

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

ОСНОВЫ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Составители:
М.А. Наквасина,
В.Г. Артюхов

Воронеж
Издательский дом ВГУ
2016

ПРЕДИСЛОВИЕ

С 2014–2015 учебного года на биолого-почвенном факультете реализуется дисциплина «Основы бионанотехнологии» для студентов 4-го курса очной и 5-го курса очно-заочной формы обучения. В ходе изучения основ бионанотехнологии обучающиеся знакомятся с перспективными направлениями нанотехнологий, бионанотехнологий и наномедицины. Главное внимание в программе дисциплины уделяется изучению наночастиц как наиболее развитому направлению нанотехнологических разработок. Рассматриваются основные методы характеристики наноструктур и наноматериалов, особенности наночастиц, обеспечивающие проявление их свойств, отличных от таковых для макроматериалов и важные для их биомедицинского применения. Студенты получают представление о типах наночастиц, применяющихся в биомедицинских исследованиях, их свойствах, преимуществах и недостатках, особенностях «функционализации», путях поступления в организм, механизмах проникновения в клетки и их модифицирующего воздействия на структурно-функциональное состояние биомолекул, клеток и внутриклеточных компонентов. Обсуждаются вопросы и проблемы, связанные с необходимостью осуществления контроля биоактивности, биобезопасности и токсичности наночастиц по отношению к биосистемам различного уровня организации.

Дополнением к теоретическому курсу, основное содержание которого на данный момент изложено в учебном пособии М.А. Наквасиной, В.Г. Артюхова «Бионанотехнологии: достижения, проблемы, перспективы развития» (2015), является настоящее учебно-методическое пособие, предназначенное для проведения лабораторных занятий. В нем представлена краткая характеристика наночастиц, используемых в биомедицине, и техногенных наночастиц, описаны методы их исследования, а также лабораторные работы, направленные на приобретение и развитие навыков получения липосом и введения в них биомолекул, исследования действия наночастиц фотосенсибилизаторов, серебра, углерода, хитозана на структурно-функциональное состояние опухолевых, эритроцитарных и лимфоцитарных клеток и их компонентов. Применительно к каждой теме изложены теоретические представления о структуре и свойствах наночастиц, особенностях их биологического действия, направлениях использования; дано описание лабораторных работ, а в конце темы приводятся контрольные вопросы. Лабораторные работы различного уровня сложности рассчитаны на выполнение студентами разных профилей направления подготовки «Биология», специализирующимися как на классических, так и экспериментальных кафедрах, т.е. они адаптированы к уровню их физико-химических и математических знаний.

В учебно-методическом пособии отражены современные тенденции междисциплинарного взаимодействия биофизики, биотехнологии, иммуно-

В основе создания современных терапевтических и диагностических препаратов лежит применение наночастиц в качестве платформ, на поверхности которых производят сборку различных функциональных компонентов: лекарственных веществ, средств визуализации очагов патологии, компонентов, обеспечивающих эффективную доставку наночастиц в целевые клетки (мишени) организма.

Наиболее важными для биомедицинского применения являются свойства наночастиц: малые размеры — от 1 до 100 нм, высокая удельная поверхность, локализация реактивных групп на поверхности наночастицы. Эти особенности наночастиц существенно изменяют их физико-химические и биологические свойства по сравнению с более крупными частицами того же состава, а именно: растворимость, реакционную способность, адсорбционную емкость, способность к агрегации, прочность. Малый размер наночастиц позволяет им непосредственно взаимодействовать с биомолекулами на поверхности и внутри клеток, что приводит к изменениям функций различных биологических структур.

При создании наночастиц с заданными свойствами возможен контроль их строения вплоть до пространственной структуры каждой составляющей молекулы. На основе наночастиц (в том числе модифицированных) создают «мультифункциональные» системы, позволяющие направлять доставку лекарственных веществ и средств диагностики в очаги патологии, ограничивая его неспецифическое распространение, подбирать оптимальную дозу препарата и пролонгировать время удержания его в организме. Применение наночастиц в качестве носителей (платформ) лекарственных веществ дает возможность использовать препараты с низкой растворимостью или нерастворимые в воде, характеризующиеся низкой биодоступностью, нестабильные и токсичные соединения.

«Функционализация» наночастиц — это «присоединение» к ним лекарственных препаратов, средств построения изображений, вспомогательных лигандов. Она может происходить за счет их инкапсуляции, ковалентного пришивания к поверхности или адсорбции. Наиболее важной модификацией наночастиц является нагрузка их молекулами лекарственного соединения или антигенными детерминантами.

Важным свойством наночастиц при медицинском использовании является их способность преодолевать физиологические барьеры: гематоретинальный, гематоэнцефалический.

Возможны различные способы введения в организм лекарственных препаратов на основе наночастиц, в том числе, внутриглазное, назальное, пульмональное, которые невозможно использовать в случае традиционных лекарственных средств.

Основными направлениями исследований, связанных с разработкой и внедрением в практику средств диагностики и терапии на основе наноча-

стиц в медицине, в настоящее время служит создание препаратов для лечения и диагностики вирусных и онкологических заболеваний.

При терапии вирусных заболеваний используют в основном немодифицированные наночастицы и неадресную доставку препаратов. Для разработки терапевтических средств при онкозаболеваниях приоритетным является создание интегрированных, направленных «мультифункциональных» наносистем для одновременной диагностики, биомаркирования и лечения. В этом случае необходим поиск путей адресной (таргетной) доставки «мультифункциональных» наночастиц и более эффективного их распределения и накопления в специфических тканях.

Системы доставки лекарственных и диагностических препаратов на основе наночастиц условно подразделяют на несколько классов: биологические и биогенные, в состав которых входят материалы природного происхождения, либо синтетические биомолекулы и их фрагменты природного строения; полимерные наночастицы, при создании которых используются неприродные мономерные и полимерные материалы; неорганические и наночастицы на основе углерода (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Системы доставки лекарственных и диагностических препаратов на основе наночастиц

Классы нанотранспортных систем доставки	Используемые материалы	Типы наночастиц
Биологические и биогенные	Вирусы Липиды Пептиды Нуклеиновые кислоты Полисахариды	Липосомы, липоплексы, вирусные наночастицы, вирусоподобные наночастицы, микросферы, собственно наночастицы (наносферы и нанокапсулы)
Полимерные	Полимолочная кислота Полигликолевая кислота Полиалкилцианоакрилат Поли-3-гидроксипропановая кислота Полиэтиленгликоль Поликапролактон Полиэтиленоксид Полиамидоамин Полиэтиленимин Полипропиленимин Полиметилметакрилат	Микросферы, собственно наночастицы (наносферы и нанокапсулы), мицеллы, дендримеры

О к о н ч а н и е т а б л. 1

Неорганические	Кремний Металлы Оксиды металлов Соли металлов	Неорганические наночастицы, квантовые точки, наностержни, наносферы, нанооболочки
Наноструктуры на основе углерода	Углерод	Углеродные нанотрубки, фуллерены

Отличительной особенностью биологических и биогенных наноструктурированных систем доставки является их способность к самоорганизации и молекулярному узнаванию мишени (биомолекула, биосистема, клетка). Это свойство активно используется при создании искусственных конструкций, имитирующих реальные биологические структуры. Биогенные наночастицы не токсичны для организма, биосовместимы, биodeградируемы, поэтому активно используются в биомедицинских разработках.

Техногенные наночастицы

В настоящее время в мире наблюдается значительный рост объемов производства новых материалов, содержащих наноразмерные техногенные частицы, и расширение областей их применения.

Экспертами Межведомственной программы по корректному управлению химическими препаратами и Организации экономической кооперации и развития разработан перечень приоритетных наночастиц для характеристики их биологического действия и обеспечения безопасности (табл. 2). Приоритетные техногенные наночастицы производятся или в ближайшее время будут производиться в больших объемах; оказывают воздействие на жизненно важные системы организма.

Т а б л и ц а 2

Характеристика некоторых приоритетных техногенных наноматериалов

Тип наноматериала	Области преимущественного применения	Потенциальные угрозы для безопасности человека
Фуллерены	Создание композитных материалов со сверхпроводящими свойствами; смазочных материалов; в микроэлектронике и оптике, в солнечных элементах, электрических батареях и аккумуляторах; для покрытий эндопротезов	Связаны с усилением перексидного окисления липидов. При облучении видимым и УФ-светом проявляют фотосенсибилизирующую активность. Основная проблема биобезопасности — воздействие через

Продолжение табл. 2

	(титан-фуллереновые композитные материалы); в биомедицине в качестве контрастирующих агентов для ЯМР-томографии	кожу при прямом применении фуллеренсодержащих препаратов
Углеродные нанотрубки	Широко применяются в электронике и компьютерной индустрии; входят в состав композиционных материалов. Используются в бионанотехнологических разработках	Общий механизм токсического действия — индукция окислительного стресса, стимулирующего воспалительные, генотоксические и цитотоксические последствия. В окружающей среде — нанодиспергированный углерод, который может усиливать воспалительные процессы в легких. Основные риски для человека — при хронических ингаляциях, особенно в производственных условиях
Наночастицы золота	В бионанотехнологии и наномедицине (на основе явления плазмонного резонанса — резонансного поглощения нанокластером падающего электромагнитного излучения, которое используется для диагностики и гипертермии опухолей)	Могут вызывать воспалительные реакции, накапливаться в ретикулярных клетках лимфатической ткани, печени; влияют на клеточный и гуморальный иммунитет. Неблагоприятные клеточные и организменные эффекты связывают с малыми размерами, а также с освобождением ионов с поверхности наночастиц
Наночастицы серебра	Покрывания для поглощения солнечной энергии; катализаторы химических реакций; антимикробные и дезинфицирующие средства; компоненты пищевых упаковок. Добавки наносеребра придают антибактериальные свойства одежде, краскам, эмалям. Используются в бионанотехнологии и наномедицине	Токсические эффекты возникают из-за сочетания свойств наночастиц и высвобождения ионов серебра. Высоко стабильны в окружающей среде, способны длительно сохранять токсические свойства
Наночастицы оксида алюминия (Al_2O_3)	Изготовление покрытий для деталей машин; входят в состав огнеупорных красок, сорбентов, электронных устройств	Снижение уровня жизнеспособности клеток, изменение митохондриального потенциала, нарушения экспрессии генов, проникновение через гематоэнцефалический барьер, нейротоксичность

О к о н ч а н и е т а б л . 2

Наночастицы оксида церия (CeO_2)	В катализе; солнечных ячейках; люминесцентных преобразователях; абразивах; газовых сенсорах	Цитотоксичность как следствие развития окислительного стресса
Наночастицы диоксида кремния (SiO_2)	Широко используются как один из самых дешевых наноматериалов в микроэлектронике, оптоэлектронике, электротехнике. Наночастицы SiO_2 входят в состав средств огнезащиты, термически устойчивых лакокрасочных покрытий, высокотемпературных клеев, огнеупорного стекла, пеногасителей, красок, антикоррозионных покрытий, строительных смесей; используются при производстве силикона, резины, каучука, полимеров, бетона, герметиков, бумаги. Применяются в бионанотехнологических разработках	Увеличение уровня активных форм кислорода в клетках, цитотоксичность, индукция воспалительных реакций
Наночастицы оксидов цинка (ZnO) и титана (TiO_2)	Диоксид титана — в лакокрасочной промышленности; разрешенная к применению микродисперсная пищевая добавка E171. ZnO и TiO_2 входят в состав косметических средств, зубной пасты, солнцезащитных кремов; компоненты пластиков и текстильных материалов	Индукция активных форм кислорода, накопление в органах, влияние на иммунные клетки, цитотоксичность

Высокая биологическая активность техногенных наночастиц обуславливает потенциальные риски возникновения нежелательных токсических эффектов для работников нанотехнологических предприятий и потребителей продукции наноиндустрии. В этой связи в настоящее время закладываются основы систем контроля рисков, связанных с использованием нанотехнологической продукции, и определения степени потенциальной опасности новых наноматериалов.

Важнейшим элементом работ по нанобезопасности является стандартизация характеристик наночастиц. Минимальный набор параметров для стандартизации наночастиц включает показатели: размер (распределение по размерам), форму, кристалличность, наличие агломерации / агрегации, характеристики поверхностных свойств (площадь поверхности, пористость,