочистения покрытой ими поверхности. Ученые полагают, что подобные модели ресничек могут быть использованы для тщательного перемешивания вязких жидкостей.

Жгутиковые моторы. В разделе 2.12 кратко упоминалось о естественных нанороботах кишечной палочки, которые обеспечивают движение ее жгутиков. **Как функционируют жгутики кишечной палочки?**

С помощью специальных биологических моторов бактерия вращает свои жгутики. Когда жгутики начинают синхронно вращаться против часовой стрелки, они сплетаются в единый пучок, напоминающий своеобразный пропеллер. Вращение пропеллера создает силу тяги, заставляющую бактерию двигаться почти по прямой линии. После того, как направление вращения жгутиков изменяется на противоположное, пучок расплетается и бактерия останавливается. Вместо поступательного движения она начинает хаотически вращаться.

Бактерии плавают со средней скоростью около 25 мкм/с, но некоторые виды могут двигаться поступательно со скоростью больше 100 мкм/с. Это означает, что за одну секунду бактерия перемещается на расстояние, которое в десять (и даже больше) раз превышает ее собственную длину. Если провести аналогию с движением пловца, который преодолевал бы за одну секунду расстояние, на порядок превышающее его собственный рост, то стометровую дорожку плавательного бассейна он проплыл бы всего за 5 секунд. **Что представляет собой жгутиковый мотор кишечной палочки?**

Жгутиковый мотор бактерии (рис. 102) является одним из наиболее древних нанороботов планеты, созданным Природой более 3 млрд. лет тому назад. Он представляет собой электромотор, который в качестве источника энергии использует разность потенциалов на клеточной мембране. Жгутиковый электромотор можно рассматривать как аналог машины постоянного тока, созданной человеком (рис. 102, 103).

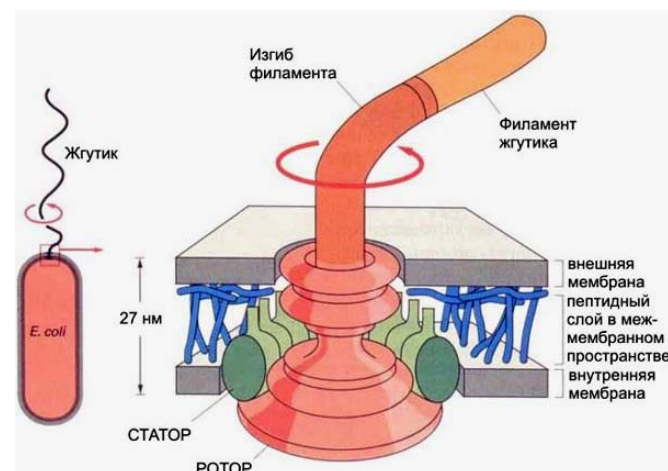


Рис. 102. Строение жгутикового мотора кишечной палочки (*E.coli*)

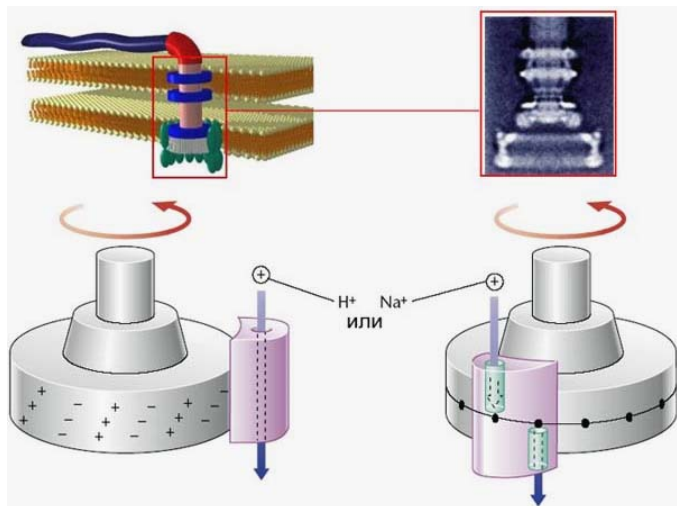


Рис. 103. Структурная модель и принцип работы жгутикового мотора кишечной палочки (в верхнем углу справа приведена микрофотография жгутикового мотора)

Филамент жгутика – свободная часть жгутика, располагающаяся за пределами клеточной оболочки, состоящей из клеточной мембраны (внутренняя мембрана) и клеточной стенки (внешняя мембрана).

Жгутиковые электромоторы бактерий привлекают ученых и наноконструкторов своей необычной эффективностью. Они вращаются со скоростью, достигающей 50-100 оборотов в секунду. У некоторых видов бактерий скорость вращения превышает 1000 оборотов в секунду. При этом электромоторы бактерий очень экономичны: они потребляют не более 1% энергетических ресурсов бактериальной клетки.

Ведущие мировые ученые в области наномедицины Р. Фрайтас и А. Кавальканти неоднократно заявляли, что именно подобные жгутиковые моторы будут наиболее эффективными в наноробототехнике будущего.

Словарь основных терминов

Аденозиндифосфат (АДФ) – нуклеотид, состоящий из азотистого основания – аденина, сахара – рибозы и двух остатков фосфорной кислоты. Образуется в результате переноса концевой фосфатной группы АТФ, участвует в энергетическом обмене во всех живых организмах.

Аденозинтрифосфат (АТФ) – нуклеотид, состоящий из азотистого основания – аденина, сахара – рибозы и трех остатков фосфорной кислоты. Универсальный переносчик и основной аккумулятор химической энергии в живых клетках.

Актин – белок, входящий в состав микрофиламентов цитоскелета немuscularных клеток. Образует сократительный аппарат в мышечных клетках и волокнах. Существует в двух формах: глобулярной (G-актин) и фибриллярной (F-актин).

Астроциты – клетки нервной ткани, имеющие многочисленные тонкие, радиально расходящиеся от тела клетки, отростки. Сеть из переплетенных отростков астроцитов заполняет пространство между телами и отростками нейронов и образует опорный аппарат мозга.

Базальное тельце (кинетосома) – внутриклеточная структура эукариот, лежащая в основании ресничек и жгутиков и служащая для них опорой.

Дублет микротрубочек («double» двойной) – структура, состоящая из двух неравнозначных микротрубочек: одна микротрубочка (А) полная, состоит из 13 протофиламентов, другая (В) – неполная, состоит из 11 протофиламентов и вплотную примыкает к первой. Дублеты микротрубочек образуют ось специальных органоидов клетки – жгутиков и ресничек.

Гуанозинтрифосфат (ГТФ) – нуклеотид, состоящий из азотистого основания – гуанина, рибозы и трех остатков фосфорной кислоты. Высокоэнергетическое соединение, участвующее в процессе биосинтеза белка.

Кератины – фибриллярные белки, входящие в состав наружного слоя кожи и ее производных (волос, ногтей). Кератины неоднородны: в зависимости от тканевого источника они различаются по аминокислотному составу и упаковке протофибрилл.

Микротрубочки – часть цитоскелета, состоящая из белка тубулина, имеющая вид полых цилиндрических структур. Длина микротрубочек варьирует от 100 нм до 1 млн нм (1 мм), диаметр 25 нм, толщина стенки составляет 5 нм. Выполняют опорную функцию в клетке, формируют веретено деления, входят в состав клеточного центра, базальных телец, ресничек и жгутиков.

Микрофиламенты актиновые – часть цитоскелета, представленная нитевидными структурами актина диаметром 7 нм. Принимают участие в изменении формы клетки, прикреплении к субстрату, амебоидном движении клетки.

Промежуточные филаменты – часть цитоскелета, образованная нитевидными структурами диаметром около 10 нм.

Самоорганизация – процесс, в ходе которого создается, воспроизводится или совершенствуется организация сложной динамической системы. Свойство самоорганизации характерно для живой клетки, целого организма, биологической популяции, биогеоценоза и т.д.

Самосборка – спонтанное упорядоченное объединение биополимеров, приводящее к образованию надмолекулярных структур (цитоскелета, мембран и др.). Не требует затрат энергии и осуществляется посредством образования нековалентных, вторичных связей.

Триплет микротрубочек («tripus» тройной) – комплекс из трех неодинаковых микротрубочек: А, В и С. Первая микротрубочка (А) полная, состоит из 13 протофиламентов, вторая и третья (В и С) неполные, состоят из 11

протофиламентов. Триплеты тубулиновых микротрубочек составляют основу немембранного органоида клетки – клеточного центра.

Тубулин – основной белок микротрубочек, состоящий из двух сходных, но не идентичных глобулярных субъединиц с молекулярной массой около 50 кДа каждая.

Фибробласты – клетки соединительной ткани, секретирующие основные компоненты межклеточного вещества (коллаген, эластин, мукополисахариды).

Центр организации микротрубочек (центр нуклеации) – ограниченный участок клетки, где начинается процесс объединения молекул тубулинов (нуклеация). В своем составе содержат систему сложноорганизованных микротрубочек (например, центриоли или базальные тельца в клетках животных).

Центросома (клеточный центр) – немембранный органоид клетки, состоящий из центриолей и связанных с ними микротрубочек центросферы.

Цитоскелет – совокупность нитевидных белковых структур – микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов, составляющих опорно-двигательную систему клетки.

Вопросы для повторения

1. Охарактеризуйте цитоскелет клетки. Назовите его основные компоненты.
2. Как распределяются основные компоненты цитоскелета в клетке? Связано ли это распределение с функциями каждого типа филаментов?
3. В чем заключается биологическая роль динамической нестабильности элементов цитоскелета?
4. Какой конец филаментов называют «плюс»-концом («минус»-концом)?
5. Какие белки образуют микрофиламенты? Назовите основной белок микрофиламентов.
6. Какие субъединицы актина Вы знаете?
7. Какой конец актинового филамента называют «заостренным» («оперенным»)?
8. Необходима ли энергия для самосборки актинового микрофиламента?
9. Какие факторы влияют на стабильность (и нестабильность) актиновых микрофиламентов?
10. Почему промежуточные филаменты получили такое название?
11. Приведите классификацию белков промежуточных филаментов. По какому принципу они разделены на группы? Что их объединяет?
12. Дайте сравнительную характеристику актиновых микрофиламентов и промежуточных филаментов.
13. Опишите строение микротрубочки.
14. Как происходит сборка и саморазборка (разрушение) микротрубочек?
15. Почему процесс объединения молекул тубулина называют «самосборкой»?

16. В образовании каких структур клетки участвуют микротрубочки ?
17. Какие вещества стабилизируют микротрубочки, а какие разрушают их?
18. Каковы перспективы использования искусственных «наноресничек»?
19. Какая структура выступает в качестве центра организации микротрубочек в животной клетке? В растительной клетке?
20. Опишите строение центросомы. Чем отличается материнская центриоль от дочерней?
21. Назовите органоиды специального назначения, образуемые микротрубочками. Какова их функция у одноклеточных и многоклеточных организмов?
22. Какое строение имеет ресничка? Чем реснички отличаются от жгутиков?
23. Как осуществляется движение жгутиков и ресничек?
24. В чем заключается сущность гипотезы С.Хамероффа?
25. Что составляет основу вычислительной системы квантового компьютера С.Хамероффа?
26. Какую функцию выполняют молекулы белка кинезина в клетке?
27. Объясните строение молекулы кинезина.
28. Каковы особенности передвижения молекулы кинезина вдоль микротрубочки?
29. Каким образом исследователи «приручили» кинезин?
30. Приведите пример использования принципов движения биологических ресничек в нанотехнологиях. Как называется это направление нанотехнологий?
31. Как функционируют жгутики кишечной палочки?
32. Объясните особенности работы жгутикового мотора кишечной палочки.
33. В каких отраслях nanoиндустрии могут найти применение искусственные жгутиковые моторы?

ЗАДАНИЯ

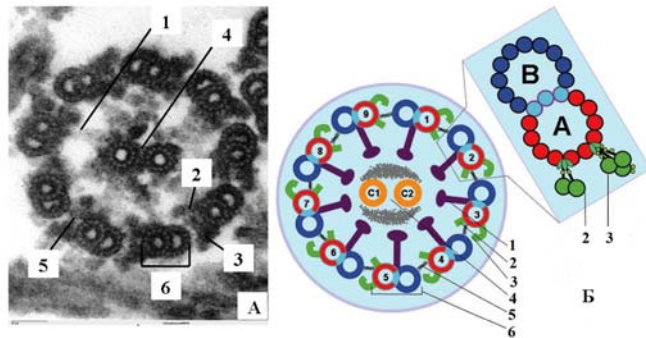
Задание № 1. Пласт клеток, выстилающий тонкий кишечник лабораторного животного, обработали колхицином. В результате клетки утратили естественную призматическую форму и обрели неправильную сферическую форму. Объясните механизм такого преобразования формы эпителиальных клеток. Какие структуры обеспечивают поддержание формы клетки? Укажите их состав. Каков механизм действия колхицина? Предположите, к каким последствиям может привести потеря клетками единственного слоя эпителиальной выстилки кишечника своей формы? Конкретизируйте ваш прогноз для клеток других тканей (соединительной, мышечной, нервной). Какое влияние окажет разрушение микротрубочек на: а) способность клетки к делению; в) внутриклеточный транспорт; г) транспорт через клеточную мем-

брану? Изменяется ли структура, расположение органоидов и их функции? Ответ объясните.

Задание № 2. Из коры тиса было выделено особое вещество – таксол, действие которого противоположно действию колхицина: молекулы таксола препятствуют разрушению микротрубочек. Однако обработанные таксолом клетки теряют способность к делению, так же как и клетки, обработанные колхицином, у которых разрушены микротрубочки. Объясните возможную причину такого результата. В чем заключается роль микротрубочек в процессе деления клетки? Как называется структура, формируемая микротрубочками в начале митоза? Предложите свой вариант использования механизма влияния таксола на клетки в медицине? Ответ обоснуйте. С помощью какой нанотехнологии можно доставить таксол к клеткам раковой опухоли? Как изменится рост опухоли после такой доставки таксола?

Задание № 3. Принято считать, что функции микротрубочек зависят от специфической пространственной организации их внутри клетки. Как создается это пространственное распределение и чем определяется образование или исчезновение индивидуальных микротрубочек? Для ответа на эти вопросы исследовали сборку тубулина в микротрубочки *in vitro* (вне организма). При концентрациях тубулина ниже 15 мкМ образования микротрубочек не происходило, но при более высоких концентрациях они интенсивно формировались. Если к раствору тубулина добавляли центросомы, микротрубочки начинали образовываться при концентрации ниже 5 мкМ. Почему концентрация тубулина, при которой начинается образование микротрубочек, различна в этих двух экспериментах? Какое значение в эксперименте имело добавление в раствор центросом?

Задание 4. На рисунке представлена электронная микрофотография поперечного сечения жгутика (А) и его схематическое изображение (Б).



Укажите, каким цифрам соответствуют:

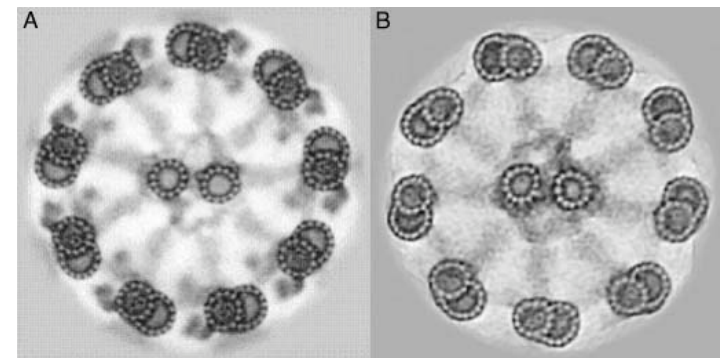
а) центральный комплекс из двух микротрубочек;

- б) дублет микротрубочек;
- в) внутренняя динеиновая ручка;
- г) внешняя динеиновая ручка;
- д) нексиновый мостик;
- е) радиальная спица.

Какие из этих структур состоят из тубулина? Изображены ли на рисунке структуры, образующие единое целое с базальным тельцем? Ответ объясните.

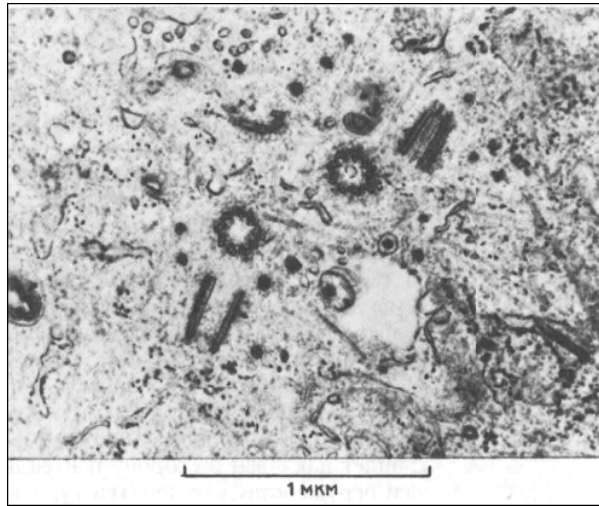
Задание 5. В начале 20 века А.К. Зивертом и М. Картагенером было описано заболевание, характерными признаками которого являлись: повторяющиеся инфекции дыхательных путей, хронический бронхит, воспаление слизистой оболочки пазух носа, бесплодие (как правило, мужское).

На рисунке приведено изображение (В.А. Afzelius et al, 2004), полученное на основе электронных микрофотографий аксонемы сперматозоида здорового мужчины и мужчины с синдромом Зиверта-Картагенера. Какой из рисунков соответствует норме? Аргументируйте свой выбор. Предположите, какова причина описанных выше признаков заболевания? Обоснуйте их взаимосвязь.



Задание 6. Ядро любой эукариотической клетки отграничено от цитоплазмы ядерной оболочкой, состоящей из двух мембран – внешней и внутренней. Ядерная оболочка выполняет важные функции: барьерную, транспортную и опорную. Однако даже при удалении обеих мембран ядерной оболочки ядро способно сохранять свою форму. Объясните причину этого явления. Какие структуры поддерживают целостность ядра?

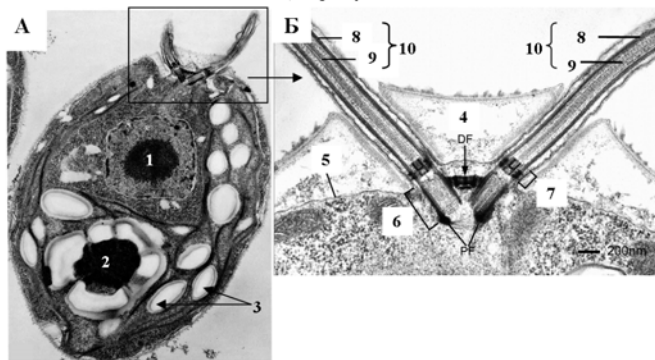
Задание 7. Определите, что изображено на электронной микрофотографии? В какой период жизненного цикла клетки могла быть получена такая микрофотография? Можно ли по этой микрофотографии определить тип клетки (растительная или животная)?



Задание 8. Одними из распространенных модельных организмов, используемых для исследования фундаментальных вопросов клеточной и молекулярной биологии, являются одноклеточные зеленые водоросли рода Хламидомонада.

Изучение строения и функционирования обычных и мутантных форм хламидомонады позволяет определить механизмы движения клеток, реакции на свет, распознавания других клеток и др.

На рисунке приведен один из представителей рода Хламидомонада. Эти водоросли широко распространены в почве и пресной воде. Диаметр клетки около 10 мкм, передвигается при помощи двух одинаковых жгутиков, расположенных на узком переднем конце. В основании жгутики соединены с помощью «полосатых» волокон (на рисунке Б соответственно DF и PF).



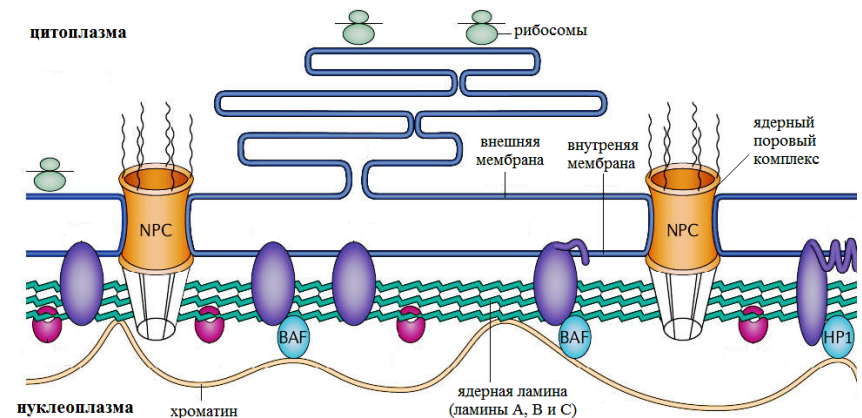
А – продольное сечение тела *Chlamydomonas reinhardtii* (электронная микрофотография, $\times 16\,000$);
Б – продольное сечение основания жгутиков (шкала соответствует 200 нм).

Укажите, каким цифрам соответствуют:

- а) ядро;
- б) гранулы крахмала;
- в) пиреноид;
- г) базальное тельце;
- д) аксонема;
- е) центральная пара микротрубочек;
- ж) периферический дублет микротрубочек;
- з) переходная (промежуточная) зона;
- и) плазматическая мембрана;
- к) клеточная стенка.

Задание 9. Белки промежуточных филаментов, образующие тонкий слой на внутренней мембране ядерной оболочки, называют ламинами (см. рисунок). У млекопитающих ламины представлены белками трех типов: А, В и С, незначительно различающихся по аминокислотному составу.

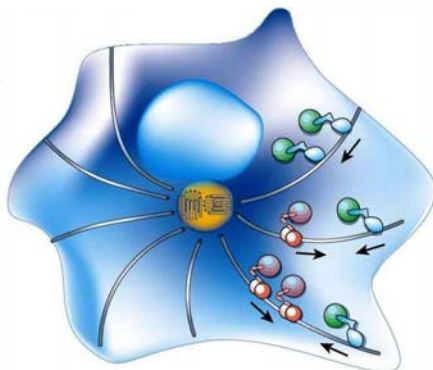
Опишите строение и функции ядерной ламины. Что отличает белки ядерной ламины от других групп промежуточных филаментов?



Мутация в гене, кодирующем ламин А, приводит к тяжелому заболеванию – синдрому преждевременного старения (детская прогерия или синдром Хатчинсона-Гилфорда). Прогерия (от греческого pro – раньше, gerontos – старец) – очень редкое генетическое заболевание, ускоряющее процесс старения примерно в 8-10 раз. Дети шестилетнего возраста при синдроме Хатчинсона-Гилфорда выглядят как пожилые люди и погибают от сильного атеросклероза к 13 годам. Данное заболевание отличают неспособность к росту, костные нарушения, маленький клювообразный нос, срезанный подбородок, полная потеря волос, пятнистая недостаточная пигментация кожи и др.

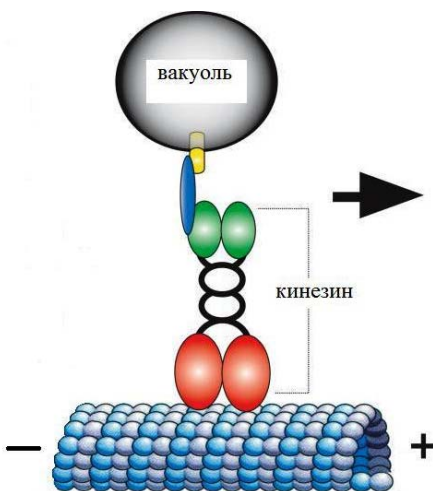
Основываясь на данных о структуре и функциях ядерной ламины, объясните последствия мутации гена, кодирующего ламин А. Какие процессы нарушаются при такой мутации? Что может быть причиной подобной мутации? Можно ли предотвратить или вылечить это заболевание? Ответ объясните. Предложите возможный способ «исправления» мутации.

Задание 10. Микротрубочки образуют в клетке радиально расходящиеся нити, «плюс»-концы которых направлены к периферии клетки. Вдоль микротрубочек белки-моторы осуществляют направленный транспорт разнообразных частиц. При этом частицы перемещаются в обоих направлениях – центробежно (от центра клетки к периферии) при участии белков кинезинов, и центростремительно (от периферии клетки к центру) при участии белков динеинов. Обозначьте на рисунке: ядро, клеточный центр, цитоплазматические микротрубочки, кинезин, динеин. Какие частицы могут перемещаться с помощью кинезина, а какие – динеина? Приведите не менее 3-х примеров.



Проведите сравнение работы актин-миозинового комплекса (раздел 2.12) с функционированием кинезинов и динеинов. Почему все перечисленные белки называют белками-моторами? В каких известных Вам структурах встречается динеин?

Задание 11. Белок кинезин относится к олигомерным белкам, имеющим четвертичную структуру. Его молекула состоит из двух одинаковых полипептидов (субъединиц), в связи с чем часто называется димером. При образовании димера тела и хвосты (изображены черным цветом на рисунке) двух субъединиц, сплетаются а глобулярные головки (красного цвета) образуют рогатину. Молекула тубулина также является димером, однако она состоит из двух различных субъединиц: α -тубулина и β -тубулина (изображены светло-серым и голубым цветами в составе



микротрубочки). Формируя микротрубочку, субъединицы тубулина объединяются таким образом, что с β -субъединицей одного димера вступает в связь α -субъединица следующего димера.

Молекулы кинезина обладают способностью передвигаться вдоль микротрубочек, которые ориентированы в клетке преимущественно радиально: от ядра к плазмалемме. Передвижение молекулы кинезина вдоль микротрубочки обеспечивается взаимодействием головки димера кинезина с димерами тубулина (см. рисунок).

Используя теоретический материал разделов 6.5 и 6.6, сравните строение двух димеров: белка тубулина и белка кинезина. Есть ли сходство в строении димеров? Объясните отличия строения димера кинезина от строения димера тубулина. Принимая во внимание то, что к хвосту димера кинезина могут присоединяться микропузырьки (вакуоли), транспортируемые кинезином, предложите собственный вариант практического использования этого естественного наномеханизма клетки, в котором кинезин выполняет роль извозчика, а микротрубочки – направляющих («рельсовых») путей.

Задание 12. Проведите поиск литературы и подготовьте доклад на тему:

- 1) «Бионика в нанотехнологиях»;
- 2) «АТФ-синтетаза – вращающийся наномотор живой клетки»;
- 3) «Теория сознания Хамероффа-Пенроуза».

Литература

Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. 3. Клетка единая, но делимая / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 8. – С. 18-23.

Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. I. Живые нити / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 2. – С. 36-43.

Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч. II. Цитоскелет, способный чувствовать и помнить / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 4. – С. 4-10.

Васильев Ю.М. Клетка как чудо архитектуры. Ч. 4. Натяжения цитоскелета контролируют архитектуру клетки и тканей / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 6. – С. 2-7.

Васильев Ю.М. Клетка как чудо архитектуры. Ч. 5. Клетка перестраивает архитектуру / Ю.М. Васильев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 11. – С. 2-6.

Каппуччинелли П. Подвижность живых клеток: пер. с англ. / П. Каппуччинелли. – М.: Мир, 1982. – 124 с.

Клячко Н.Л. Биологическая подвижность и полимеризация актина / Н.Л. Клячко // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 10. – С. 5-9.

Молекулярная биология клетки: в 3 т.: пер. с англ. / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1994.

Тихонов А. Н. Молекулярные моторы. Ч. 1. Вращающиеся моторы живой клетки // Соросовский образовательный журнал. 1999. – №6. – С. 8-16.

Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Ч. 2. Молекулярные основы биологической подвижности // Соросовский образовательный журнал. 1999. – №6. – С. 17-24.

Фултон А. Цитоскелет: архитектура и хореография клетки: пер. с англ. / А. Фултон. – М.: Мир, 1987. – 200 с.

Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 495 с.

Afzelius B.A. Cilia-related diseases // The Journal of Pathology. – 2004. – V.204, Iss. 4. – P.470-477.

Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome) / Margaret W. Leigh et al. // Genetics in Medicine. – July 2009. – V. 11, № 7. – P. 473-487.

Coutinho H.D.M. Molecular ageing in progeroid syndromes: Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model / H.D.M. Coutinho, V.S. Falcão-Silva, G.F. Gonçalves, R. Batista da Nóbrega // Immun Ageing. – 2009. – V.6: 4.

Duncan J.E., Goldstein L.S.B. The Genetics of Axonal Transport and Axonal Transport Disorders // PLoS Genetics. – 2006. – V. 2, Iss. 9. – P.1275-1284.

Hennekam R. C.M. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype // American Journal of Medical Genetics. Spec. Iss.: 13th Annual Robert J. Gorlin Conference on Dysmorphology; Facial and Oral Structures: Molecular Perspectives. – 2006. – V.140A, Iss. 23. – P. 2603–2624.

Howard J., Hyman A. A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end / J. Howard, A. A. Hyman // Nature. – 2003. – V.422. – P. 753-758/ (www.nature.com)

Magnetically actuated nanorod arrays as biomimetic cilia / B.A. Evans, A.R. Shields, R.L. Carroll, S. Washburn, M.R. Falvo, R. Superfine // Nano Lett. – 2007. – V. 7 № 5. – P. 1428-1434.

Molecular Biomechanics: The Molecular Basis of How Forces Regulate Cellular Function / G.Bao et al. // Mol Cell Biomech. – 2010. – V. 3 № 2. – P. 91–105.

Montemagno C. Constructing Biological Motor Powered Nanomechanical Devices / C. Montemagno et al. – Nanotechnology. – 1999. – V. 10. – P.225-231.

Ringo D.L. Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas* // The Journal of cell biology. – 1967. – V. 38. – P. 543-579.

Интернет-сайты:

www.molbiol.ru

www.nature.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.scharfphoto.com

www.sciencephoto.com

www.quantumconsciousness.org

thesaurus.rusnano.com

www.fbs.osaka-u.ac.jp/eng/labo/02/09_img9.jpg

multimedia.mcb.harvard.edu/anim_innerlife_Hi.html

ГЛАВА 7.

Прокариотические и неклеточные формы жизни в наноконструкциях и нанобиотехнологиях

7.1. Общая характеристика прокариотических организмов

Прокариотические организмы (прокариоты) – самые примитивные клеточные организмы. На протяжении 2 млрд. лет существования жизни на Земле они являлись ее единственной формой. Учеными описано около 3000 видов прокариот, которые представлены в природе бактериями и архебактериями, их одноклеточными, колониальными и нитчатыми формами. **Как устроены самые примитивные клеточные организмы планеты?**

Прокариотические клетки гораздо меньше эукариотических. Их средний диаметр колеблется в пределах 0,5-5 мкм и только у отдельных видов прокариот клетки бывают крупнее. В цитоплазме прокариотической клетки отсутствуют мембранные органоиды. Следовательно, прокариоты лишены митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматической сети, пластид, которые свойственны эукариотам. Более мелкие, чем у эукариот, рибосомы располагаются в цитоплазме свободно (рис. 104).

С учетом важнейшей роли мембранных структур в жизнедеятельности эукариотической клетки, вполне закономерным представляется вопрос: **«Обходится ли прокариотическая клетка совсем без каких-либо мембранных компонентов?»**

Нет, не обходится. Ее цитоплазма ограничена наружной клеточной мембраной (плазмалеммой). Внутренняя складка плазмалеммы, названная

мезосомой, выполняет функции митохондрий. Кроме этого наружная мембрана образует другие складки внутри цитоплазмы, к поверхности которых прикрепляются ферменты. Клеточная мембрана участвует также в биосинтезе полисахаридной клеточной стенки и слизистой капсулы, выделении ферментов, делении и спорообразовании. Таким образом, **жизнедеятельность любых клеточных форм жизни немыслима без мембранных структур**. Лишенная плазмалеммы клетка незамедлительно гибнет.

В прокариотических клетках отсутствует ядро. **Поскольку в ядре эукариотической клетки локализуется ее наследственный материал, то где находится он в прокариотической клетке? Или отсутствует вообще?**

Вместо ядра в клетке прокариот присутствует нуклеоид. Последний представляет собой структуру неопределенной формы, состоящую из одной большой кольцевой молекулы ДНК, белков и РНК. Единственная молекула ДНК содержит в себе всю наследственную информацию прокариотической клетки. **Молекула ДНК, как и весь нуклеоид, находится непосредственно в цитоплазме**. Она прикрепляется к внутренней поверхности клеточной мембраны с помощью специальных белковых нитей.

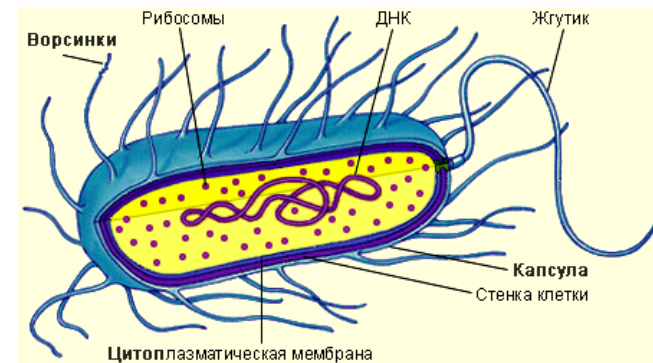


Рис. 104. Схема строения (внизу) и внешний вид (вверху) прокариотического организма (палочковидной бактерии)

Общее содержание ДНК в прокариотической клетке намного меньше, чем в эукариотической. Большинство генов в клетке прокариот уникальны, повторяются обычно только гены, кодирующие тРНК и рРНК. Прокариоты размножаются делением клетки надвое путем образования поперечной перегородки. Этому предшествует самоудвоение (ауторепликация) молекулы ДНК. Образовавшиеся две молекулы ДНК расходятся, увлекаемые растущей клеточной мембраной.

Плазмалемму прокариотической клетки окружает снаружи достаточно жесткая клеточная стенка. Ее каркас образован особым полисахаридом – муреином. С внешней стороны от клеточной стенки может находиться слизистая капсула (рис. 104).

Несмотря на предельную простоту строения, прокариоты способны к активному передвижению. **Каким аппаратом передвижения обладают клетки прокариот?**

Многие бактерии имеют специальные органоиды движения – жгутики. Их количество колеблется у разных видов от 1 до 1000. Толщина жгутика составляет 10-20 нм, длина – 3-15 мкм. Его вращение осуществляется против часовой стрелки с частотой 40-60 оборотов в секунду. Это обеспечивает бактериям рекордную скорость передвижения. Бактерия Хеликобактер за 1 секунду перемещается на расстояние в 60 раз длиннее ее тела. Если провести аналогию с крупными животными, то скорость перемещения бактерии в 2,5 раза превышает скорость бега леопарда.

Жгутики могут располагаться равномерно по всей поверхности бактериальной клетки, либо отходить от одного или двух ее полюсов. **Являются ли жгутики единственными поверхностными структурами прокариотической клетки?**

Кроме жгутиков на поверхности бактерий располагаются **ворсинки**. Они тоньше жгутиков (диаметром 5–10 нм, длиной до 2 мкм) и служат для прикрепления бактерии к субстрату. Ворсинки могут принимать участие в транспорте веществ. Кроме типичных ворсинок бактерии могут иметь **длинные нитевидные ворсинки – пили** (диаметром 3-10 нм, длиной до 10 мкм). Они используются при передаче ДНК от одной бактерии к другой в процессе примитивного полового процесса – конъюгации.

Существенные различия в строении клеток прокариот и эукариот не могли не сказаться на различиях процессов жизнедеятельности. Окислительные процессы у многих прокариот ограничены брожением. Некоторые прокариотические организмы обладают способностью фиксировать атмосферный азот. Фотосинтез у автотрофных прокариот проходит в складках клеточной мембраны.

Эти уникальные свойства прокариотических организмов не могли не заинтересовать ученых и конструкторов, работающих в области нанотехнологий.

7.2. Использование бактерий в нанотехнологиях

Доставка веществ внутрь клетки. В настоящее время бактерии рассматриваются практически идеальным транспортным средством для направленной доставки в клетку лекарственных препаратов и генов. **Какие свойства бактерий привлекли внимание исследователей, работающих в области направленного транспорта веществ в клетку?**

Бактерии обладают естественной способностью легко проникать в живые клетки. При этом, доставляя в клетку вещество (гормон, ДНК, лекарственный препарат), бактерии не только не уничтожают, но даже не повреждают клетку-мишень.

Доставка генов используется в нанотехнологии, получившей название «генной терапии». После того, как доставленный ген попадает в клеточное ядро и начинает функционировать, клетка вырабатывает необходимый ей белок (фермент). Последний нормализует обмен веществ и снижает до минимума проявление наследственной болезни. **Каким образом бактерии «загружаются» необходимыми для доставки в клетку генами?**

Для этого используют специально приготовленные наночастицы размером от 40 до 200 нм. Затем их соединяют с генами (фрагментами молекул ДНК). С помощью специальных связующих молекул наночастицы с генами закрепляют на поверхности бактерий (рис. 105).

На одной бактерии можно разместить до нескольких сотен наночастиц, увеличивая, таким образом, количество и «типы» доставляемых грузов. Так, например, можно совместить средство для диагностики с лекарством. Тогда появится возможность понаблюдать за участком органа, в который доставлено лекарство.

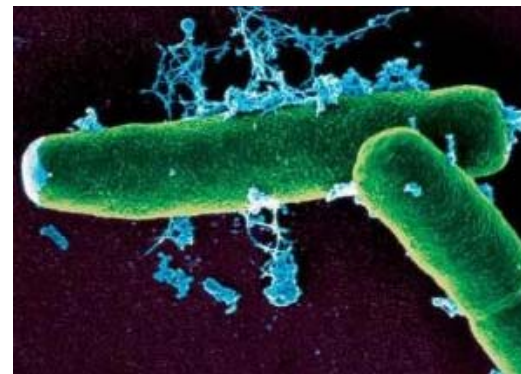


Рис. 105. Бактерии с полезным грузом, закрепленным на их поверхности

При контакте «загруженной» генами (лекарством) бактерии с клеткой плазмалемма последней образует впячивание. Мембрана области впячивания окружает бактерию так, что бактерия заключается в мембранный пузырек. Последний проникает внутрь клетки. Через некоторое время бактерия расщепляет мембрану пузырька и оказывается вместе с полезным грузом внутри цитоплазмы клетки. Доставленный груз в виде лекарственного препарата начинает оказывать свое действие. Если доставлялись фрагменты ДНК (гены), то они проявят свою активность спустя некоторое время после проникновения в клеточное ядро.

Использование бактерий для производства наночастиц. Группой немецких биологов, работавшей на урановом руднике в Саксонии, была обнаружена бактерия «Бацилла сферическая JG-A12». Для защиты от тяжелого металла урана бактерия обладает очень прочной наружной белковой оболочкой. Эта оболочка отличается множеством нанопор, которые располагаются так, что формируется равномерный узор. **Как использовать эту уникальную особенность оболочки бактерии для производства наночастиц?**

В поиске решения проблемы учеными был проведен ряд опытов. В одном из них бактерия «Бацилла сферическая JG-A12» была помещена в солевой раствор благородного металла палладия. Наблюдения за ней велись в инфракрасном спектре. При контакте с белковой оболочкой бактерии соль палладия превращалась в чистый металл палладий. Из него в порах бактериальной оболочки формировались крохотные наноструктуры (рис. 106), состоящие из 50-80 атомов палладия. Самой приятной неожиданностью для исследователей оказалось то, что эти наноструктуры проявляют намного большую каталитическую активность, чем палладий, получаемый другим способом.

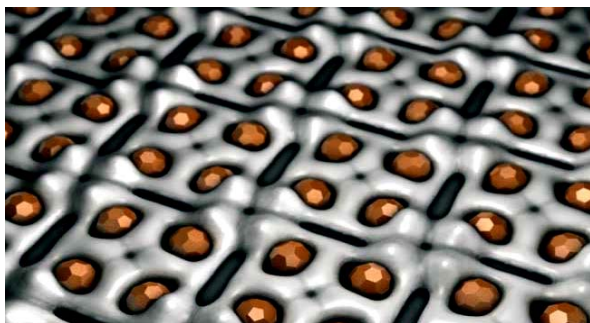


Рис. 106. Нанокристаллы палладия (изображены коричневым цветом), формирующиеся в порах оболочки бактерии «Бацилла сферическая JG-A12»

В лабораторных экспериментах ученые обнаружили, что некоторые бактерии обладают свойствами химического восстановителя. **Как поведут себя такие бактерии, если окажутся в среде, содержащей ионы металла?**

Ученые поместили бактерии с восстановительными свойствами в раствор солей золота. Бактерии поглощали ионы золота и, восстанавливая их в цитоплазме своих клеток, превращали в наночастицы металла. Накапливающиеся в цитоплазме наночастицы золота имели диаметр от 5 до 15 нм. Создавая таким образом собственные «золотые запасы», бактерии чувствовали себя нормально и продолжали размножаться.



С помощью данного метода исследователи получили также наночастицы серебра и сплава золота с серебром. Это стало несомненным успехом, так как производить наночастицы в таком узком диапазоне размеров биологическими методами ранее никак не удавалось. Наночастицы металлов, формируемые в теле бактерий, представляют интерес для различных наноконструкций и технологических производств.

Бактерии в качестве источника энергии. Бактерии Шewanелла привлекли внимание ученых своей санитарной функцией. Они перерабатывают токсичные растворы в безвредные вещества. **Что произойдет с такими бактериями, если резко ухудшить условия их жизнедеятельности?**

Исследователи заставили бактерий Шewanелла работать в очень «тяжелых» условиях. Для этого в среде обитания бактерий уменьшили содержание кислорода, а также необходимых для их жизнедеятельности веществ. **На поверхности таких бактерий стали появляться шипы**, позволяющие дотянуться если не до кислорода, то до ближайшей бактерии, имеющей доступ к кислороду (рис. 107). При крайнем недостатке питательных веществ, шипы превращались в тонкие длинные нити с гораздо большими возможностями жизнеобеспечения.

Эти неожиданно **возникающие у бактерий новые органы исследователи назвали нанонитями**. Их толщина составляла от 10 до 150 нанометров, а длина, в зависимости от вида бактерий, достигала порой десятков микрометров.

Особый интерес вызвал тот факт, что, получая нужное «питание», бактерии могли освобождаться от лишних электронов, способных перемещаться по этим нанонитям. Если конец нанонити дотягивался до положительного иона, то появлялась разность потенциалов, обуславливающая движение электронов к ионам. Таким образом, возникал электрический ток. **Чем более «трудными» были условия жизни бактерий, тем длиннее становились нанонити и большее количество бактерий объединялось в своеобразное «электрическое сообщество».** Члены такого сообщества обменивались ве-

ществами по живой и очень разветвленной электрической сети. Ученые не без оснований полагают, что подобные бактерии могут в будущем использоваться в качестве источника энергии.

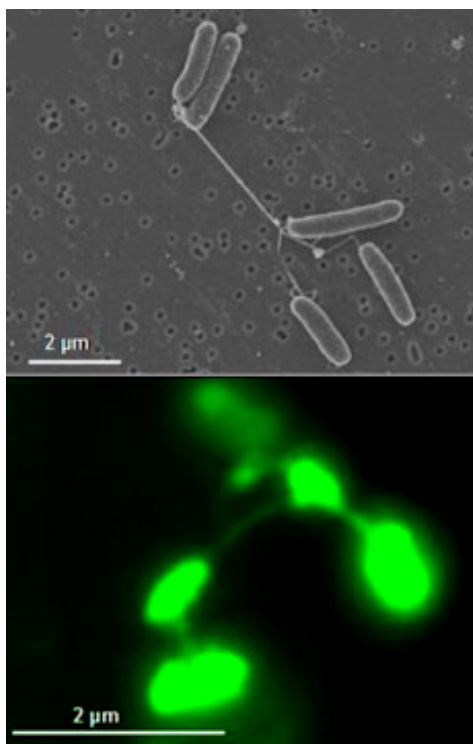


Рис. 107. Бактерии Шewanелла формируют электрическую цепь. Верхняя половина рисунка – снимок, выполненный с помощью сканирующего электронного микроскопа. Нижняя половина рисунка – микрофото, сделанное с применением флуоресцентного микроскопа (описание в тексте)

7.3. Наноконструкции на основе прокариот

Высокая устойчивость к антибиотикам придала золотистому стафилококку (рис. 108) статус «супермикроба». В США он представляет гораздо большую угрозу здоровью, чем вирус СПИДа, унося ежегодно жизни более 16000 американцев.

К супермикробу проявили интерес ученые из университета Айдахо (США). **Что способствует такой быстрой и надежной доставке стафилококком своих токсинов в клетку человека?**

Исследуя поверхность золотистого стафилококка, ученые обнаружили на ней особый **белок фибронектин**. Этот белок легко связывается с молекулами других веществ, в том числе с биомолекулами.

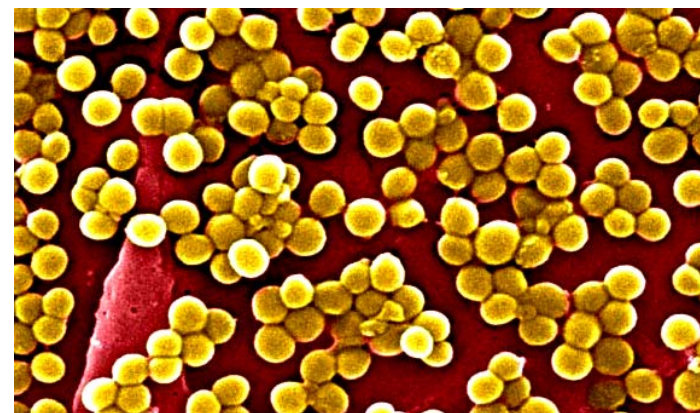


Рис. 108. Золотистый стафилококк

Исследователи выделили из золотистого стафилококка фибронектин и покрыли им снаружи нанотрубки. Оказалось, что нанотрубки с таким покрытием значительно легче проникают в живые клетки, чем обычные нанотрубки. Ученые попробовали наполнять нанотрубки бактериальным токсином. Покрытые фибронектином нанотрубки быстро доставляли токсин в клетки и вызывали их гибель. Таким образом, **белок золотистого стафилококка может использоваться для улучшения характеристик средств направленного транспорта веществ** в организме.

В настоящее время ученые университета Айдахо приступили к разработке биосенсоров, в которых найдут применение конструктивные особенности опасного «супермикроба».

7.4. Нанобактерии: реальность или заблуждения отдельных ученых

Сотрудником университета в г. Куопио (Финляндия) О. Кайандером описаны чрезвычайно маленькие микроорганизмы, которые он назвал нанобактериями (рис. 109). Линейные размеры нанобактерий колеблются от 20 до 150 нанометров. Нанобактерии, следовательно, существенно меньше, чем все известные к настоящему времени бактерии, споры грибов или клетки многоклеточных организмов. **Что послужило основанием для утверждения о существовании нанобактерий?**

С помощью электронного микроскопа исследователи наблюдали и фотографировали упорядоченные структуры, внешне напоминающие колонии необычайно мелких бактерий сферической формы (рис. 109). В последующих наблюдениях было обнаружено, что **«загадочные нанообразования» размножаются**.

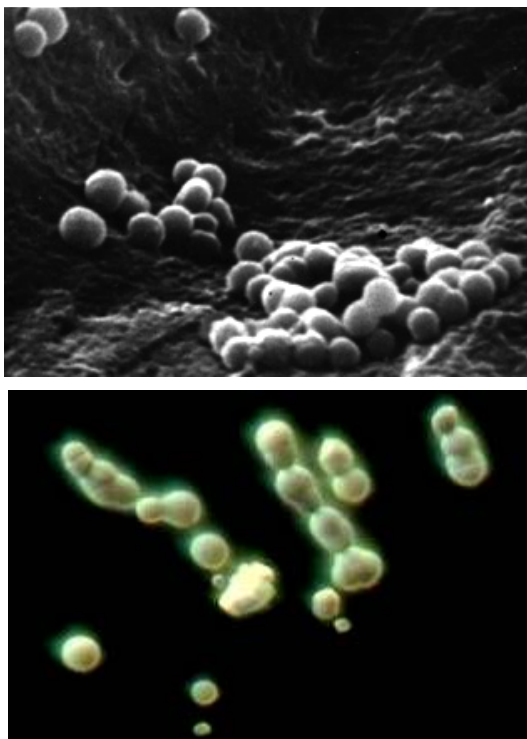


Рис. 109. Нанобактерии (снимки сделаны с помощью сканирующего электронного микроскопа)

Эти наблюдения убедили ученых в том, что они имеют дело с **новой формой жизни, названной нанобактериями.**

Однако подобное заключение подверглась серьезной критике. **Каковы основные аргументы противников этой точки зрения?** Нанобактерии слишком малы, чтобы самостоятельно осуществлять процессы жизнедеятельности. В них физически не могут разместиться молекулы и структуры, обеспечивающие обмен веществ и размножение.

Однако в начале 90-х годов мнение финского ученого О. Кайандера и его сторонников о реальности существования нанобактерий получило **палеонтологические подтверждения.** При изучении минеральных отложений горячих источников в окрестностях Рима геологом Р. Фолком из университета штата Техас (США) были обнаружены и рассмотрены под электронным микроскопом подобные структуры. Позднее австралийскими геологами с глубины 3,5 км ниже уровня морского дна у западного побережья континента были добыты образцы песчаника. На его поверхности выявлены миниатюрные узловатые нити длиной от 20 до 128 нанометров, внешне напоминающие нити грибов. По аналогии с микробами, австралийские исследователи назвали их «нанобами».

Размер нанобактерий действительно настолько мал, что в них вряд ли найдется место даже для нескольких молекул ДНК. О размещении остальных структур живой клетки и говорить не приходится. Поэтому **ученые предположили, что нанобы отличаются от всех прочих организмов не только размерами, но и сущностью функционирования.** О. Кайандер полагает, что нанобы не синтезируют аминокислоты и жирные кислоты, а получают их из внешней среды. Возможно, что нанобы образуют колонии, чтобы совместно обрести жизнеспособность, или их гены распределены таким образом, что нанобы могут размножаться, лишь объединившись в группы. Вопрос остается открытым, и единой точки зрения пока не существует.

Дискуссии по поводу того, что же представляют собой нанобактерии, обнаруженные О. Кайандером, в настоящее время продолжаются. Тот факт, что нанобы способны размножаться, позволяет отнести их, согласно современной концепции определения живых существ Тролланда-Мюллера, к живым организмам. По мнению О. Кайандера и других ученых, **нанобактерии опасны и способны являться причиной различных заболеваний,** вызывая гибель клеток головного мозга, почек и других органов.

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

Вирусы – простейшая неклеточная форма жизни на Земле, находящаяся на границе между неживой и живой природой. У вирусов отсутствует такое проявление жизни как обмен веществ и энергии. Способность к размножению и связанные с ней наследственность и изменчивость они приобретают лишь после проникновения в живую клетку.

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

Вирусы стали известны науке в 1892 году, когда Д.И. Ивановский впервые опубликовал результаты исследований мозаичной болезни табака. Через 7 лет голландский микробиолог М. Бейерник предложил термин «вирус». **Как же устроены вирусы, своего рода мост между неживой и живой природой?**

Размер вирусов составляет 20-100 нм и только в отдельных случаях (вирус оспы) достигает 300 нм. Большинство из них можно увидеть только в электронном микроскопе. Строение вирусов предельно простое. **Состоят они из двух компонентов: нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белковой оболочки** (рис. 110).

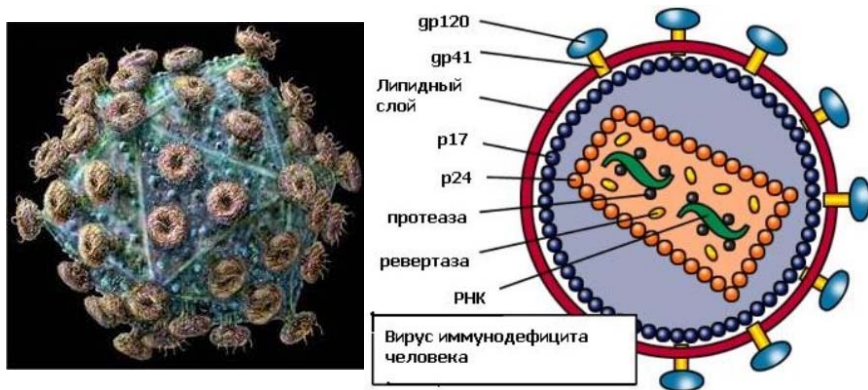


Рис. 110. Вирус СПИДа (иммунодефицита человека): внешний вид (верхний рисунок) и схема строения (нижний рисунок): gp120, gp41, p17, p24 – молекулы белков различных типов; протеаза, ревертаза – ферменты

Нуклеиновая кислота является носителем наследственной информации (генетическим материалом), белки защищают ее и обеспечивают ферментацию процессов. Сложные вирусы, такие как вирус СПИДа, имеют ещё дополнительную внешнюю оболочку (липидную мембрану) с гликопротеинами – рецепторами, которые распознают клетку хозяина (рис. 110).

Генетический материал вирусов «исчерпывает» все его возможные виды: одно- и двухцепочечные ДНК, одно- и двухцепочечные РНК. При этом они могут быть как в линейной, так и в кольцеобразной формах. **Природа как бы испытала на вирусах все возможные варианты генетического материала.** Испытала, чтобы затем остановить свой выбор на двух видах – двухцепочечной ДНК как хранителе генетической информации и одноцепочечной РНК как ее переносчике.

Соответственно генетическому материалу все вирусы разделяют на две группы: **ДНК-содержащие вирусы** (аденовирусы, вирусы герпеса); **РНК-содержащие вирусы** (вирус полиомиелита, вирусы раневых опухолей растений).

Оболочка вируса (капсид) построена из белковых субъединиц (капсомеров) и может иметь палочковидную, сферическую (рис. 91) формы, а также форму многогранника. Число белковых субъединиц капсида существенно различается: у некоторых бактериофагов – 12, у вируса табачной мозаики – 2200.

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

Вирусы являются внутриклеточными паразитами, способными развиваться и размножаться только внутри живых клеток. **Каким образом вирусы проникают в клетку живого организма?**

Способы внедрения вирусов в клетки живых организмов разнообразны. Проникновение вируса в растительную клетку, защищенную прочной клеточной стенкой, происходит только в местах ее механических повреждений вредителями. **В клетки животных, защищенные лишь плазмалеммой, вирусы проникают, подобно бактериям, предварительно окружаясь фрагментом клеточной мембраны.**

После проникновения внутрь клетки-хозяина белковая оболочка вируса разрушается, и в цитоплазму попадает молекула нуклеиновой кислоты. **Каким же образом происходит размножение вируса, от которого в клетке осталась только молекула нуклеиновой кислоты?**

Вирусная нуклеиновая кислота включается в обмен веществ клетки-хозяина. Последняя прекращает заботиться о своих нуждах и начинает производить только вирусную нуклеиновую кислоту и вирусные белки. Если вирусной нуклеиновой кислотой является ДНК, то она «размножается» путем типичной ауторепликации (самоудвоения). Одновременно ДНК служит матрицей для синтеза соответствующих молекул информационной РНК. Последние, поступая в рибосомы клетки-хозяина, обеспечивают синтез белков оболочки вируса.

Затем происходит «самосборка» белковых оболочек вокруг вирусной нуклеиновой кислоты. В результате в одной клетке образуется множество (иногда тысячи) вирусных частиц. У вирусов, не содержащих ДНК, роль носителя наследственной информации выполняет РНК (рис. 110). Выход вирусных частиц из клетки может сопровождаться ее разрушением. Частицы растительных вирусов в определенных условиях могут не выходить из клетки, а накапливаться в ней, образуя кристаллы.

Особняком среди вирусов стоят те, которые паразитируют на бактериях – бактериофаги (рис. 111). **Чем отличаются бактериофаги от остальных вирусов?** Бактериофаг состоит из многогранной призматической головки и хвостового отростка. Диаметр головки 60-95 нм, длина хвоста – 250 нм.

Головка образована белковой оболочкой, внутри которой заключена ДНК или РНК (рис. 111). Хвостовой отросток – полый стержень, окруженный чехлом из белков. На его конце расположена пластинка с шипами и нитями (фибриллами), обеспечивающими выбор клетки хозяина и прикрепление на ней. После прикрепления чехол хвоста сокращается, стержень прокалывает клеточную стенку, и нуклеиновая кислота впрыскивается в клетку-хозяина (рис. 112).

Следовательно, бактериофаг «работает» как живой шприц одноразового действия. На поверхности клеток остаются «использованные шприцы» – пустые фаговые оболочки. В клетке происходит «размножение» нуклеиновой кислоты и синтез белков бактериофага. Образующиеся новые бактериофаги после растворения бактериальной оболочки выходят во внешнюю среду.

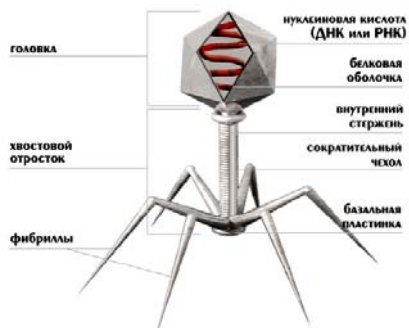
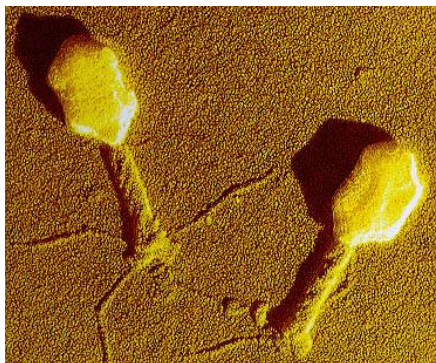


Рис. 111. Внешний вид (верхняя часть рисунка) и схема строения (нижняя часть рисунка) бактериофага (описание в тексте)

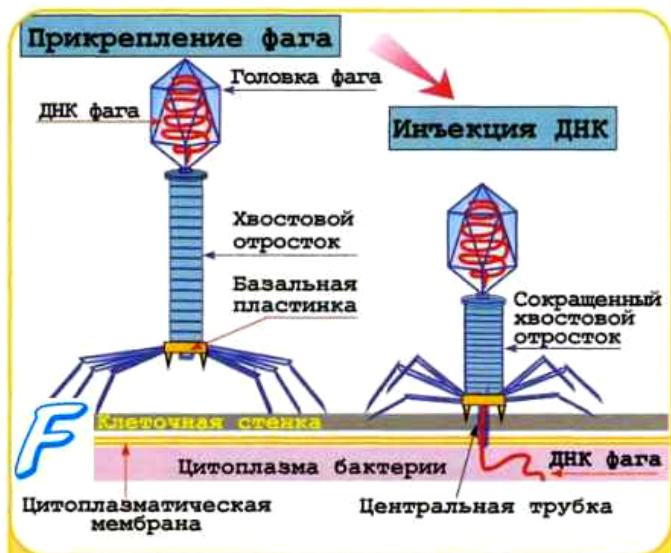


Рис. 112. Схема взаимодействия бактериофага с бактерией

Благодаря простоте строения и несложности процессов жизнедеятельности вирусы стали удобным объектом исследования. Изучение вирусов привело к пониманию тонкой структуры гена, расшифровке генетического кода, выяснению механизмов наследственности и изменчивости.

7.6. Наноконструкции и нанотехнологии на основе вирусов

Вирусы в борьбе против раковых заболеваний. Каждый вирус является возбудителем строго определенного инфекционного заболевания. Это обусловлено тем, что вирус распознает на клеточной поверхности организма-хозяина специфические структуры – рецепторы, различающиеся у разных типов клеток (рис. 113). **Можно ли такую избирательность вирусов использовать для уничтожения только больных (раковых) клеток в органе?**

Очертив такую проблему, ученые-онкологи и генетики начали работать над генетической модификацией вирусов. Ее цель – изменить наследственные качества вирусов до такой степени, чтобы те превратились в «высокоточное самонаводящееся оружие». Модифицированные вирусы должны были поражать исключительно раковые клетки, оставляя нетронутыми здоровые клетки.

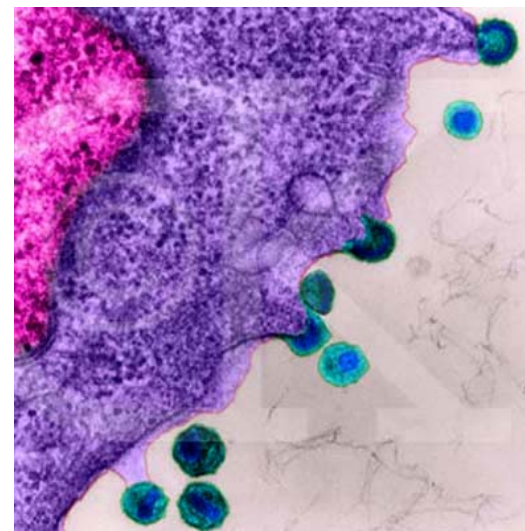


Рис. 113. Вирусы распознают рецепторы больной клетки и «атакуют» ее

Чаще всего для этой цели используют аденовирусы. При этом создают «искусственный вирус», в ДНК которого встраивают ген, позволяющий вирусной ДНК размножаться только в раковых клетках. Миллионы дочерних

вирусных частиц, образующихся в раковой клетке, в итоге буквально разрывают ее на части и поражают затем другие раковые клетки. Вирус может внедряться также в здоровые клетки органа, однако в них он не размножается и никакого вреда им не причиняет. Такой способ избавления органа от больных клеток получил название вирусотерапии.

Можно ли генетически модифицированные вирусы использовать для диагностики онкологических заболеваний? Особенно на начальных стадиях их развития, когда немногочисленные в органе раковые клетки не обнаруживаются другими методами.

Для решения указанной проблемы учеными были проведены новые исследования. В ходе них было установлено, что, модифицируя вирусы, им можно придать, кроме способности физически уничтожать раковые клетки, также другие важные свойства. Так, вирусы могут доставлять в клетки гены, повышающие их чувствительность к лекарственным препаратам. Специфичные для данной опухоли вирусы можно пометить флуоресцирующими красителями, или радиоактивными изотопами. При попадании в организм «меченые» вирусы будут связываться с опухолевыми клетками.

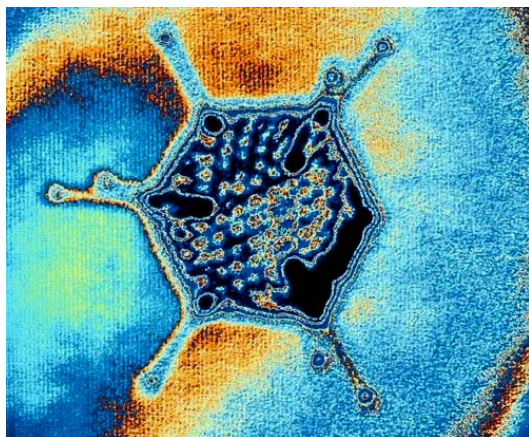


Рис. 114. Клетка, которую вирус «пометил» специальным красителем

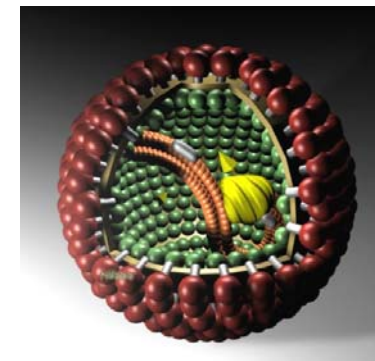
Помеченные вирусами опухолевые клетки (рис. 114) будут затем легко обнаруживаться в органе.

«Искусственные вирусы» в коррекции наследственных аномалий. Многие наследственные заболевания человека вызваны различными генными мутациями. К ним относятся гемофилия, дальтонизм, фенилкетонурия и др. Учеными установлено, что вирусы могут быть использованы для лечения некоторых наследственных заболеваний человека. Такие искусственные вирусы способны встраивать свои гены в геном клетки-хозяина, где они функционируют неограниченно долго. Новые гены должны заменить в орга-

низме те измененные гены, которые обусловили развитие наследственной болезни. Непростой для решения оказалась, однако, **проблема «оснащения» вируса новыми (нормальными) генами человека.**

Для решения упомянутой проблемы ученые применили метод генетической инженерии. Он должен был обеспечить введение в наследственный аппарат вируса нормального гена человека. **Как технически соединить далеко не родственные молекулы ДНК человека и ДНК вируса?**

Исследователи использовали для этого «биологические ножницы» – фермент рестриктазу. Ферментом обрабатывали ДНК вируса и ДНК вводимого гена человека. В результате были получены линейные ДНК вируса и гена, имеющие «липкие» концы. Последующая обработка смеси ДНК вируса и гена с «липкими» концами ферментом ДНК-лигазой приводит к образованию вируса, ДНК которого содержит встроенный нормальный ген человека.



Внесенные вирусом в организм человека нормальные гены обеспечивают синтез необходимых белков (ферментов). Последние нормализуют обмен веществ и снижают до минимума проявление наследственной аномалии в организме.

Бактериофаги вместо антибиотиков? В связи со стремительным ростом устойчивости болезнетворных бактерий к антибиотикам, необходимо прекратить их использование. Чтобы антибиотики восстановили свою активность, расстаться с ними желательно на несколько десятилетий. **Что может послужить надежной и безопасной заменой антибиотикам?**

В качестве одной из альтернатив антибиотикам рассматриваются бактериофаги. **Бактериофаги** действуют медленнее, однако они **гораздо менее вредны, чем антибиотики**, являющиеся по существу химическими ядами. Бактериофаги **обладают строгой избирательностью**: каждый бактериофаг уничтожает лишь определенный вид бактерий. Действие антибиотиков менее избирательно, потому они уничтожают в организме полезную микрофлору и вызывают дисбактериоз.

В ситуациях, когда все антибиотики уже не действуют, спасти жизнь могут только бактериофаги. В особых случаях их можно применить вместе с антибиотиками. Уже сейчас бактериофаги успешно используются в нашей стране для лечения и профилактики дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллеза и других заболеваний.

Словарь основных терминов

Бактериофаг – вирус, поражающий бактерии.

Вирус – простейшая неклеточная форма жизни, находящаяся на границе между неживой и живой природой; состоит из ДНК (РНК) и белковой капсулы.

Капсид – белковая оболочка вируса.

Капсомеры – белковые субъединицы (молекулы белка), образующие капсулу вируса.

Лигазы – группа ферментов, сшивающих фрагменты различных молекул ДНК друг с другом.

«Липкие концы» ДНК – короткие (от 4 до 20 нуклеотидов) одноцепочечные участки на концах молекул ДНК, которые позволяют соединяться («слипаться») различным фрагментам ДНК. Соединение происходит за счет образования водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями одноцепочечных концов ДНК.

Муреин – полисахарид, образующий клеточную стенку прокариот (бактерий).

Нанобактерии (нанобы) – самые маленькие микроорганизмы сферической формы, диаметр которых колеблется от 20 до 150 нанометров, впервые открытые в конце XX века; реальность их существования оспаривается до настоящего времени.

Нуклеоид – зона цитоплазмы прокариот, содержащая одну кольцевидную молекулу ДНК.

Пили – длинные нитевидные ворсинки бактерий.

Прокариотические организмы (прокариоты) – самые примитивные одноклеточные организмы, не имеющие оформленного ядра и мембранных органоидов; включают бактерии и архебактерии.

Рестриктазы – группа ферментов, разрезающих молекулу ДНК на фрагменты.

Ретровирус – вирус, наследственный материал которого представлен РНК.

Фибронектин – белок располагающийся на поверхности золотистого стафилококка; легко связывается с биомолекулами, способствуя проникновению бактерии в живую клетку.

Вопросы для повторения

1. Что представляют собой прокариотические организмы?
2. Охарактеризуйте строение прокариотической клетки.
3. Как передвигаются бактерии?
4. Сравните между собой бактериальные ворсинки и пили. Каковы особенности их формы и функции?

5. Каким образом бактерии проникают в клетку организма-хозяина?
6. Как можно использовать бактерии для доставки в живые клетки лекарств и генов?
7. Каким образом бактерии могут создавать и накапливать наночастицы металлов?
8. Что происходило с бактериями Шewanелла, когда их заставляли работать в тяжелых условиях?
9. Как формировалось «электрическое сообщество» бактерий Шewanелла?
10. Какие особенности бактерий Шewanелла позволяют рассматривать их в качестве возможных источников энергии?
11. Охарактеризуйте возможности создания наноконструкций на основе золотистого стафилококка.
12. Что представляют собой нанобактерии (нанобы)?
13. Почему реальность существования нанобактерий оспаривается до настоящего времени?
14. Почему нанобактерии должны, по мнению ученых, отличаться от всех живых организмов сущностью функционирования?
15. Какие особенности вирусов позволяют рассматривать их как переходную форму между неживой и живой природой?
16. Чем может быть представлен генетический (наследственный) материал вирусов?
17. Как устроена оболочка вирусов?
18. Каковы особенности оболочки вируса СПИДа?
19. Как вирусы проникают в живые клетки?
20. Что происходит в клетке организма-хозяина после проникновения в нее вируса?
21. Охарактеризуйте строение бактериофага.
22. Каким образом бактериофаг поражает бактерию?
23. Как используются вирусы в борьбе против раковых заболеваний?
24. Каким образом можно использовать вирусы для диагностики онкологических (раковых) заболеваний.
25. Как можно использовать вирусы для лечения наследственных заболеваний человека?
26. Почему бактериофаги рассматриваются в качестве возможной замены антибиотикам?

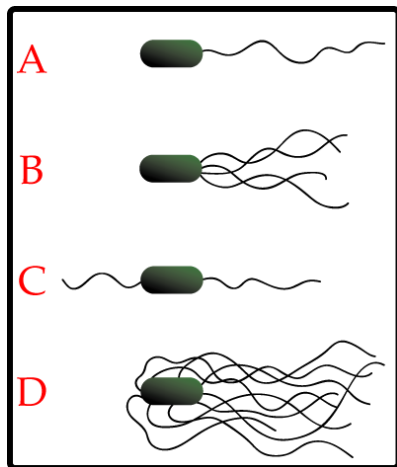
ЗАДАНИЯ

Задание № 1. Нарисуйте в тетради приведенную ниже схему прокариотического организма (бактерии). Затем дорисуйте известные вам, но отсутствующие на схеме структуры прокариот. Сделайте дополнительные обозначения для новых структур. Сравните между собой прокариотическую и

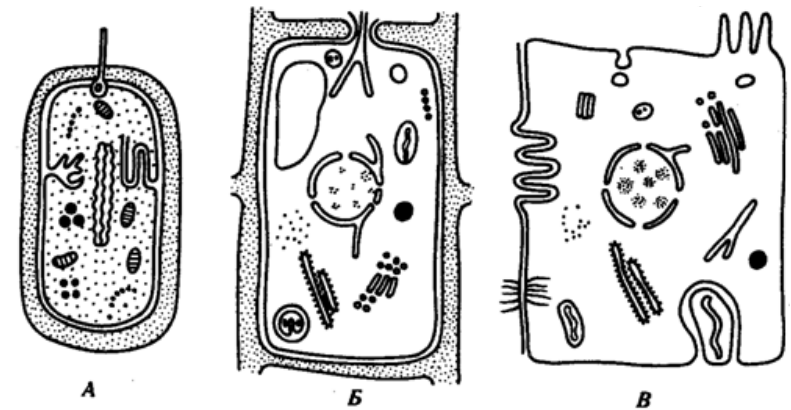
эукариотическую клетки. Укажите основные различия между ними. Какой органоид эукариотической клетки напоминает своим строением всю прокариотическую клетку? Какой эволюционный вывод вы можете сделать из последнего сравнения?



Задание № 2. На приведенном ниже рисунке изображены 4 типа расположения жгутиков у прокариот (А, В, С, D). Опишите каждый из них в тетради, зарисовав предварительно рисунок. Объясните известный вам механизм «биения» жгутиков, который обеспечивает передвижение бактерии.



Задание № 3. Определите типы представленных на рисунке клеток (А, Б, В) живых организмов. Нарисуйте клетки всех трех типов в тетради. Обозначьте все известные вам органоиды этих клеток. Опишите отличительные черты строения клетки каждого типа. Какие из этих черт вы рекомендуете для определения каждого типа клетки?

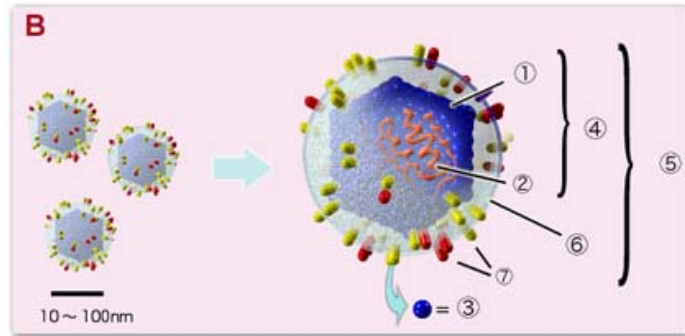
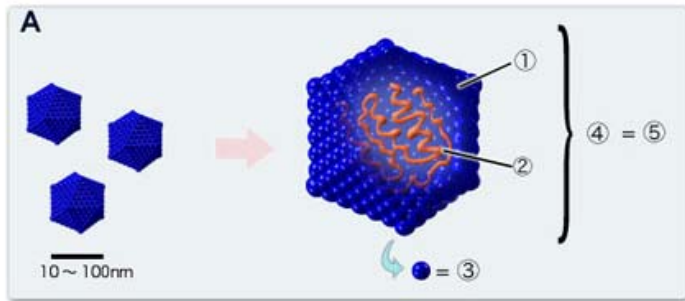


Задание № 4. На рисунке представлен опаснейший «супермикроб». Почему он получил такое название? Какое подлинное название «супермикроба»? Объясните, какую пользу извлекли ученые, исследовавшие «супермикроб»?

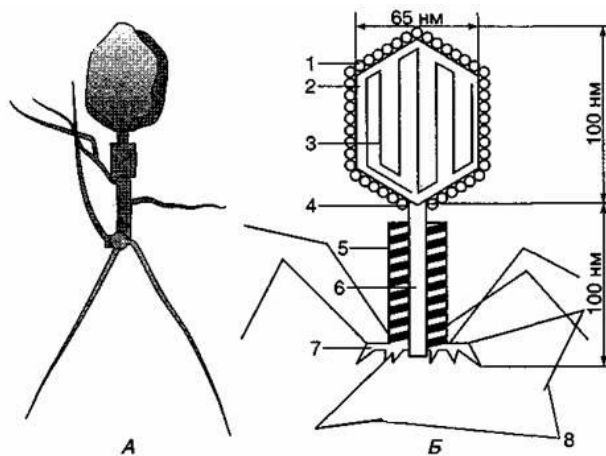
В каких нанотехнологиях нашел применение поверхностный белок «супермикроба»? Предложите свои варианты использования свойств «супермикроба» в перспективных нанотехнологиях.



Задание № 5. Нарисуйте схемы строения двух вирусов (А и В) в тетради. Напишите названия частей (структур) вирусов, обозначенных на схеме цифрами, используя текст раздела 7.5. Укажите различия в строении между двумя вирусами. Объясните, почему вирусы получили образное название «промежуточного моста» между неживой и живой природой.

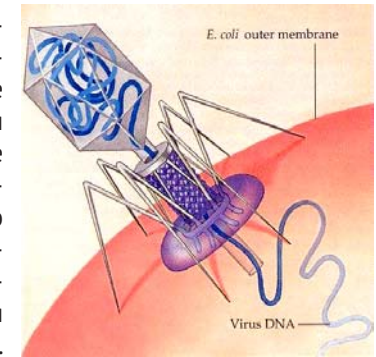


Задание № 6. Нарисуйте схему строения бактериофага (рисунок Б). Напишите названия его структур (частей), которые обозначены цифрами. Сравните строение вируса и бактериофага и укажите общие для них черты строения. Найдите основное отличие строения бактериофага от строения вируса. Чем вы можете объяснить возникновение этого отличия в ходе эволюции?



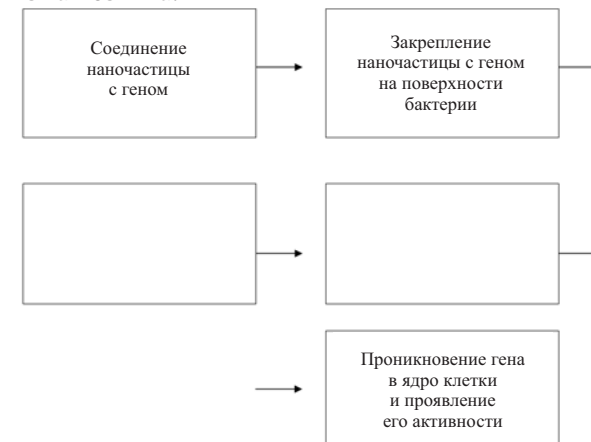
Задание № 7. Самые примитивные живые организмы планеты – бактерии появились около 3,5 млрд. лет тому назад. Обоснуйте время появления на Земле вирусов и бактериофагов (вирусов бактерий), принимая во внимания их строение, а также образное определение вирусов как «моста между неживой и живой природой».

Задание № 8. Рассмотрите схему взаимодействия бактериофага с кишечной палочкой. Объясните процессы, происходящие на данном этапе взаимодействия. Какая часть бактериофага окажется в цитоплазме кишечной палочки в конце этого взаимодействия? Что произойдет с остальной частью бактериофага? На каком основании бактериофага уподобляют «живому одноразовому шприцу»? Сравните способы заражения клетки-хозяина вирусами и бактериофагами. Дайте собственную оценку надежности и эффективности этих способов.



Задание № 9. Вирус гепатита поражает клетки печени человека. Объясните, почему этот вирус никогда не обнаруживается в клетках кожи человека. Представьте себе, что вы ученый-биолог и перед вами поставлена задача: изменить вирус гепатита так, чтобы он внедрялся своим обычным способом в клетки кожи. Составьте план ваших манипуляций с вирусом гепатита, направленный на решение этой задачи.

Задание № 10. Используя материал раздела 7.2, укажите промежуточные звенья приведенной ниже схемы доставки бактерией нового гена в клетку организма-хозяина:



Задание № 11. Подготовьте письменный реферат на одну из следующих тем:

- 1) Прокариоты (бактерии) – самые примитивные клеточные организмы Земли.
- 2) Использование бактерий в нанотехнологиях (внутриклеточная доставка лекарств, создание наночастиц, бактерии как источник энергии и т.п.).
- 3) Нанобактерии: реальность или миф?
- 4) Особенности строения и функционирования вирусов как представителей неклеточной формы жизни.
- 5) Вирусы в борьбе против раковых заболеваний.
- 6) Нанотехнологии на основе вирусов.
- 7) Применение генетически модифицированных вирусов в медицине.

Задание № 12. Составьте общий список названий нанотехнологий на основе прокариотических и неклеточных форм жизни. Ранжируйте его на свое усмотрение, учитывая, прежде всего, оригинальность конструкторской (инженерной) мысли (подхода) к созданию каждой нанотехнологии. Затем составьте и ранжируйте аналогичный список, критерием которого будет перспективность широкого применения нанотехнологии. Сравните оба списка и проанализируйте их различия. На основе сравнения и анализа двух списков сделайте собственное заключение.

Задание № 13. Создайте информационную базу об использовании бактерий и вирусов в наноконструкциях и нанотехнологиях.

Литература

Антонов А.Р. Нанотехнологии в медицине и биологии / А.Р. Антонов, Ю.И. Склянов // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины». 11-12 окт. 2007 г., СибГУ (режим доступа <http://www.sibupk.nsk.su/new/05/sem/2007/1>).

Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века / В.С. Баранов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 3. – С. 63-68.

Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 208 с.

Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2006. – 479 с.

Неттелбек Д. Вирусы: оружие против рака / Д. Неттелбек, Д. Карел // В мире науки. – 2004. – № 1.

Общая биология: Учеб. для 10-11 кл./ В.Б.Захаров, С.Г.Мамонтов стр.181-189.

Сыч В.Ф. Общая биология: Учебник для высшей школы. – Москва: Академический Проект, 2007. – 330с.

Сыч В.Ф. Основы биологической терминологии / В.Ф. Сыч. – Ульяновск: УлГУ, 2003. – 456 с.

Урок «Вирусы» <http://school-collection.edu.ru/catalog/rubr/000001a6-a000-4ddd-9fa3-4e0046b1dbb1/81894/>

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Интернет сайты:

www.nanonewsnet.ru – сайт о нанотехнологиях в России

www.nanojournal.ru – Российский электронный наножурнал

www.nanorf.ru – журнал «Российские нанотехнологии»

www.nanoportal.ru – информационно-аналитический портал по нанотехнологиям и наноматериалам Росатома

www.nanometer.ru – сайт нанотехнологического общества «Нанометр»

www.rusnanotech.ru – ОАО «Роснано»

cor.edu.27.ru/dlrstore/afb1d29f-eacd-506c-b906-d199c408f8fd

mycityua.com/articles/all/p210.html

gazeta.lenta.ru/flopovod/01-04-1999_virus.htm

radon-xm.do.am/publ/1-1-0-11

meduniver.com/Medical/Microbiology/103.html

www.botan0.ru/?cat=2&id=13

www.express-k.kz/show_article.php?art_id=42460

ru.wikibooks.org/wiki/Биология_клетки/Одностраничная_версия

invistra.m-l-m.info/?p=176

www.express-k.kz/show_article.php?art_id=42460

ГЛАВА 8.

Биореакторы и биокатализаторы в нанотехнологиях

8.1. Ферменты (биологические катализаторы) как природные нанообъекты

Биологическая роль ферментов. Реакции синтеза и расщепления в живой клетке протекают при умеренной температуре и нормальном давлении. Однако при таких условиях реакции протекают очень медленно. Для обеспечения своей жизнедеятельности клетке необходимы гораздо более высокие скорости биохимических реакций. **Каким образом Природа решила проблему ускорения химических реакций в живой клетке?**

Химические **реакции резко ускорились с появлением** в живых системах **естественных катализаторов**, получивших название **ферментов**. Они увеличивают скорость протекания биохимических реакций в миллионы и миллиарды раз. Так, одна молекула фермента каталазы за 1 секунду расщепляет до 10000 молекул опасной для клеток перекиси водорода.

Молекулы ферментов участвуют в осуществлении всех процессов обмена веществ и реализации генетической информации. Переваривание и усвоение пищевых веществ, синтез и распад белков, нуклеиновых кислот, жиров, углеводов и других соединений в клетках всех организмов невозможны без участия ферментов. **Любое проявление функций живого организма – дыхание, мышечное сокращение, размножение и др. – обеспечивается действием ферментов.**

Индивидуальные особенности клеток, выполняющих определенные функции, в значительной мере определяются набором молекул ферментов. Известно более 2000 ферментов живых организмов. Отсутствие или какой-

нибудь дефект даже одного фермента могут привести к серьезным отрицательным последствиям для организма.

Молекулы ферментов находятся в цитоплазме клетки, однако основная их часть связана с определенными клеточными органоидами, где и проявляет свое действие. В ядре, например, находятся ферменты, ответственные за синтез (репликацию) ДНК (ДНК-полимеразы). В митохондриях присутствуют ферменты, ответственные за накопление энергии.

Что представляют собой ферменты в структурном аспекте? Молекулярная масса ферментов лежит в пределах 10 тыс. – 1 млн. Они могут состоять из одной или нескольких полипептидных цепей или могут быть представлены сложными белками. В состав последних наряду с молекулой белка (белковым компонентом или апоферментом) входят коферменты (ионы металлов, нуклеотиды, витамины и др. низкомолекулярные соединения). **Апофермент (белковый компонент) и кофермент в отдельности ферментативной активностью не обладают. Они приобретают свойства фермента, лишь соединившись вместе.**

Молекулы разных ферментов могут формировать так называемые ферментные комплексы. Такие комплексы, например, встроены в мембраны клеток или клеточных органоидов и участвуют в транспорте веществ.

Подлежащее превращению в ходе химической реакции вещество (субстрат) связывается с определенным участком фермента – активным центром. **Чем образуется активный центр фермента?**

Активный центр **формируется коферментом и боковыми цепями аминокислот**. Последние часто находятся в значительно удаленных друг от друга участках полипептидной цепи (рис. 115).

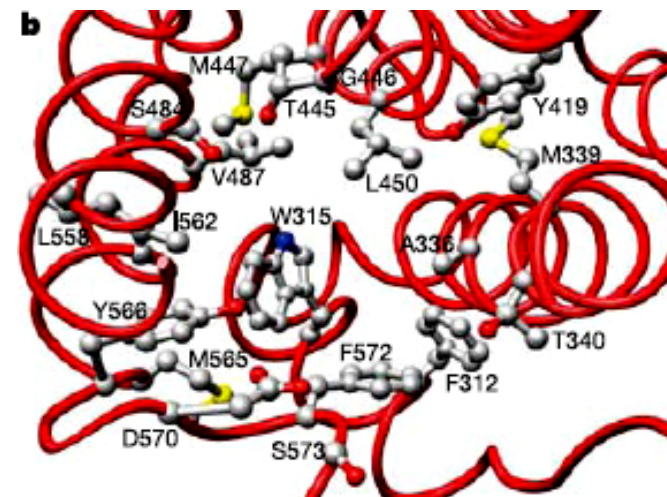


Рис. 115. Трёхмерная модель активного центра фермента. Молекула белка (апофермент) изображена в виде нити красного цвета. Боковые цепи аминокислот, формирующие активный центр, обозначены буквами и цифрами

Сложная укладка полипептидной цепи в молекуле белка (молекуле фермента) обеспечивает возможность нескольким боковым цепям аминокислот оказаться в строго определенном месте и на определенном расстоянии друг от друга. Благодаря этому формируется активный центр фермента. **Каков механизм участия фермента в биохимической реакции?**

Большинство ферментов отличается высокой специфичностью (избирательностью) действия: превращение каждого реагирующего вещества (субстрата) в продукт реакции осуществляется специальным ферментом. **Молекула фермента осуществляет свое действие, образуя комплекс с субстратом** (фермент-субстратный комплекс). В таком комплексе осуществляется многоточечный контакт активного центра фермента с субстратом (рис. 115, 116). При этом **субстрат изменяет свою конфигурацию и химические связи ослабевают**. Вследствие этого реакция протекает с меньшей начальной затратой энергии и, следовательно, с гораздо большей скоростью. После завершения реакции комплекс фермента с субстратом распадается с образованием продуктов реакции и свободной молекулы фермента. Освободившийся при этом активный центр фермента может связывать новые молекулы субстрата.

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

Большинство ферментов бактериальной клетки – это **адаптивные ферменты**. Они **синтезируются в клетке под воздействием какого-либо вещества (индуктора)**, чаще всего субстрата. При отсутствии этого вещества гены, контролирующие синтез фермента, заблокированы, а фермент содержится лишь в следовых количествах. Таким образом, **изменяя состав питательной среды можно регулировать продукцию ферментов микроорганизмами**.

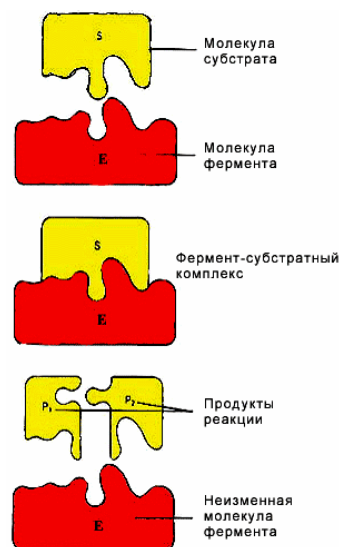


Рис. 116. Схема механизма действия молекулы фермента (описание в тексте)

8.2. Применение ферментов

Как ферменты соотносятся с наноструктурами и нанотехнологиями?

Молекулы ферментов, синтезируемые бактериями, по своим размерам являются природными нанообъектами. Они, в свою очередь, катализируют биохимические реакции с участием других нанообъектов – молекул субстрата. Эти реакции могут протекать не только в живых системах, но и за их пределами. В живом организме они обеспечивают выполнение его жизненных функций. Катализируемые ферментами реакции используются для обеспечения нанотехнологических циклов за пределами организма, получения искусственных наноматериалов и наноконструкций.

Чем привлекательны ферменты с точки зрения практического применения? Важным свойством ферментов является то, что они сохраняют свою эффективность и специфичность действия за пределами клетки. К тому же в отличие от химических катализаторов, **ферменты нетоксичны, функционируют в мягких условиях, используют доступное сырье, включая отходы**. Поэтому они представляют значительный интерес для промышленности с экономической и экологической точек зрения.

Ферменты находят все более широкое применение в текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, химической промышленности. Успешно используют их также для разрушения (обезвреживания) антропогенных органических загрязнителей окружающей среды. По объему производства ферменты уже вышли на третье место после аминокислот и антибиотиков.

Все более широкое применение ферменты находят в медицине. Так, ферменты, расщепляющие белки, используются при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, печени и поджелудочной железы. В последние годы выявлена эффективность применения этих ферментов в лечении раковых заболеваний, а также в растворении тромбов кровеносных сосудов.

С помощью ферментов получают многие лекарственные препараты, включая сложные химические соединения. Ферменты незаменимы в исследованиях тонкой структуры белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов, а также в экспериментах по генетической инженерии.

8.3. Микроорганизмы – биореакторы ферментов

Любой живой организм содержит ферменты. Однако для их выделения используются только те организмы, в которых содержание необходимого фермента составляет не менее 1%. Для промышленного получения ферментов

пригодны только некоторые растения (проросшие семена злаковых и бобовых, клеточный сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). **Могут ли микроорганизмы служить источником ферментов?**

Методами генной инженерии и селекции можно усиливать природную способность микроорганизмов (бактерий) к ускорению протекания биологических процессов. Их продуктивность повышается при этом в десятки и сотни раз. Поэтому **микроорганизмы рассматриваются практически неограниченным источником ферментов.**

Устройства, в которых осуществляются биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, ферментов или экстрактов клеток, называют биореакторами. Биореакторами или своеобразными «биологическими фабриками» могут рассматриваться также отдельные микроорганизмы (рис. 117), грибы или растения.

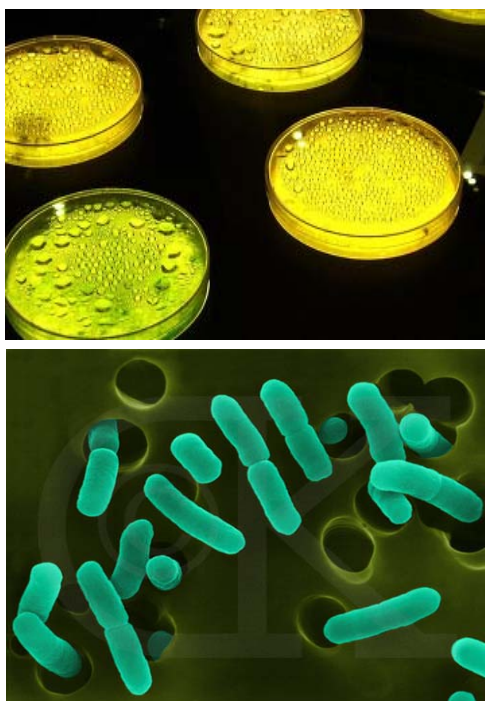


Рис. 117. Бактерии, растущие на специальных питательных средах и производящие ферменты, рассматриваются как самостоятельные биореакторы

Часто термин «биореактор» относят к сосуду (емкости), в котором растут микроорганизмы (рис.118). Такой **биореактор может содержать либо большое количество живых клеток, либо смесь реагентов и ферментов.**



Рис. 118. Опытный (слева) и промышленный (справа) биореакторы

Большинство биокаталитических процессов протекает в водной среде. При добавлении органических растворителей ферменты утрачивают свои свойства. **Можно ли найти способ превращения с помощью ферментов органических соединений, которые не растворимы в воде?**

Для решения проблемы учеными проведены серии опытов. В ходе них было обнаружено, что если раствор полностью обезвожить, сохранив лишь органический растворитель, то структура и свойства ферментов в нем сохраняются. Затем исследователями были «сконструированы» специальные микроорганизмы. **С помощью методов генетической инженерии микроорганизмам придали свойства производить ферменты в органических растворителях.** Такие микроорганизмы успешно используются в обезвреживании (расщеплении) органических загрязнителей среды, которые не растворяются в воде.

8.4 Биореакторы в производстве биотоплива

Ограниченность запасов углеводов вынуждает ученых многих стран мира активно искать новые способы получения топлива. В том числе такие, которыми можно получать биотопливо с участием живых организмов. По их мнению, к 2050 году биотопливо будет составлять более четверти производимого в мире топлива. **Какие же организмы наиболее подходят для получения биотоплива?**

Внимание ученых привлекли **сине-зеленые бактерии, отличающиеся высокой продуктивностью и простотой культивирования.** В молекулу ДНК сине-зеленых бактерий ученые встроили методом генетической инженерии

рии ген, контролирующей продукцию больших количеств этилового спирта (этанол).

Наряду с этим геном в ДНК этих же бактерий был внедрен второй ген, названный «генетическим переключателем». Он ограничивает естественную тенденцию сине-зеленых бактерий к максимальному росту и размножению. С помощью этого гена ученые позволяют бактериям делиться лишь несколько дней. Затем посредством «генетического переключателя» тормозят размножение бактерий, переключая их на производство этанола. Это позволяет добиться максимального выхода этанола при минимальной биомассе бактерий.

Специально для таких бактерий были сконструированы **фотобиореакторы**. Они не нуждаются в постоянном притоке свежей воды и занимают небольшое пространство (рис. 119).

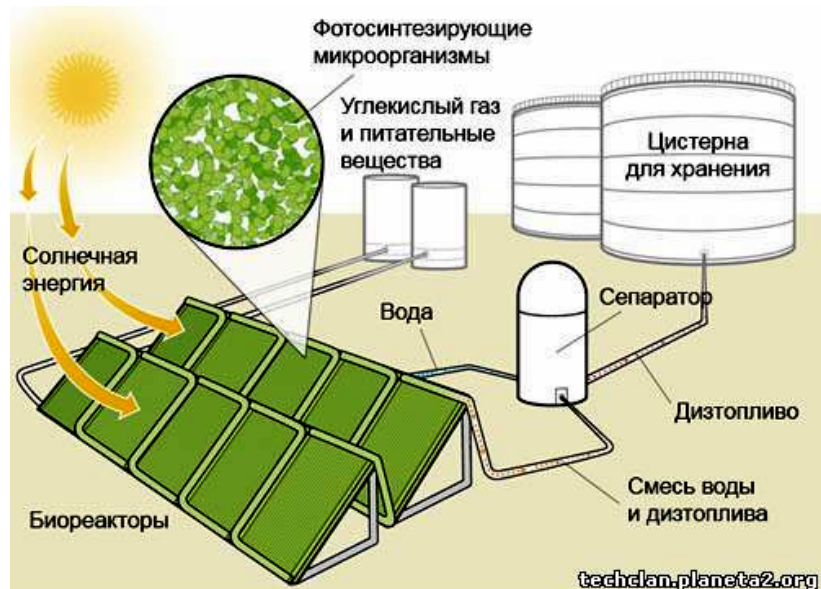


Рис. 119. Система биореакторов «топливная ферма» поглощает солнечный свет и, потребляя углекислый газ и питательные вещества, производит биотопливо в ходе фотосинтеза.

Сепаратор разделяет продукты жизнедеятельности сине-зеленых бактерий, отбирая дизельное топливо и возвращая воду обратно в систему

Сине-зеленые бактерии в процессе фотосинтеза непрерывно вырабатывают и выделяют биотопливо в окружающую их жидкую среду. Специальный сепаратор регулярно отделяет биотопливо от остальных веществ. Оставшиеся после отбора биотоплива вода и другие вещества возвращаются обратно в систему биореакторов. Такая система биореакторов, получившая оригинальное название «топливная ферма», отличается высокими экономическими и экологическими характеристиками. В том числе и в сравнении с другими биотехнологиями производства биотоплива.

Можно ли использовать для производства биотоплива анаэробные бактерии, обитающие в бескислородной среде? Такой вопрос заинтересовал ученых в связи с тем, что в ходе жизнедеятельности анаэробных бактерий выделяется водород. К бактериям-анаэробам относятся кишечная палочка, энтеробактер (рис. 120) и другие. Водород выделяется наиболее интенсивно в тех случаях, когда бактерии расщепляют глюкозу. Иными словами, когда в роли субстрата для действия микробных ферментов выступает глюкоза.

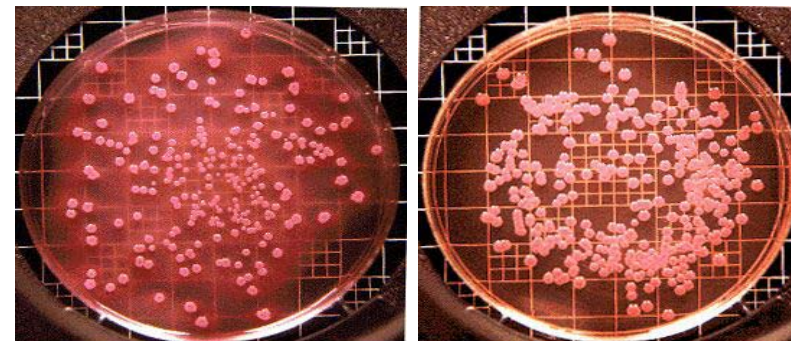


Рис. 120. Процесс расщепления субстрата бактериальными ферментами с выделением водорода. Бактерии кишечная палочка (слева) и энтеробактер (справа) культивируются на питательной среде в чашках Петри

Кишечная палочка и энтеробактер рассматриваются как потенциальные природные биореакторы, которые могут производить водород для топливных элементов. При этом эти бактерии не выделяют сероводород, являясь, в определенной степени, примером экологически чистого производства топлива.

Водород выделяют также другие обитатели анаэробной среды — бактерии клостридий. В отличие от кишечной палочки и энтеробактера, клостридий вырабатывает и выделяет в среду сильнодействующие яды. Последние обуславливают развитие таких опасных болезней как столбняк, ботулизм и газовая гангрена. Поэтому клостридий не рассматривается в качестве возможного промышленного производителя водородного топлива.

8.5. Получение наночастиц в естественных биореакторах

Наряду с ферментами с помощью биотехнологий получают аминокислоты, витамины, органические кислоты, антибиотики, вакцины, сыворотки. **Как получить с помощью естественных биореакторов (бактерий) наночастицы?**

Для решения указанной проблемы ученые отобрали специальный вид бактерий — магнетотактильные бактерии. Подбирая опытным путем определенные условия среды, исследователи достигли успеха: бактерии синтезируют

вали и накапливали наночастицы магнетита (Fe_3O_4). Варьируя условия культивирования бактерий, исследователи получали наночастицы различного размера. Не менее важным обстоятельством для общего успеха эксперимента оказалось то, что наночастицы магнетита накапливались в цитоплазме бактериальных клеток. Поэтому наночастицы можно легко выделять из раствора.

Следующий шаг в решении проблемы получения наночастиц с использованием бактерий был сделан после изучения ДНК магнетотактильных бактерий. **Ученые установили структуру генов магнетотактильной бактерии, которые контролируют синтез наночастиц.** Используя методы генетической инженерии, теперь можно направленно изменять ДНК бактерий и, следовательно, параметры синтезируемых бактерией наночастиц. Получаемые таким образом наночастицы могут найти самое разнообразное применение:



- в системах разделения клеток (клеточной сепарации) и выделения нуклеиновых кислот;
- в контроле за адресной доставкой лекарств;
- в медицинской диагностике с использованием иммунохимии.

8.6. Бактерии-биореакторы управляют процессами жизнедеятельности и здоровьем человека

Со времен Пастера известно, что желудочно-кишечный тракт человека, по существу, является биореактором проточного типа, в котором обитает множество микроорганизмов. Около ста лет назад российский ученый, лауреат Нобелевской премии И.Н. Мечников предложил удаление толстого кишечника как один из способов продления жизни. А тем, кому эта мера казалась слишком радикальной, он рекомендовал пить как можно больше кефира, чтобы вытеснить вредных микробов полезными молочнокислыми бактериями.

Изменилось ли отношение ученых к бактериям кишечника спустя столетие? Изменилось, к тому же довольно существенно. Так было установлено, что в толстом кишечнике человека обитает около 100 триллионов бактериальных клеток – примерно в 10 раз больше общего числа клеток тела человека (рис. 121). По сути, в организме человека «микробного» оказалось в 10 раз больше, чем собственно «человеческого».

Набор генов, входящих в состав бактериальных сообществ кишечника, примерно в 100 раз превышает набор генов человеческого организма. В свою очередь, объем биохимических реакций, протекающих внутри кишечной популяции бактерий, многократно превышает объем реакций в организ-

ме человека. Несметное количество бактериальных «реакторов» осуществляют в организме хозяина тысячи биохимических реакций, поддерживают важнейшие обменные процессы. Те процессы, которые организм человека не способен поддерживать самостоятельно: синтез аминокислот, многих витаминов и биологически активных веществ, разложение опасных ядов.

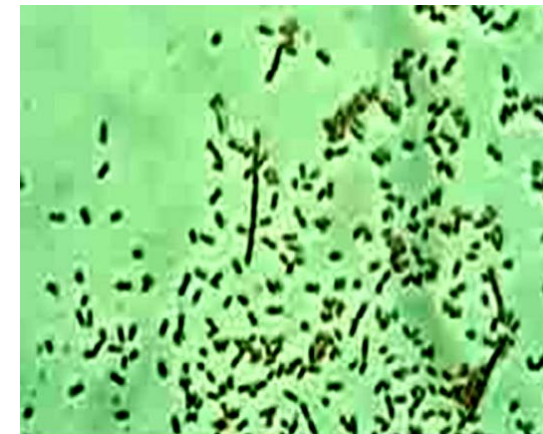
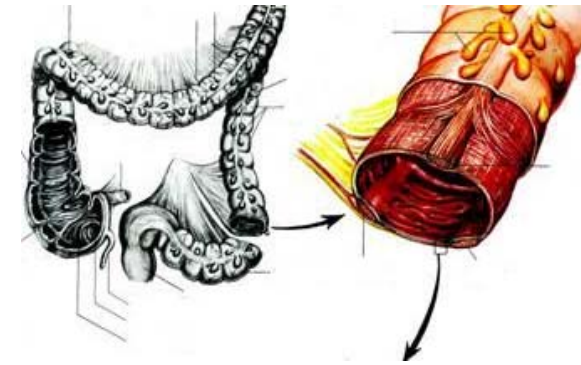


Рис. 121. Толстый кишечник человека (верхний снимок) является местом обитания для 100 триллионов бактерий-биореакторов (микрофото внизу)

Зависит ли население бактерий-биореакторов кишечника от индивидуальных качеств человека? Поиском ответа на этот вопрос занялась группа американских биологов под руководством П. Брауна из Стэнфордского университета. Ученые исследовали формирование бактериальной флоры у новорожденных младенцев на протяжении длительного периода. Они установили, что индивидуальные, в том числе наследственные, особенности человека оказывают большое влияние на видовой состав бактерий его кишечника.

Исследования, проведенные в лаборатории университета Вашингтона (США), позволили обнаружить связь между видовым разнообразием бактерий

желудочно-кишечного тракта и особенностями обмена веществ индивидуума. Кроме этого, авторам удалось показать принципиальную схожесть микрофлоры кишечника у страдающих ожирением людей и ожиревших мышей. Это открывает новые перспективы в решении проблемы избыточного веса путем формирования здоровой микрофлоры у людей, страдающих ожирением.

Таким образом, **бактерии-биореакторы кишечника человека осуществляют важные биохимические реакции**, перераспределяют энергетические потоки и, по существу, управляют процессами жизнедеятельности организма человека. При этом популяции бактерий изменяются под воздействием среды и самовосстанавливаются при неблагоприятных внешних воздействиях. Этим **бактерии-биореакторы повышают приспособляемость организма человека к изменениям среды и, тем самым, улучшают его здоровье в целом.**

8.7. Биореакторы в космических полетах

В будущих полетах к Марсу и другим далеким космическим объектам не обойтись без биореакторов, непрерывно производящих пищу и топливо. Так считают американские исследователи из НАСА Дж. Камберс и К. МакКей. Они обращают внимание на бактерии, подобные ацидофильным, которые по своей природе не способны вызывать заболевания. Такие бактерии не являются опасными для космонавтов. Не представляют они угрозу и для «чужих» миров с точки зрения «заражения» их несвойственными микробами.



Исследователи НАСА полагают, что бактерию, пригодную для полета на Марс, придется специально «конструировать». **Каким образом можно создать бактерию, идеальную для практического применения в космическом полете?**

Ученые предлагают осуществить это **путем генетической инженерии**. Они намерены, в частности, «извлечь» необходимые гены из ДНК различных видов существующих бактерий и «смешать» их в одном виде «конструируемой» бактерии. В первую очередь это должны быть **гены, способные производить биотопливо, съедобный белок и обеспечивать приспособленность к определенным условиям космоса**. Например, к марсианским условиям, отличающимся отсутствием кислорода, жестким ультрафиолетовым излучением и крайне низкой температурой.

Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Д. Камберс с коллегами сумели получить методом генетической инженерии холодоустойчивый искусственный вид (штамм) обыкновенной кишечной палочки. Для этого им пришлось из бактерий, живущих в приполярных льдах, выделить ген, кон-

тролирующий синтез особых «упаковочных» белков шаперонов. Эти белки обеспечивают формирование правильной трехмерной структуры остальных клеточных белков.

Выделенный ген был встроен в ДНК обыкновенной кишечной палочки. Полученная искусственная (гибридная) кишечная палочка прекрасно переносит такой холод, на котором ее «дикий сородич» погибает.

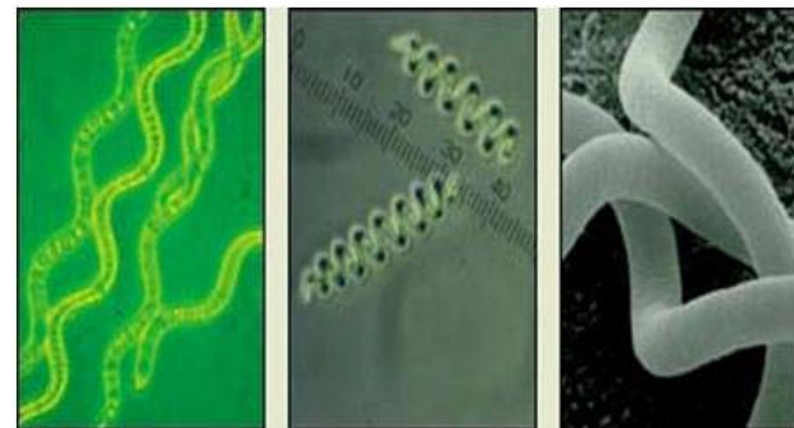


Рис. 122. Сине-зеленая бактерия (старое название – водоросль) спирулина. Фотоснимки (слева-направо) сделаны при малом, среднем и большом увеличении

Ученые планируют провести подобные опыты с **сине-зеленой бактерией спирулиной** (рис. 122). Она является очень продуктивным производителем белка, содержащего все необходимые человеку аминокислоты. Однако спирулина обитает в теплых морских водах и приспособить ее к суровым условиям Марса представляется нелегкой задачей.

Эти и другие трудности не могут остановить целеустремленно работающих ученых. Ведь **если удастся получить хотя бы один вид бактерии-биореактора, способного самостоятельно жить и размножаться на марсианской орбите и постоянно обеспечивать космонавтов пищей и биотопливом, это станет научным достижением века.**

Словарь основных терминов

Активный центр фермента – часть молекулы фермента, ответственная за присоединение и превращение субстрата. Структура активного центра соответствует химическому строению субстрата, благодаря чему достигается специфичность действия ферментов.

Апофермент – белковый компонент фермента; свойства фермента апофермент приобретает лишь соединившись с коферментом.

Биокатализ – превращения веществ при участии ферментов.

Биореактор – устройство, в котором протекают биохимические реакции при участии живых микроорганизмов, клеточных экстрактов или ферментов.

Биотехнология – использование живых организмов и биологических процессов в производстве.

Биотопливо – топливо, вырабатываемое живыми организмами.

Индукцибельный (адаптивный) фермент – фермент, появляющийся в организме лишь в присутствии субстрата его действия.

Конститутивный фермент – фермент, постоянно присутствующий в организме, независимо от наличия субстрата.

Кофермент – небелковый компонент фермента, вещество низкомолекулярной природы (молекула витамина, нуклеотид, ион металла). Приобретает свойства фермента лишь соединившись с апоферментом.

Микрофлора – совокупность микроскопических организмов, обитающих в органе (например, в толстой кишке) или в определенной экосистеме.

Нанобиореакторы – живые организмы, используемые для получения наночастиц.

Наночастицы – объекты, у которых три линейных размера находятся в диапазоне от 1 до 100 нм. Часто к наночастицам относят объекты, у которых хотя бы одно измерение не превышает 100 нм.

Субстрат – вещество, химическое превращение которого происходит при участии фермента.

Ферменты – биологические катализаторы химических реакций в живых системах, вещества белковой природы. С участием ферментов реализуется генетическая информация и осуществляются все процессы обмена веществ и энергии в живых организмах.

Шапероны (упаковочные белки) – белки, которые обеспечивают формирование нормальной пространственной структуры всех белков клетки; шапероны восстанавливают нормальную пространственную структуру других белков после их денатурации.

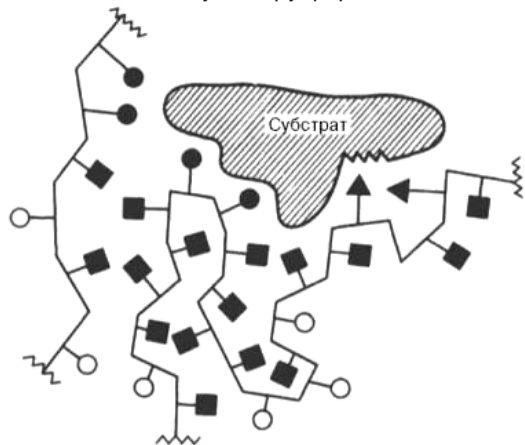
Вопросы для повторения

1. Охарактеризуйте биологическую роль ферментов.
2. В каких органоидах (частях) клетки располагаются ферменты?
3. Что представляет собой апофермент?
4. Какие вещества могут выступать в роли кофермента?
5. Какое вещество, участвующее в биохимических превращениях, называют субстратом?
6. Что представляет собой активный центр фермента?
7. Что происходит с субстратом после образования фермент-субстратного комплекса?

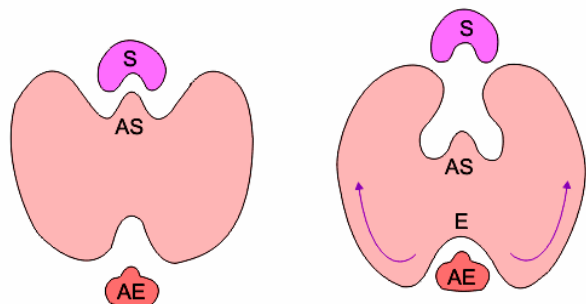
8. Какие ферменты называют конститутивными?
9. С чем связано появление и исчезновение в клетке индуцибельных (адаптивных) ферментов?
10. Охарактеризуйте применение ферментов в различных отраслях производства.
11. Для каких целей используются ферменты в медицине?
12. Что может являться источником промышленного получения ферментов?
13. Какие устройства называют биореакторами?
14. Какие живые организмы можно назвать биореакторами?
15. Каким образом ученые решили проблему расщепления ферментами органических загрязнителей среды, которые не растворяются в воде?
16. Какие бактерии производят (выделяют) водород?
17. Какие виды бактерий могут использоваться в качестве биореакторов, производящих водородное топливо?
18. Бактерии какого вида, производящие водород, не могут использоваться в качестве реакторов? Ответ объясните.
19. Какие бактерии могут синтезировать наночастицы?
20. Каким образом можно изменить размеры (параметры) синтезируемых бактериями наночастиц магнетита?
21. Охарактеризуйте возможное применение наночастиц, синтезируемых бактериями.
22. Каково количественное соотношение бактериальных клеток и собственных клеток тела в организме человека?
23. Объясните значение бактериальных биореакторов толстого кишечника для организма человека.
24. Каким образом бактериальные биореакторы могут управлять жизнедеятельностью и здоровьем человека?
25. От чего может зависеть видовой состав бактерий, заселяющих организм человека?
26. Почему исследователи космоса заинтересовались бактериями?
27. Какими биологическими свойствами должны обладать бактериальные биореакторы, чтобы стать обитателями космического корабля, отправляющегося к Марсу?
28. Каким образом ученые планируют придать бактериям одного вида все те свойства, которые необходимы для дальних космических полетов?
29. Почему теплолюбивая сине-зеленая бактерия спирулина заинтересовала исследователей космоса как возможный обитатель космического корабля, который отправится к чрезвычайно «холодному» Марсу?

ЗАДАНИЯ

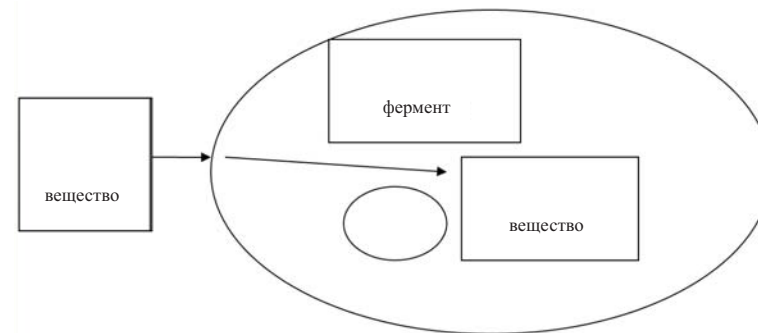
Задание № 1. Нарисуйте приведенную ниже схему в тетради. Обозначьте на схеме фермент. Найдите, какая часть фермента может являться его активным центром. Обведите пунктирной линией все структуры, которые могут быть отнесены к активному центру фермента.



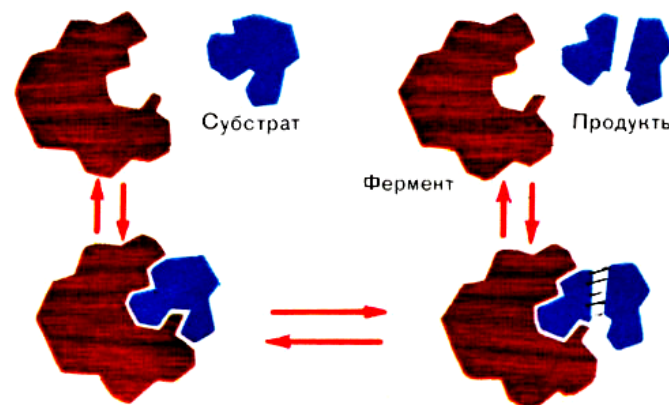
Задание № 2. На схеме изображен процесс, в котором принимают участие апофермент (AS), кофермент (AE) и молекула субстрата (S). Объясните сущность этого процесса. Нарисуйте схему в тетради и опишите процесс, который она иллюстрирует. Почему форма апофермента различается на двух рисунках схемы? Найдите на обоих рисунках схемы активный центр фермента и обведите его контуры. Объясните роль активного центра фермента в процессе, изображенном на схеме.



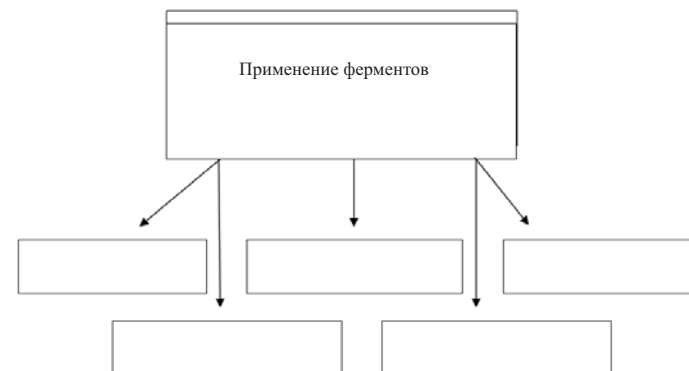
Задание № 3. Зарисуйте приведенную ниже схему в тетради. Напишите названия вещества и двух видов ферментов. Первый вид фермента присутствует в клетке постоянно, второй вид фермента образуется только при воздействии на клетку определенного вещества. Как называется это вещество?



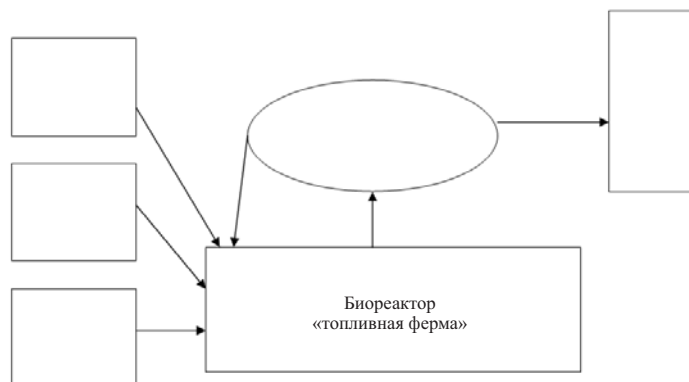
Задание № 4. Объясните сущность процессов, которые схематически изображены на приведенной ниже схеме. Зарисуйте схему в тетради и обозначьте на ней все структуры, включая две неподписанные.



Задание № 5. Нарисуйте приведенную ниже схему в тетради и завершите ее выполнение, указав отрасли производства, в которых применяются ферменты.



Задание № 6. Пользуясь текстом и рисунком раздела 8.4, завершите в тетради выполнение схемы биореактора «топливная ферма».



Задание № 7. Проанализируйте работу ученых по созданию синезеленой бактерии, производящей биотопливо этанол (раздел 8.4). Выделите ключевые этапы этой работы. Какой метод использован учеными на обоих ключевых этапах работы? Составьте свой план «наноконструирования» синезеленой бактерии, производящей метанол? Обязательным условием успешного завершения такого наноконструирования должно явиться максимальное производство метанола при минимальной массе культивируемых в биореакторе синезеленых бактерий «сконструированного» вами вида (штамма).

Задание № 8. Известно, что условия на планете Марс характеризуются отсутствием кислорода, жестким ультрафиолетовым излучением и крайне низкой температурой. Тем не менее, американских ученых, занимающихся подготовкой полета на Марс, заинтересовала теплолюбивая бактерия спирулина (изображена на рисунке). Они рассматривают спирулину в качестве бактерии-биореактора для полета на Марс. Чем это можно объяснить? Каким образом теплолюбивой спирулине можно придать устойчивость к марсианскому холоду и способность производить биотопливо? Составьте свой план «конструирования» из спирулины бактерии-биореактора для марсианского путешествия. Обоснуйте этапы вашего конструирования.



Задание № 9. Американские исследователи НАСА, работающие над подготовкой полета на Марс, обратили внимание на бактерии, подобные ацидофильным. Такие бактерии по своей природе не способны вызывать

заболеваний, а потому не опасны для космонавтов. Не представляют они угрозу и для марсианской биосферы с точки зрения «заражения» ее несвойственными микробами. Пользуясь материалом раздела 8.7, составьте свой план экспериментов по созданию из термофильной бактерии молочнокислая палочка (изображена на рисунке) нового вида бактерии-биореактора для космического полета к Марсу.



Задание № 10. Используя доступные вам источники информации, подготовьте краткое сообщение (реферат) на одну из тем:

- 1) Строение и биологическая роль ферментов.
- 2) Синтез ферментов микроорганизмами.
- 3) Практическое применение ферментов в медицине.
- 4) Бактерии-биореакторы в жизнедеятельности организма человека.
- 5) Биореакторы для космических полетов

Задание № 11. Создайте информационную базу об использовании биореакторов и биокатализаторов (ферментов) в нанобиотехнологиях.

Литература

- Березов Т.Т. Применение ферментов в медицине / Т.Т. Березов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 3. – С. 23-27.
- Волькенштейн М.В., Догонадзе Р.Р., Мадумаров А.К., Урушадзе З.Д., Харкац Ю.И. Теория ферментного катализа / Молекулярная биология. 1972. 431–439.
- Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
- Грин Н. Биология: в 3 т.: пер. с англ. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор; под ред. Р. Сопера. – М.: Мир, 1996.
- Диксон, М. Ферменты: в 3 т.: пер. с англ. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т.1-2. – 808 с.
- Евтушенков А.Н. Введение в биотехнологию: курс лекций / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Мн: БГУ, 2002. – 105 с.
- Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 208 с.
- Иванов В.И. Как работают ферменты / В.И. Иванов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 9. – С. 25-32.

Кислухина О. В. Ферменты в производстве пищи и кормов. – М.: ДеЛи принт, 2002.

Лещинская И.Б. Современная промышленная микробиология / И.Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 4. – С. 14-18.

Раков Э.Г. Микробы на службе нанотехнологии / Э.Г. Раков // Химия. Издательский дом «Первое сентября». – 2004. – № 7 (режим доступа: <http://www.him.1september.ru>).

Сыч В.Ф. Введение в нанотехнологии. Элективный курс в программу биологии: учебное пособие для 10-11 классов средней общеобразовательной школы // Сыч В.Ф., Дрождина Е.П., Курносова Н.А. и др. – Ульяновск: УлГУ, 2008. – 100 с.

Ферменты микроорганизмов. – Казань: Унипресс, 1998.

Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. – М., 1980.

Чернов Н.Н. Ферменты в клетке и пробирке / Н.Н. Чернов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 5. – С. 28-34.

Koshland D. The Enzymes. – New York, Acad. Press, 1959. – VI, Ch.7.

Интернет-сайты:

www.him.1september.ru

vechnayamolodost.ru/pages/drugienaukiozhizni/glubokouvazhaemiy_mikrob

fortunita.narod.ru

www.gazeta.ru/archive.shtml?page=1&start=19.08.2008 <http://aquainfo.ucoz.ru/spirulina.jpg>

fo.ucoz.ru/spirulina.jpg

aquainfo.ucoz.ru/spirulina.jpg

www.popmech.ru/article/7005-toplivnaya-ferma/scoreid/30791/

coyoteuss.livejournal.com/50426.html

dabao.info/secrets_nature.htm

ekb.tiu.ru/pc216-c52338-p2-fastfood.html

ГЛАВА 9. Проблема безопасности наноматериалов и нанотехнологий

9.1. Особенности влияния наночастиц на живые организмы

Наночастицы (частицы вещества размером 1-100 нм) гораздо меньше размеров живых клеток. Они обладают уникальными физическими и химическими свойствами. **Как поведут себя наночастицы, вступив в контакт с живыми клетками?**

Из-за малых размеров наночастицы обладают высокой проникающей и реакционной способностью. Они довольно легко проникают через биологические ткани и стенку кровеносных сосудов, формирующих так называемый тканево-кровяной барьер (рис. 123).

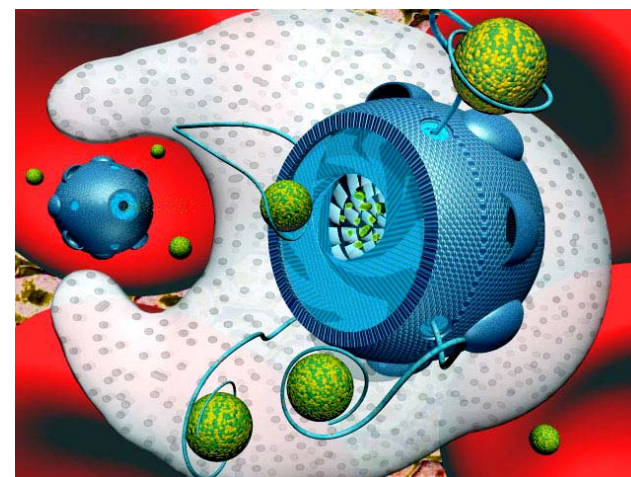


Рис. 123. Наночастицы, проникшие через тканево-кровяной барьер, захватываются клеткой

Барьер, призванный защитить органы и ткани от чужеродных веществ и регулировать постоянство состава внутренней (межклеточной) среды организма. **Тканево-кровяной барьер оказывается беспомощным перед наночастицами**, что может представлять опасность для иммунной системы и всего организма человека (рис. 124) Наночастицы захватываются клетками и попадают в органеллы клетки (митохондрии, ядро и др.). Поэтому новые наноматериалы могут проявлять (или приобретать в организме) непредсказуемые токсикологические и экологические свойства. Необходимо заблаговременно выявлять и оценивать связанные с ними биологические и экологические риски.

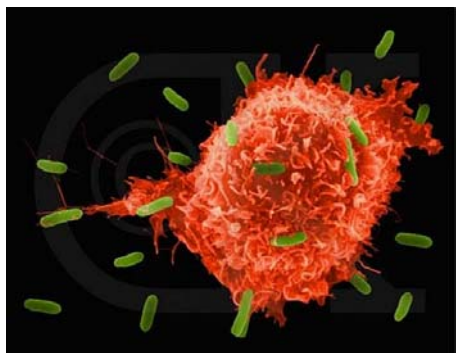


Рис. 124. Наночастицы адсорбируются на поверхности клетки иммунной системы

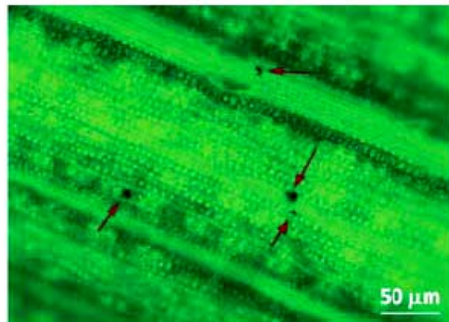


Рис. 125. Лист «второго поколения» риса, выращенного из семян, которые не обрабатывались наночастицами углерода (стрелками указаны агрегаты наночастиц углерода)

Как долго могут сохраняться наночастицы после проникновения в живой организм? Ученые из университета Клемсон (США) представили первое свидетельство накопления и сохранения углеродных наночастиц в рисе, которым питается более половины населения земного шара. Семена риса проращивали в растворе, в который предварительно добавили наночастицы углерода C_{70} . Уже через неделю после проращивания наночастицы углерода были обнаружены в корнях, стеблях и листьях. Через 6 месяцев из таких растений были собраны семена риса, которые проращивали уже в нормальных условиях, не добавляя

наночастицы углерода C_{70} . Вопреки прогнозам ученых, в выращенных в нормальных условиях растениях второго поколения были обнаружены агрегаты наночастиц углерода черного цвета (рис. 125). Следовательно, оказавшись в живом организме, наночастицы углерода проявляют высокую «живучесть», продолжая свое существование и в потомках следующего поколения.

Какими конкретными свойствами обусловлена опасность наночастиц?

К ним в первую очередь следует отнести следующие: 1) чрезвычайно большое отношение площади поверхности наночастиц к объему; 2) высокую реакционную способность; 3) повышенную растворимость наночастиц; 4) высокие каталитические и адсорбционные свойства наночастиц; 5) способность наночастиц к накоплению (аккумуляции) в окружающей среде и пищевых цепях; 6) возможность проникновения наноматериалов через тканевые барьеры в печень, мозг, легкие, почки и другие важнейшие органы жизнеобеспечения; 6) способность наночастиц встраиваться в биологические мембраны, нарушая их проницаемость; 7) низкую способность наночастиц к биологическим превращениям в клетках и значительно сниженное выведение из организма; 8) способность наноструктур накапливаться в клетках, тканях и органах; 9) непредсказуемый характер взаимодействия наночастиц с биомолекулами и субклеточными структурами.

На протяжении всей своей истории человечество «купалось» в морях и океанах наночастиц, извергаемых вулканами, поднимаемых в атмосферу пыльными бурями пустынь, создаваемых микробами, растениями, грибами и животными в воде и на суше. В течение двух последних веков к наночастицам естественного происхождения лавинообразно и необратимо добавлялись наночастицы, выбрасываемые в атмосферу, воду и почву различными горнорудными, металлургическими, химическими и др. производствами, а также дорожным покрытием и автотранспортом. И только сейчас с развитием нанотехнологий на это обратили внимание. Учеными установлены факты связывания и переноса наночастицами некоторых особо опасных продуктов горения. В проведенных медико-экологических исследованиях получены доказательства влияния твердых пылевых частиц на здоровье человека. Длительное воздействие таких частиц увеличивает риск сердечно-сосудистых и ряда других заболеваний.

Зависит ли опасность наночастиц от их конкретных размеров? Для ответа на этот вопрос были проведены специальные исследования. В ходе них установлено, что токсичность наноматериалов напрямую связана с их размерами: **чем меньше размер наноматериала, тем больше его удельная площадь и тем больше степень токсичности материала.** Так, наночастицы золота



размером 0,8 нм оказались более токсичными для эмбрионов лабораторных животных, чем наночастицы размером 1,5 нм. В то же время способность вызывать уродства и другие отклонения в развитии организма у тех и других примерно одинакова.

Наночастицы серебра размером 5-50 нм губительно действуют не только на бактерии, но и на клетки печени лабораторных крыс. Их токсичность связана с нарушением функций митохондрий и увеличением проницаемости клеточной мембраны. Однако ингаляционное воздействие наночастицами серебра на лабораторных крыс в концентрации $1,73 \cdot 10^4 - 1,23 \cdot 10^6$ частиц/см³ в течение 28 дней не вызвало у них значимых изменений в массе тела и биохимических показателях периферической крови. Это соответствует требованиям американской конференции (ACGIH), установившей **предельно допустимую концентрацию наночастиц серебра в воздухе – $2,16 \cdot 10^6$ частиц/см³.**

Исследования токсичности наночастиц кадмия, хрома, меди, никеля и цинка проведены на водной культуре дафний. Они показали, что медь и цинк проявляют похожую токсичность, которая усиливается при низких значениях рН (водородного показателя). При этом добавление в среду тиосульфата натрия снижало токсическое воздействие наночастиц меди.

9.2. Источники и основные пути поступления наночастиц в организм человека

Основными техногенными источниками наночастиц, попадающих в окружающую среду, а затем и в организм человека, являются:

1) пылевидные выбросы горнорудных и промышленных предприятий в атмосферу;

2) сточные воды и твердые отходы различных производств;

3) специально производимые и используемые человеком наноматериалы и вещества, содержащие наночастицы.

Как отмечают ученые, важно делать **различия между свободными и зафиксированными наночастицами**. Фиксированные на определенных местах наночастицы представляют намного меньше угроз из-за своей неподвижности.

Каким образом наночастицы попадают в клетки органов человека?

Основными путями поступления наночастиц в организм человека являются:

1) органы дыхательной системы (носовая полость, носоглотка, трахея, бронхи, бронхиолы, легочные альвеолы), из которых наночастицы проникают в кровь легочных капилляров (рис. 126) и далее в кровяное русло малого круга кровообращения организма; переносимые по воздуху наночастицы

двигаются конвекцией и диффузией; частицы такого размера осаждаются преимущественно в дыхательных путях путем диффузии.

2) органы пищеварительной системы (рот, глотка, пищевод, желудок, тонкий, толстый кишечник), из которых наночастицы поступают в кровяное русло большого круга кровообращения (рис. 127);

3) эпителий кожных покровов (эпидермис), из которого наночастицы проникают в кровеносные сосуды соединительнотканного слоя кожи (дермы) и далее в сосуды большого круга кровообращения (рис.128).

Затем **наночастицы накапливаются (аккумулируются) в органах-мишенях**. Соответственно путям поступления наночастиц в организм органами-мишенями становятся, в первую очередь, структуры и ткани дыхательной, пищеварительной систем и системы кожных покровов.

С кровью наночастицы могут заноситься в критические по возможным последствиям органы иммунной, нервной, кроветворной и репродуктивной систем, накапливаясь в их клетках.

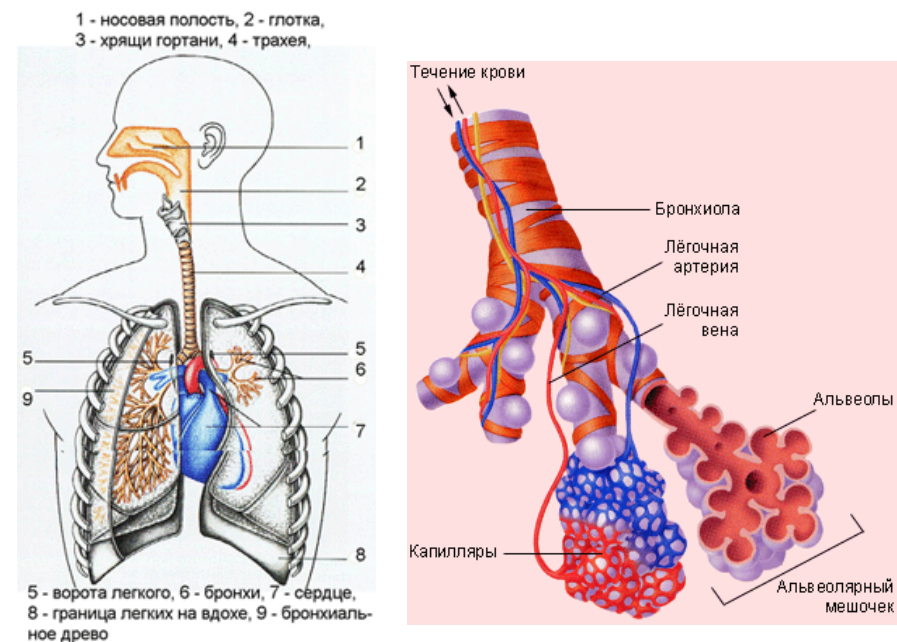


Рис. 126. Органы дыхательной системы – один из основных путей проникновения наночастиц в организм человека (описание в тексте)

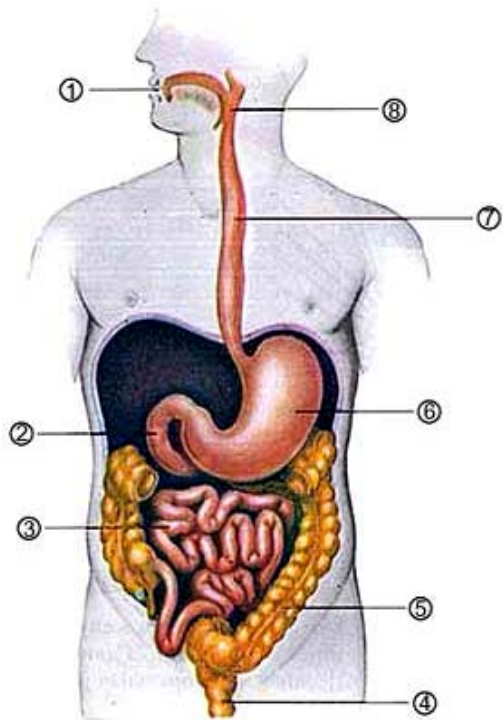


Рис. 127. Органы пищеварительной системы, из которых наночастицы проникают в кровеносные сосуды большого круга кровообращения: 1 – ротовая полость; 2 – двенадцатиперстная кишка; 3 – тонкий кишечник; 4 – прямая кишка; 5 – толстый кишечник; 6 – желудок; 7 – пищевод; 8 – глотка

9.3. Механизмы действия наночастиц на живой организм

Что происходит с наночастицами, оказавшимися в крови или другой биологической жидкости? Наночастицы, попавшие в кровь, лимфу, желудочный сок или любую другую биологическую жидкость, покрываются своеобразной «коронай». «Корона» – это слой белков, находящихся в биологической жидкости и адсорбирующихся на поверхности частицы. Как следствие взаимного влияния, изменяются при этом и сами белки. Белки, окружающие наночастицу, могут подвергаться модификациям (рис. 129).

Отдельно следует заметить, что процесс формирования «короны» зависит от «предыстории» попавшей в живой организм наночастицы (нанотрубки, частицы диоксида железа, наногранулы полимера, липосомы). Еще до попадания в организм наночастица может содержать адсорбированные на ней молекулы: остатки от производственного процесса, атмосферные газы, промышленные стабилизаторы эмульсий, используемые для приготовления растворов наночастиц.

Основные белки, образующие «корону» – это альбумин, иммуноглобулины, фибриноген и липопротеины. Укрытие наночастицы этими белками во многом определяет ее дальнейшую судьбу – распределение между тканями и органами, скорость выведения из организма, поглощение клеткой с участием рецепторов мембраны. Белки и другие органические вещества увеличивают растворимость наночастиц, таких, например, как ZnO, CdSe, оксиды железа и алюминия).

Наночастицы, в свою очередь, могут влиять на молекулы белка, вызывая их агрегацию, окисляя боковые цепи, снижая ферментативную активность, изменяя трехмерную структуру. Это обстоятельство уже вызывает определённые опасения. В лабораторном эксперименте наночастицы оксида церия вызвали образование из микроглобулина β_2 фибрилл (микроволокон). Это может означать, что в определённых условиях возможен аналогичный процесс и в организме человека. Например, в мозгу это приведёт к развитию болезни Альцгеймера. Хотя следует отметить, что к настоящему моменту нет ни одного свидетельства, что наночастицы как-то участвуют в развитии нейродегенеративных заболеваний.

Наночастицы на основе металлов. Этот широко используемый вид наночастиц заслуживает особого внимания. В первую очередь это относится к оксиду титана, применяющемуся как в чистом виде, так и в составе наноматериалов. **Насколько безопасны наноматериалы на основе оксида титана?**

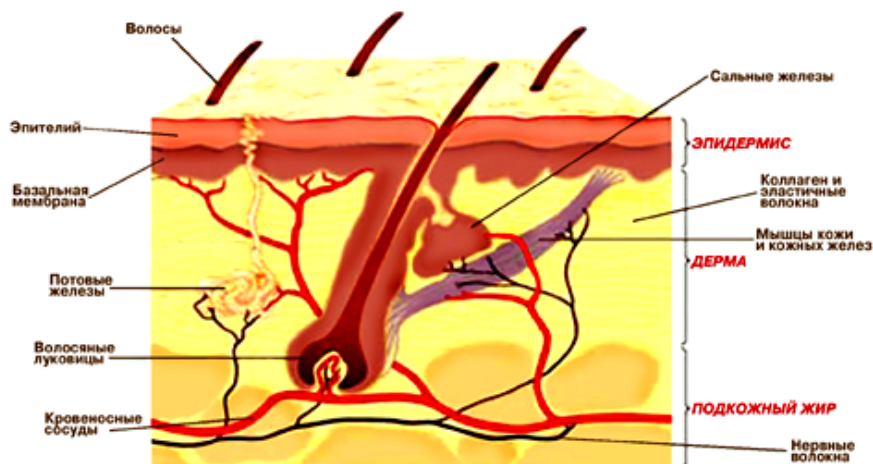


Рис. 128. Кожные покровы человека, через которые наночастицы проникают в кровеносные сосуды большого круга кровообращения

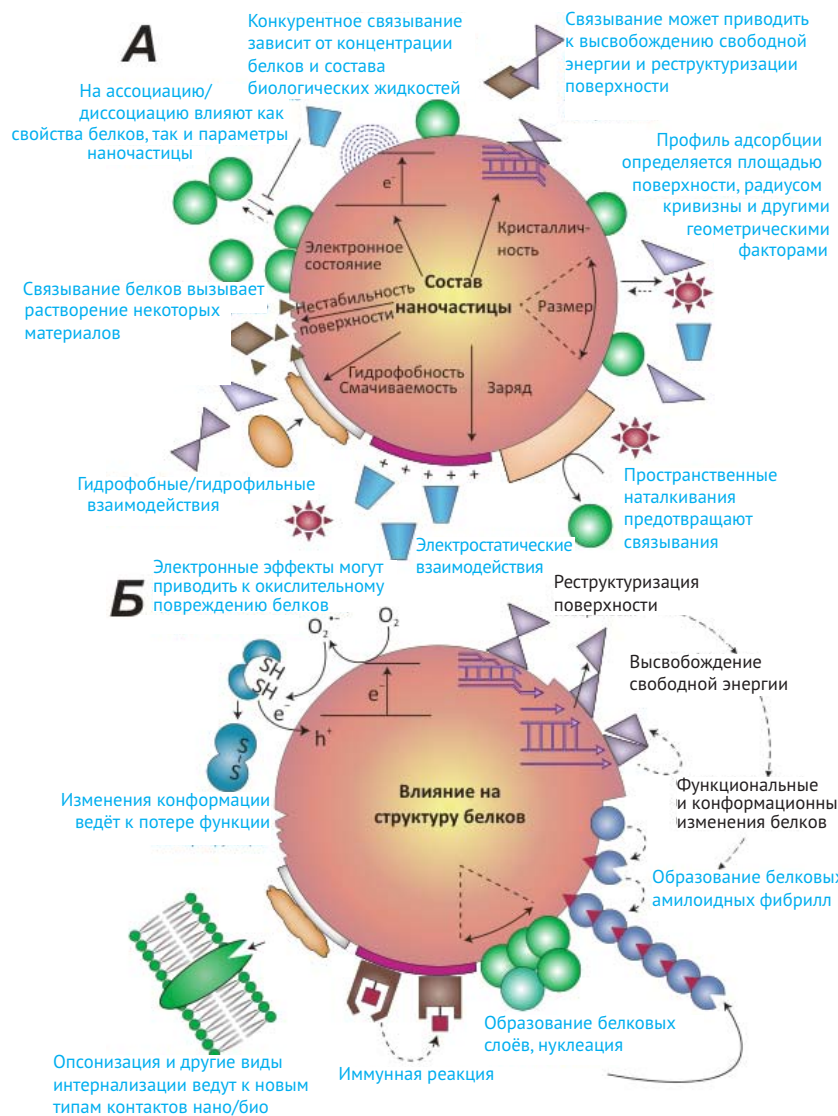
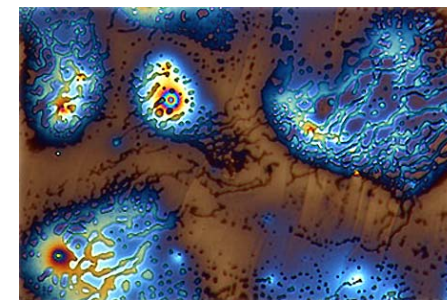


Рис. 129. Взаимное влияние белковой «короны» и наночастицы. Белковая «корона» – первое нанобиозвено, в котором участвует наночастица, попавшая в организм. «Корона» определяет дальнейшую «судьбу» наночастицы. Однако и молекулы белков модифицируются при контакте с частицей. А. Состав «короны» непрерывно изменяется. Он зависит от констант ассоциации/диссоциации, процессов конкурентного связывания, факторов, влияющих на адсорбцию, состава биологической жидкости, в которой находится наночастица. Б. Варианты модификации структуры и функций белков, вызываемые взаимодействием с наночастицей. В некоторых случаях такие взаимодействия изменяют конформацию белка: например, молекула лизоцима из куриного яйца «теряет» α -спираль, необходимую для ее каталитической активности. Разноцветные фигурки обозначают разные типы белков: заряженные, гидрофобные, белки с лабильной пространственной структурой, каталитически активные и образующие фибриллы (микроволокна) белки.

Токсикологические исследования наночастиц TiO_2 размером 20 нм проведены посредством ингаляционного введения в дыхательные пути лабораторных крыс. Обнаружено, что наночастицы оксида титана накапливаются в клетках иммунной и нервной систем. При этом они вызывают повреждение ДНК лимфоцитов и нервных клеток мозга. **Основным механизмом токсического действия наночастиц оксида титана является индукция атомарного кислорода.** Последний отличается высокой повреждающей активностью по отношению к биомолекулам. Эта активность зависит не только от размеров наночастицы, но и от тонкой структуры TiO_2 .

В специальных опытах изучались механизмы сильных токсических влияний на живые организмы наночастиц алюминия. Последние, как оказалось, подавляют синтез матричной РНК (мРНК) и вызывают деление клеток. При этом наночастицы алюминия нарушают функционирование митохондрий, ответственных за производство универсального клеточного топлива – АТФ. Тем самым **наночастицы алюминия вызывают изменения в энергетическом обмене клетки, отрицательно сказывающиеся на всех процессах ее жизнедеятельности.**



Токсичность наночастиц оксида ванадия (рис. 130) обусловлена их сильно выраженными каталитическими свойствами. Наночастицы размером менее 30 нм в концентрации выше 10 мкг/мл способны вызывать образование ОН-радикалов. Последние окисляют липиды, в том числе липиды биологических мембран и плазмалеммы клетки. Это, в свою очередь, вызывает **нарушение функций мембранных органоидов клетки и плазмалеммы**, что отрицательно влияет на все процессы жизнедеятельности клетки.

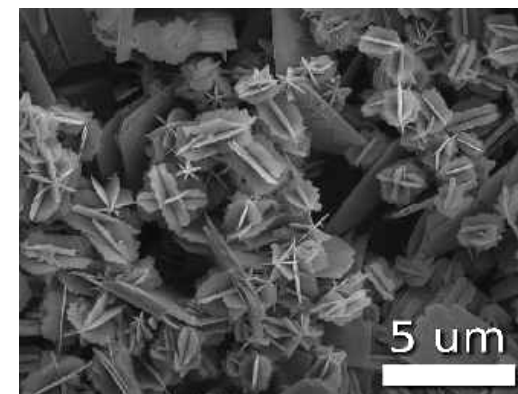


Рис. 130. Наночастицы оксида ванадия

Различается ли характер воздействия наночастиц металлов в зависимости от путей их проникновения в организм? Для ответа на этот вопрос учеными были проведены исследования на лабораторных мышах, крысах, крупном рогатом скоте, птицах, и рыбах. **Суспензии наночастиц железа вводились животным в первой серии опытов через рот.** Оказалось, что однократное введение мышам суспензии наночастиц железа через рот в дозе 50 (100 и 500) мкг/кг не вызывает каких-либо токсических эффектов. Только дробное введение доз 1000, 2000 и 5000 мкг/кг приводило к развитию воспалительного процесса в желудке и кишечнике, а также нарушениям кровотечения.

Во второй серии опытов наночастицы железа вводились животным через дыхательные пути ингаляционным способом. Воздействие наночастиц оксида железа размерами 22 и 280 нм на лабораторных крыс в дозах 0,8 и 20 мг/кг вызывало индукцию активных форм кислорода в клетках. При этом выявлялись отек и разрастание тканей легких, а также нарушения систем свертывания крови (рис. 131).

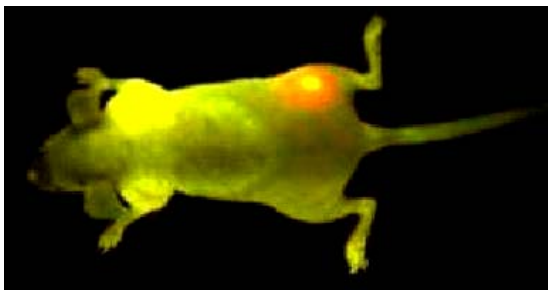


Рис. 131. Лабораторное животное после опыта второй серии (описание в тексте)

Следовательно, попадание наночастиц железа в организм через дыхательную систему представляет более значительную угрозу, чем их проникновение через пищеварительную систему.

Как скажутся на процессах жизнедеятельности небольшие дозы наночастиц, вводимые в организм регулярно на протяжении длительного времени? Сможет ли организм не только безболезненно адаптироваться к такому воздействию, но и приспособиться извлекать из этого пользу?

Для ответа на эти крайне интересные вопросы учеными были поставлены 3-месячные опыты. В ходе исследований было выявлено, что наночастицы железа в дозах 20 и 40 мкг/кг (микрограмм на 1 килограмм веса тела), потребляемые в течение 90 дней, никаких отклонений в организме не вызывают. Еще меньшие дозы наночастиц железа (2 – 6 мкг/кг) стимулируют рост животных, повышают бактерицидную активность сыворотки крови и увеличивают содержания белков в крови. Следовательно, на второй поставленный учеными вопрос в ходе исследований был получен утвердительный ответ.

Углеродные нанотрубки. В ходе исследований в культуре клеток (in vitro) лабораторных мышей и человека выявлена токсичность углеродных нанотрубок (рис. 132). **Каков механизм токсического воздействия нанотрубок на живые структуры?**

Учеными проведены специальные исследования на лабораторных животных. В ходе них установлено, что углеродные нанотрубки проникают через плазмалемму клеток кожного эпителия и аккумулируются в их цитоплазме. Клетки кожи, накапливая нанотрубки, погибают преждевременно.

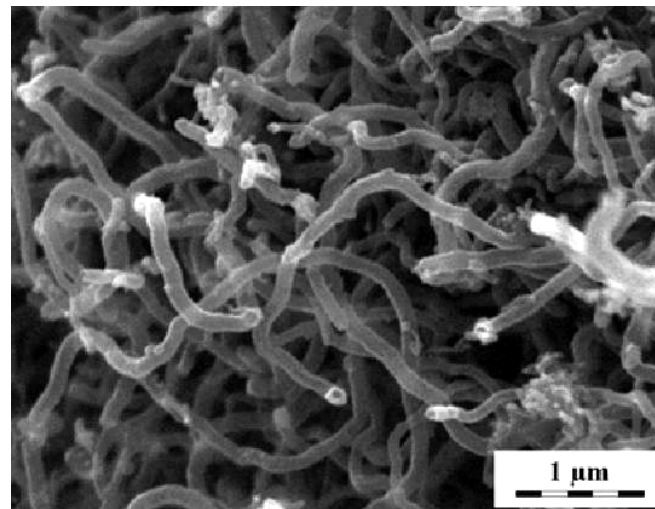


Рис. 132. Углеродные нанотрубки, токсичность которых испытывалась в культуре клеток и на лабораторных животных

При введении с пищей лабораторным животным растворимые в воде углеродные нанотрубки распределяются практически по всем тканям и органам. Одностенные углеродные нанотрубки в концентрациях 25, 50, 100 и 150 мкг/мл подавляют размножение эмбриональных клеток почки человека. Многостенные углеродные нанотрубки, проникая в ткани и органы, снижают жизнеспособность их клеток.

Как отреагируют на углеродные нанотрубки самые древние и самые примитивные клеточные существа Земли – прокариоты? В опытах исследователи использовали кишечную палочку со встроенным геном, выделенным из светящихся морских бактерий. Клетки бактерий смешивали с одностенными углеродными нанотрубками таким образом, чтобы в 1 мл водной суспензии присутствовали 1 млрд. клеток и 0,2 мг нанотрубок. Смесь выдерживали разное время при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от нанотрубок и рассматривали с помощью атомно-силового микроскопа.

После четырех суток инкубации с углеродными нанотрубками **поверхность бактерий оказывалась деформированной.** Бактерии частично утра-

чивали содержимое, из-за чего их микроскопическое изображение имело провал в средней части. **На 7-8-е сутки содержимое клеток вытекло полностью, и от бактерий оставалась только сплюснутая клеточная оболочка.**

Что конкретно оказывает столь пагубное воздействие на живые существа? Углерод как химическое вещество или же сама по себе трубнообразная наноструктура? Для решения проблемы были проведены дополнительные исследования. В ходе них исследователи убедились, что сам по себе материал (углерод), из которого изготовлены нанотрубки, не оказывает на клетки такого токсического действия. **Токсическими (бактерицидными) свойствами обладают именно наноструктуры в форме трубок.** Через двое суток инкубации с ними количество живых бактерий в суспензии сократилось вдвое, через 3 суток – более чем на порядок. Трубочатые структуры наночастиц механически разрушают бактериальную клеточную стенку, плазмалемму, вызывая в итоге гибель бактериальной клетки.

Что опаснее для живого организма: углеродные нанотрубки или городской воздух? Этим сравнением заинтересовалась группа исследователей из США. В ходе предпринятого ими исследования изучалось воздействие на свертываемость крови углеродных нанотрубок, смешанных углеродных наночастиц, а также образцов городского воздуха. Ученые обнаружили, что наночастицы легко проникают через легкие в кровь, взаимодействуют с тромбоцитами и, слипаясь друг с другом, повышают свертываемость крови.



Результаты опытов показали, что наибольшим негативным эффектом обладают смешанные углеродные наночастицы, провоцирующие максимальное слипание тромбоцитов человека и значительную закупорку сонной артерии у лабораторных животных. Последующие места по интенсивности воздействия распределились следующим образом: однослойные углеродные нанотрубки – второе место, многослойные нанотрубки – третье, образец городского воздуха – четвертое место.

Из приведенного выше краткого обзора проблемы следует, что токсичность наноматериалов зависит от: 1) физической природы наноматериалов; 2) способа получения наноматериалов; 3) размеров наночастиц; 4) структуры наночастиц; 5) биологического объекта, на котором проводятся испытания; 6) вводимой однократно дозы наночастиц; 7) регулярности введения наночастиц. Органы-мишени и механизмы развития токсического эффекта разнообразны. Одни наноматериалы благодаря своей физической природе способны индуцировать образование активных форм кислорода. Другие могут проникать через тканевые барьеры и плазмалемму внутрь клеток и

взаимодействовать с внутриклеточными компонентами. Третьи нарушают плазмалемму и биологические мембраны органоидов, делая их проницаемыми для токсических и других опасных веществ.

9.4. Национальные и международные проекты в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий

В мире стремительно растет внимание к перспективам развития нанотехнологий. Совокупность научных данных о наноматериалах указывает на то, что они относятся к абсолютно новому классу продукции. В связи с этим как никогда актуальными стали изучение безопасности наноматериалов, а также разработка методологии по оценке их токсичности. Как отдельные страны, так и мировое сообщество в целом остро ощутили потребность в соответствующих нормативных документах.

Национальные инициативы. Крайне заинтересована в вопросах безопасности наноматериалов и нанотехнологий Россия. По оценкам специалистов, к 2015 году объем продаж российской продукции наноиндустрии составит 250–300 млрд. руб.

Для реализации государственной политики в сфере нанотехнологий в 2007 году в России была создана Российская корпорация нанотехнологий. Формирование системы надзора за нанотехнологиями и наноматериалами осуществляется в Российской Федерации с 2007 года. В нем участвуют государственные учреждения совместно с научными учреждениями Российской академии наук. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ в 2007 году была утверждена «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов». В «Концепции» даны определения, классификация и область применения наноматериалов, наночастиц и нанотехнологий. В ней также указано на необходимость изучения в полной мере каждого индивидуального наноматериала в токсикологическом аспекте.

В США в 2000 г. была обнародована Национальная нанотехнологическая инициатива (NNI), координирующая нанотехнологическую деятельность 26 федеральных агентств. Это межведомственная программа по оценке опасных для здоровья людей агентов на основе использования современных токсикологических тестов. В рамках этой программы 6-ю федеральными агентствами США ведется изучение потенциального риска применения наноматериалов для здоровья человека. Одна из основных задач данных исследований – разработка нормативов и методик для оценки безопасности нанопродуктов. Американское агентство по охране окружающей среды (EPA) проводит исследования экологической безопасности продуктов, созданных с использованием наноматериалов.

В Японии активно ведутся исследования по оценке потенциальных рисков, связанных с производимыми наноматериалами. Разрабатываются тесты по определению токсичности (главным образом, токсичности при вдыхании) и методы оценки риска, связанного с производством наноматериалов.

Международные проекты и инициативы. Работы по биологической безопасности применения наноматериалов координирует Рабочая группа по промышленным наноматериалам при Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР). В выполнении межгосударственной программы по выявлению потенциальной опасности наноматериалов принимают участие более 20 стран. В рамках программы ведутся работы по мониторингу содержания наноматериалов в окружающей среде, выявлению их потенциальной токсичности для живых организмов.

На семинаре Европейского центра экотоксикологии и токсикологии химических продуктов (ЕСОТОР) в ноябре 2005 г. обсуждена необходимость расширения работ по изучению наноматериалов. На нем рассмотрены проблемы их возможной потенциальной опасности, связанной преимущественно с легочным и кожным путями проникновения наноматериалов. Был сделан вывод о том, что воздействие наночастиц в значительной степени определяется их составом, площадью и формой.

Национальная ассоциация nanoиндустрии и Торгово-Промышленная Палата РФ провели в июне 2010 г. семинар «Нанотоксикология и стандарт безопасности», в котором приняли участие более 60 ученых и специалистов из ведущих российских научных учреждений и вузов. В докладах и выступлениях участников обсуждена необходимость создания научно-образовательных центров по безопасности нанотехнологий и наноматериалов, а также организации региональных центров по тестированию безопасности нанотехнологий и наноматериалов.

В рамках III Международного форума по нанотехнологиям «Роснанотех 2010» проведено заседание секции «Безопасность для здоровья человека продукции nanoиндустрии и нанотехнологий». В работе секции приняли участие представители государственных учреждений, научных организаций и бизнеса из России, стран Европы и США.



В качестве первоочередных задач обеспечения безопасности для здоровья человека продукции nanoиндустрии, и нанотехнологий секция определила следующие:

1. Расширение научных исследований в области оценки безопасности наноматериалов, оценки риска их производства и применения.

2. Подготовка гигиенических нормативов содержания наночастиц и наноматериалов в воздухе рабочей зоны, в питьевой воде и водоемах, пищевых продуктах, средствах бытовой химии.

3. Разработка высокоэффективных методов обнаружения и количественного определения наноматериалов в воздухе, воде, почве, пищевых продуктах и средствах бытовой химии.

4. Организация подготовки высококвалифицированных специалистов в области оценки и обеспечения безопасности нанотехнологий и наноматериалов.

5. Расширение сотрудничества с международными организациями в области надзора за нанотехнологиями и использованием наноматериалов.

6. Расширение международного обмена результатами научных исследований в области безопасности нанотехнологий.

7. Подготовка создания международной базы знаний по вопросам нанобезопасности, включающей мировые научные данные о свойствах наноматериалов и их биологическом действии.

Словарь основных терминов

Агрегация белков – взаимодействия белковых молекул посредством вторичных структур (участков правозакрученных альфа-спиралей) с образованием надмолекулярных агрегатов.

Диффузия – распространение (перенос) частиц в определенной среде, обусловленное хаотическим тепловым движением молекул (атомов).

Конвекция – явление переноса теплоты в жидкостях или газах путем вынужденного или самопроизвольного перемешивания самого вещества.

Конформация белка – пространственная (трехмерная) структура молекулы белка.

Липосома – сферический пузырек, стенка которого образована липидами; последние формируют обычно двойной слой – липидный бислой.

Модификация белков – последующие химические превращения полипептида: разрезание молекулы на фрагменты; сшивание отдельных фрагментов полипептида в новую молекулу; соединение простых белков с разнообразными веществами с образованием сложных белков – гликопротеинов, липопротеинов, металлопротеинов и др.; химические превращения отдельных аминокислот в составе полипептида (окисление, образование дисульфидных и водородных связей).

Наночастицы (наноструктуры) – объекты, размеры которых лежат в диапазоне от 1 до 100 нанометров (нанометр – одна миллиардная часть метра, 10^{-9} метра).

Нанотехнологии – фундаментальные технологии, основанные на манипуляциях с наноструктурами.

Орган-мишень – орган, в котором накапливаются вещества (гормоны, лекарственные препараты и т.п.), переносимые в организме естественным путем или посредством искусственно управляемого направленного транспорта.

Суспензия – дисперсная система, состоящая из частиц твёрдого тела (дисперсной фазы), распределённых в жидкой среде.

Тканево-кровяной барьер – система биологической защиты организма, образованная структурными элементами биологических тканей и стенками кровеносных сосудов.

Фибриллы – микроскопические волокна, образуемые молекулами белков.

Вопросы для повторения

1. Почему наночастицы легко проникают через биологические ткани и стенку кровеносных сосудов?
2. Что происходит с наночастицами, которые проникают через тканево-кровяной барьер?
3. Какими свойствами наночастиц обусловлена их опасность для живых организмов?
4. Зависит ли опасность наночастиц от их конкретных размеров?
5. Каким образом воздействуют на живые клетки наночастицы серебра?
6. Как воздействуют на культуру дафний наночастицы цинка?
7. Можно ли усилить (ослабить) влияние наночастиц цинка на культуру дафний?
8. Назовите основные источники поступления наночастиц в окружающую среду.
9. Какие наночастицы (свободные или зафиксированные) представляют меньшую угрозу для окружающей среды?
10. Объясните основные пути поступления наночастиц из окружающей среды в организм человека.
11. В каких органах накапливаются наночастицы после проникновения в организм человека?
12. Как образуется белковая «корона»?
13. Оказывают ли наночастицы влияние на белки «короны»?
14. Какое влияние на клетки оказывают наночастицы оксида титана после проникновения в организм?
15. Объясните механизм влияния на клетки органов наночастиц алюминия.
16. Какие изменения в клетках вызывают наночастицы оксида ванадия?
17. Зависит ли опасность наночастиц от пути проникновения в организм? Ответ объясните.
18. Как сказывается на живом организме регулярность введения наночастиц в небольших дозах?

19. Что происходит с клетками кожного эпителия после проникновения в них углеродных нанотрубок?
20. Как влияют на лабораторных животных углеродные нанотрубки, скормливаемые им с пищей?
21. Какое влияние оказывают углеродные нанотрубки на прокариотические клетки?
22. Что конкретно влияет на бактериальные клетки, углерод нанотрубок или трубкообразная наноструктура?
23. Что опаснее для живого организма: углеродные нанотрубки или городской воздух? Каким образом это было установлено?
24. Охарактеризуйте национальные инициативы в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий.
25. Какие международные проекты и инициативы в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий вам известны?
26. Какие первоочередные задачи по обеспечению безопасности для здоровья человека продукции наноиндустрии и нанотехнологий сформулированы на форуме «Роснанотех 2010»?

ЗАДАНИЯ

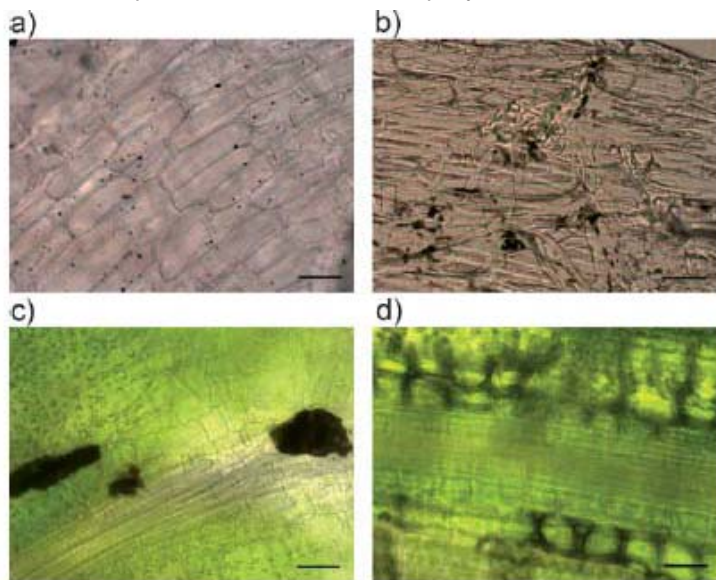
Задания № 1. В разделе 9.1 указаны девять свойств наночастиц, обуславливающие их опасность для живых организмов. Ранжируйте их самостоятельно по степени опасности для живого организма. Составьте свой список свойств наночастиц, обуславливающих их опасность для организма, в котором будут учтены результаты проведенного вами ранжирования. Объясните использованные вами в ходе ранжирования критерии оценки степени опасности свойств наночастиц.

Задание № 2. В опытах ученых из университета Клемсон (США) семена риса проращивались в растворе с добавлением наночастиц углерода C_{70} .

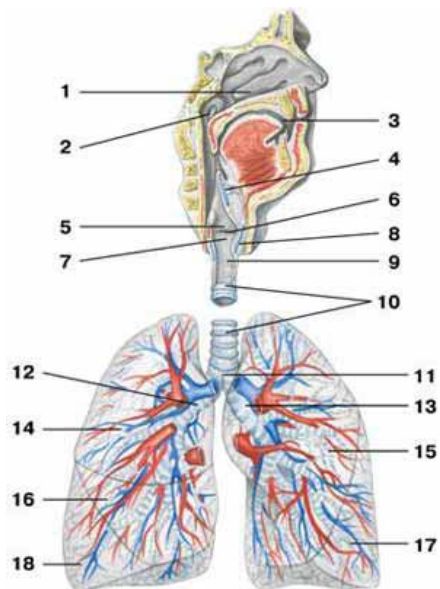
В выращенных растениях первого поколения наночастицы углерода были обнаружены во всех органах: корнях, листьях, стеблях. При этом самые мелкие наночастицы углерода (на рисунке показаны черным цветом) обнаруживались в корневых волосках (а), крупные скопления наночастиц наблюдались в глубоких тканях корня (б), а также в проводящей ткани (с) и основной ткани (д) листьев.

У растений первого поколения были собраны семена риса. Эти семена не подвергались обработке наночастицами. Тем не менее, в листьях, выращенных из них растений, были обнаружены скопления наночастиц углерода. Их встречаемость, однако, была менее значительной, чем встречаемость в листьях растений первого поколения. Объясните результаты опыта американских ученых. Объясните возможный механизм проникновения наночастиц

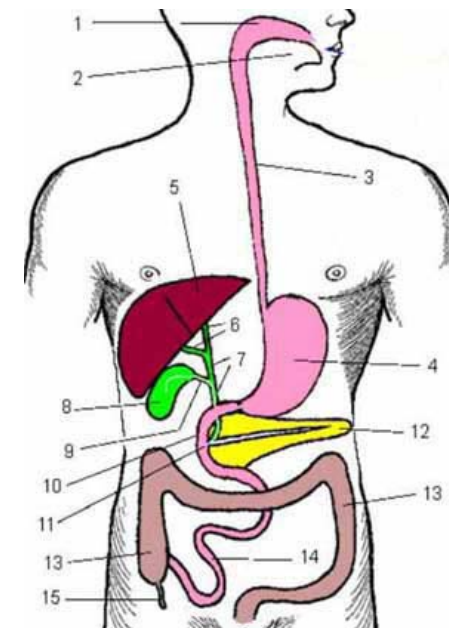
углерода в растения второго поколения. Почему скопления наночастиц углерода встречались в растениях второго поколения реже, чем в растениях первого поколения? Какие выводы можно сделать на основе результатов опыта? Сформулируйте собственные практические рекомендации для специалистов-растениеводов, которые основывались бы на результатах опыта.



Задание № 3. На приведенном рисунке схематично изображены и обозначены номерами органы дыхательной системы. Укажите номера тех органов, в полость которых могут проникнуть вместе с вдыхаемым воздухом наночастицы. Напишите названия этих органов в тетради. Номера 14 и 18 отмечены венозные сосуды малого круга кровообращения, в которые наночастицы проникают из легочных альвеол (17). Объясните, каким образом наночастицы из этих сосудов могут попасть в кровеносные сосуды головного мозга?



Задание № 4. На приведенном рисунке изображены органы пищеварительной системы. Каждый из них обозначен соответствующим номером. Укажите номера тех органов, в полость которых вместе с пищей могут проникнуть наночастицы. Напишите полные названия этих органов. Объясните, почему вы не указали другие органы пищеварительной системы. При каких условиях наночастицы могут оказаться в органах, не указанных вами.



Задание № 5. На рисунке изображена схема строения кожных покровов человека. Нарисуйте ее в тетради и обозначьте все известные вам структуры, формирующие кожу. Укажите стрелками путь проникновения наночастиц через кожные покровы в вены большого круга кровообращения. Какие слои кожи отделяют наночастицы, находящиеся на ее поверхности, от стенки вен?



Задание № 6. Опасность наночастиц оксида ванадия, проникающих в живой организм, обусловлена их сильно выраженными каталитическими свойствами. Наночастицы способны вызывать образование ОН-радикалов, которые окисляют липиды, в том числе липиды биологических мембран и плазмалеммы клетки. Назовите органоиды клетки, функции которых могут нарушаться при попадании в клетку наночастиц оксида ванадия. Какие функции клеточной мембраны (плазмалеммы) могут претерпевать изменения при проникновении в клетку наночастиц оксида ванадия? Объясните, каким образом может повлиять на опасность наночастиц ванадия белковая «корона», которая сформировалась вокруг них до проникновения в клетку.

Задание № 7. В ходе исследований ученые обнаружили, что углеродные нанотрубки оказывают на кишечную палочку пагубное влияние. На 7-8 сутки культивирования бактерий с углеродными нанотрубками содержимое бактериальных клеток вытекало полностью, и от бактерий оставалась только сплюснутая клеточная стенка. Ученые засомневались в том, что конкретно негативно повлияло на бактерий: углерод как химическое вещество или же сама по себе структура в виде нанотрубки. Как «развеять» сомнения ученых? Какие новые вещества (материалы) потребуются для подтверждающих (опровергающих) опытов? Составьте собственный план экспериментального решения проблемы.

Задание № 8. В рамках III Международного форума по нанотехнологиям «Роснанотех 2010» работала секция «Безопасность для здоровья человека продукции наноиндустрии и нанотехнологий». Секция определила несколько первоочередных задач обеспечения безопасности для здоровья человека продукции наноиндустрии и нанотехнологий (см. раздел 9.1). Ранжируйте эти задачи исходя из:

- безотлагательности решения задач во временном аспекте;
- степени важности каждой задачи для обеспечения здоровья человека.

Составьте два перечня задач соответственно результатам вашего ранжирования. Сравните оба перечня задач между собой и поясните результаты сравнения.

Задание № 9. Подготовьте сообщение (реферат) на одну из указанных тем:

- 1) Национальные инициативы европейских государств, США и Японии в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий.
- 2) Международные инициативы и проекты в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий.
- 3) Решения российских и международных форумов (конгрессов, конференций, совещаний и т.п.) в области обеспечения безопасности наноматериалов и нанотехнологий.

Задание № 10. Создайте информационную базу о программах и принятых решениях в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий.

Литература

Алексеева О. Воздействие наноматериалов на окружающую среду / О. Алексеева // ПерсТ. – 2008. – Т. 15. – Вып. 13/14 (режим доступа <http://perst.issep.ras.ru>).

Алексеева О. Все о токсичности наноуглерода / О. Алексеева // ПерсТ. – 2007. – Т. 13. – Вып. 14 (режим доступа <http://perst.issep.ras.ru>), по материалам Carbon 2006, 44, p. 6.

Алексеева О. Новая дисциплина – нанотоксикология / О. Алексеева // ПерсТ. – 2007. – Т. 14. – Вып. 19 (режим доступа <http://perst.issep.ras.ru>).

Ильин Л.А., Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. – 1990. – С.440-447.

Кардановский В.А. «Наноматериалы: то ли враг, то ли друг?» статья для журнала «Наука и жизнь» // Электронный ресурс: http://www.nkj.ru/news/6191/?sphrase_id=22217

Годымчук А.Ю. Лекции по курсу «Отрасли nanoиндустрии и области применения наноматериалов» // Электронный ресурс: <http://portal.tpu.ru/SHARED/g/GODYMCHUK/Education>.

Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. М.: Бино. Лаборатория знаний. – 2007. – 134 с.

Данилов А. «Дуализм наночастиц» // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т.41. №5. – С. 20-21.

Carbon nanotubes render E. coli inactive // Электронный ресурс: <http://nanotechweb.org/articles/news/6/8/14/1>.

Онищенко Г.Г., Бикотько Б.Г., Покровский В.И., Потапов А.И. «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» 2007 год. // Электронный ресурс: <http://www.nanonewsnet.ru/blog/nikst/kontseptsiya-toksikologicheskikh-issledovaniy-nanomaterialov>.

Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеглов С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. – М.: Наука, 2008. – 319 с.

Коваленко Л.В., Фолманис Г.Э. Биологически активные нанопорошки железа. – М.: Наука. – 2006. – 124 с.

Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Специалисты биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова предложили простой и удобный тест для предварительной оценки токсичности наноматериалов // 2009. Электронный ресурс: <http://newsru.com>.

Интернет-сайты

www.focus.ua/tech?p=181&v=full
www.nk-time.com/2159-zdorovyy-obraz-zhizni-poleznye-sovety-37-foto.html
nano-portal.ru/archive/date/2009/06/00?year=2009&month=
www.medencyclopedia.info/index.php?option=
www.ambu.ru/кожный-покров
sgmlab.ru/nanotechnology-in-russia/nanotexnologii-nanomaterialy-i-nanoelektronika
newsru.com
perst.issep.ras.ru
www.nkj.ru/news/6191/?sphrase_id=22217
nanotechweb.org/articles/news/6/8/14/1
www.nanonewsnet.ru/blog/nikst/kontsepsiya-toksikologicheskikh-issledovaniy-nanomaterialov
portal.tpu.ru/SHARED/g/GODYMCHUK/Education

ГЛАВА 10. Применение нанобиотехнологий в медицине

10.1. Нанобиотехнологии и наномедицина

Развитие биологии и медицины характеризовалось постепенным переходом от визуальных методов исследования к молекулярным и атомным. Внедрение методов нанобиотехнологий в практическую медицину привели к обособлению в ней такого направления как «наномедицина». **Наномедицина включает диагностику и лечение заболеваний человека на молекулярном уровне.** Взаимосвязь биотехнологий, нанотехнологий и медицины показана на рисунке 133.

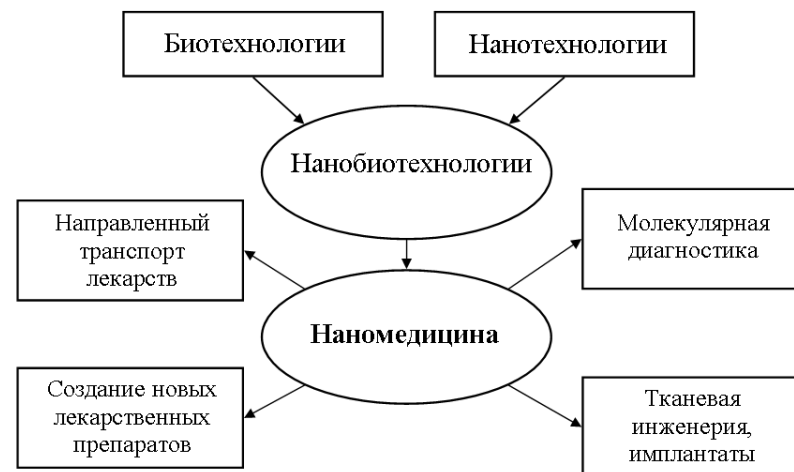


Рис. 133. Взаимосвязь биотехнологий, нанотехнологий и медицины

Методы наномедицины предусматривают использование различных наночастиц для адресной доставки лекарств и фрагментов ДНК в нуждающиеся клетки. Нанотехнологии могут обеспечить доставку препарата не только в определенную клетку, но и в ее конкретную часть (органOID). Новые методы позволяют увеличить время действия препаратов и значительно снизить их побочные эффекты.

Нанотехнологии способствуют также усовершенствованию методов диагностики заболеваний. Использование наночастиц позволяет отыскивать в живом организме раковые и другие неблагоприятные клетки. Благодаря нанотехнологиям значительно повышена чувствительность методов распознавания в биохимической диагностике.

Среди основных направлений наномедицины можно выделить:

- доставку активных лекарственных веществ;
- новые методы и средства лечения нанометрового уровня;
- нанодиагностику в живом организме и лабораторных условиях (*in vivo* и *in vitro*);
- тканевую инженерию;
- медицинские имплантаты.

10.2. Первые достижения в направленном транспорте лекарств

Практикуемые способы применения лекарств имеют серьезные недостатки:

1. В организм необходимо вводить дозы лекарства в 10-100 раз превышающие теоретически необходимые. Это связано с тем, что лекарственный препарат распределяется по всем органам и в нуждающийся орган (орган-мишень) попадает в небольшом количестве.

2. Из-за небольшой концентрации лекарства в нуждающемся органе и его быстром выведении из него препарат необходимо принимать часто.

3. Введенный в организм препарат воздействует на все органы, нарушая их функцию. Следствием этого являются так называемые «побочные эффекты» лекарственных препаратов.

4. Из-за низкой растворимости в воде многих лекарственных веществ возникают трудности с их введением в организм и недостаточным поступлением в орган-мишень.

Как устранить указанные недостатки лекарственной терапии? Для этого нужно решить проблему адресной доставки лекарств в конкретную нуждающуюся клетку – клетку-мишень. Однако все живые клетки защищены от внешнего вторжения естественными барьерами. Исследователям прихо-

дится вступать в суровую битву с могущественной Природой, чтобы создать брешь в естественном барьере клетки.

В 9-й главе указывалось на способность наночастиц преодолевать тканево-кровяной барьер организма и проникать через клеточную мембрану в цитоплазму клетки. Эта способность наночастиц побудила исследователей к созданию наноразмерных лекарственных средств.

При разработке таких средств исследователям приходилось решать следующие задачи:

1. Защита лекарственного средства от преждевременного разрушения.
2. Увеличение степени усвоения организмом нерастворимых в воде веществ.
3. Преодоление биологических барьеров организма на разных уровнях.
4. Осуществление адресной доставки лекарственных веществ.

Адресная доставка наночастиц осуществляется двумя способами, получившими названия пассивного и активного нацеливания. **Пассивное нацеливание основано на самопроизвольном накоплении наночастиц в очагах воспаления и тканях опухолей.** Это возможно благодаря явлению «повышенной проницаемости сосудов». Стенка кровеносных капилляров в опухолях изменена так, что между ее клетками возникают поры (рис. 134). Через них свободно проходят наночастицы, направляясь затем к клеткам опухоли. Из-за недоразвития лимфатических сосудов и недостаточного оттока межклеточной жидкости наночастицы накапливаются в опухолевой ткани (рис. 134).

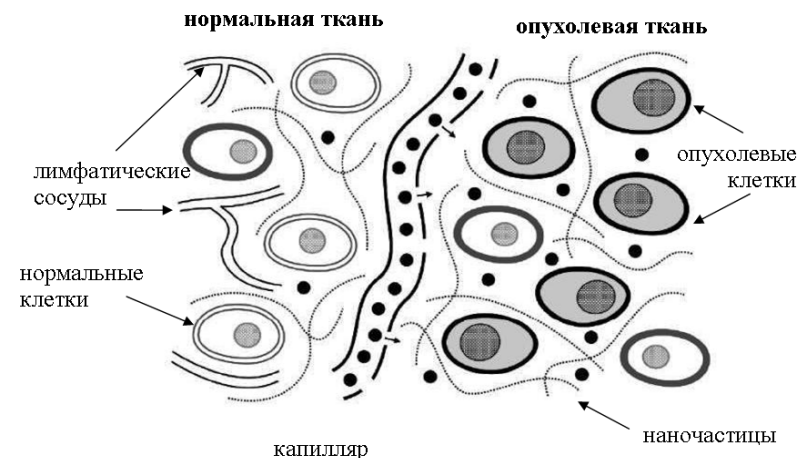


Рис.134. Иллюстрация явления «повышенной проницаемости сосудов» в опухолевых тканях

Активное нацеливание (управляемый транспорт) осуществляется путём нанесения на поверхность наночастиц соответствующего лиганда (рис. 135), выполняющего функцию «молекулярного адреса». Таким «адресом» могут быть антитела или их фрагменты, пептиды, углеводы. Лекарственное

вещество может быть помещено внутрь наночастицы или присоединено к ее поверхности посредством химических связей или адсорбции.

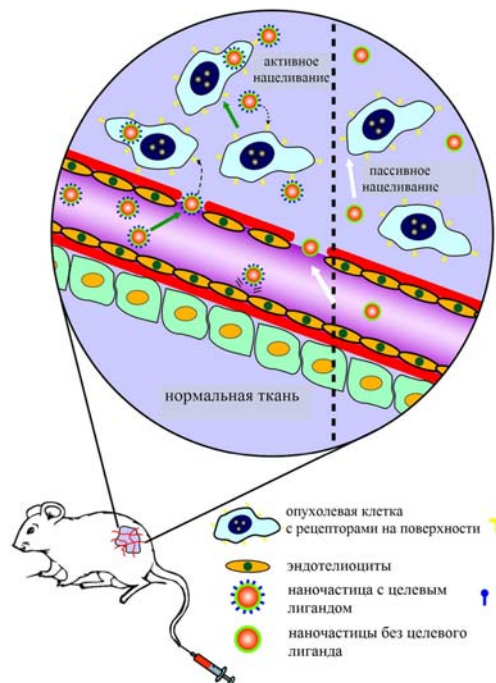


Рис. 135. Схема, иллюстрирующая два способа проникновения наночастиц в ткани: активное и пассивное нацеливание

Накоплению наночастиц в клетках-мишенях способствует их длительная циркуляция в кровеносном русле. Однако при внутривенном введении наночастицы быстро выводятся из кровотока, накапливаясь преимущественно в клетках печени и селезенки. К тому же наночастицы окружаются белками крови, и после этого поглощаются клетками иммунной системы. **Как увеличить время нахождения наночастиц в кровотоке? Можно ли сделать их незаметными для клеток иммунной системы?**

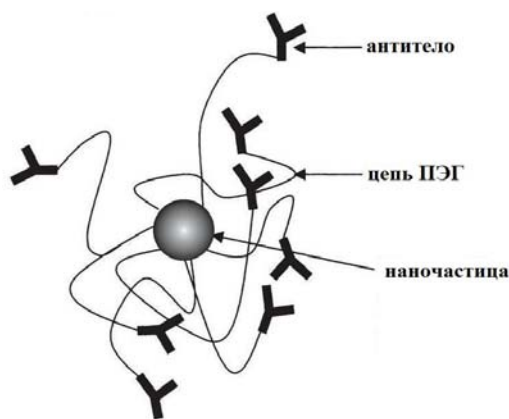


Рис. 136. Схематическое изображение наночастицы, покрытой стабилизирующим полимером (ПЭГ) и объединенной с антителами

Решая эти проблемы, исследователи попытались нанести на поверхность наночастиц полимер полиэтиленгликоль. Его молекулы сформировали защитный гидрофобный слой на поверхности наночастицы, который препятствовал накоплению на ней белков (рис.136). В итоге увеличилось время циркуляции наночастиц в крови.

После попадания в окружение клеток-мишеней такие наночастицы лишаются полимерного покрытия и проникают в клетки. Этому могут способствовать изменения pH и другие химические взаимодействия.

Среди большого разнообразия наночастиц лишь некоторые могут быть использованы в медицине. **Какими же свойствами должны обладать наночастицы – носители лекарственных препаратов?**

Среди таких свойств следует особо выделить:

- отсутствие токсичности;
- способность к переносу достаточного количества лекарственного препарата;
- освобождение лекарства в клетке-мишени в оптимальной дозе;
- незаметность для клеток иммунной системы.

Этими свойствами более всего отличаются липосомы, полимерные мицеллы, дендримеры, неорганические наночастицы и углеродные материалы.

Липосомы стали первыми частицами, которые начали использоваться для направленного транспорта. Они нетоксичны, их мембрана может сливаться с клеточной и обеспечивать доставку содержимого в клетку (см. раздел 5.5). В липосомы могут включаться различные вещества.

При этом водорастворимые вещества находятся преимущественно во внутренней полости липосомы, а нерастворимые в воде – в углеводородной области бислоя. Некоторые вещества могут присоединяться к внешней поверхности липосомы (рис. 137). Вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов.

Липосомы получают из липидов как природного, так и синтетического происхождения. Для получения липосом наиболее широко используются фосфолипиды – самый распространенный тип липидов биологических мембран. В водной среде липиды формируют разнообразной формы частицы:

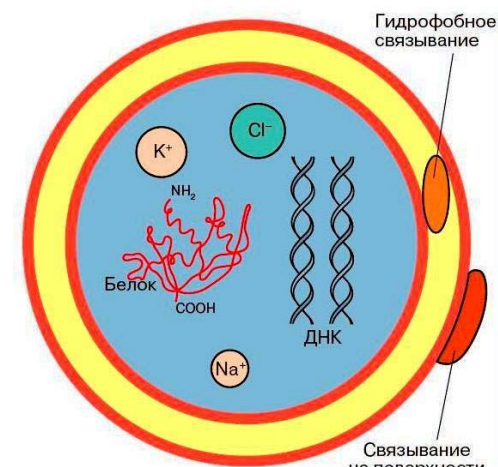


Рис. 137. Способы включения различных веществ в липосомы

полые вакуоли, плоские везикулы, или трубчатые образования. Липиды, обладающие длинными гидрофобными «хвостами», называют небислойными, т.к. в растворах они формируют не двухслойные структуры, а однослойные мицеллы (рис. 138).

Размер липосом может быть различным. Так, диаметр многослойных липосом достигает 10 мкм, минимальный диаметр однослойных липосом – 20-50 нм. В настоящее время липосомы используются для направленного транспорта ДНК, белков, лекарственных препаратов.

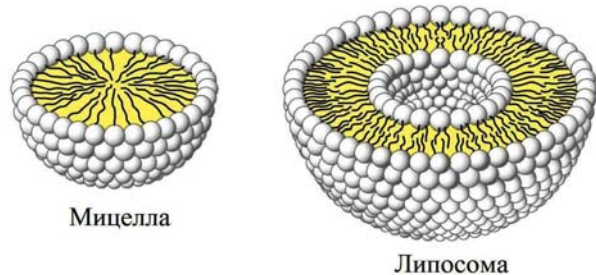


Рис. 138. Структуры, формируемые молекулами липидов

Полимерные наночастицы было предложено использовать в качестве систем доставки лекарственных веществ в 70-х годах XX в. Исходным материалом для них могут служить различные естественные или синтетические полимеры (например, полисахариды, полимолочная кислота). Под термином «полимерные наночастицы» понимают как правило два различных вида частиц: наносферы и нанокапсулы. Наносферы представляют собой сплошные частицы, на поверхности которых распределяется активное вещество. Нанокапсулы состоят из полимерной оболочки, ограничивающей внутреннюю полость, где и находится транспортируемое вещество. Эти виды наночастиц различаются по высвобождению лекарственного вещества: из наносфер высвобождение протекает с возрастающей скоростью, а из нанокапсул – с постоянной скоростью в течение длительного времени.

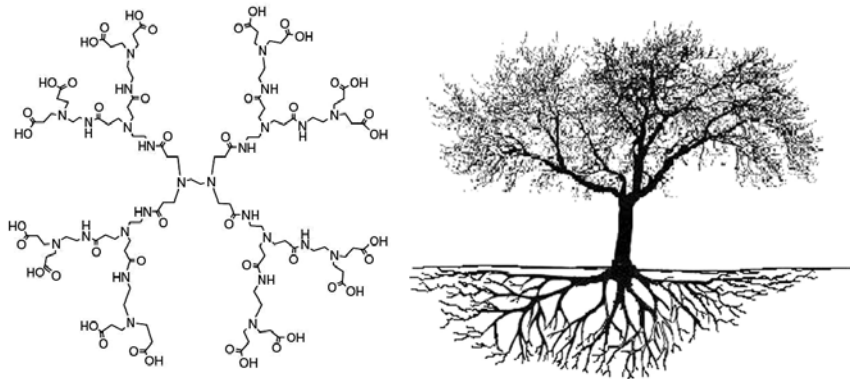


Рис. 139. «Ветвление» ПАММ-дендримера похоже на ветвление дерева

Дендримеры представляют собой сверхразветвленные полимеры, напоминающие дерево. Типичным для структуры дендримеров является повторяющийся образец ветвления вокруг центрального ядра. Это обеспечивает геометрическую правильность дендримеров (рис. 139).

Возможность получения сверхразветвленных полимеров показана П. Флори в 1952 г., однако методы их синтеза были разработаны только в 80-х годах в работах Д. Томалиа, М.Н. Бочкарева, А. М. Музафарова и др. В настоящее время синтезировано более ста видов дендримеров. Наиболее распространенными из них являются полиамидаминные, фосфорные, карбоксилановые, полилизинные дендримеры.

Из-за высокой степени ветвления, сферической формы, небольших размеров (1-100 нм), а также легкости использования поверхности дендримеры рассматриваются перспективными носителями лекарственных препаратов. Молекулы транспортируемого вещества связываются с дендримерами либо путём образования комплексов с поверхностью, либо встраиваясь глубоко между их отдельными цепями.

К настоящему времени дендримеры успешно используются в качестве носителей лекарственных препаратов, ДНК, диагностических веществ. Кроме того, с помощью дендримеров могут транспортироваться противовоспалительные средства, противомикробные и противовирусные агенты.

Для направленного транспорта препаратов предложен новый метод синтеза молекулярных комплексов, состоящих из двух дендримеров, объединенных небольшим отрезком ДНК (рис. 140). Один из них содержит лекарственное вещество, другой – «молекулярный адрес» (например, антитела к определенному типу рецепторов).

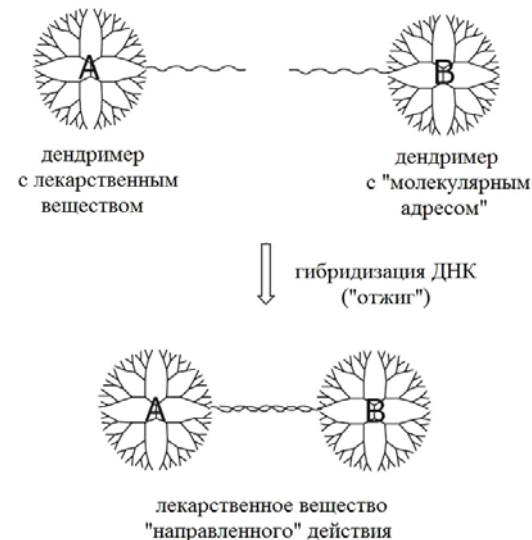


Рис. 140. Использование одноцепочечной ДНК при создании системы направленного транспорта лекарственного вещества

С целью переноса лекарств могут быть использованы также **неорганические наночастицы**. При этом высвобождение лекарственного вещества может контролироваться термическим воздействием или изменением магнитного поля. **В качестве возможных** переносчиков лекарственных препаратов **рассматриваются также углеродные наноматериалы**: фуллерены и нанотрубки (рис.141).

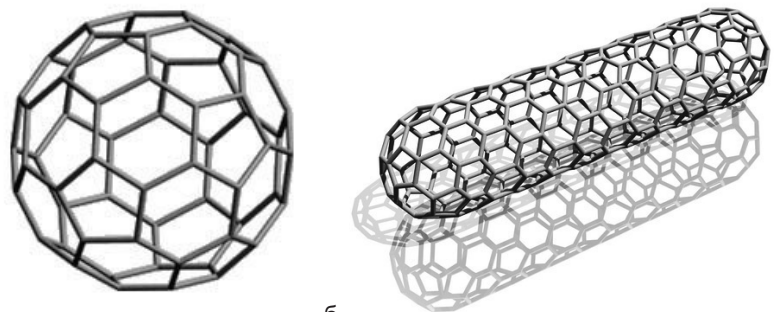


Рис. 141. Углеродные наноструктуры (компьютерные модели): а) фуллерен; б) нанотрубка

Фуллерены, наряду с алмазом, графитом и карбином, представляют аллотропную форму углерода. **Какие свойства и особенности строения фуллеренов позволяют использовать их в медицине?**

Возможности использования фуллеренов в медицинских целях связаны, прежде всего, с такими свойствами их молекул, как:

- небольшие размеры (диаметр сферической молекулы C₆₀ равен 0,714 нм);
- способность проходить через липидные мембраны клеток;
- трехмерность и наличие полости внутри молекулы;
- **высокая реакционная способность**;
- низкая токсичность.

Внутри молекул фуллеренов достаточно места для того, чтобы там могли разместиться 1-2 или даже более атомов других элементов, в том числе и металлов. Получающиеся таким образом соединения называются эндофуллеренами (рис.142). Они были открыты в 1985 г. почти одновременно с фуллеренами.

Первым эндофуллереном, полученным в макроскопических количествах, был эндофуллерен с атомом лантана внутри фуллерена C₈₂. К на-

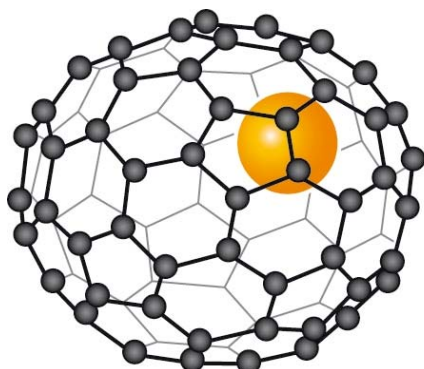


Рис. 142. Атом металла, включенный внутрь фуллерена C₈₂

стоящему времени известно более 20 металлов, с участием которых могут быть получены эндофуллерены.

Для решения каких задач могут быть использованы эндофуллерены?

Одно из направлений применения эндофуллеренов – радиационная медицина. В лечении раковых заболеваний уже давно применяются радиоактивные препараты, содержащие скандий, иттрий и другие радиоактивные элементы. По сравнению с обычными препаратами, эндофуллерены более стабильны. Кроме того, если присоединить к фуллереновой оболочке «молекулярный адрес», то можно обеспечить целенаправленную доставку препарата только в клетки опухоли. Благодаря этому удастся избежать облучения здоровых клеток органа.

Углеродные нанотрубки относятся к аллотропным модификациям углерода. Они представляют собой полые цилиндрические структуры, образованные листками графита (рис. 141). Выделяют две разновидности нанотрубок: однослойные (наружный диаметр составляет 0,6-2,4 нм) и многослойные (наружный диаметр – 2,5-100 нм).

Возможность использования углеродных нанотрубок в медицине основана на уникальных свойствах этих структур: высокая жесткость и упругость, обратимость сгибания и изменения структуры, способность связываться с биологическими макромолекулами.

Можно ли использовать нанотрубки в качестве средств направленного транспорта лекарственных и диагностических веществ?

Решая эту проблему, ученые разработали несколько способов использования нанотрубок для доставки лекарственных веществ:

- адсорбция молекул лекарства на поверхности нанотрубок;
- химическое присоединение лекарственного вещества к внешней стенке нанотрубок;
- размещение молекул вещества в полостях нанотрубок (рис. 143).

Необходимым условием превращения нанотрубок в носитель лекарственного вещества является преобразование (функционализация) их поверхности. Процесс заключается в присоединении к поверхности нанотрубки химических группировок, играющих роль связующего звена между поверхностью и лекарственным препаратом (рис.144). Одним из наиболее распространенных методов преобразования

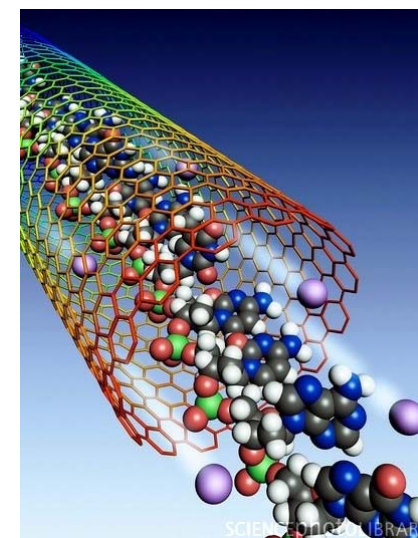


Рис. 143. Молекулы в полости нанотрубки. Компьютерная модель

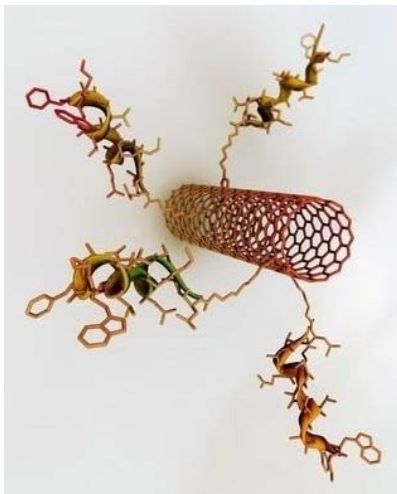


Рис. 144. Функционализируемая нанотрубка. Компьютерная модель

поверхности нанотрубок является присоединение к ним полиэтиленгликоля. Такие нанотрубки могут служить переносчиками как небольших молекул лекарственных веществ, так и макромолекул (белков и ДНК).

Клетки «усаживают» на нанокорышки. Для доставки веществ в клетку ученые прибегают к самым разным хитростям, напоминающим взятие крепости. К примеру, белок может быть посажен в вирус, как отряд греков в Троянского коня, или прикреплен к другому белку, который клетка легко «допускает» в свои пределы. К сожалению, такие методы часто узкоспецифичны: они предназначены для строго определенных соединений и типов клеток, что

усложняет задачи ученых. **Можно ли создать универсальный метод для доставки веществ во все типы клеток?**

Одно из решений проблемы предложили ученые Гарвардского университета (США) под руководством профессора Х. Парка. Исследователи обнаружили, что **клетки, выращенные на подложке, усеянной вертикально расположенными нанотрубками, не получают никаких повреждений** и ведут себя в целом нормально. В течение нескольких часов клетки, медленно опускаясь под собственной тяжестью, протыкаются нанотрубками без всяких для себя последствий. После такой «операции» клетки прекрасно растут, развиваются и делятся (рис. 145, 146).

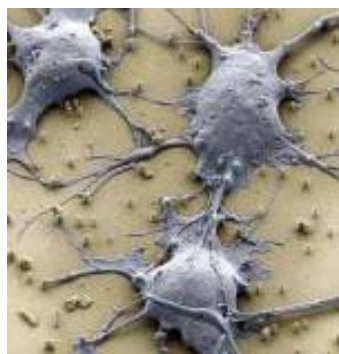


Рис. 145. Нервные клетки крысы, выросшие на массиве нанотрубок, ведут себя совершенно нормально. Они даже соединяются посредством отростков друг с другом, образуя нервные связи



Рис. 146. Массив вертикальных нанотрубок, «протыкающий» клетку, используется для избирательной и точной доставки в нее необходимых веществ

Следовательно, ученые легко и просто получают прямой физический доступ к внутреннему пространству проткнутой нанотрубками клетки. Это значит, что в такие клетки можно доставлять нужные молекулы без ограничений, свойственных другим методам, широко практикуемым сегодня.

Делать это ученые предлагают так. Для начала вводимая в клетку молекула (или молекулы) сравнительно слабо связывается с поверхностью нанотрубки. После того как клетка сажается на подложку из таких нанотрубок и протыкается ими, молекулы оказываются внутри клетки (рис.146).

Если изменять длину нанотрубок, то можно доставлять вещество строго в нужную часть (органойд) клетки. Коллектив Х. Парка уже продемонстрировал универсальность этого метода, внедрив молекулы РНК, ДНК и белков в клетки разных типов. Сам по себе массив нанотрубок не слишком сложен в изготовлении. Более того, к нанотрубкам можно прикреплять разные молекулы, внедряя в клетку сразу большое количество веществ.

10.3. Нанобиотехнологии в диагностике вирусных инфекций, получении и применении искусственных антител

Проблема диагностики вирусных инфекций сохраняет актуальность, несмотря на огромное разнообразие уже разработанных методов. **Какие задачи в области инфекционных заболеваний требуют безотлагательного решения?**

К таким задачам в первую очередь следует отнести:

- ускорение процедуры диагностики;
- повышение точности определения возбудителя вирусного заболевания, особенно при исследовании образца с многими видами вирусов;
- определение возбудителя при его крайне низком содержании в образце;
- проведение не только качественного, но и количественного анализа образца.

В решении этих задач достаточно перспективным представляется использование атомно-силовой микроскопии. Этот метод позволяет за небольшое время получить изображение поверхности образца с разрешением в несколько нанометров.

Атомно-силовой микроскоп дает возможность избирательно определять иммуноглобулины (антитела белковой природы) без дополнительных стадий обработки. Это обусловлено различиями формы и размеров молекул иммуноглобулинов (рис. 147, 148). Подобным образом можно определять также белки оболочки вируса, которые выступают в роли антигенов.

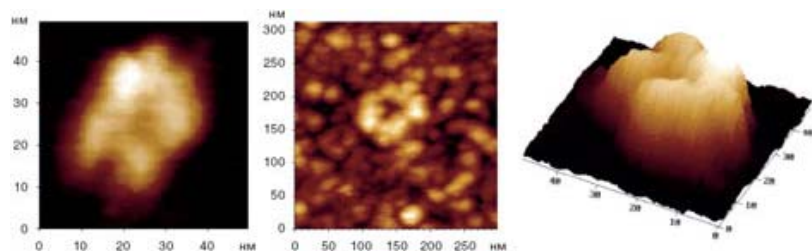


Рис. 147. Изображения иммуноглобулинов «М» в свободном состоянии (слева) и в виде иммунных комплексов (в центре), полученные с помощью атомно-силового микроскопа; справа – трехмерная реконструкция изолированной молекулы иммуноглобулина

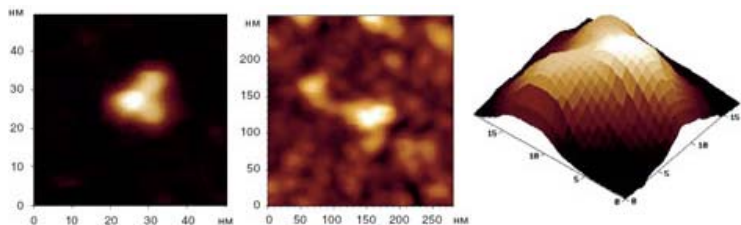


Рис. 148. Изображения иммуноглобулинов «G» в свободном состоянии (слева) и в состоянии иммунных комплексов (в центре), полученные с помощью атомно-силового микроскопа; справа – трехмерная реконструкция изолированной молекулы иммуноглобулина

Получение искусственных антител. Вокруг нас простирается мир, кишащий бесконечно разнообразными и непрерывно совершенствующимися микроорганизмами. От их нападения нас защищают антитела, которые производятся В-лимфоцитами – клетками иммунной системы человека.

Антитела (полное название – моноклональные антитела) являются древнейшими естественными наноструктурами. Каждое антитело представляет собой Y-образную молекулу белка. Однако, по молекулярным меркам антитела просто гиганты: каждое из них состоит из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей, свернутых замысловатым образом и «сдобренных» сложными сахарами (рис.149).

Антитела плавают в крови и с помощью осязания проверяют все встречающиеся на пути молекулы. Каждый вид антитела «разыскивает» только один, соответствующий ему, вид микроба, аллергена или токсина.

Несмотря на совершенство иммунной обороны, мы все же часто боеем. Иммунная система дает сбой: то она слишком медлительна, то вдруг проявляет неоправданную деликатность (например, по отношению к раку), то бурно отторгает трансплантированные органы. А когда она по ошибке атакует собственные клетки организма, то сама иммунная реакция может вызвать саморазрушение органов, например, суставов при ревматоидном артрите. **Можно ли помочь организму своевременно исправлять ошибки иммунной системы?**



Рис. 149. Миллионы разновидностей человеческих антител представляют собой вариации одной и той же исходной структуры: две более крупные (или тяжелые) цепи соединены с двумя цепями меньшего размера (или легкими). Пара варибельных сегментов на концах ветвей уникальна для каждого типа антител и называется участком, определяющим комплементарность. От последнего зависит, с какой мишенью будет связываться антитело. Нанотело – это варибельная часть верблюжьего антитела, в котором исходно отсутствуют легкие цепи. По размерам оно в десять раз меньше антитела

На протяжении многих лет ученые пытались решить эту проблему. Однако только **в 1975 г. были созданы искусственные антитела, которые могут корректировать (или хотя бы частично смягчать) ошибки иммунной системы.** В этом году был открыт способ создания идентичных, или моноклональных, антител. За это открытие в 1984 г. Мильштейн, Кёлер и Эрне были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Как получают искусственные антитела, используя открытие ученых?

В настоящее время лекарственные препараты для иммунной системы человека производят из антител мышей. Процесс получение антител осуществляется в 4 этапа:

1. **Иммунизация.** Исследователи вводят антиген (молекулу-мишень) в организм лабораторной мыши. В-лимфоциты иммунной системы мыши производят антитела, распознающие и блокирующие этот антиген (рис. 150).

2. Слияние, отбор и тиражирование.

Мышиный В-лимфоцит (голубого цвета), вырабатывающий антитела, сливают с опухолевой клеткой миеломы (оранжевого цвета), способной бесконечно делиться. В результате образуется «гибридома» (фиолетового цвета) – бессмертная клетка, способная бесконечно делиться и вырабатывать антитела (рис.151).

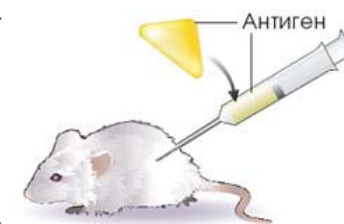


Рис. 150. Иммунизация

3. **Получение антител.** Культура клеток (гибридома) выделяет антитела, которые затем очищают и проверяют. Важным звеном антитела является участок, определяющий комплементарность (рис. 152). Он обеспечивает узнавание соответствующего ему (комплементарного) участка антигена и вступает с ним в контакт. Тем самым антитело обезвреживает антиген.

4. **Гуманизация.** Генные инженеры изменяют гены (участки ДНК) мышей, которые кодируют полипептиды антител. В результате в мышиных антителах появляются фрагменты полипептидов человеческих антител. Благодаря такой модификации иммунная система больного не воспринимает антитела мышей как чужеродные вещества.

Применение антител. Антигены присутствуют в плазмалемме как здоровых, так и раковых клеток органа. Исследуя их, ученые обратили внимание на различия антигенов больных и здоровых клеток. Следовательно, с больными клетками будут связываться одни антитела, а со здоровыми клетками – другие. **Можно ли такое различие антигенов здоровых и раковых клеток использовать в лечении онкологических заболеваний?**

Для решения проблемы ученые использовали антитела (моноклональные антитела), соответствующие антигенам раковых клеток органа. Антитела были «привязаны» к ферромагнитным микрочастицам. Тем самым был создан своеобразный иммуномагнитный сорбент для раковых клеток. В органе он соединялся только с больными клетками. При помещении такого органа в магнитное поле наблюдалось избирательное извлечение из него раковых клеток. Такое извлечение осуществляли микрочастицы сорбента, которые, «связавшись» с раковыми клетками, однонаправленно перемещались в магнитном поле. Орган очищался («избавлялся») от раковых клеток. Таким образом, ученые решили упомянутую выше проблему, создав эффективный и относительно безопасный метод лечения на основе антител.

В тяжелых случаях течения онкологического заболевания извлечение из органа раковых клеток оказывается недостаточным для его оздоров-

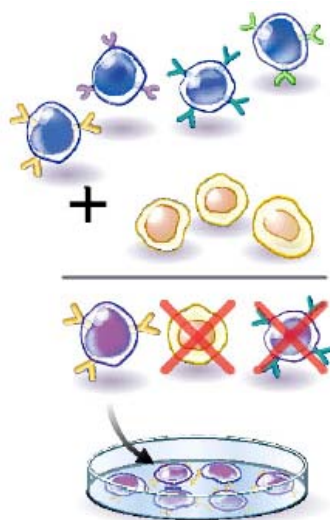


Рис.151. Схема второго этапа процесса получения антител

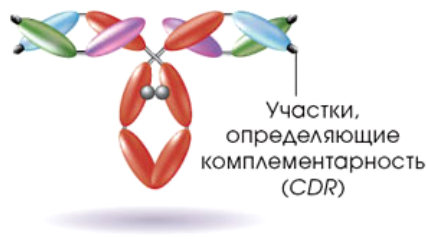


Рис. 152. Произведенное гибридомой антитело

ления. Орган (или его часть) может нуждаться в трансплантации здоровых клеток. **Как выделить здоровые клетки из больного органа?**

В иммуномагнитный сорбент вместо антител к раковым клеткам исследователи включили другие антитела – антитела к здоровым клеткам. При проникновении в здоровый орган, например, красный костный мозг, сорбент извлекал из него только здоровые кроветворные клетки. После отделения сорбента здоровые клетки пересаживались в самую «нуждающуюся» часть органа. Как видим, используя различие антигенов здоровых и больных клеток одного и того же органа, ученые разработали два перспективных метода лечения онкологических заболеваний.

10.4. Медицинские имплантаты на основе нанотехнологий

В современной медицинской практике все чаще используется «капитальный ремонт» или даже полная замена поврежденных органов. В ряде случаев для этого требуются сложнейшие искусственные материалы и конструкции, превосходящие по физическим свойствам естественные органы и структуры. Их разработка, испытание и применение стали предметом нового направления в медицине, возникшего на стыке медико-биологических и технических наук. Таким направлением является создание и использование медицинских имплантатов.

Имплантаты – это специально создаваемые конструкции, которые вживляются в организм человека в роли заменителей отсутствующих или поврежденных органов (рис. 153). Они изготавливаются из биоматериалов – особых материалов, «уживающихся» с клетками и тканями организма. **Какие конкретные требования предъявляются к биоматериалам?**

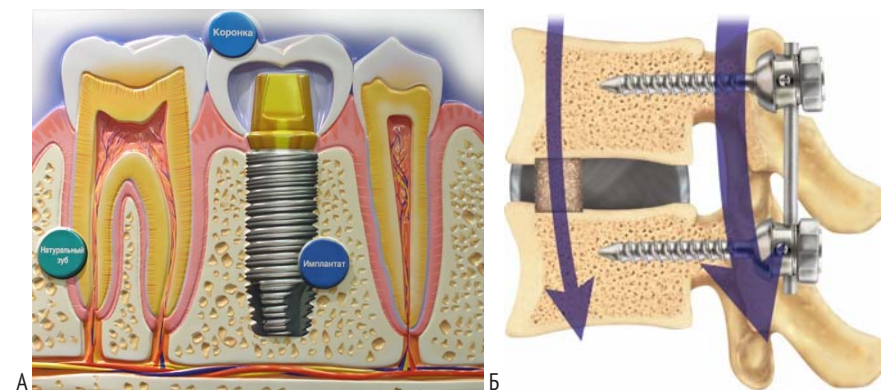


Рис. 153. Примеры имплантатов: А – зубной имплантат; Б – костный имплантат (винты для фиксации позвоночника)

Об одном из основных требований уже упоминалось: биоматериалы **должны обладать высокой совместимостью с живым организмом**. После вживления в организм они будут находиться в нем длительное время, не вызывая реакций отторжения. Наряду с этим свойством биоматериалы **должны характеризоваться высокими механическими характеристиками, часто специальными для каждого случая**: жесткостью, растяжимостью или нерастяжимостью, эластичностью, общей прочностью, износостойкостью и др.

Материалы, используемые для изготовления имплантатов, могут быть как природного, так и искусственного происхождения. К ним относятся металлы, керамика, синтетические и естественные полимеры. В настоящее время наиболее широко применяются металлические имплантаты. По степени биохимической совместимости (отсутствию воспалительных реакций тканей) **металлические материалы разделены на три группы**:

- **«живые»** (Ti и его сплавы, Zr, Nb, Ta, Pt), не оказывающие значительно воздействия на окружающие биологические ткани;
- **«инкапсулируемые»** (Al, Fe, Mo, Ag, Au, нержавеющие стали и CoCr-сплавы), от воздействия которых организм защищается, образуя «капсулу»;
- **«токсичные»** (Co, Ni, Cu, V), оказывающие резко негативное влияние на организм.

Из указанных материалов наиболее высокими прочностными характеристиками обладают стали. Однако даже высоколегированные стали не удовлетворяют требованиям совместимости. Имплантаты, изготовленные из легированных сталей, в т.ч. коррозионно-стойких, при взаимодействии с биологическими жидкостями вызывают воспалительную реакцию тканей. В некоторых случаях они оказывают общее токсическое и аллергическое действие на организм.

Среди современных металлических биоматериалов лидирующее положение занимает титан и создаваемые на его основе сплавы. Этот металл используется для изготовления протезов тазобедренных, коленных, челюстных суставов, пластин и спиц для костного сращения, винтов для фиксации позвоночника.

Какие свойства титана обеспечили его широкое применение в медицине?

Среди ценных свойств титана и его сплавов можно отметить следующие: высокая биосовместимость, хорошая коррозионная стойкость, отсутствие магнитных свойств, низкая теплопроводность, более низкий, по сравнению со сталью, удельный вес. Высокая коррозионная стойкость титана объясняется быстрым образованием на его поверхности оксидной пленки, прочно связанной с основным металлом. Такая пленка предотвращает непосредственный контакт металла с коррозионно-активной средой живого организма. В настоящее время для производства имплантатов чаще всего используется технически чистый титан, а также титановые сплавы Ti-4Al-6V, Ti-5Al-2Sn и Ti-2,5Al-5Mo-5V и др.

Однако своими механическими характеристиками титановые сплавы заметно уступают сталям. При этом большинство из перечисленных выше сплавов содержат токсичные для живого организма легирующие химиче-

ские элементы (Ni, Al, V и др.). В опытах выявлено, в частности, токсическое действие на культуру костных клеток одного из наиболее коррозионно-стойких титановых сплавов Ti-6Al-4V. Вместе с тем, сплавы, не содержащие указанных легирующих элементов, не оказывают неблагоприятных влияний на клетки костной ткани. **Как повысить механические свойства титана, не используя токсичные легирующие элементы?**

Одним из вариантов решения этой проблемы стала **замена титановых сплавов чистым наноструктурированным титаном**. В наноструктурированном состоянии (размер зерна менее 100 нм) механические характеристики титана (упругость, прочность и твердость) достигают свойств легированных титановых сплавов. Механическая прочность имплантатов, изготовленных из наноструктурированного титана, увеличивается в 2-3 раза по сравнению с исходным чистым титаном.

Таким образом, из наноструктурированного титана можно изготавливать более тонкие и, соответственно, менее травматичные имплантаты, сохраняющие требуемые механические свойства (рис. 154). Конкретными видами подобных имплантатов являются дентальные имплантаты, а также имплантаты для коррекции и фиксации позвоночника. В чешской компании «Тимплант» из наноструктурированного титана разработаны и изготовлены дентальные имплантаты улучшенной конструкции марки «Наноимплант» диаметром 2,4 мм. Они рассчитаны на ту же максимальную нагрузку, что и исходные титановые имплантаты диаметром 3,5 мм.

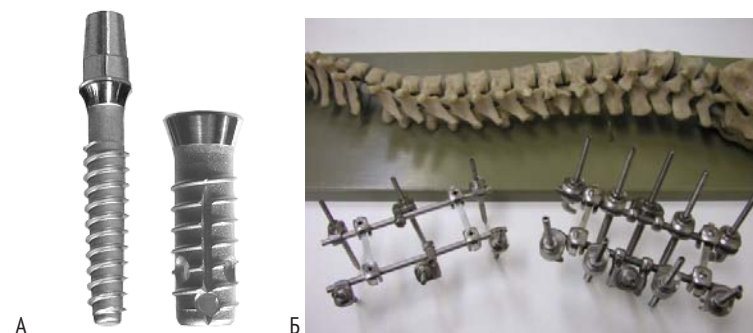


Рис. 154. Имплантаты из наноструктурированного и обычного титана:
а – стоматологические имплантаты фирмы Timplant (Чехия): Nanoimplant®, d=2.4 mm; Timplant®, d =3.5 mm;
б – имплантаты для коррекции позвоночника

Наноструктурированный титан, к сожалению, значительно отличается по своим свойствам от любых тканей организма, включая и костную ткань. **Каким образом можно повысить биосовместимость титановых имплантатов?**

В качестве одного из вариантов решения проблемы предложена специальная обработка (модификация) поверхности имплантатов. Вначале поверхности имплантата придают пористость и шероховатость. Затем на нее наносят покрытие, приближенное по свойствам к костной ткани человека.

Основу такого покрытия составляют коллаген животного происхождения и синтетический наноструктурированный гидроксиапатит. Кроме этих компонентов в композиционный препарат могут быть введены биологически активные вещества – факторы роста и адгезии. Они обеспечивают нормальное функционирование костной ткани и ее быстрое заживление в случае травмы.

В последующих разработках в качестве покрытий имплантатов были исследованы углеродные нанотрубки и фуллеренсодержащие материалы. Ученые исходили из того, что углерод является основным элементом в живых организмах и не должен вызывать существенных отрицательных реакций.

В опытах на животных выявлена хорошая биосовместимость углеродных плёнок. В отличие от металлов, углеродные наноструктуры при взаимодействии с живой тканью и кровью не образуют активные ионы, отравляющие организм. Даже при отделении от имплантата достаточно крупных углеродных частиц, в организме не возникают реакции со стороны иммунной системы.

Еще одна перспективная область применения некоторых металлов в медицине связана с их способностью «запоминать» предыдущую форму. Впервые это свойство было обнаружено в 50-х гг. прошлого века у сплава золота с кадмием: сплав деформировался при низкой температуре и возвращался в исходное состояние при нагревании до критической температуры. Это явление получило название **эффекта памяти формы**. К концу XX века эффект памяти формы был обнаружен более чем у 20 сплавов. Среди них самым распространенным и широко применяемым в восстановительной медицине является сплав никеля с титаном – **нитинол**. Из него могут изготавливаться фиксаторы и скобы для суставов, внутрисосудистые стенты (рис. 155), рабочие части медицинских инструментов. Полезным свойством этих сплавов, наряду с эффектом памяти формы, является сверхупругость.

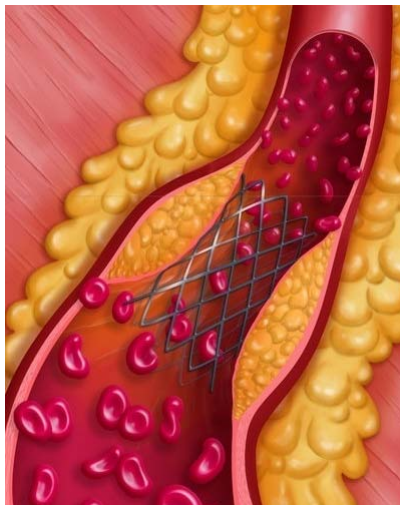


Рис. 155. Внутрисосудистый имплантат (стент)

– тканевая инженерия. **Целью тканевой инженерии является конструирование компонентов биологических тканей** для последующей имплантации в живой организм. **Как получают тканевой имплантат?**

Технология получения тканевого имплантата включает:

1. Получение исходного клеточного материала. Для этого у пациента берут клетки той ткани, которая нуждается в восстановлении. Чаще всего отбирают неспециализированные (стволовые) клетки, которые лучше других размножаются в искусственной среде.
2. Изготовление биосовместимых конструкций (матриков) для культивирования клеток пациента.
3. Формирование тканей в лабораторных условиях (*in vitro*). Стволовые клетки помещаются в специальную среду, которая способствует превращению их в клетки конкретного типа (рис. 156).
4. Имплантация полученных конструкций в организм пациента.

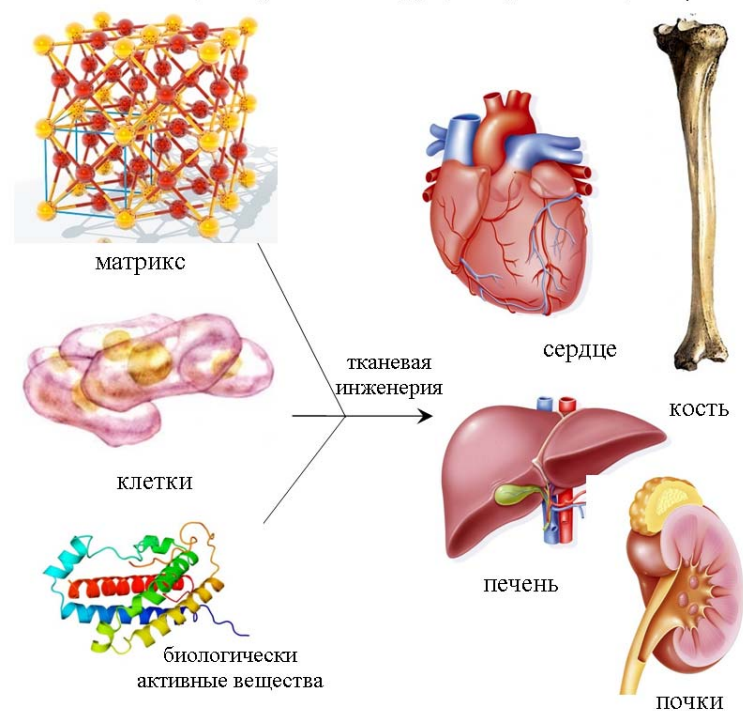


Рис.156. Принцип тканевой инженерии

10.5. Тканевая инженерия

Восстановление поврежденных органов становится все более актуальным для современной медицины, привлекая внимание не только ученых-медиков и биологов, но и представителей технических наук. Как результат объединения их усилий оформилось новое межатраслевое направление

Важной задачей тканевой инженерии является конструирование трехмерных матриков, способствующих образованию тканей. Матрикс должен выступать в качестве каркаса, а также стимула для размножения стволовых клеток и последующего превращения их в специализированные клетки новой ткани.

Ткань может быть выращена на матриксах, которые после имплантации в организм хозяина по мере роста новой ткани полностью растворяются. При этом на месте дефекта остается только новая ткань. Возможно также имплантировать «биокompозит», состоящий из матрикса и уже частично сформированной новой ткани. **Какими свойствами должен обладать «идеальный» матрикс?**

1. Матрикс должен иметь структуру, копирующую структуру ткани организма-хозяина и обеспечивать рост ткани в пространстве.

2. Матрикс должен обладать сетью больших пор, обеспечивающих доставку питательных веществ ко всем клеткам. Желательно, чтобы матриксы стимулировали образование кровеносных сосудов внутри пор.

3. Матриксы должны иметь определенную структуру поверхности: текстура пор нанометрического масштаба или шероховатость поверхности влияют на функциональную активность прикрепляющихся к ней клеток.

4. Необходимое свойство идеальных матриксов – способность к био-разрушению. Продукты распада материала матрикса должны быстро выводиться из организма.

5. Оптимальные каркасы активируют клетки ткани к самовосстановлению (в материал матрикса можно включать биологически активные соединения, факторы роста клеток, лекарственные препараты).

6. Механические свойства матрикса должны соответствовать механическим свойствам ткани организма-хозяина.

Матриксы получают из биологических тканей, удаляя из них клетки и сохраняя трехмерную структуру межклеточного вещества. Матриксы можно изготавливать из неорганических и органических материалов, используя, например, керамику, гидроксипатиты, полимеры, кораллы, коллаген, желатин и др.

При использовании неразрушаемых матриксов нередко возникают осложнения, связанные с длительным присутствием чужеродного материала в организме. Поэтому ученые сосредоточили свои усилия на разработке матриксов из биоразрушающихся полимеров. Одними из первых стали использоваться биоразрушающиеся матриксы, создаваемые на основе полимеров молочной и гликолевой кислот. Из них уже создан ряд тканеинженерных конструкций кожи, кости, хряща, сухожилий, мышц и др.

К перспективным методам получения матриксов относится **метод электростатического формования или электроспиннинга. В чем заключается сущность электроспиннинга?**

Капилляр, заполненный раствором (расплавом) полимера, помещается в электрическое поле (рис. 157). Находящийся в капилляре раствор полимера заряжается, и его плоский мениск становится выпуклым. Изменяя показатели напряжения поля, вязкости жидкости и скорости ее подачи, можно формировать волокно, сечение которого оказывается меньше диаметра капилляра. После испарения растворителя волокно становится еще тоньше. Подобным образом можно получить волокно диаметром несколько нанометров (рис.158).



Рис.157. Схема установки для получения волокон методом электроспиннинга

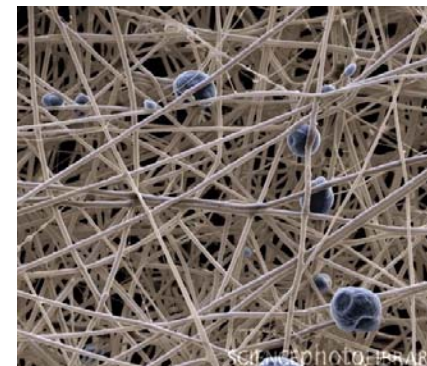


Рис. 158. Нановолокна, полученные методом электроспиннинга

Клеточные матриксы для роста, размножения и дифференциации клеток, полученные методом электроспиннинга, обладают такими преимуществами как высокая пористость и удельная поверхность, малый диаметр волокон. Благодаря этому резко увеличивается способность матрикса связываться с рецепторами клеток. Это позволяет максимально заполнить матрикс клетками и повысить их концентрацию в поврежденной зоне.

Клеточные матриксы из нановолокон уже используются для регенерации хрящевой, костной и нервной тканей, кожи, стенок кровяных сосудов. Для обеспечения лучшей биологической совместимости при их создании зачастую применяют природные полимеры: коллаген, белок шелка, целлюлозу, а также их смеси. Чтобы улучшить механические свойства волокон, матрикс формируют одновременно из биологических и синтетических полимеров. В клеточные матриксы могут включать также неорганические компоненты. При пересадке костной ткани для этого используют карбонат и фосфат кальция.

Метод электроспиннинга позволяет производить полимерные нановолокна и капсулы, внутри которых содержатся живые, способные к специализации клетки (рис. 159).

Для этого используется система «игла в игле». По внутренней игле поступают взвешенные в среде живые клетки, а по внешней игле – густой, не проводящий электричество полимер.

Приложение электрического поля позволяет вытягивать каплю полимера в тончайшую нить. При этом клетки, содержащиеся внутри волокон и подвергающиеся воздействию электрического поля, не теряют своих свойств в течение нескольких дней. Использование различных полимеров позволяет создавать волокна, различающиеся по прочности и долговечности. Возможно, в будущем такие нановолокна будут применяться в качестве шовного материала в хирургии.

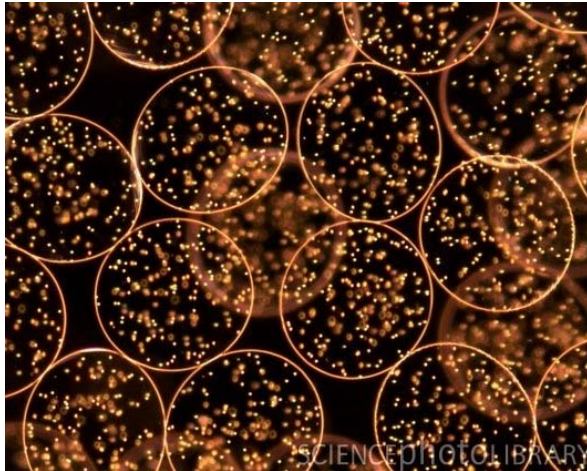


Рис.159. Живые клетки, инкапсулированные в полимер (микрофотография)

Метод электроспиннинга имеет, к сожалению, серьезный недостаток: клетки могут повреждаться электрическим током. **Как предотвратить гибель клеток при использовании метода электроспиннинга?**

Решением упомянутой проблемы стала разработка нового метода получения нановолокон. Таким стал **метод создания нановолокон с помощью давления**. Данную технологию можно использовать в создании искусственных каркасов для регенерации органов и точечной доставки лекарств. Чтобы создать волокна, содержащие живые клетки, разработчики использовали приспособление, оснащенное тремя концентрическими иглами. Первая (внутренняя) игла высвобождает клетки, вторая игла поставляет обволакивающий их полимер, а третья (внешняя) игла обеспечивает необходимое давление. Медленно выделяя клетки, обволакиваемые движущимся с более высокой скоростью полимером, и прикладывая давление, в два раза превышающее атмосферное, исследователи получили длинное и очень тонкое волокно. Его толщина регулируется величиной прикладываемого давления. На общем успехе проведенных испытаний сказался, в первую очередь, тот факт, что используемый уровень давления не оказывал никаких отрицательных воздействий на жизнедеятельность клеток.

Изложенное в настоящей главе убеждает в том, что достижения нанобиологии и нанобиотехнологий наиболее востребованы в медицине. Ни одна другая сфера человеческой деятельности так не «жаждет» открытий в нанобиологии и достижений нанобиотехнологий как медицина. И это вселяет основательные надежды на то, что тесное сотрудничество медиков и нанобиологов позволит предотвратить онкологическую и инфекционно-иммунную катастрофы, о которых упоминалось во «Введении».

Словарь основных терминов

Антиген – вещество, которое организм человека воспринимает как чужеродное или потенциально опасное и против которого вырабатывает собственные антитела.

Антитело – Y-образная молекула белка, которая состоит из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей; вырабатывается клетками иммунной системы – В-лимфоцитами.

Биологические барьеры – тканевые структуры, которые осуществляют защиту органов от неблагоприятных внешних агентов и обеспечивают постоянство внутренней среды организма. К внешним биологическим барьерам относят кожу и слизистые оболочки; внутренние барьеры препятствуют проникновению из крови в ткани чужеродных и ядовитых веществ.

Биоматериалы – искусственные материалы, совместимые с клетками и тканями организма.

Биосовместимость – способность материала, изделия или устройства выполнять свои функции в живом организме, не вызывая его отрицательных реакций.

Биотехнология – совокупность промышленных методов, использующих живые организмы и биологические процессы для производства ценных продуктов (ферментов, витаминов, аминокислот, антибиотиков и др.).

Гематоэнцефалический барьер – полупроницаемый барьер между кровью и нервной тканью, препятствующий проникновению в мозг крупных или полярных молекул, а также клеток крови, в том числе иммунной системы.

Гибридома – гибридная клетка (линия размножающихся клеток), полученная в результате слияния клеток двух видов: способного к образованию антител В-лимфоцита и раковой клетки миеломы. Слияние клеток производится с помощью нарушающего мембраны агента, такого, как полиэтиленгликоль или вирус Сендай.

Дендримеры – разветвленные синтетические полимеры с симметричной регулярной структурой.

Дифференцировка – возникновение различий между однородными клетками и тканями, изменения их в ходе развития организма, приводящие к формированию специализированных клеток, тканей и органов.

Иммуноглобулины – сложные белки, способные связываться с чужеродными веществами – антигенами и обеспечивающие гуморальный иммунитет.

Иммунология – биологическая и медицинская научная дисциплина, изучающая защитные реакции организмов, направленные на поддержание их структурно-функциональной целостности и биологической индивидуальности.

Имплантат – медицинский объект (конструкция или устройство), помещаемый хирургическим путем в тело человека в роли протеза (заменителя

отсутствующего органа человека), либо в качестве идентификатора (например, чип с информацией о домашнем животном, вживляемый под кожу).

Макрофаги – неоднородная группа клеток иммунной системы организма. Включает все клетки, способные поглощать из крови коллоидные частицы и микроорганизмы; участвует в формировании иммунитета и поддержании гомеостаза.

Наноколышки – массив нанотрубок, на котором выращивают клетки. Наноколышки прободают плазмалемму и проникают в цитоплазму на разную глубину, не вызывая повреждений клетки.

Наномедицина – диагностика и лечение заболеваний человека на молекулярном и субклеточном уровнях.

Нанотело – вариабельная часть верблюжьего антитела, в котором отсутствуют легкие полипептидные цепи. По размерам нанотело в десять раз меньше антитела.

Нитинол – сплав титана и никеля, обладающий высокой коррозионной стойкостью и свойством «памяти формы». Процентное содержание титана составляет 55%, никеля – 45%.

Регенерация – свойство живых организмов восстанавливать поврежденные клетки, ткани, а иногда и целые органы.

Стволовые клетки – клетки, входящие в состав постоянно обновляющихся тканей животных и способные специализироваться, преобразовываться в другие типы клеток.

Тканевая инженерия – конструирование вне организма живых функциональных компонентов, которые могут быть использованы для восстановления поврежденных тканей или органов. Является междисциплинарной областью, объединяющей в единое целое методы биологии и медицины с основами инженерных дисциплин.

Углеродные нанотрубки – протяжённые цилиндрические структуры диаметром от одного до нескольких десятков нанометров, состоящие из одной или нескольких свёрнутых в трубку графитовых плоскостей.

Фуллерены – форма углерода (наряду с алмазом, карбином и графитом), представляющая собой сферические замкнутые многогранники, состоящие из чётного числа атомов углерода.

Электроспиннинг (электростатическое формование) – способ получения искусственного волокна в электростатическом поле.

Эндофуллерен – фуллерен, внутрь которого заключен один или несколько атомов или простейших молекул.

Эффект «памяти формы» – явление возврата к первоначальной форме при нагреве, наблюдающееся у некоторых материалов после предварительной деформации.

In vitro (лат. буквально «в стекле») – это технология выполнения эксперимента вне живого организма, «в пробирке».

In vivo (лат. буквально «в живом») – это технология выполнения эксперимента в живом организме.

Вопросы для повторения

1. Дайте определение понятия «наномедицина».
2. Какова взаимосвязь нанотехнологии, биотехнологии и наномедицины?
3. Назовите основные направления наномедицины.
4. Какие недостатки существуют у традиционных форм лекарств?
5. Что представляют собой биологические барьеры живого организма? Какова их роль?
6. Какие задачи должны быть решены при создании новых лекарственных форм?
7. Охарактеризуйте основные способы направленного транспорта лекарств.
8. Опишите «пассивное нацеливание» как один из способов направленного транспорта активных соединений.
9. Что отличает капилляры опухолевой ткани?
10. Какие особенности организации опухолевой ткани способствуют накоплению в ней наночастиц?
11. Каким образом осуществляется управляемый транспорт лекарственных веществ?
12. Какие молекулы могут обеспечивать избирательный транспорт наночастиц, выполняя функцию «молекулярного адреса»?
13. От каких факторов зависит длительность циркуляции наночастиц в крови? Каким образом ее можно увеличить?
14. Назовите основные типы частиц, которые могут быть использованы как средства направленного транспорта лекарств.
15. Какими свойствами должны обладать наночастицы, выполняющие роль носителей лекарственных препаратов?
16. Какие липиды чаще всего используются для получения липосом?
17. Можно ли заключить в липосомы гидрофильные (гидрофобные) вещества?
18. Каковы преимущества липосом как средства направленного транспорта активных веществ?
19. Какие размеры имеют липосомы?
20. Приведите примеры полимеров, которые могут быть использованы для получения наночастиц – носителей лекарственных препаратов.
21. Укажите различия наносфер и нанокапсул.
22. Что представляют собой дендримеры?
23. Какие свойства дендримеров позволяют использовать их для направленного транспорта лекарств?
24. Что отличает фуллерен от других аллотропных форм углерода? Какие особенности определяют возможность его использования в медицине?
25. Как устроены эндофуллерены? Каковы возможности использования их в медицине?

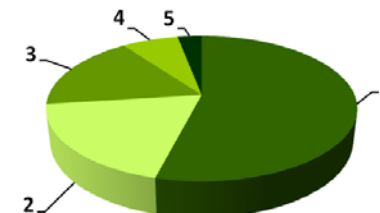
26. Каким образом можно использовать углеродные нанотрубки в медицине?
27. Что происходит с клетками после «усаживания» их на наноколышки?
28. Каким образом ученые использовали массив нанотрубок для доставки веществ в клетку?
29. Можно ли использовать массив нанотрубок для доставки веществ в различные участки клетки?
30. Как, используя один массив нанотрубок, доставить в одну и ту же клетку несколько различных веществ?
31. Какие задачи в области инфекционных заболеваний требуют безотлагательного решения?
32. Благодаря каким особенностям антител их можно определять с помощью атомно-силового микроскопа без дополнительных стадий обработки?
33. Что представляет собой антитело?
34. Какие «сбои» (ошибки) иммунной системы человека нуждаются в корректировке?
35. Охарактеризуйте этапы получения искусственных антител.
36. Как был создан иммуномагнитный сорбент для раковых клеток?
37. Какие два метода лечения онкологических заболеваний разработали ученые, используя различие антигенов здоровых и больных клеток одного и того же органа?
38. Какую функцию выполняют медицинские имплантаты?
39. Какие материалы называют «биоматериалами»? Каким общим свойством они обладают?
40. Какой металл используется чаще всего для изготовления имплантатов? Почему?
41. Могут ли нанотехнологии усовершенствовать существующие имплантаты? Ответ объясните и приведите примеры.
42. Какие металлы или сплавы обладают эффектом «памяти формы»? Опишите это явление.
43. Охарактеризуйте основные этапы получения тканевого имплантата.
44. Какими свойствами должен обладать «идеальный» матрикс для тканевой инженерии?
45. В чем заключается сущность электроспиннинга? Каким образом используются микро- и нановолокна, полученные этим методом?

ЗАДАНИЯ

Задание №1. Наномедицина ускоряет и без того высокие темпы своего развития. Об этом свидетельствует увеличение доли компаний-разработчиков и производителей нанотехнологических препаратов, возрастание числа наименований препаратов, разрешенных к медицинскому применению и находящихся на разных стадиях разработки.

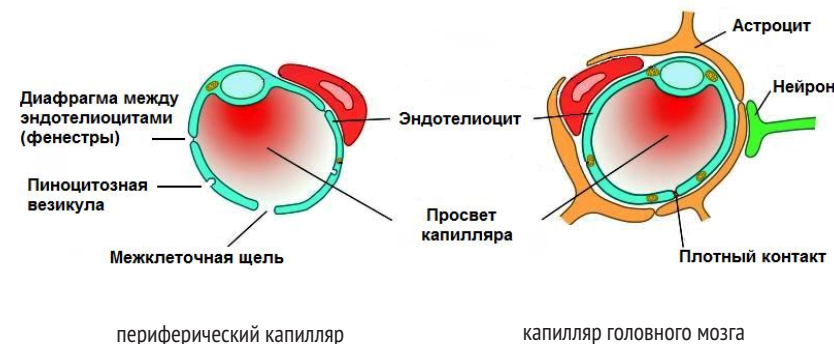
На диаграмме показано распределение по направлениям компаний, работающих в области наномедицины:

- 1 – системы доставки, 54%
- 2 – имплантаты, 19%
- 3 – средства для диагностики *in vitro*, 17%
- 4 – средства для диагностики *in vivo*, 7%
- 5 – методы и средства терапии, 3%



Используя данные литературы и интернет, оцените современное распределение указанных направлений. Как изменилось это соотношение? Какие новые направления наномедицины (в т.ч. в рамках уже существующих) можно выделить?

Задание № 2. Из изучавшегося в курсе анатомии человека материала вспомните общую схему кровообращения. Какие сосуды называют артериями, капиллярами, венами? Что происходит в капиллярах большого круга кровообращения? Почему капилляры имеют более тонкие стенки по сравнению с артериями и венами?



Рассмотрите поперечный разрез капилляров. Что отличает периферический капилляр от капилляра головного мозга? Через какой из этих капилляров легче проходят макромолекулы? Какое свойство организма обеспечивает такое строение капилляров головного мозга? Почему заболевания центральной нервной системы трудно поддаются лечению?

Какие еще биологические барьеры, кроме стенки капилляров, вам известны? По какому принципу и как их можно классифицировать?

Задание №3. Основоположник учения о барьерных функциях Л.С. Штерн в 1929 г. обосновала положение о том, что между кровью и тканевой жидкостью находятся защитно-регуляторные приспособления. Особое место среди них занимает барьер между кровью и тканями центральной нервной системы – гематоэнцефалический барьер.

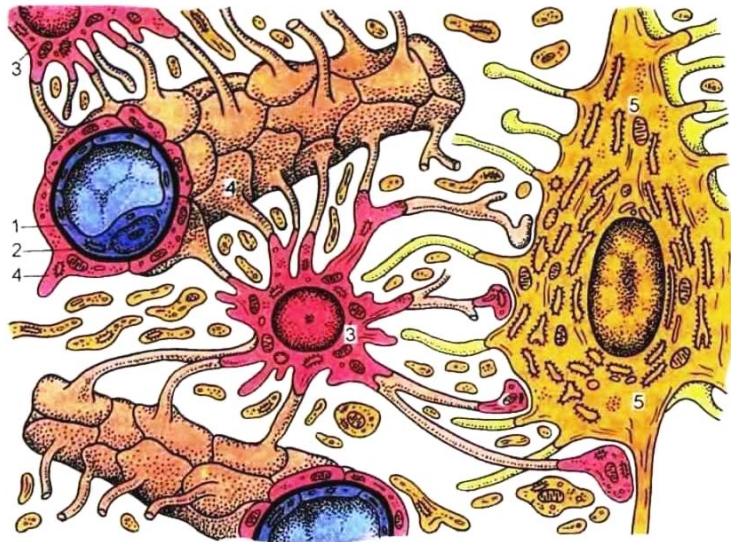


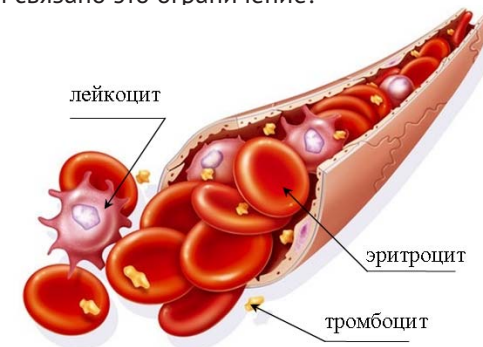
Схема строения гематоэнцефалического барьера (по Афанасьеву)
 1 – эндотелий капилляра, 2 – базальная мембрана, 3 – клетки нейроглии,
 4- пластинчатые окончания клеток нейроглии, 5 – нервная клетка.

Рассмотрите схему гематоэнцефалического барьера. Какие структуры обеспечивают его высокую избирательность? Перечислите особенности строения капилляров центральной нервной системы. Какие клетки входят в состав нервной ткани? Каковы функции нейроглии?

Задание №4. В начале 20 века немецкий бактериолог Пауль Эрлих высказал мысль о том, что лекарство должно действовать, как «волшебная пуля», которая способна молниеносно найти болезнетворную цель и поразить ее. Такая пуля, доставляя лекарство в больной орган, миновала бы остальные органы и тем самым уберегла бы их от ненужного, а зачастую и вредного воздействия. В 1910 г П. Эрлих совместно с химиком А. Берггеймом создали препарат, который избирательно действовал на спирохет (бактерий, имеющих извитую форму и вызывающих, например, возвратный тиф) и трипаносом (одноклеточных организмов, вызывающих сонную болезнь). Однако как быть в случаях развития раковых опухолей? Ведь в этом случае вызывающими заболевание становятся собственные клетки организма. Каким образом можно обеспечить избирательную доставку лекарства в опухоль? Опишите основные способы направленного транспорта лекарств. Сравните их эффективность. Какой из этих способов обеспечивает наибольшую избирательность и точность доставки? Ответ объясните. Какие молекулы могут быть использованы в качестве «адреса» в случае управляемого транспорта? Приведите не менее трех примеров.

Задание №5. В качестве носителей лекарственных препаратов могут быть использованы самые разнообразные частицы. Какими общими свойствами они должны обладать? Как классифицировать эти частицы? Объясните, каким образом можно присоединить лекарственное вещество к носителю? От чего будет зависеть выбор конкретного метода? Приведите примеры.

Укажите минимальные и максимальные размеры частиц, которые можно использовать для направленного транспорта лекарств. Чем определяются эти размеры? Каковы максимальные размеры частиц при внутривенном введении? С чем связано это ограничение?

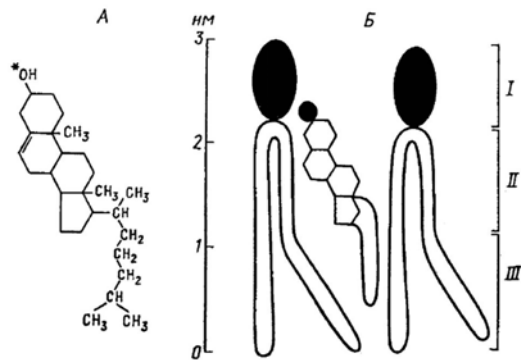


Проведите сравнение указанных Вами размеров частиц – носителей лекарственных препаратов с размерами клеток крови и диаметром капилляров. Предположите, к каким последствиям может привести введение частиц, размеры которых превышают максимальную границу?

Задание №6. Одними из самых распространенных частиц – носителей лекарственных препаратов являются липосомы. Почему для получения липосом чаще всего используют фосфолипиды? Опишите строение молекулы фосфолипида. Какие факторы определяют формирование в водном растворе двухслойных липосом и однослойных мицелл? Можно ли получить липосомы в неполярных растворителях? Если да, то чем они будут отличаться от липосом, полученных в водной среде? Для каких целей могут быть использованы подобные липосомы?

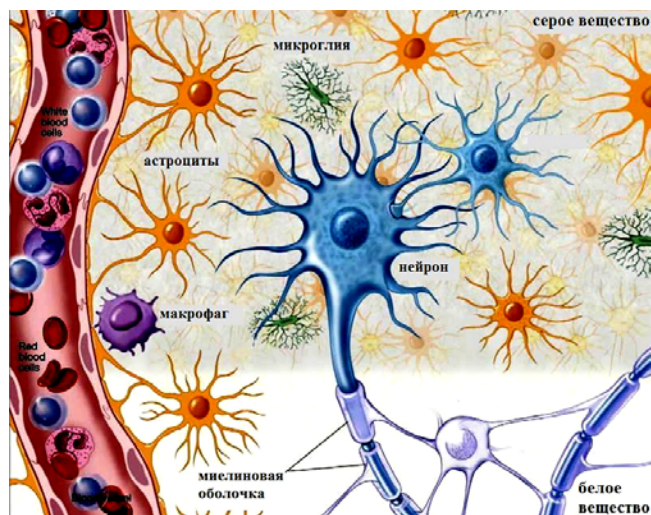
В состав липосом, как и природных биологических мембран, часто входит холестерин. Какие свойства придает бислою этот липид? Ответ обоснуйте. Каким образом необходимо изменить состав липосомы с целью улучшения ее слияния с клеточной мембраной? Возможно ли защитить липосомы от разрушения в биологических средах, а также от «атаки» клеток иммунной системы? На основании всех вышеперечисленных вопросов, предложите свой вариант «идеальной» липосомы. Приведите ее схему.

Предположите, могут ли оказывать липосомы токсическое действие на живые клетки (предположение обоснуйте)? Каковы недостатки липосом как средства направленного транспорта лекарств?



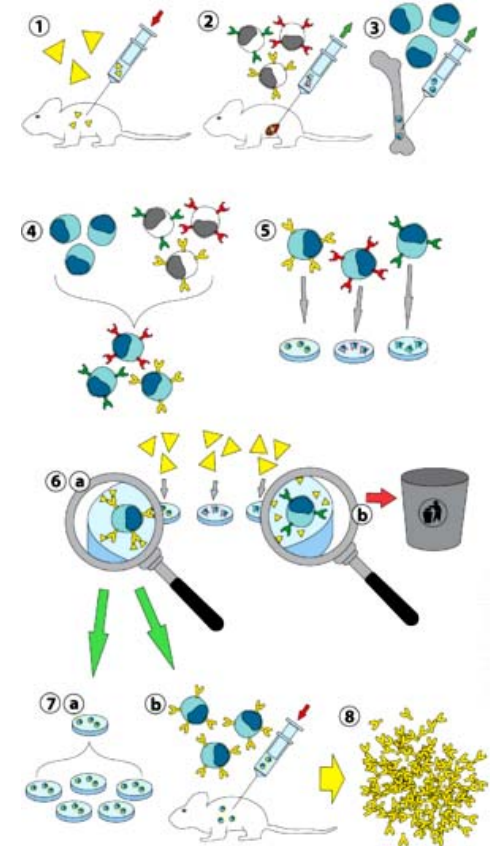
А – структурная формула холестерина,
Б – взаимное расположение фосфолипидов и холестерина в бислое.

Задание №7. Одним из распространенных заболеваний людей пожилого возраста является паркинсонизм. При этом заболевании движения человека замедлены, мышцы напряжены. Обнаружено, что при этой болезни в одном из отделов головного мозга снижается содержание медиатора дофамина. Можно предположить, что устранить все симптомы заболевания можно путем введения дофамина. Однако введение раствора дофамина не дает никакого результата. Объясните, почему дофамин не достигает нейронов головного мозга? Какие «препятствия» должно пройти лекарственное вещество, прежде чем оно достигнет цели? Рассмотрите варианты внутривенного введения вещества и его поступления через желудочно-кишечный тракт. Почему при лечении многих заболеваний часто наблюдаются побочные эффекты со стороны других органов? Какой из биологических барьеров самый «надежный»? Рассмотрите рисунок.



Каким образом вещества из кровеносных сосудов могут поступить к нейронам (нервным клеткам)? При ответе на вопрос используйте материал о транспорте веществ через мембрану (глава 2). Какие вещества могут пройти через изображенный барьер? Каким образом можно доставить дофамин в головной мозг, если известно, что это вещество отличается высокой растворимостью в воде? Предложите возможный вариант доставки дофамина к нейронам головного мозга.

Задание № 8. На рисунке изображена схема получения искусственных антител. Получение антител включает следующие процессы: иммунизация животных; выделение В-лимфоцитов из селезенки животных; извлечение клеток миеломы; слияние В-лимфоцитов и клеток миеломы; культивирование клеточных линий гибридомы; селекция клеточных линий, производящих антитела; размножение гибридомы (*in vitro*; *in vivo*); получение антител.



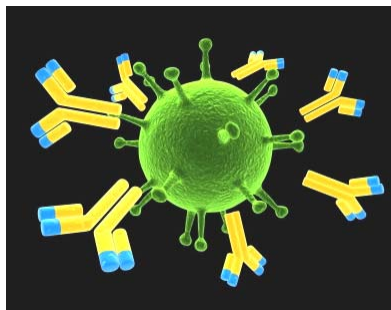
Используя названия этих процессов, расшифруйте обозначения на рисунке (1-8, а, б). Объясните сущность обозначенных на рисунке цифрами процессов. Какие из процессов могут быть отнесены к этапам: 1) иммунизация; 2) слияние, отбор и тиражирование; 3) получение антител; 4) гуманизация?

На каком из указанных этапов получения искусственных антител применяется метод генетической инженерии? Почему В-лимфоциты сливаются с клетками раковой опухоли, а не со здоровыми клетками этого же органа? Спрогнозируйте поведение в кровеносном русле искусственного антитела, у которого отсутствует участок, определяющий комплементарность.

Задание № 9. В ходе исследования в культуру лимфоцитов целенаправленно были занесены вирусы. Спустя некоторое время в культуре обнаружены соединения молекул вирусного белка с антителами. Эти комплексы

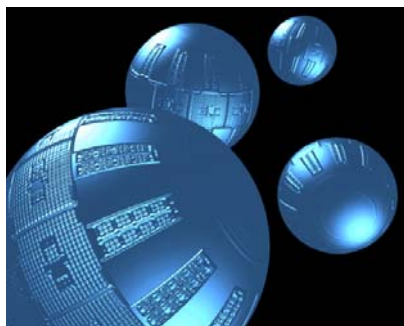
подверглись микроскопическому изучению с целью избирательного определения антител. Какой микроскоп использовали для этого ученые? Сколько полипептидных цепей включало каждое антитело?

Задание №10. Какое взаимодействие изображено на приведенном рисунке? Как называются структуры, изображенные желто-голубым цветом? Какой своей частью они вступают во взаимодействие с шиповидными выпячиваниями на сферическом теле зеленого цвета? Какие из взаимодействующих структур уже создаются искусственным путем? Предскажите два возможных конечных результата взаимодействия упомянутых структур. Ответ аргументируйте.

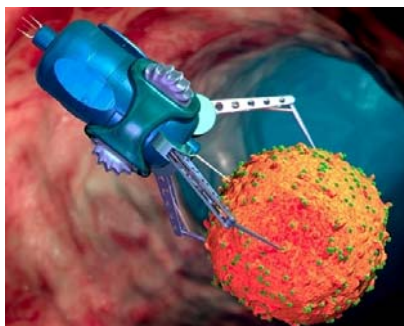


Задание №11. Первоначально концепция наномедицины возникла из фантастических идей создать и внедрить в тело человека крошечные нанороботы и подобные им устройства, которые выполняли бы «ремонт» клеток на молекулярном уровне. Представьте, что такие нанороботы созданы. Какими свойствами они должны обладать? Из какого материала возможно их изготовление? Какой максимальный размер могут иметь нанороботы? Какие источники энергии они могут использовать для своей работы? Каким образом может осуществляться контроль за работой этих устройств? Как будут выводиться нанороботы из организма после выполнения функции или в случае их «поломки»? Будут ли они выводиться с помощью клеток иммунной системы? В каких органах нанороботы могут осуществлять свою работу?

Предположите, будут ли созданы реальные нанороботы, функционирующие внутри живого организма?



Искусственный эритроцит – респироцит



Наноробот уничтожает клетку-возбудителя инфекции

Задание №12. Многие тяжелые заболевания приводят к выходу из строя жизненно важных органов: сердца, легких, почек, печени, поджелудочной железы. Если не заменить нефункционирующий орган, человек может погибнуть. Существует несколько возможных путей восстановления или замены пораженных тканей и органов: пересадка донорских органов, вживление механических конструкций, тканевая инженерия.

Почему пересадка донорских органов не может полностью решить проблему замены пораженных болезнью органов? Какие проблемы могут возникнуть при пересадке? Как реагирует организм на внедрение чужеродного материала? Можно ли избежать этих реакций или уменьшить их? Ответ обоснуйте.

В каких случаях используются имплантаты? Приведите не менее трех примеров. Назовите материалы, из которых могут быть изготовлены имплантаты. Возможно ли усовершенствование существующих биоматериалов с помощью нанотехнологий?

Проанализируйте возможности создания различных искусственных органов методом тканевой инженерии. Возможно ли создание с помощью этого метода целых органов? Основываясь на знаниях о строении и функциях органов кровообращения, дыхания, выделения, предположите, что может являться ограничивающим фактором в создании органов? Для создания каких типов тканей наиболее успешно применяется тканевая инженерия? Приведите примеры.

Задание №13. Опишите основные этапы тканевой инженерии. Какие клетки могут быть использованы в качестве исходного клеточного материала? Чем эти клетки отличаются от остальных клеток организма? В каких органах они присутствуют? Каким образом можно «управлять» дифференцировкой (специализацией) клеток в культуре? Обсудите этические проблемы применения стволовых клеток в медицине.

Задание №14. Проведите поиск литературы и подготовьте доклад на тему:

- 1) «Получение микро- и нановолокон методом электропрядения. Фильтры Петрянова»
- 2) «Титан и его сплавы: применение в медицине».
- 3) «Биоискусственная кожа: технологии получения и перспективы использования»
- 4) «Искусственные органы чувств (органы зрения, слуха, обоняния)»
- 5) «Искусственное сердце»
- 6) «Восстановление костной ткани с использованием бионанотехнологий»

Литература

- Боздаганян М. Е. Фуллерены и перспективы их применения в биологии и медицине // Российский электронный наножурнал (<http://nanorf.ru>)
- Бронштейн Л.М., Шифрина З.Б. Наночастицы в дендримерах: от синтеза к применению // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т.4, №9-10. – С.32-55.
- Гиббс У. Нанотела / У. Гиббс // В мире науки. – 2005. – № 11 (режим доступа <http://www.sciam.ru>).
- Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
- Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию: пер. с яп. / Н. Кобаяси. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 134 с.
- Кольтовер В.К. Эндоздральные фуллерены: от химической физики к нанотехнологии и медицине / В.К. Кольтовер // Вестник РФФИ. – 2008. – № 3 (59). – С.54-71.
- Мастеров В.Ф. Физические свойства фуллеренов / В.Ф. Мастеров // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №1. – С.92-99.
- Моисеенко В.М. Моноклональные антитела в лечении злокачественных опухолей / В.М. Моисеенко // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 148-156.
- Нанотехнологии в биологии и медицине / Под ред. Шляхто Е.В. (<http://prostonauka.com>)
- Пиотровский Л.Б. Механизмы биологического действия фуллеренов – зависимость от агрегатного состояния / Л.Б.Пиотровский и др. // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7, № 2. – С. 1548–1554.
- Пиотровский Л.Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Российские нанотехнологии. – 2007. – Т.2. – №7-8. – С.6-18.
- Пол У. Иммунология: в 3 т.: пер. с англ. / У. Пол, А. Сильвертайм, М. Купер и др. – М.: Мир, 1987-1988.
- Ройт А. Иммунология: пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
- Сидоров Л.Н. Химия фуллеренов / Л.Н. Сидоров, Макеев Ю.А. // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.6, №5. – С.21-25.
- Фуллерены: Учебное пособие / Сидоров Л.Н., Юровская М.А. и др. – М.: Экзамен, 2005. – 688с.
- Хартманн У. Очарование нанотехнологии: пер. с нем. / У. Хартманн. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 173 с.
- Шимановский М.Л. Нанотехнологии в современной фармакологии // Клиническая фармакология. – 2009. – №1. – С.131-135.
- Шпилевский М.Э., Шпилевский Э.М., Стельмах В.Ф. Фуллерены и фуллереноподобные структуры – основы перспективных материалов // Инженерно-физический журнал. – 2001. – Т. 74, № 6. – С. 106-112.

Ambade A.V. Dendrimeric micelles for controlled drug release and targeted delivery / A.V. Ambade, E.N. Savariar and S. Thayumanavan // Mol Pharm. – 2005. – V. 2, № 4). – P. 264-272.

Boas U., Christensen J. B., Heegaard P. M. H. Dendrimers in Medicine and Biotechnology. New Molecular Tools. – The Royal Society of Chemistry, 2006

Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering / S.G. Kumbara et al. // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, №30. – P. 4100-4107.

Medicinal applications of fullerenes (review) / Bakry R. et al // International Journal of Nanomedicine. – 2007. – №2(4). – P.639–649.

Partha R., Conyers J.L. Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials // International Journal of Nanomedicine. – 2009. – №4. – P.261–275.

Peptide-based Biopolymers in Biomedicine and Biotechnology / D. Chow et al. // Mater Sci Eng R Rep. – 2008. – Vol. 62, №4. – P. 125-155.

Satoh M., Takayanagi I. Pharmacological Studies on Fullerene (C60), a Novel Carbon Allotrope, and Its Derivatives (review) // J Pharmacol Sci. – 2006. – V.100. – P. 513 – 518.

Wu H.Ch. Peptide-mediated liposomal drug delivery system targeting tumor blood vessels in anticancer therapy / Wu H.Ch., Chang De-K. // Journal of Oncology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Интернет-сайты:

www.sciam.ru
www.medvestnik.ru
www.strf.ru
www.cbio.ru
www.nanonewsnet.ru
www.newchemistry.ru
prostonauka.com
nanorf.ru
www.ncbi.nlm.nih.gov
thesaurus.rusnano.com
allforchildren.ru
www.electrospinning.ru
www.nanomedicine.com
www.foresight.org
www.rfreitas.com

Заключение

Главная цель, которую преследовали авторы пособия – дать учащемуся возможность непринужденно и с интересом прикоснуться к фундаментальной биологической науке и ее прикладным достижениям в области нанотехнологий. Биология – точная наука, и желание окунуть ученика в атмосферу подлинного лабораторного эксперимента немислимо без всестороннего объяснения условий его постановки.

Описывая эксперименты, авторы стремились возбудить у учащегося устойчивый интерес к экспериментальному научному исследованию, где биология, химия, физика, математика и информатика, «переплетаясь» (интегрируясь), обеспечивают желанный результат. Тем самым наглядно иллюстрируется тесная взаимосвязь естественных наук в познании живой природы. Авторы надеются, что настоящее пособие будет способствовать более серьезному отношению учащихся к изучению естественных наук, проявлению у них устойчивого интереса к открытию нового для себя, а затем и к настоящему открытию для всех.

Многие нанопроцессы и наноявления живой природы появились на Земле еще около 3 млрд. лет тому назад. Последующие периоды эволюции живого многократно убеждают нас в гениальности древнейшего наноконструктора и нанотехнолога планеты – Природы. Это важнейшее обстоятельство решающим образом повлияло на подход авторов к определению структуры и содержания учебного пособия. Всестороннее познание живых структур и механизмов жизнедеятельности на самих глубинных уровнях организации живого – главное условие конструирования наноструктур и разработки нанотехнологий путем моделирования.

Глубокое изучение живых прототипов и воссоздание их в технических моделях останется основным направлением в нанобиологии и нанобиотехнологиях на ближайшую перспективу. Это и предопределило содержание настоящего пособия.