

ЛЕКЦИЯ

УДК 612.017.2

©Арчаков

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ: НАНОДИАГНОСТИКА И НАНОЛЕКАРСТВА

А.И. Арчаков^{1,2}

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН

²Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

В первом десятилетии XXI века, мы стоим на пороге удивительного мира – мира нанотехнологий. И с замиранием сердца хотим узнать, какой будет завтрашний день в этом новом мире. Молодежи знаком этот мир из фантастических романов, компьютерных игр и кинофильмов. На самом деле – это не только “завтра”, но уже реальное “сегодня”, создаваемое руками наших коллег и сотрудников.

Наука вступила в нанотехнологии широким фронтом с 70-х годов прошлого века – когда появились работы по молекулярному узнаванию (которые сейчас можно отнести к разряду “**нанобиотехнологии**”). Молекулярное узнавание и молекулярное конструирование входят в основной каталог нанотехнологий.

Нанотехнологии качественно отличаются от традиционных дисциплин. На уровнях 10^{-9} метра и ниже привычные, макроскопические методы обращения с веществом становятся неприменимыми, а микроскопические явления, по силе своей пренебрежительно слабые в привычных масштабах, становятся намного значительнее – их влияние на исследуемые процессы уже нельзя игнорировать: здесь надо учитывать свойства и взаимодействия отдельных атомов и молекул, молекулярных комплексов, квантовые эффекты.

В практическом аспекте нанотехнологии – это производство устройств и их компонентов, необходимых для создания, обработки и манипуляции атомами, молекулами и частицами, размеры которых находятся в пределах от 1 до 100 нанометров.

Нанотехнология сейчас находится в начальной стадии развития, поскольку основные открытия, предсказываемые в этой области, пока не сделаны. Тем не менее, проводимые исследования уже дают практические результаты. Использование передовых научных разработок применения нанотехнологий для решения практических хозяйственных задач, например в медицине, военной отрасли, фармацевтической промышленности, позволяет относить нанотехнологии к **высоким технологиям**, т.е. к наиболее новым и прогрессивным технологиям современности и самым наукоемким отраслям промышленности.

Нанотехнологии – это технологии, которые манипулируют единичными объектами размером не более 100 нм и используют их уникальные свойства, возникающие вследствие того, что в наночастицах, благодаря их малым размерам, существенно изменяются физико-химические свойства вещества.

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ: НАНОДИАГНОСТИКА И НАНОЛЕКАРСТВА

Нанотехнологии не ограничивают область изучения и созидания. Название говорит лишь о линейных размерах процессов, определяющих функционирование приборов и свойства материалов: $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$.

Напомню: классический размер атомов по порядку величины равен 0,1 нм; длины валентных связей и расстояния между атомами в кристаллических решетках того же порядка; диаметр двухспиральной молекулы ДНК – 2 нм; толщина клеточной мембраны – 10 нм; размер вирусов от 20 до 300 нм. Минимальный размер углеродных нанотрубок, синтезированных в настоящее время, составляет 0,4 нм; характерные размеры белков – от 10 до 100 нанометров.

Нанопроцессы происходят не только в нано-, но и в больших пространственных масштабах, и есть такие нанопроцессы, для которых наличие наноразмеров принципиально существенно.

Чем, кроме размеров, отличается наномир от, например, макромира?

Какие эффекты существуют в наномасштабах и отсутствуют в макромире?

Почему у наночастиц появляются новые физико-химические свойства?

В основном состоянии все атомы и молекулы вещества находятся внутри, в то время как в наночастицах – на поверхности, что резко изменяет их свойства. Например, инертные материалы могут стать агрессивными. Так, известны сейчас три аллотропных состояния углерода: графит, алмаз и наносостояние – **фуллерены** – молекулярные соединения углерода, пребывающие в виде наночастиц, нанотрубочек, нанополлимеров и дендримеров (рис. 1).

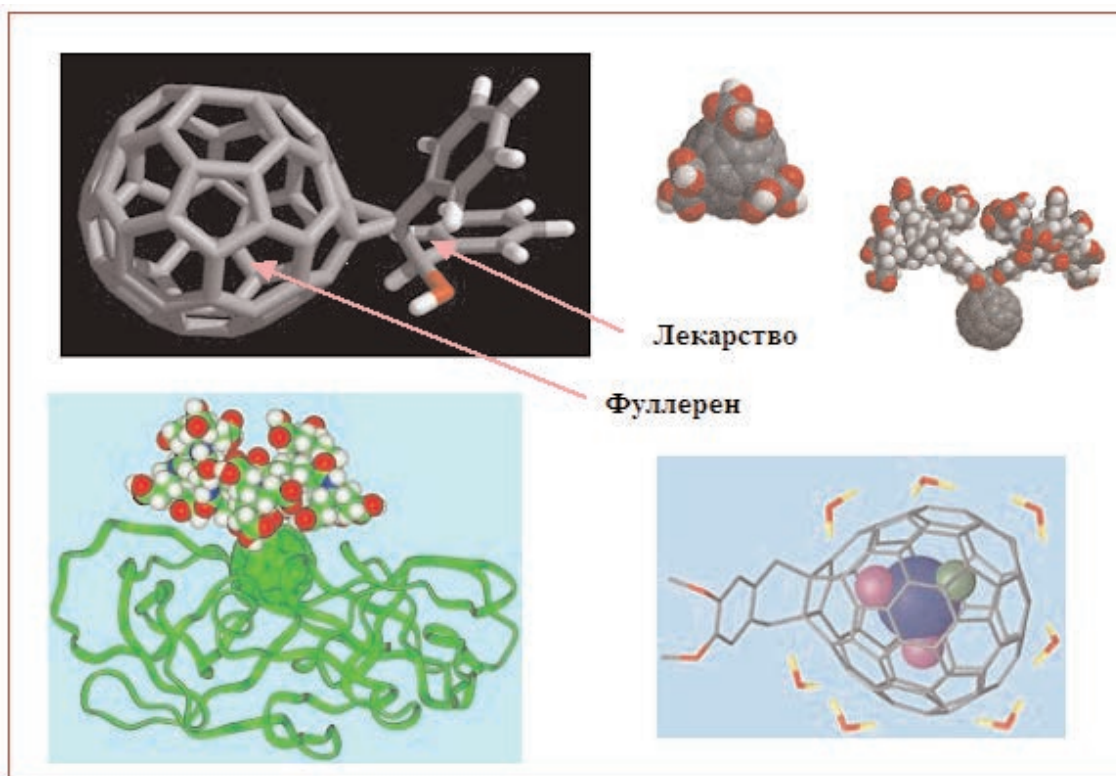


Рисунок 1.

Структура модифицированных фуллеренов.

Тот факт, что процессы в наномире подразделяются на: 1) происходящие *in vivo* и 2) относящиеся к неживой природе, определяет еще одно стратегически важное направление исследований и разработок.

Все живое основано на углероде, в то время как почти вся современная электроника базируется на кремнии. В песке (SiO_2) масса кремния близка к 50%.

Процентное содержание кремния в любом живом организме – от бактерии до человека – совершенно ничтожно: как правило, каждый атом кремния *in vivo* оказывается под контролем. Для кремния, как и для углерода, характерно образование кремнийорганических соединений, в которых атомы кремния соединены в цепи с помощью атомов кислорода. В последнее время синтезированы материалы, состоящие из кремниевых цепочек, включающих до ста атомов кремния.

При переходе к наномасштабам возникает теоретическая и практическая возможность создания гибридных устройств, в которых электроника и органика находятся в функциональной взаимосвязи. А вот тут-то и возникают проблемы, имеющие фундаментальный характер: возникает реальная перспектива построения *altera vitae*, другой жизни, основанной либо на кремнии, либо на гибридах кремния с углеродом, либо только на углероде, но базирующаяся на принципах, отличающихся от тех, на которых базируется все живое (например, использующих другие аминокислоты или вообще не аминокислоты, другой генетический код или вообще не ДНК в качестве носителя наследственной информации). Фантастика становится реальностью. И здесь возникает множество вопросов:

Насколько опасно использование нелинейных молекул (шарообразных фуллеренов, дендримеров, имеющих ветвящуюся структуру, и других) в фармакологии и медицине?

Каковы риски гибридных кремнийорганических технологий для окружающей среды и биосферы?

И, наконец, какие именно научно-технологические дисциплины и области промышленности должны образоваться из круга проблем, в настоящее время называемых нанотехнологиями?

Постановка этого круга вопросов представляется правомерной и перспективной как с научно-технологической, так и с государственной точек зрения.

Нанотехнологии все прочнее утверждаются в окружающем мире. Общий объем мирового рынка нанотехнологий в 2010 году по прогнозам составит около 1 триллиона долларов. Основными продуктами на рынке будут представлены наноматериалы; нанобиотехнология и нанoeлектроника.

Нанотехнологии являются системо-образующей наукой, которая подобно информатике изменит в недалеком будущем лицо всех существующих наук.

В последнее десятилетие возникло новое направление в науке и технологиях – **нанобиотехнология** или **биомолекулярная нанотехнология**. Эта область познания представляет собой биологическое использование нанотехнологий, в качестве связующего звена между живой и неживой природой. Изучение структур и функций природных наноконструкций, существующих в живой клетке необходимый этап для создания нанобиоустройств. Задача нанобиотехнологии - понять принципы функционирования биологических единиц для создания с помощью специальных материалов и интерфейсов малых компонентов живого. Нанобиотехнология способствует тесной кооперации наук о живом с физикой, химией и инженерией.

Медицинские приложения нанобиотехнологии привели к появлению новой отрасли наномедицины [1]. По определению Р. Фрейтаса [1]: "**Наномедицина** - это исправление, конструирование и контроль над биологическими системами человека на молекулярном уровне с использованием разработанных наноустройств и наноструктур".

В области медицины возможности нанотехнологий нацелены на управление с помощью наноматериалов и наночастиц физическими, химическими и биологическими процессами, протекающих в живых организмах на молекулярном уровне. В настоящее время на основе нанотехнологий разрабатываются наноустройства, способные выполнять операции от диагностики и мониторинга до уничтожения патогенных микроорганизмов, восстановления поврежденных органов, снабжения организма необходимыми веществами и т.д.

Нано(био)технологии в медицине – **наномедицина** – развиваются в следующих направлениях:

- **Нанодиагностикумы** на основе молекулярных детекторов и биосенсоров и флуоресцентных наночастиц;

- нанопоровые сиквенаторы индивидуальных геномов;
- наночастицы как контейнеры для доставки лекарств и вакцин;
- наночастицы как лекарства;
- синтетические геномы в качестве саморазмножающихся систем;
- нанобиоинженерия – репарация органов и тканей наноматериалами;
- нанороботы для медицины – устройства, разыскивающие очаги поражения тканей и устраняющие их, и наноустройства, имитирующие функции различных клеток (например, эритроцитов).

Несмотря на сравнительную молодость данного направления исследований, у нас уже есть определенные результаты применения нанобиотехнологии в медицине. Остановлю ваше внимание на достижениях исследователей в этой области и наших перспективных разработках для наномедицины.

Нанодиагностикумы.

Хорошо известно, что своевременная, быстрая и высокочувствительная диагностика является важнейшим этапом в терапии любых заболеваний. Однако, в протеомике существует концентрационный барьер для обнаружения и идентификации белковых молекул в биологическом материале, что отражается в степени количества одобренных FDA биомаркеров несмотря на большое количество направленных на поиск биомаркеров протеомных исследований [2].

Концентрационные уровни белка в биологическом материале, особенно в плазме крови, находятся в очень широком диапазоне от 10^{-3} М – до единичных молекул. И современные диагностические приборы просто не “видят” низкокопийные тканевые белки в крови, сигнализирующие о начале заболевания или изменения состояния организма. Последние нанотехнологические разработки позволяют достаточно успешно решить эту проблему.

Регистрировать белки – маркеры заболеваний можно используя **молекулярные детекторы**, то есть детекторы, измеряющие не концентрацию белков, а считающих единичные молекулы. Нанодиагностикумы на основе молекулярных детекторов подразделяются на два типа устройств:

1. Нанодиагностикумы на основе сканирующих микроскопов высокого разрешения;
2. Нанодиагностикумы на основе нанопроводов и нанопор.

В условиях отсутствия ПЦР-подобной реакции для увеличения количества молекул низкокопийного белка и невозможности получить большой объём биоматериала от пациента одним из способов выделения и концентрирования белков из сложных смесей (например, плазма крови) является их селективный захват и концентрирование на поверхности **нанобиочипов** за счёт биоспецифических межмолекулярных взаимодействий, так называемый **биоспецифический фишинг** [3]. Такой подход позволяет выделять белки с низким содержанием из биологической жидкости и одновременно концентрировать их с последующей идентификацией с помощью специального оборудования – атомно-силового микроскопа (АСМ). При этом чувствительность анализа может достигать 10^{-16} М.

Атомно-силовая микроскопия (рис. 2) позволяет визуализировать и подсчитывать как отдельные белковые молекулы, так и их комплексы. Совмещение атомно-силовых детекторов с технологией биоспецифического фишинга позволяет сконцентрировать специфические молекулы на малой площади и с помощью АСМ подсчитать количество молекул и сдвинуться в область концентрационной чувствительности на уровне единичных молекул в литре, то есть к величине обратного числа Авогадро [4].

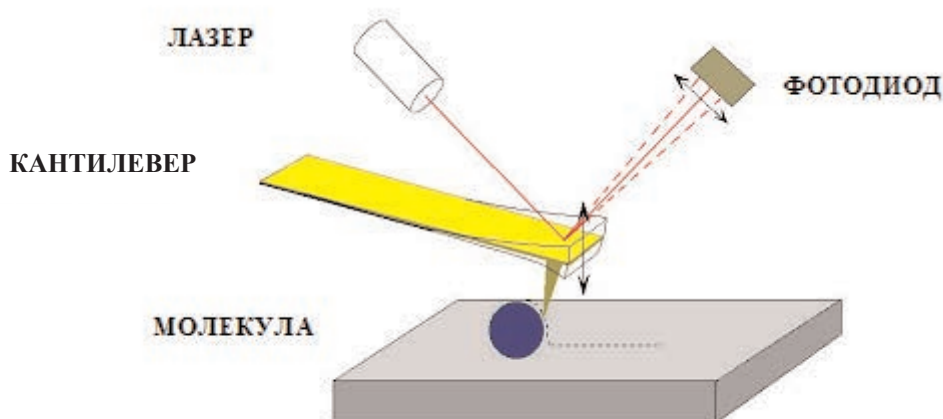


Рисунок 2.

Принцип действия атомно-силового микроскопа "Solver P47H" (НТ-МДТ, Россия).

В сканирующем АСМ острие зонда сканирует поверхность образца, а в качестве подложки используются атомарно-гладкие поверхности. При этом регистрируется сила взаимодействия между острием зонда кантилевера, укрепленного на пьезоэлектрическом кристалле, и поверхностью атомарно-гладкой подложки из высоко ориентированного пиролитического графита или слюды с иммобилизованным образцом. Наблюдаемые изменения соответствуют топографии макромолекулы (рис. 3).

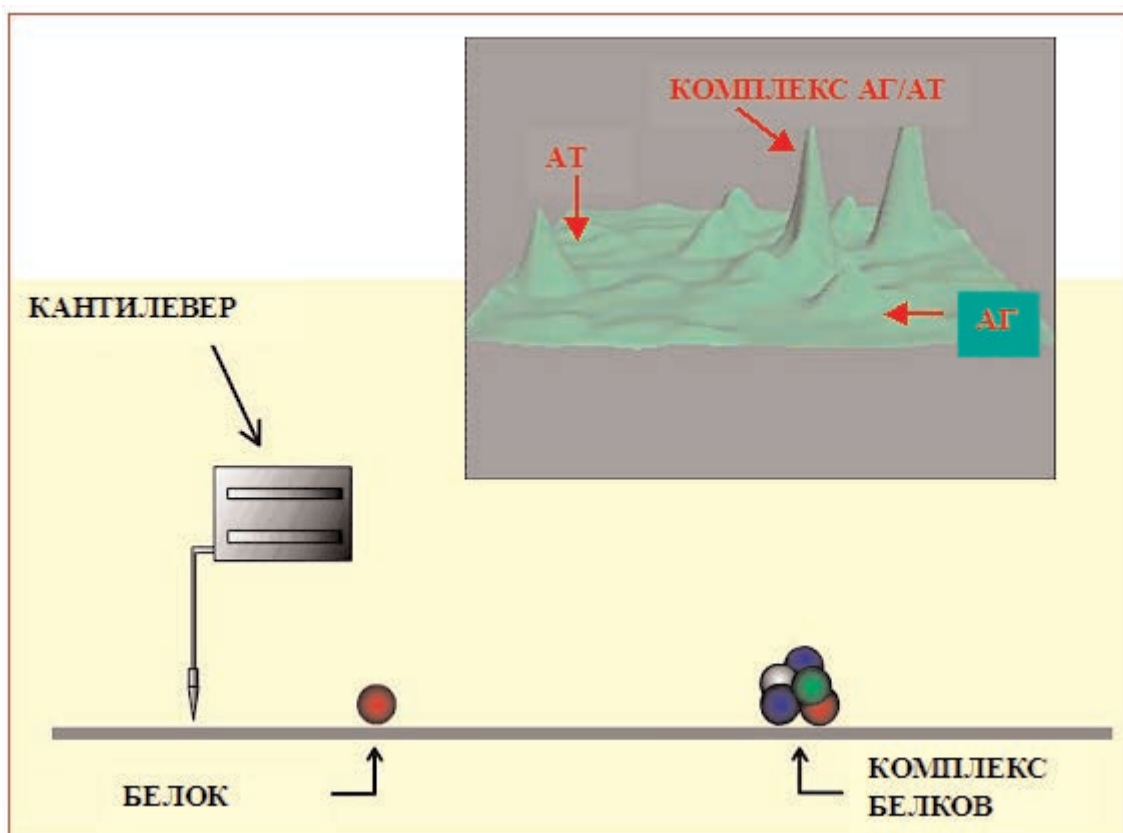


Рисунок 3.

Схема работы АСМ. Обозначения: АТ - антитело, АГ - антиген.

Регистрирующая система позволяет детектировать вертикальное и латеральное смещение кантилевера одновременно. Когда игла взаимодействует с поверхностью молекулы, амплитуда колебаний изменяется. Это изменение соответствует топографии макромолекулы или комплекса молекул.

АСМ-технологии позволяют визуализировать белки в условиях, близких к нативным (например, в правом верхнем углу на рисунке 3 представлено изображение антитела размером ~3-4 нм, антигена ~1,0-1,5 нм и комплекса АГ/АТ размером ~ 5-7 нм).

С помощью АСМ удалось визуализировать широкий спектр водорастворимых белков (иммуноглобулины, ферритин, фосфоорилаза, протеинкиназа) и их комплексов. Нами была продемонстрирована возможность использования АСМ для регистрации как иммунокомплексов антиген/антитело: НВs-антиген/антитело, НСcore-антиген/антитело, инсулин/антитело, α-фетопропротеин/антитело, гликодеин/антитело, - так и белковых комплексов: трипсин/ингибитор, химотрипсин/ингибитор, стрептавидин/биотинилированный олигонуклеотид, тромбин/аптамер.

Замена биоспецифического фишинга на необратимый фишинг позволила понизить концентрационный предел чувствительности на несколько порядков – до 10^{-16} М. На комбинации необратимого фишинга и атомно-силовой микроскопии мы разработали **диагностические системы для выявления маркеров заболеваний** [5]. Это позволяет использовать молекулярный детектор на базе АСМ для диагностики инфекционных заболеваний (гепатитов В и С), рака, сердечно-сосудистых заболеваний и т.п.

В наших работах были получены АСМ-изображения диагностических маркеров болезни Альцгеймера, гепатитов В и С в сыворотке крови (антитела к НСVcore-АГ, анти-НСVcore-АГ и комплексы анти-НВsАГ/НВsАГ, анти-НСVcore-АГ/НСVcore-АГ), вирусных частиц гепатитов В и С (рис. 4) с помощью анти-НВs-антигенов и анти-НСVcore-антигенов, иммобилизованных на наночипе. Это объекты от 2 до 40 нм. Их можно подсчитать.

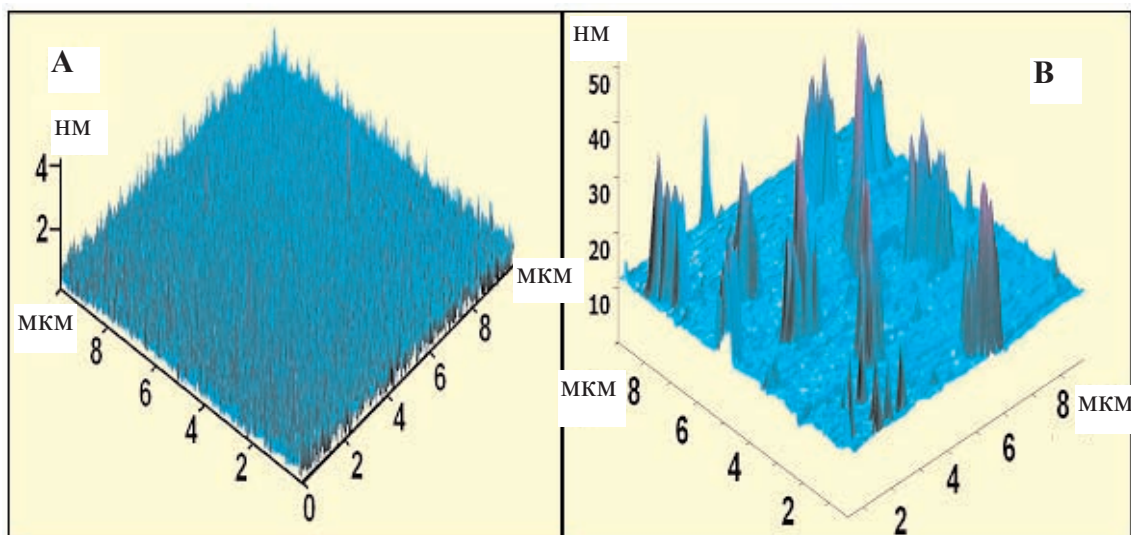


Рисунок 4.

АСМ-изображение частиц вируса гепатита С (В), выловленных из сыворотки человека с помощью технологии фишинга на подложку с иммобилизованными антителами anti-НСVcore (А).

Сравнительный анализ данных по обнаружению НВs-антигенов в сыворотке крови с помощью ИФА и молекулярного детектора на базе АСМ показал совпадение в 75% случаев результатов исследований сывороток на гепатит В. При сравнении результатов анализа сывороток крови на гепатит С по обнаружению НСVcore-антигена с помощью АСМ и ПЦР наблюдалось соответствие в 74% случаев.

Биочипы, изготовленные в виде АСМ-нанополей, на которых нанесены различные макромолекулярные зонды (антитела или антигены) на разные заболевания, расширяют возможности молекулярных детекторов на основе АСМ – осуществление диагностики сразу несколько сотен заболеваний с помощью одного наночипа.

АСМ можно применять и для измерения активности единичных молекул ферментов. Мы можем “видеть” дыхание молекулы фермента Р450 Вm3 по флуктуациям высоты работающей молекулы в условиях, близких к нативным [5].

Применение такого нанотехнологического подхода в медицинской протеомике позволит повысить чувствительность медицинской диагностики и создать атлас белков органов и тканей. Подход позволяет преодолеть концентрационный барьер и уравнивать протеомику в ее аналитическом потенциале с геномикой и транскриптомикой, что создает методическую основу новой области знаний – **системной биологии**, которая будет иметь громадные перспективы в будущем.

Другими молекулярными детекторами, позволяющими решать проблему низких концентраций биомолекул, являются детекторы, созданные на основе **нанопровода**.

Для медицинской диагностики созданы полупроводниковые нанопровода толщиной в несколько атомов, расположенные между электродами на тончайшей платформе [6]. На поверхность нанопроводов наносят белки-антитела, способные специфически связывать белки-антигены и вирусные частицы. Межмолекулярные взаимодействия регистрируются по изменению проводимости нанопровода. С помощью такого **нанопроводного детектора** можно регистрировать единичную вирусную частицу.

Для одновременной регистрации вирусов нескольких видов нанопровод покрывают соответствующими антителами, при этом характер ответа при связывании разных вирусов индивидуален. Наша разработка молекулярного детектора с использованием нанопроводов [ИБМХ РАМН совместно с ИФП СО РАН, 2006] применима для регистрации единичных клеток-маркеров инфекционных и соматических заболеваний, а также единичных вирусов, например: гепатитов В и С (рис. 5).

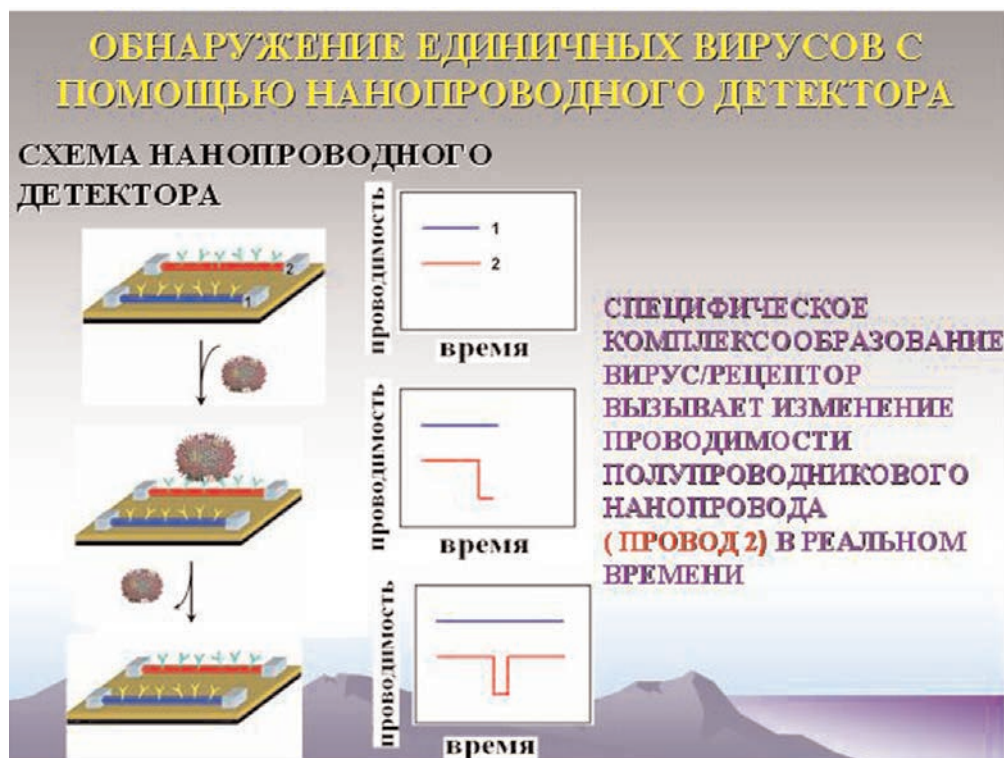


Рисунок 5.

Обнаружение единичных вирусов с помощью нанопроводного детектора.

Наиболее широкое применение в биологии и медицине нашли *оптические биосенсоры*.

Биосенсоры - новые аналитические устройства, использующие биологический материал для "узнавания" молекул и дающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала.

К оптическим биосенсорам относятся конструкции, использующие эффекты поверхностного плазмонного резонанса [7] и резонансного зеркала [8], позволяющие в протеомных исследованиях в течение нескольких секунд регистрировать образование комплексов макромолекул с высокой концентрационной чувствительностью (до 10^{-12} М).

На поверхности нанослоя, который является дном измерительной кюветы, иммобилизуются молекулы, которые комплементарно связываются с добавляемым в кювету молекулой лиганда, например, белком, нуклеиновой кислотой и наоборот. Увеличение поверхностной концентрации лиганда, обусловленное формированием комплексов лиганд/лигат вызывает увеличение индекса преломления света в чувствительном слое на сенсорной поверхности, что в свою очередь вызывает изменение сигнала (рис. 6). Прослеживается тенденция по созданию многоканальных биосенсоров, например, SPR-биосенсор ("Biacore", Швеция), позволяющих регистрировать сразу до 400 реакций комплексообразования в реальном времени. Такие биосенсоры являются удобным инструментом для описания синтезируемых для задач протеомики аптамеров и их комплексов с белками-партнерами. Сразу до 400 аптамеров могут быть одновременно анализироваться в одном эксперименте.

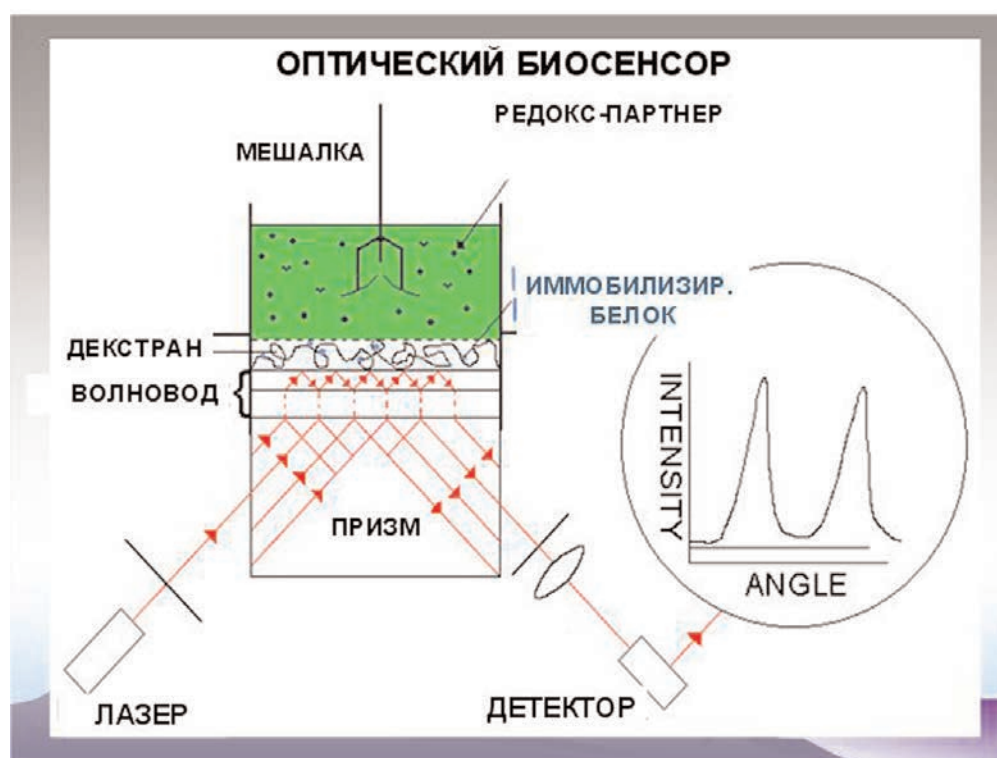


Рисунок 6.

Принцип работы оптического биосенсора.

Достоинством оптических биосенсоров является также их способность регистрировать как белок-белковые взаимодействия (например, антиген/антитело), так и взаимодействия лекарство/рецептор, что имеет важное значение для создания и тестирования лекарств.

Разработана [5] **биосенсорная система регистрации маркеров социально-значимых заболеваний** (в частности, гепатитов В и С) в режиме реального времени без использования меток.

Так, биосенсором с иммобилизованными на подложке антителами анти-HBs выявляется поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в сыворотке пациентов по изменению индекса преломления света. Этот способ диагностики мы успешно применили и для выявления антител к HCVcore-антигену в сыворотки крови для диагностики гепатита С, при этом чувствительность измерений составила 10^{-9} М.

С помощью оптического биосенсора нами был выполнен анализ 345 сывороток на содержание поверхностного антигена гепатита В, анти-HCVcore-антигена на гепатит С. Полученные данные совпадали с данными ИФА (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительные данные по детекции HBsAg в сыворотке крови с помощью оптического биосенсора и ИФА.

| Количество сывороток | ИФА | Анализ с помощью оптического биосенсора |
|-----------------------------|------------|--|
| 14 | + | + |
| 5 | + | - |
| 10 | - | - |
| 1 | - | + |

Преимуществами разработанного метода являются быстрота анализа (5-8 мин) и возможность многократного использования (до 100-150 раз) биочипа, что существенно снижает стоимость анализа.

Помимо биосенсоров, конвертирующих биомолекулярные взаимодействия в оптический, электрический, акустический и др. сигналы существуют ещё биосенсоры, конвертирующие биомолекулярные взаимодействия в информационный двоичный код.

Так, в нашей лаборатории создан биосенсор, превращающий белок-белковые взаимодействия непосредственно в информационный сигнал – оптико-акустический биосенсор [5]. Реализован он **на компакт-дисках к персональному компьютеру** (рис. 7).

В этом случае биочипом является стандартный компакт-диск с нанесенными на него белковыми полями. С помощью ридера компакт-дисков персонального компьютера считываются “ошибки” – информация, возникающая в результате нанесения белков на поверхность CD. В дальнейшем нанесение на такой биочип образца, содержащего биомолекулы-партнеры к иммобилизованным белкам, приводит к формированию молекулярных комплексов, которые вновь изменяют оптические свойства поверхности диска; появляются новые “ошибки”. Сравнение распределения ошибок на поверхности компакт-диска, вызванных образованием комплексов, с исходным позволяет рассчитывать количество образовавшихся комплексов и рассчитывать константы взаимодействия партнеров. Сигнал можно также преобразовывать в свет цветовой гаммы и музыку (рис. 8).

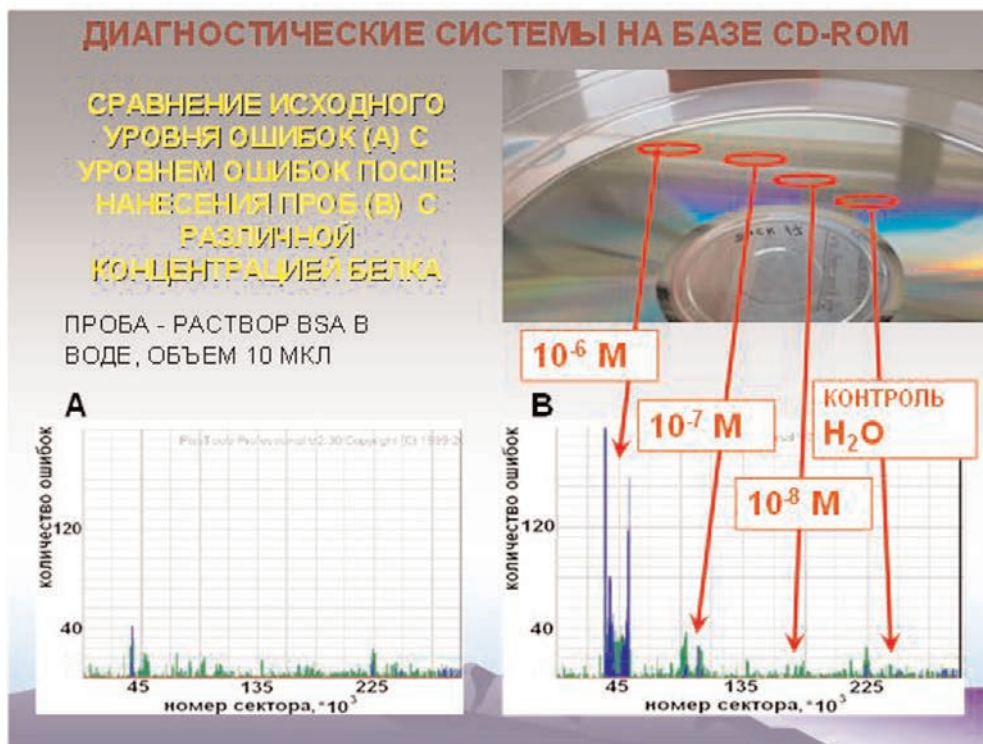


Рисунок 7.
Диагностические системы на базе CD.



Рисунок 8.
Превращение сигнала в музыку.

Новая наша разработка экспресс-нанодиагностическая система на основе компакт-диска персонального компьютера для выявления белковых маркеров инфаркта миокарда и онкомаркеров в биологической жидкости с помощью оптико-акустического детектора использует в качестве биочипа обычный CD-диск. Система применима в полевых и домашних условиях, удобна для использования в машинах скорой помощи [5].

Наночастицы как лекарства.

В период 1998-2005 г.г. опубликовано более 200 научных работ, демонстрирующих эффективность применения фуллеренов при лечении целого ряда заболеваний, включая рак, склероз, вирусные и бактериальные инфекции (менингит и ВИЧ). В России ведутся работы и получены положительные результаты, подтвержденные публикациями и патентами, в области применения фуллеренов и их модификаций для лечения гриппа, онкологических заболеваний и бактериальных инфекций (туберкулез). Получены данные о возможности использования наночастиц для производства эффективных вакцин.

Разнообразие технологий производства фуллеренов и их производных позволяет планировать существенное расширение спектра применения наночастиц как лекарств.

Лекарства в виде наночастиц обладают целым рядом преимуществ: высокой скоростью растворения, повышенной биодоступностью, быстрым терапевтическим эффектом, снижаются риски развития побочного действия.

Наши исследования на протяжении тридцати лет привели к созданию нанолечения – *препарата “ФОСФОГЛИВ”* (рис. 9). Также разработана инъекционная форма лекарственного препарата “ФОСФОГЛИВ” с использованием наночастиц.

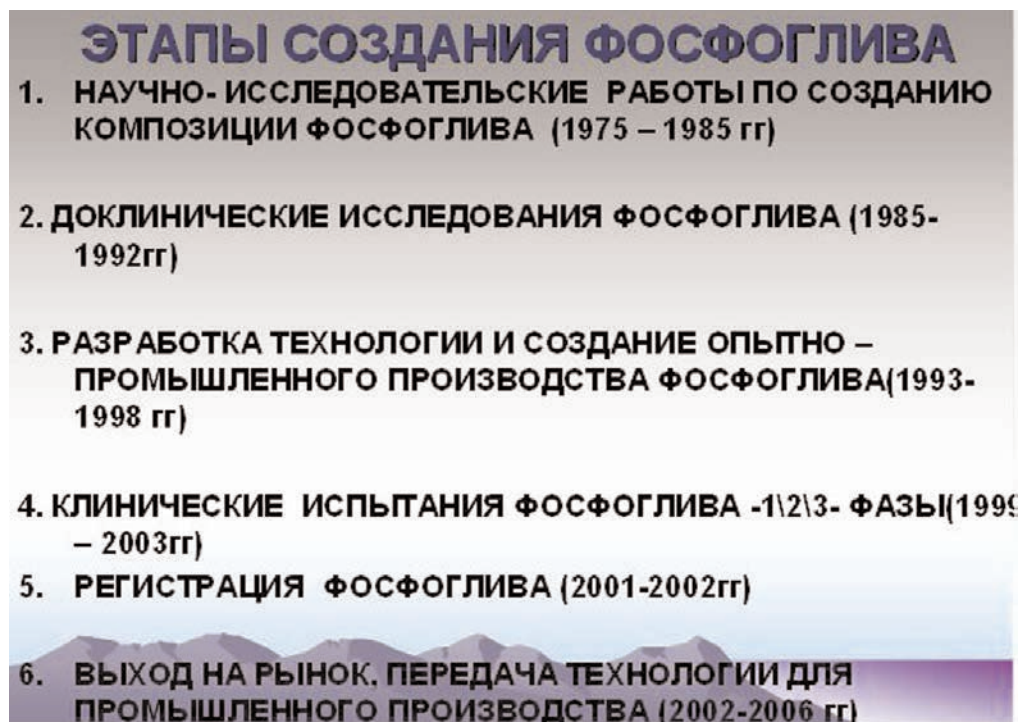


Рисунок 9.
Этапы создания ФОСФОГЛИВА.

Наносистема лекарственного средства “ФОСФОГЛИВ” представляет собой частицы диаметром не более 50 нм и содержит соевый фосфатидилхолин и глицерризиновую кислоту. При клиническом применении препарата отмечается его ингибирующее действие на репликативную активность вирусов гепатита В и С,

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ: НАНОДИАГНОСТИКА И НАНОЛЕКАРСТВА

а также положительное влияние на иммунный интерфероновый статус. Ремиссия при лечении гепатита С с использованием препарата составила 70%.

“ФОСФОГЛИВ” обладает очень низкой токсичностью, не вызывает аллергических реакций, устойчив при хранении. Получают препарат эмульгированием активных компонентов в водном растворе мальтозы под давлением 1500 атм. Потом следуют процессии ультрафильтрации и лиофилизации раствора в флаконах. Получено также изображение частиц препарата с помощью АСМ. Основная масса частиц имеет размеры около 40 нм.

Сейчас “ФОСФОГЛИВ” – сертифицированный лекарственный препарат из группы гепатопротекторов, обладает также противовирусной активностью (рис. 10). Фосфатидилхолин в составе средства, действуя наподобие “мембранного клея”, восстанавливает структуру поврежденных мембран гепатоцитов, восстанавливая функцию печени. Глицирризиновая кислота в виде натриевой соли подавляет репродукцию вируса в печени и других органах за счет стимулирующего действия на продукцию интерферона, увеличения активности естественных киллеров и др. Препарат показан при острых и хронических гепатитах (А, В, С и D), дегенеративных изменениях печени, при лекарственном и алкогольном поражении печени, при псориазе, экземе и бронхиальной астме.



Рисунок 10.

Лекарственные формы ФОСФОГЛИВА.

Наночастицы как контейнеры для доставки лекарств.

Помимо создания новых лекарственных форм многие разработки идут по пути конструирования наносистем, способных доставлять лекарство непосредственно к органам и клеткам-мишеням. Улучшенный транспорт лекарств в очаг развития патологического процесса позволяет добиться повышения эффективности уже существующей лекарственной терапии. Объем продаж в США лекарств с системой улучшенной доставки в настоящее время составляет 20% от общего объема рынка фармпрепаратов.

В России разработки систем адресной доставки ведутся по двум направлениями: пассивный направленный транспорт (облегченное проникновение естественных барьеров) и специфическая доставка (“узнавание” патологической ткани), что отвечает мировому уровню развития исследований в этой области. Практические результаты уже в ближайшее время могут быть достигнуты в области использования фосфолипидных частиц, липосом и фуллеренов в качестве контейнеров для доставки препаратов (в. т.ч. и вакцин).

Лекарства, снабженные системой доставки, имеют ряд преимуществ по сравнению со свободными препаратами: а) повышается растворимость гидрофобных лекарств; б) улучшается их проникновение в клетки; в) улучшается фармакокинетика, г) у многих лекарств появляется способность пересекать мембранные и гематоэнцефалический барьеры. **Использование наносистем для транспорта лекарственных препаратов** позволяет не только увеличить биодоступность последних, но и обеспечить поступление препарата в определённые органы и клетки-мишени.

За последние 20 лет достигнуты существенные успехи в разработке **фосфолипидных транспортных систем**. Так, **фосфолипидные наночастицы** (мицеллы/липосомы) до сих пор имеют ряд преимуществ перед другими, например, полимерными наночастицами. Они нетоксичны, биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, благодаря своему строению и составу, имеют высокое сродство к мембранам клеток, что позволяет доставлять лекарство внутрь клетки. В настоящее время в мире существует 10-15 сертифицированных наносистем, используемых в качестве переносчиков лекарств, а на фармацевтическом рынке – несколько десятков препаратов, в основном, противоопухолевых, снабженных фосфолипидной системой транспорта (липосомы), например: дауномицин и доксорубицин (2005), винкристин (2006), аннамицин и третиноин (2005). Большинство препаратов находятся на последних стадиях клинических испытаний.

Высокую транспортную эффективность показала и наша разработка транспортной системы [9] – **фосфолипидная наносистема “Нанофосфолип”**, представляющая собой стабильный при хранении лиофильно высушенный порошок фосфолипидных наночастиц, диаметром 20-30 нм.

Такие наноконтейнеры лекарств хранятся до 5 лет без потери фармакологических свойств, обладают большей биодоступностью, слабо поглощаются ретикулоэндотелиальной системой клеток, фармакодинамика их в 2-3 раза лучше, чем у липосом сложного состава.

НАНОФОСФОЛИП как транспортную систему можно наполнять различными лекарственными субстанциями (табл. 2).

Таблица 2. Композиции лекарственных препаратов на основе фосфолипидных наночастиц.

| Композиция | % встраивания лекарственной субстанции | Размер частиц, нм | Фармакологическое действие |
|--------------------------------|--|-------------------|---|
| Фосфолипидная наносистема (ФН) | | 19±3 | Обладает антитоксическим действием |
| Арбидол + ФН | 98 | 8±3 | Противовирусное |
| Доксорубицин + ФН | 96 | 17±2 | Противоопухолевое |
| Хлорин Е6 + ФН | 90 | 21±3 | Фотодинамическая терапия и диагностика |
| Будезонид + ФН | 99 | 22±5 | Противовоспалительное (глюкокортикостероид) |
| Индометацин + ФН | 98 | 35±5 | Нестероидный противовоспалительный препарат |
| Липосевая кислота + ФН | 99 | 35±3 | Антиоксидантное |

Уже проведено сравнительное исследование фармакологического эффекта на крысах при пероральном введении крысам с вирусом гепатита А свободной лекарственной формы Арбидола и в составе фосфолипидных наночастиц (Арбидол-НФ). Показано увеличение концентрации Арбидола-НФ в крови в несколько раз по сравнению со свободным Арбидолом через 15 мин после приема препарата внутрь и его эффективное ингибирующее действие на репродукцию вируса гепатита А в более низких дозах, чем свободный Арбидол.

В настоящее время мы работаем над созданием технологии производства фосфолипидной транспортной наносистемы (рис. 11), предназначенной для последующего её насыщения лекарственными субстанциями.

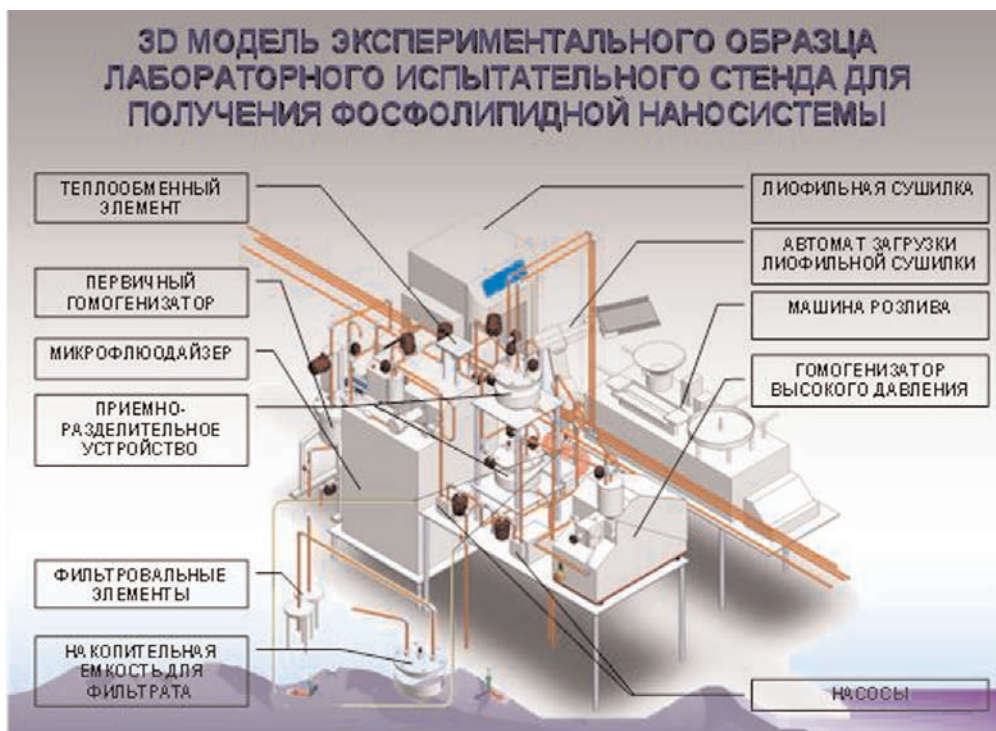


Рисунок 11.

Макет экспериментальной установки для получения НАНОФОСФОЛИПА.

В долгосрочной перспективе существующий в России научный задел позволяет довести до коммерческих препаратов специфические системы доставки на основе антител или аптамеров, способных избирательно связываться с патологически измененными клетками.

Нанопоры для регистрации единичных олигонуклеотидов и секвенирования генома.

Развитие персонализированной медицины напрямую связано с информацией о геноме человека. Для расшифровки генома в 1990 году правительство США санкционировало проект "Геном человека". Стоимость секвенирования генома примата составляла порядка 20 млн. долларов, занимая по времени 3-5 месяцев. Для удешевления процедуры секвенирования генома человека до порядка 1000 долларов был открыт проект "Персональный геном", инициированный Гарвардской медицинской школой [10]. Осуществить это можно с применением новых методов секвенирования генома. Одним из наиболее перспективных методов идентификации азотистых оснований в молекуле ДНК может стать метод, основанный на использовании физических различий между четырьмя нуклеотидами. Эти различия можно выявить, протягивая ДНК через нанопору, и регистрируя при этом электрический сигнал, возникающий в электронной структуре нанопоры. Такой метод не предполагает использования процедуры

амплификации, что значительно удешевляет технологию секвенирования до 1000 долларов за сутки и повышает быстродействие процедуры. Согласно оценкам исследователей из Гарвардского Университета, первый шаг в создании такой технологии сделан: создано устройство на основе нанопор, регистрирующие отдельные олигонуклеотиды. В устройстве счета единичных олигонуклеотидов регистрируется изменение во времени электрического сопротивления нанопоры с диаметром порядка нескольких нанометров при прохождении через нее ДНК. К сожалению, пока исследователи имеют затруднения в тестировании последовательности оснований, так как ДНК совершает обратные движения, как бы танцует. Решение разрабатывается с использованием электрического поля для удержания движения ДНК под контролем.

Такой подход необходимо развивать и в нашей стране, так как это даёт возможность сконструировать портативные, относительно дешёвые, быстродействующие наноустройства для секвенирования генетического материала. Эти устройства найдут применение и в решении проблем медицинской диагностики, и в анализе продуктов на наличие генетически-модифицированного материала.

Нанороботы, наноматериалы для тканевой биоинженерии, саморазмножающиеся геномы.

Изначально (1959) концепция наномедицины возникла из фантастических идей создать и внедрить в тело человека крошечные **нанороботы** и родственные им механизмы, которые выполняли бы “ремонт” клеток на молекулярном уровне [11].

Например, механический наноробот помещается в кровяное русло (рис 12), направляется в сердце, “осматривает” его, находит поврежденный клапан и с помощью микроскальпеля оперирует. Другая возможность - *микроробот* – помещается в организм пациента (рис. 13), находит и уничтожает больные клетки.

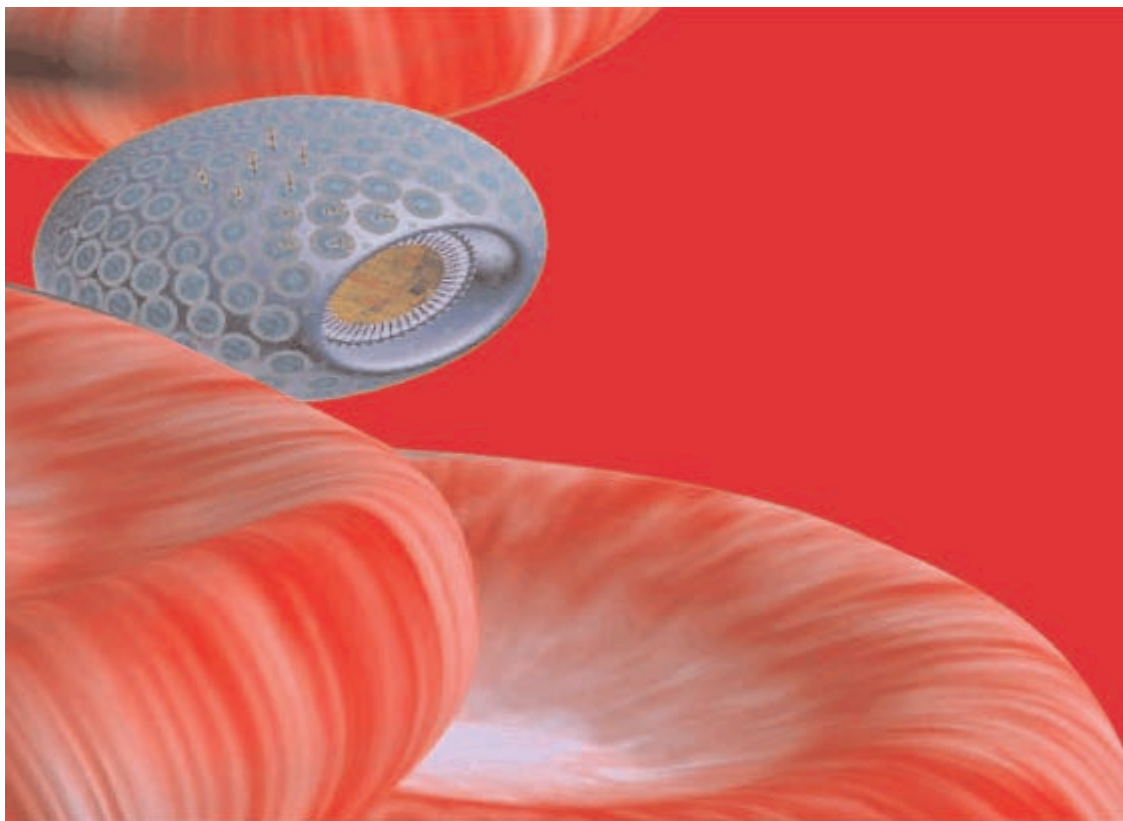


Рисунок 12.

Наноробот в кровяном русле (адаптировано из www.nanonewsnet.ru (2009)).

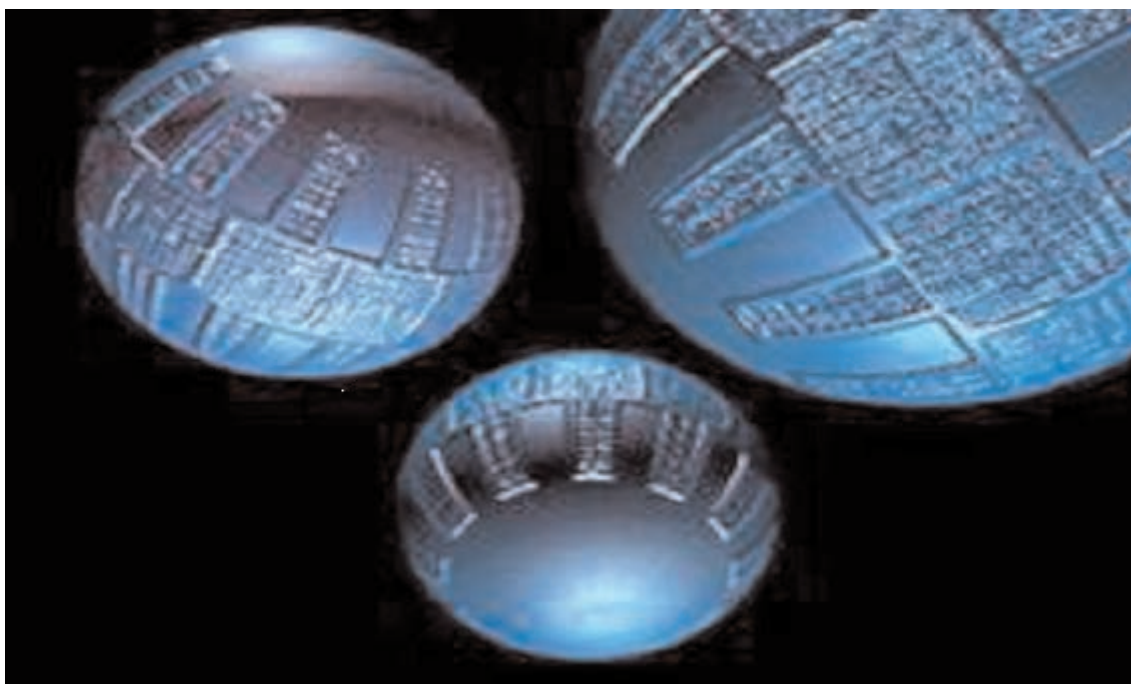


Рисунок 13.

Искусственные клетки крови нанометрических размеров - "респироциты"
(адаптировано из www.microbot.ru (2003)).

Медицинские нанороботы являются кибернетическими устройствами нанометрических размеров, изготовленные с атомарной точностью. Медицинские нанороботы способны функционировать в организме человека производя контролируемую коррекцию молекулярных и клеточных процессов.

В настоящее время, не существует теоретических барьеров, препятствующих созданию такого рода устройств с широким спектром функций. Современный уровень развития нанотехнологии позволяет конструировать работоспособные медицинские нанороботы, в частности, устройства для контроля уровня глюкозы в крови (перспективы использования - при мониторинге диабетических больных) и для вырабатывания инсулина. В то же время, методами молекулярного моделирования продемонстрированы возможности создания на порядок более сложных систем: искусственных фагоцитов, эритроцитов и т.п.

Если усилия нанобиотехнологии направлены на то, чтобы создавать новые методы диагностики, новые транспортные системы и новые лекарства, то в наномедицине на первое место выходят медицинские нанороботы, наноматериалы для тканевой биоинженерии, и саморазмножающиеся геномы.

Особые свойства наноматериалов могут быть использованы для выращивания искусственных органов и тканей. За рубежом разработана на сегодняшний день методика восстановления хрящевой ткани, которая по механическим и биохимическим свойствам была близка к естественному хрящу. В России задел в этом направлении сделан в области использования **биосовместимых наноматериалов** для восстановления механических свойств зубной эмали.

Самовоспроизводящиеся геномы представляют собой минимальные искусственные биосистемы, способные самостоятельно выполнять лишь одну базовую функцию – воспроизводить себя. Технологии живых систем перспективны с точки зрения контролируемого создания наноустройств различного назначения. Принципиально важной особенностью биологических систем является способность к самовоспроизведению.

В России имеется необходимая компонентная база и коллективы с опытом синтеза (конструирования) олигонуклеотидных конструкций для начала работ по созданию минимальной искусственной биосистемы.

Начало 2008 года ознаменовалось мировой сенсацией – Крейгу Вентеру и Клайду Хатчисону удалось синтезировать первый в мире **искусственный геном**. Это был геном паразитической бактерии *Mycoplasma genitalium*, состоящий всего(!) из 485 генов. Процесс синтеза очень сложный и многоступенчатый: сначала синтезируются олигонуклеотиды, затем из них формируются фрагменты генома с помощью реакций лигирования и полимеразной циклической сборки, и, наконец, собирается полный геном. Внедрение же этого искусственного генома в бактериальную клетку без генетического аппарата привело к созданию следующей сенсации – искусственной бактерии *Mycoplasma laboratorium* (рис. 14). Искусственный геном заработал! Т.е. впервые за всю историю науки синтезирована живая система.



Рисунок 14.

Искусственная бактерия *Mycoplasma laboratorium*
(адаптировано из www.squidoo.com/energy-invention (2008)).

Создание синтетического генома позволит лучше понять, как он работает, как взаимодействуют гены в составе полного генома. Станет возможным проследить, как эволюционирует сложный геном. В биотехнологии возможна будет манипуляция отдельными генами микроба-производителя, можно будет создать геном, направленный на синтез нужного вещества (например, антибиотика).

Здесь на ум приходят слова: **“ОКОЛО 20000 ЛЕТ ТОМУ НАЗАД ЧЕЛОВЕК НАЧАЛ ОДОМАШИВАТЬ РАСТЕНИЯ И ЖИВОТНЫХ. СЕЙЧАС НАСТУПИЛО ВРЕМЯ ОДОМАШИВАТЬ МОЛЕКУЛЫ.”** [12].

Индустрия нанотехнологий.

Внедрение нанотехнологий в биологию и медицину способно существенно расширить возможности применения конкурентоспособных результатов исследований в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве уже в самом ближайшем будущем. На это направлена и Национальная доктрина развития в Российской Федерации нанотехнологий, принятая в 2006 году.

Мировые инвестиции в сферу разработки нанотехнологий значительно возрастают из года в год. В США национальная доктрина в области

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ: НАНОДИАГНОСТИКА И НАНОЛЕКАРСТВА

нанобиотехнологий включает создание высокочувствительных нанодетекторов для выявления заболеваний на ранней стадии. Предполагаемый рынок нанотехнологического оборудования для медицины в США на базе электронных и атомно-силовых микроскопов составит порядка 5 млрд. долларов.

В настоящее время в России ведутся работы по созданию современной инфраструктуры и реализации потенциала отечественной наноиндустрии. Так, в 2007 году создана Государственная корпорация **“Российская корпорация нанотехнологий” (РОСНАНОТЕХ)**, которая должна содействовать реализации государственной политики в сфере нанотехнологий, развитию инновационной инфраструктуры в сфере нанотехнологий, реализации проектов создания перспективных нанотехнологий и наноиндустрии. Утверждена Федеральная целевая программа “Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008-2010 годы”. Объём финансирования в рамках программы — 27,7 млрд. рублей. Программой назначены головные организации отраслей по направлениям развития нанотехнологий, в частности по направлению “Нанобиотехнологии” головной организацией назначен Российский научный центр “Курчатовский институт”. В сентябре 2007 года Минпромэнерго РФ утвердило масштабную программу развития электронной промышленности страны до 2025 года, в рамках которой предусматриваются инвестиции на общую сумму около 250 млрд. рублей, существенная часть которых будет израсходована на создание прорывных технологий, и в частности, нанотехнологий.

Какой будет нанобиотехнология в нашем мире? Как отразятся её прорывные и фантастические сегодня разработки на здоровье и благополучии нашей цивилизации? Как они изменят нас, наше отношение к жизни и к планете? Ответы на эти вопросы определяют стратегические направления развития нанотехнологий, а в более широком контексте – и цивилизации XXI века вообще.

“ДЕЙСТВИТЕЛЬНОСТЬ В ТОМ, ЧТО НАНОТЕХНОЛОГИЯ УЖЕ РЕАЛЬНОСТЬ СЕГОДНЯШНЕГО ДНЯ” [13].

Таким образом, нанотехнологии, как и информационные технологии, призваны изменить наши представления об окружающем мире. Одна из основных задач нанотехнологий – заполнить ту пропасть, которая существует между ЖИВОЙ природой и НЕЖИВОЙ. Вероятно, только с помощью этой науки мы в состоянии понять их принципиальные отличия. В тоже время, уже существующие в настоящем времени достижения нанотехнологий – это создание синтетических саморазмножающихся геномов и появившаяся в прошлом году синтетическая клетка микоплазмы – *Mycoplasma laboratorium* (Институт Крейга Вентера, США), – позволяют надеяться на то, что казавшаяся непреодолимой эта пропасть в ближайшем будущем будет преодолена. Поэтому не вызывает никакого сомнения, что нанобиотехнология и наномедицина – это науки, которые составляют основу биомедицины начала 21-го столетия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Freitas R. Jr.* (2005) *Nanomedicine*, **1**, 2-9.
2. *Anderson N.L., Anderson N.G.* (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 845-867.
3. *Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G.* (2009) *Proteomics*, **9**, 1326-1343.
4. *Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G.* (2007) *Proteomics*, **7**, 4-9.
5. *Archakov A.I., Ivanov Y.D.* (2007) *Mol. Biosyst.*, **3**, 336-342.
6. *Patolsky F., Zheng G., Leiber C.M.* (2006) *Nanomedicine*, **1**, 51-65.
7. *Sigmundsson K., Masson G., Rice R., Beachemin N., Obrink B.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 8263-8276.
8. *Ivanov Y.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I.* (2006) *Proteomics*, **6**, 1399-1414.

-
9. *Ипатова О.М.* (2005) Кн.: Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. Изд. ГУ НИИ БМХ РАМН.
 10. www.mcb.harvard.edu/branton/projects-NanoporeSequencing.htm
 11. www.zyvex.com/nanotech/Feynman.html
 12. *Lindquist S.* (2003) Engineering and Medicine, Crete, Greece, 1-5.
 13. *Service R.F.* (2004) Science, **304**, 1732-1734.

Поступила: 14. 04. 2009.