УДК 57.088

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

С.В. Горобец, О.Ю. Горобец

Национальный Технический Университет Украины
«Киевский политехнический институт»,
факультет биотехнологии и техники, кафедра биоинформатики
Проспект Победы, 37, Киев

Представлен обзор в области нанобиотехнологии, анализ основных тенденций, достижений и перспектив развития этой быстро развивающейся отрасли, стоящей на пересечении биотехнологии, нанотехнологии, химии, физики, биоинформатики и т.п.

The paper represents the review of the state of the fields of nanobiotechnology. The purpose of the paper is analysis of main branches, trends and achievements of this fast developing intersection of chemistry, physics, biotechnology and nanotechnology.

Введение

Нанобиотехнология – одна из самых перспективных технологий XXI столетия. Нанотехнология – это наука, специализирующаяся на создании, исследовании и применении наномаштабных структур. Нанотехнология – это также манипуляции химическими и физическими свойствами веществ на молекулярном уровне, она меняет способ нашего мышления, стирает границы между физикой, химией и биологией. Разрушение этих границ ставит много сложных проблем и требует формирования нового научного мышления и создания отдельной методологии научного поиска.

Биотехнология имеет дело с процессами на клеточном и субклеточном уровнях в живых организмах и использует знания и технику биологии для манипулирования молекулами, генетическими и клеточными процессами с целью разработки продуктов и услуг, которые используются в разных отраслях промышленности, от медицины до сельского хозяйства.

Нанобиотехнология – это объединение подходов биоорганической, молекулярно-биологической наук и физико-химических нанотехнологий. Эта гибридная дисциплина направлена на создание нанороботов путем имитации или включения биологических систем на молекулярном уровне. Потенциал данной отрасли действительно очень высок, переплетение биотехнологии, нанотехнологии и информационных технологий позволяет осуществить много важных открытий в разных отраслях науки и промышленности.

Постановка задачи

Задачей работы было проведение литературного поиска с целью анализа мирового опыта в области нанобиотехнологии, определения основных направлений теоретического и практического развития этой дисциплины, ознакомление читателя с методами научных исследований и перспективами данной отрасли науки.

Химия, физика и технология поверхности. 2007. Вып 13. С.265-272

Интеграция элементов живого и неживого на наноуровне

2003-й год ознаменовал 50-ю годовщину открытия двойной спирали ДНК и начало биотехнологической революции. Также в 50-х годах XX века физик Р. Фейман теоретически предвидел возможность работать «на дне» – контролировать и точно манипулировать атомами и молекулами [1]. Сегодня возможности манипулировать веществом перешли от генов к атомам. Нанотехнология манипулирует атомами и молекулами для создания новых продуктов.

Индустрия нанотехнологии следует стратегии развития индустрии биотехнологии. Биологический материал может быть выделен для манипуляций с тем, чтобы выполнять функции машин и сделать возможным существование гибридных материалов – «живое + неживое». Как в прошлом для первых машин использовали продукты животноводства (кожаные ремни и желудки овец), на сегодняшний день вирусы и бактерии адаптируются для наномашин. И наоборот, «неживые» материалы будут использованы внутри живых организмов, чтобы выполнять биологические функции. «Живое», несмотря ни на что, является «дешевым» и на уровне атомов и молекул не отличается от «неживого».

На наноуровне, как писала А. Стайкман в *Technology review*, «отличие живого от неживого стирается» [2]. Идет поиск совмещения свойств небиологических материалов (таких как электропроводность) с определенными свойствами биоматериалов (таких как самоорганизация и адаптация).

Основные направления и примеры достижений нанобиотехнологии

Ожидается, что нанобиотехнология инициирует инновации и сыграет важную роль в биомедицине, не только в областях транспорта лекарств и генной инженерии, а также в формировании изображений молекул, биомаркеров и биосенсоров. Использование достижений нанотехнологии в медицине привело к появлению новой дисциплины, известной как наномедицина, которая включает процессы диагностики, лечения, профилактики заболеваний и травматических случаев, разработку обезболивающих средств, улучшение здоровья человека с использованием молекулярных приборов и молекулярных знаний о теле человека и создание отдельной отрасли медицины – клеточной инженерии. Так, The National Institutes of Health Bioengeneering Consortiun США проводил в 2000 году симпозиум «Нанонауки и технологии формируют биомедицинские исследования». Среди направлений работы конференции восемь областей нанонауки и нанотехнологии имели отношение к исследованиям по биомедицине, такие как: синтез и использование наноструктур в терапии, биологические наноструктуры, электронно-биологические межфазные поверхности, оборудование для ранней диагностики заболеваний, оборудование для изучения отдельных молекул, нанотехнология и инженерия тканей.

Проблемы, которые решают ученые и инженеры в области нанобиотехнологии, имеют очень сложную природу, требуют создания материалов и устройств для влияния на субклеточном уровне с высокой степенью специфичности.

Нанобиотехнология создает в первую очередь инструменты для наноманипуляций с наиболее важными биологическими макромолекулами ДНК, РНК и белками. Раньше для работы с ними требовалось огромное количество химических реакций. Проблема в том, что реакции происходят стохастически и можно измерить только средние значения величин. Для того, чтобы точно контролировать биологическую систему, необходимы инструменты, которые взаимодействуют с ней на наноуровне, в естественной среде обитания. Сначала интерес был сфокусирован на манипуляциях с ДНК, но сейчас разработаны методы манипуляции с белками, мембранами, клетками и т.д.

Классификация наноманипуляций

В процессе наноманипуляций контролировано прикладываются внешние силы для того, чтобы изменить размер, форму или положение объекта на наномасштабе. Основанные на взаимодействии биообъектов с разными типами силовых полей системы наноманипуляций классифицируются как контактные (атомно-силовая микроскопия), неконтактные (электрические и магнитные поля или лазер) или гибридные (при гибридных манипуляциях биообъектами эффекты силовых полей используются вместе с наночастицами, нанотрубками, электродами и т.д.).

При этом в зависимости от нужного силового режима, могут использоваться разные по величине силы, например магнитные пинцеты используются в диапазоне 0,01 – 10 пН, оптические и электрические силы -0,1 – 100 пН, тогда как атомно-силовую микроскопию (АСМ) можно использовать для сил порядка 10 – 10000 пН [3].

Молекулярные моторы

Для изучения отдельных молекул ДНК, РНК, белков, для осуществления манипуляций с ними очень эффективны оптические улавливатели. В отличие от АСМ использование оптических улавливателей является неконтактным и не ведет к повреждению образца. Единственная проблема – молекулы должны быть прикреплены к шарикам, так как силы, которые действуют на отдельные молекулы, очень малы. Это значит, что необходима некоторая подготовка к процессу.

В работах [4, 5] оптический улавливатель использовался для манипуляций с молекулой кинезина, при этом определялась связь между механическим влиянием и реакциями на молекулу кинезина АТФ. Молекула кинезина, присоединенная к оптически захваченному шарику, приводилась в контакт с микротрубкой, адсорбированной на стекле. При движении молекулы кинезина по трубке, она толкала шарик, благодаря чему с использованием оптического улавливателя измерялся шаг перемещения молекулы кинезина, который равен 8 нм.

Функционализация наночастиц в биотехнологии. Комплексы наночастица – лекарства или гены

На сегодняшний день большой интерес вызывает разработка нанотехнологий, которые позволяют производить манипуляции на наномаштабном уровне и комбинировать биомолекулы с другими наномаштабными структурами [6]. Одна из основных проблем в биоприменениях – это трансфекция клеток в ДНК-терапии. Современные методы терапии имеют существенное ограничение, которое включает риск неконтролируемой передачи болезни вирусным вектором. Это привело ученых к исследованию комплексов полимер-ДНК и липосома-ДНК для доставки генов [7].

Несмотря на риск и ограничения, использование вирусных векторов является эффективным подходом для целевой доставки лекарств. Тетпептид из вируса иммунодефицита человека и другие вирусные протеины прикрепляются к ДНК, протеинам и другим вирусным протеинам для транспортировки в клетку. Эти нанокомплексы имитируют действие синтезированных протеинов, которые отвечают за эффективную вирусную трансфекцию [8, 9].

Дистанционный контроль ДНК

Использование процессов самоорганизации биологических мембран и ядерной ДНК клеток в соединении с введением в их структуру наночастиц золота позволит создать модель для управляемого влияния на процесс включения-выключения некоторых генов и их комплексов, ответственных за ключевые процессы клеточного метаболизма. Цель – ускорить процесс создания лекарств, которые позволят фармацевтам включать-

выключать определенные гены. Такая технология уже запатентована при использовании *in vitro* и находится в стадии разработки на молекулярном уровне в клетках *in vivo* [10], то есть планируется перенести эти нанобиоприборы из пробирки в клетку.

Наночастицы фосфата кальция представляют собой уникальный класс невирусных векторов, которые могут служить как эффективные и альтернативные носители ДНК для целенаправленного выделения генов. ДНК, которая инкапсулирована внутри таких наночастиц, защищена от внешнего воздействия и может без повреждений перемещаться в условиях *in vitro* и *in vivo* [10].

Наносенсоры. Нанотехнология в измерении количества растворенного кислорода

Кислород – один из самых главных метаболитов в аэробных системах, и измерение его содержания жизненно необходимо в медицине, в охране окружающей среды и в различных промышленных процессах. В последнее время интерес к методам измерения концентрации растворенного кислорода сфокусировался на методе ее определения с помощью оптических наносенсоров вследствие их преимуществ по сравнению с методами амперометрических измерений. Преимущества данного метода заключаются в том, что в нем не используются токсичные вещества и он более оперативен. Оптические наносенсоры используют органически модифицированные силикатные наночастицы в качестве матрицы [11]. Высокая проницаемость и гидрофобная структура силикатных наночастиц, так же как и их малые размеры, в сумме дают высокую степень чувствительности к растворенному кислороду и линейный отзыв по всему диапазону от 0 до 100 % насыщения кислородом. Данный тип сенсоров имеет более высокую степень чувствительности, ширину линейности, дольше пребывает в состоянии возбуждения и эмиссии длинных волн, что в сумме дает уменьшенный фон шума для клеточного материала. Эти сенсоры отличаются возможностью повторного использования и стабильностью. С их помощью происходит измерение изменения концентрации растворенного кислорода вследствие дыхания клеток в режиме реального времени в закрытой камере. Эти сенсоры сейчас используют для одновременных внутриклеточных измерений концентрации кислорода и глюкозы [11].

Нано-ДНК технологии и ДНК-стрептовидиновые пары

Открытие цепной полимеразной реакции (ЦПР) привело к началу нового этапа в биологических исследованиях. Влияние этого открытия было ощутимо не только в области биологии, но и в других подобных областях науки. Созданы новые классы полусинтетических ДНК-протеиновых пар, самоорганизованые олигомерные структуры, которые состоят из стрептовидина и двойной ДНК, которая может быть конвертирована в четко определенный супрамолекулярный круг [12].

ДНК-стрептовидиновые пары применяются как новые строительные блоки для производства иммунологических реагентов для ультрачувствительного трейсерного анализа протеинов и других антител с помощью методов иммуно-ЦПР. Иммуно-ЦПР – это комбинирование высокоспецифичного иммуноанализа, который основывается на антителах и экспоненциального усиления ЦПР, и поэтому результат – это 1000-кратная чувствительность в сравнении со стандартным ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay – иммуносорбционный ферментный анализ) методом.

Самоорганизованые ДНК-стрептовидиновые пары используют также в области нанобиотехнологии. Например, эти пары используют как модельные системы для ионно-переключаемых структур наночастиц, как стандарт калибровочной шкалы для сканирующего зондового микроскопа [13] или как запрограммированные строительные блоки для рациональной конструкции сложной биомолекулярной структуры, которая может

использоваться как подложка для создания наномасштабных неорганических устройств [14].

Ковалентные пары одноцепочечной ДНК и стрептовидина используют как биомолекулярные адаптеры для иммобилизации биотиновых макромолекул на твердом субстрате посредством гибридизации нуклеиновых кислот. Эта «ДНК-направленая иммобилизация» позволяет осуществлять обратную и строго-селективную функционализацию твердого субстрата металлическими и полупроводниковыми наночастицами, или наоборот, ДНК направленную функционализацию наночастиц протеинами, такими как иммуноглобулин или ферменты. Наночастицы, функционализированные антителами, используют как устройства для диагностики и биоанализа.

Нанобиотехнология в высокоэффективном анализе нуклеотидного полиморфизма

В соответствии с опубликованной картой вариаций генома человека геномная последовательность включает в себя более 2 миллионов полиморфизмов одиночных нуклеотидных пар (ПОН) (The International SNP Map Working group, 2001). Для эффективного определения связи между генетическими вариациями (полиморфизмами) и болезнями необходимо совершенствовать методы определения генотипа, что позволит фармацевтическим, биотехнологическим и академическим исследователям разрабатывать новые методы диагностики и лечения. Предложенный в работе [15] микроприбор делает возможным детектирование полиморфизма через высокоскоростную сепарацию фрагментов, используя капиллярный электрофорез и высокоэффективную жидкостную хроматографию, что позволяет сократить время необходимое для выделения ДНК до секунд; обеспечивает извлечение ДНК из раствора без использования ферментации, например эндонуклеазами, или без механического разрушения ДНК; позволяет осуществлять извлечение клеточных обломков (например протеинов), которые могут стать препятствием процессу гибридизации ДНК; позволяет осуществлять подготовку ДНК образцов по упрощенным протоколам, что уменьшает число процедур; предотвращает, насколько это возможно, влияние химических реагентов, минимизирует стоимость обработки и управления, обеспечивает высокую степень воспроизводимости [15].

Потенциальный вклад нанотехнологии в быстрый высокоэффективный анализ ПОН становится более значимым при использовании платформ биочипов. Компанией Nanogen Inc. (San Diego, California, USA) разрабатываются электронноадресные микроматричные платформы, которые позволяют проводить анализ ПОН с эффективностью порядка 10^7 генотипов в день, что позволит эффективно определять связи между генами и болезнями [16].

Наноутройства. Клеточная энергия

Сложную работающую наномашину с биомотором сконструировал К. Монтемаго (университет Калифорнии, Лос-Анджелес). Команда Монтемаго использовала в качестве наномотора протеин из бактериальной клетки и объединила его с металлическим цилиндром 750 × 150 нм [17]. Как источник энергии для биомолекулярного наномотора, был использован бактериальный АТФ. Полученный таким образом наномотор способен вращать металлический цилиндр – «нанопропеллер» со средней скоростью 8 оборотов в секунду. В октябре 2002 года команда исследователей заявила, что при присоединении химической группы к этому протеиновому наномотору, они достигли возможности контролировано включать и выключать нанобиомашину.

Молекулярное наносито

Первое контролируемое импульсами напряжения молекулярное наносито было сконструировано Шарлем Мартином с коллегами [18] в Университете штата Колорадо в

1995 году. Мембрана Мартина включает в себя массив цилиндрических золотых нанотрубок с внутренним диаметром 1,6 нм. Когда трубки положительно заряжены, положительные ионы через мембрану не проходят, что позволяет разделять отрицательные и положительные ионы и наоборот, когда трубки заряжены отрицательно – пропускаются только положительно заряженные ионы. Такого типа наноустройства могут комбинировать управление напряжением с размерами пор, знаком и величиной заряда, для достижения точного контроля ионного транспорта и, как следствие, значительной молекулярной избирательности.

Функциональные наноструктурные материалы

Процесс стирания границ живой и неживой природы – это в частности вживление искусственных веществ в организм для выполнения биологических функций. Современные достижения в этой области – это электронные стимуляторы сердца, искусственные суставы, но на наноуровне эти явления имеют особое значение.

В работе [4] исследователями предложен пластик со встроенными в него ферментами. Этот пластик предназначен для очистки различных сред от загрязнений и благодаря встроенным в него ферментам, является самоочищающимся [4]. В этой же работе рассматривается возможность укрепления крыльев самолета углеродными нанотрубками, которые будут заполнены протеином. Такие нанотрубки в 100 раз прочнее и в 6 раз легче, чем сталь [4].

Инженерия тканей

Инженерия тканей основывается на создании новых тканей *in vitro* с последующим хирургическим размещением в теле человека или стимуляции восстановления тканей *in situ* с использованием искусственных биоконструкций или имплантатов живых клеток, внедренных в или около поврежденного участка. Данная технология использует материал как самого пациента или донора (алогеник), так и материал животных (ксеногеник).

Применение

Наноманипуляции биологическими объектами – это важнейший инструмент, который уже широко применяется в таких областях.

- Молекулярная хирургия: с помощью физической манипуляции можно разрезать ДНК в любом нужном месте, с помощью АСМ, лазеров и энзимов может извлечь и модифицировать специфические гены.
- Молекулярные моторы: формирование изображений молекул и манипуляции с ними помогают понять, как химические реакции генерируют движение и силы в молекулярных машинах, это дает возможность построить высокоэффективные искусственные машины.
- Лаборатория на чипе: такие методы, как диэлектрофорез, электровращение и оптическое рассеивание могут быть интегрированы в прибор «лаборатория на чипе», который может работать с нуклеиновыми кислотами, частичками вирусных размеров и направлены на создание мощных диагностических устройств.
- Секвенирование ДНК: обычное секвенирование не дает порядок фрагментов и требует большого количества времени для длинных ДНК. С использованием точных манипуляций фрагменты ДНК могут вырезаться по порядку и секвенирование ускоряется.
- Размерная сепарация ДНК: методы типа глобулярной трансформации и серии дипольных улавливателей [19] могут использоваться для размерной сепарации ДНК значительно эффективнее, чем методы с использованием гелей для больших моле-

кул. Дипольные улавливатели, размещенные возле входа канала капиллярного электрофореза, могут намного улучшить разделительную способность этого метода.

- Нанопроизводство: АСМ может использоваться для выбора и пересадки ДНК на поверхность кремния. Это может использоваться в нанопроизводстве сенсоров и биоэлектрических приборов.

Открытые вопросы наноманипуляций

Таким образом, в целом рассмотрены основные приемы наноманипуляций. Было произведено сравнение основных преимуществ и недостатков методов и определены основные области их применения. Но все еще остается большое количество сложных проблем, которые приведены ниже.

- Взаимодействие в контактном режиме манипуляций типа АСМ в жидкости не до конца исследовано и необходимы точные физические модели этих явлений для точной и безопасной манипуляции.
- В применениях, в которых изучают влияние больших полей на живые клетки, непонятна природа возникновения побочных эффектов.
- Большая часть физических методов манипуляций обеспечивает их точность на наномасштабах, но не обеспечивает возможность одновременной (т.е. параллельной) манипуляции с большим количеством биообъектов. С другой стороны, биохимические процессы типа ПЦР являются параллельными, но не полностью контролированными. Было бы идеально, если бы можно было интегрировать эти две парадигмы в единую систему, обеспечивая тем самым параллельность и в тоже время точность процесса.
- Успехи, полученные благодаря физическим манипуляциям с ДНК и другими объектами, были бы более внушительными при условии их совместимости с традиционными химическими методами.
- Реализация автономнофункционирующей наномаштабной системы была бы значительным достижением. На микромасштабе (микроуровне) это было осуществлено совсем недавно и кажется, что создание таких наносистем будет возможным в скором времени.

Выводы

Мультидисциплинарная область применения нанотехнологии для создания новых молекул и манипуляция с теми из них, которые доступны в природе, являются многообещающими в сфере усовершенствования диагностики и лечения.

Необходимо принять к сведению, что нанобиотехнология не отдельная дисциплина, которая появилась недавно, но представляет собой точку пересечения традиционных наук, таких как физика, биология, химия, материаловедение, информатика, которые несут коллективное знание, необходимое для развития этих новых технологий.

Література

1. Feynman R. Six Easy Pieces // Addison-Wesley Pub. Co., Menlo Park, CA. – 1963.
2. Stikeman A. Nano Biomaterials: new combinations provide the best of both worlds // Technology Review. – 2002. – P. 35 – 42.
3. Single molecule studies of DNA mrchanics / C. Bustamante, S. Smith, J. Liphardt, D. Snith // Structural Biology. – 2000. – V. 338. – P. 279 – 285.
4. Funatsu T., Harada Y., Higuchi H. Imaging and nano-manipulation of single biomolecules // Biophys. Chem. – 1997. – V. 68. – P.63 – 72.
5. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry / K. Svoboda, C. Schmidt, B. Schnapp, S. Block // Nature. – 1993. – V. 365. – P.721 – 727.

6. Thrall J.H. Nanotechnology and Medicine // Radiology. – 2004. – V. 230, № 2. – P. 315 – 318.
7. Xu L., Frederik P., Pirollo K.F. Self-assembly of a virus-mimicking nanostructure system for efficient tumour-targeted gene delivery // Hum. Gene Ther. – 2002. – № 13. – P. 469 – 481.
8. Lewin M., Carlesso N., Tung C.H. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow *in vivo* tracking and recovery of progenitor cells // Nat. Biotechnol. – 2000. – № 18. – P. 410 – 413.
9. Reynolds A.R., Moein Moghimi S., Hodivala-Dilke K. Nanoparticle mediated gene delivery to tumour neovasculature // Trends Mol. Med. – 2003. – № 9. – P. 2 – 4.
10. Engene O.S. web site, http://www.engeneos.com/comfocus/index.asp.
11. Koo Lee Y.E., Cao Y., Kopelman R. Real-time measurements of dissolved oxygen inside live cells by organically modified silicate fluorescent nanosensors // Anal. Chem. – 2004. – № 76. – P. 2498 – 2505.
12. Niemeyer C.M., Adler M., Pignataro B. Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immunio-PCR // Nucleic Acids Res. – 1999. – № 27. – P. 4553 – 4561.
13. Quality mapping of DNA-protein complex by dynamic scanning force microscopy / S. Gao, L.F. Chi, S. Lenhert, B. Anczykowsky // High Chem. Phys. Chem. – 2001.– № 2. – P. 384 – 388.
14. Niemeyer C.M. Nanotechnology. Tools for the biomolecular engineer // Science. – 2002. – № 297. – P. 62 – 63.
15. Galvin P.A Nanobiotechnology Roadmap of high-throughput single nucleotide polymorphism analysis // Psychiatric Genetics. – 2002. – № 12. – P. 75 – 82.
16. Heller M.J., Forster A.H., Tu E. Active microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hibridization and other genomic applications // Electrophoresis. – 2000. – № 21. – P. 157 – 164.
17. Gerge M. Whitesides, J. Christopher L. Powering an inorganic nanodevice with a biomolecular motor // Science. – 2000. – V. 290 – P. 1555 – 1557.
18. Nishizawa M., Menon V.P., Martin C.R. Metal nanotubule membranes with electrochemically switchable ion-transport selectivity // Science. – 1995. – № 268. – P. 700 – 702.
19. Dielectrophoretic manipulation of avidin and DNA / D. Bakewell, M. Hughes, J. Milner, H. Morgan // Proc. of the Int. Conf. of the IEEE Engg. In Medicine and Biology Soc. – № 2. – V. 20. – 1998. – P. 1079 – 1082.