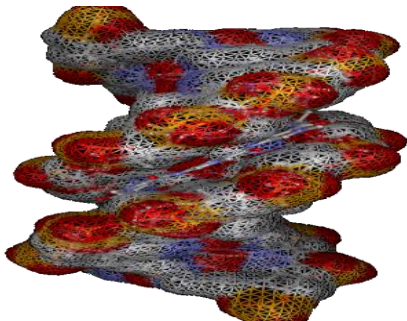


«ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗНАНИЙ НАНОМИРА В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАКОЛОГИИ НАСТОЯЩЕГО И БУДУЩЕГО»

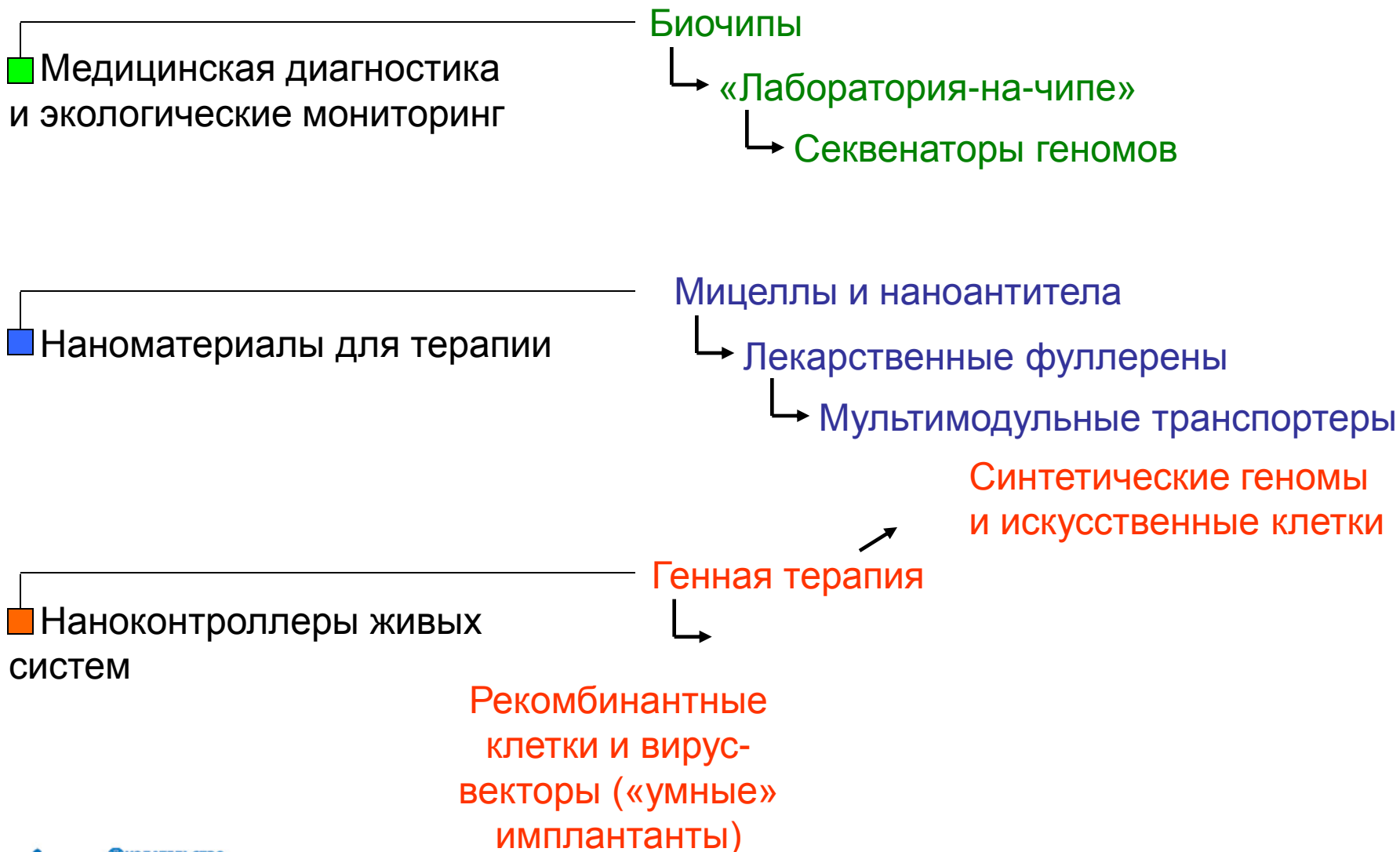
Максимов Георгий Владимирович, д.б.н.,
профессор каф. биофизики биологического
факультета МГУ им. Ломоносова

ТЕХНОЛОГИИ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ

1. Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии
2. Биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных
3. Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств
4. Клеточные технологии
5. Технологии биоинженерии

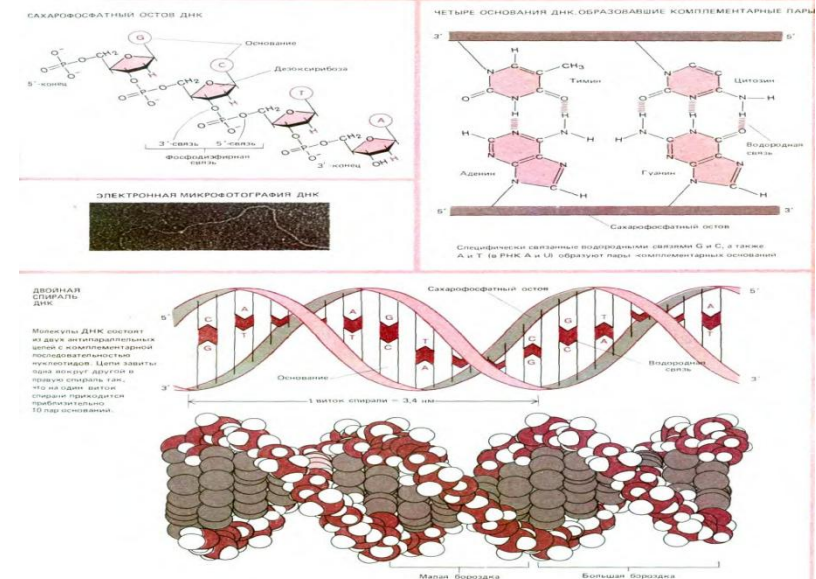
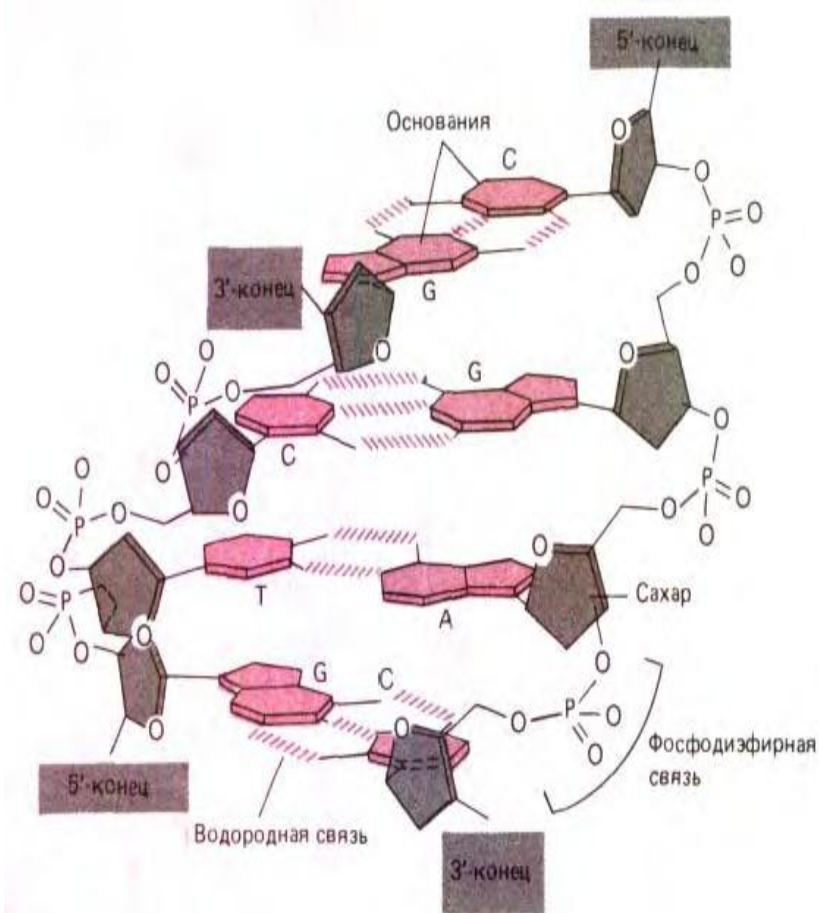


- 1). БИОМЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА
- 2). СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ
- 3). ГЕНОТЕРАПИЯ
- 4). КОНТРОЛЬ СОСТОЯНИЯ И ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЕ
- 5). НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

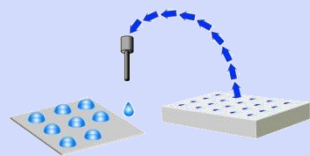


Участок двойной спирали ДНК.

Две цепи ДНК закручены в противоположных направлениях и что каждая пара оснований удерживается вместе либо двумя, либо тремя водородными связями.



Стадии изготовления биочипов



Робот переносит растворы молекул зондов на поверхность биочипа

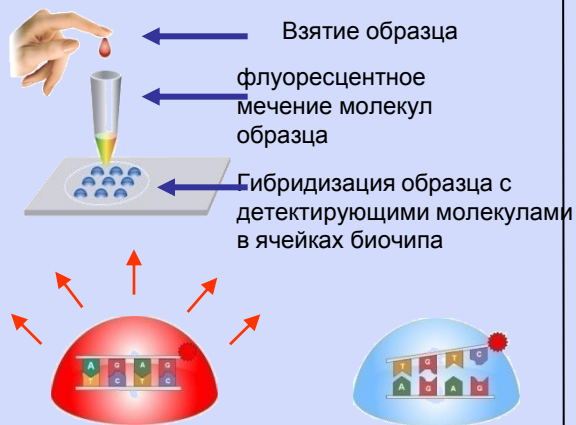
УФ излучение

Растворы полимеризуются

Гидрогелевые ячейки с иммобилизованными зондами

Объем ячейки 0.1 нанолитра

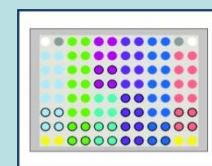
Диагностика заболеваний по последовательностям ДНК



При соответствии - есть сигнал в ячейке

При несоответствии - нет сигнала в ячейке

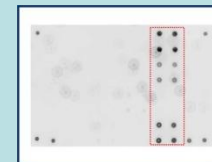
Диагностика восьми типов лейкозов



расположение ячеек на биочипе

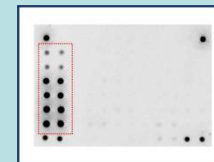


результат гибридизации



t(9;22)BCR/ABL

Хронический миелолейкоз - неблагоприятный прогноз. Требуется терапия и трансплантация костного мозга.



t(15;17)PML/RARA

Острый промиелоцитарный лейкоз - благоприятный прогноз. Требуется специальная терапия препаратами ретиноевой кислоты.

Технология ДНК- и белковых чипов позволяет в течение нескольких часов диагностировать:

- ТУБЕРКУЛЕЗ и его лекарственно-устойчивые формы (по 70 мутациям)
- ОНКОЗАБОЛЕВАНИЯ (15 типов)
- ВИЧ, гепатиты В и С (22 подтипа)
- ОСПУ, ветряную оспу, простой герпес (2 типа), оспу животных (8 типов)
- СИБИРСКУЮ ЯЗВУ
- БИОТОКСИНЫ (7 типов)
- неонатальные инфекции (4 типа)
- варианты гриппа А и птичьего гриппа (15 подтипов)
- проводить идентификацию личности с вероятностью ошибки менее 0,1%

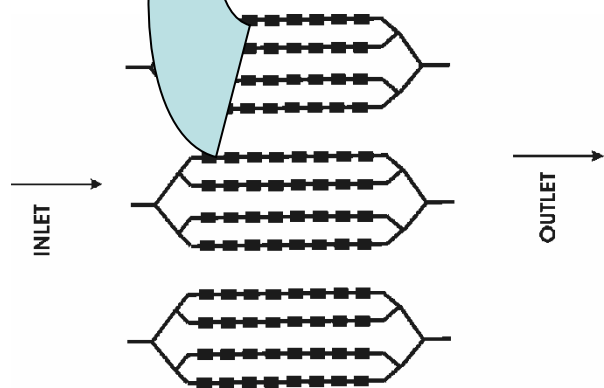
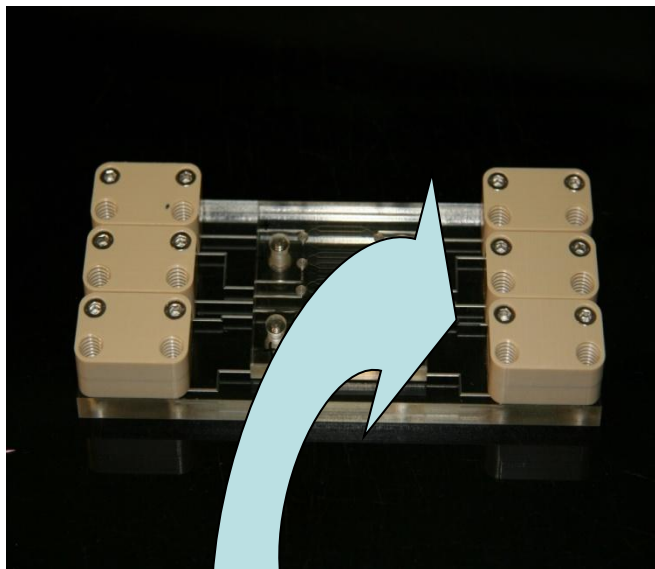


тест-система "ТБ-Биочип"
регистрационное удостоверение
№ ФС 03262004/0889-04

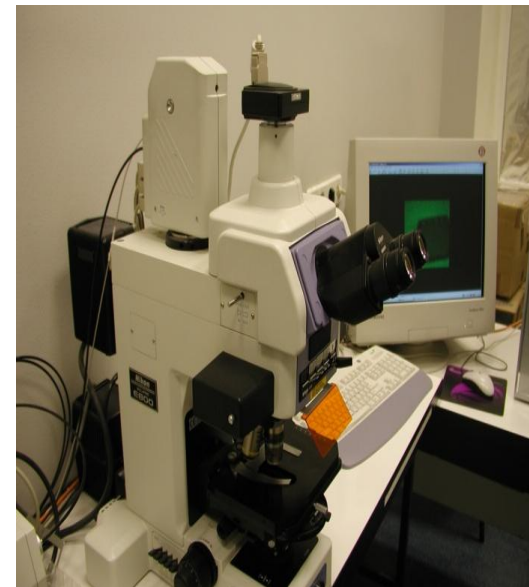


анализатор биочипов УАПК-01
регистрационное удостоверение
№ ФС 022a2006/3777-04
<http://www.videcor.ru>

БИОДАТЧИКИ НА ОСНОВЕ МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЫ



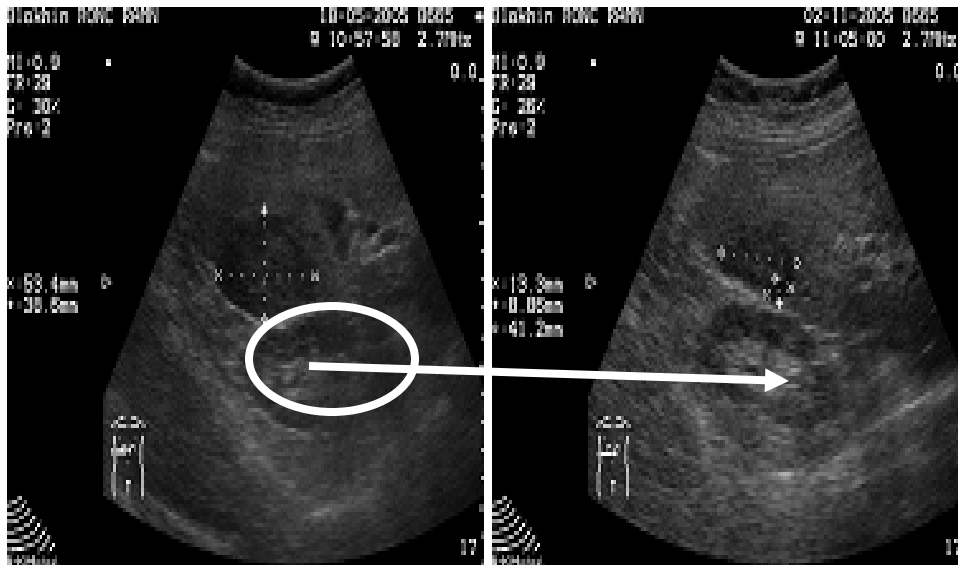
Микрофлюидный чип (61 x 22 мм) состоит из системы каналов и ячеек. Ячейки для иммобилизации бактерий (100 x 100 x 50 мкм) соединены между собой каналами (диаметр 50 мкм). Ячейки последовательно объединены в сегменты (по 20 ячеек в сегменте).



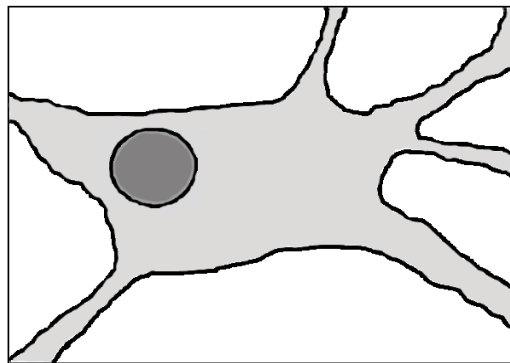
Этапы генетического программирования:

опухолевые клетки пациентов культивируются вне организма и программируются с помощью наночастиц, содержащих ДНК, кодирующую ген иммуноактиваторного белка; введение модифицированных опухолевых клеток больному запускает защитную программу; происходит активация собственного иммунитета, направленного против опухолевых клеток.

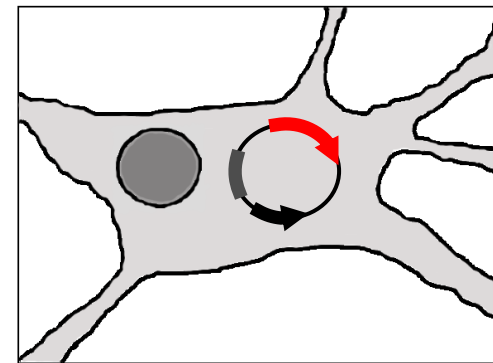
УЗИ ПЕЧЕНИ



СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ГЕННЫМИ КОНСТРУКТАМИ – «УМНЫЕ» ИМПЛАНТАНТЫ

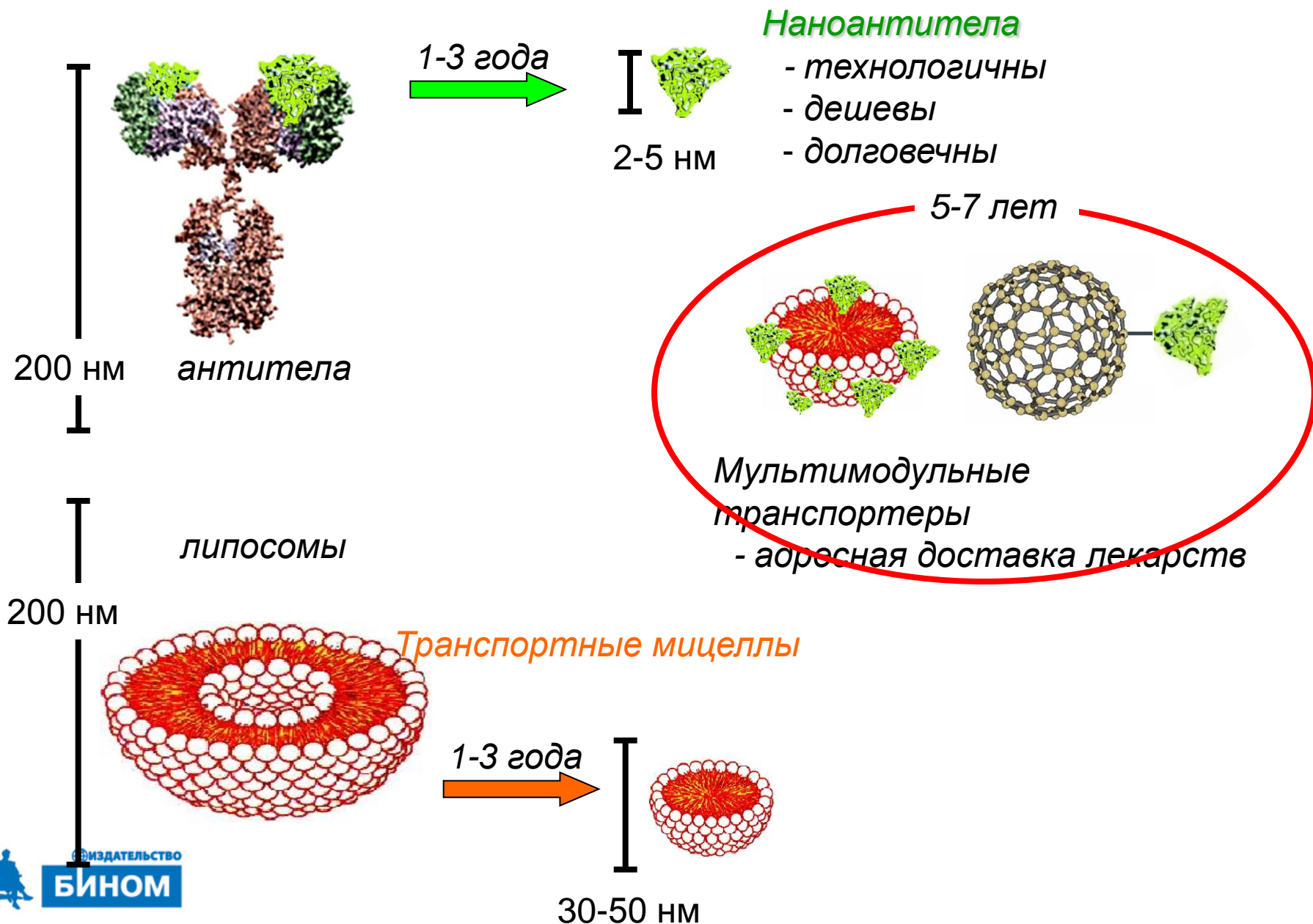


ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
ПРОГРАММИРОВАНИЕ



Трансплантация в
целях терапии

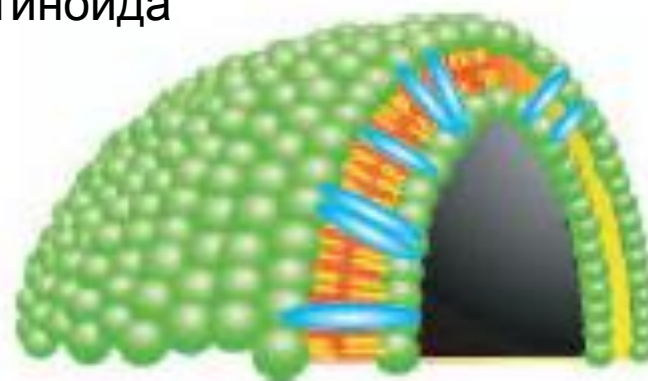
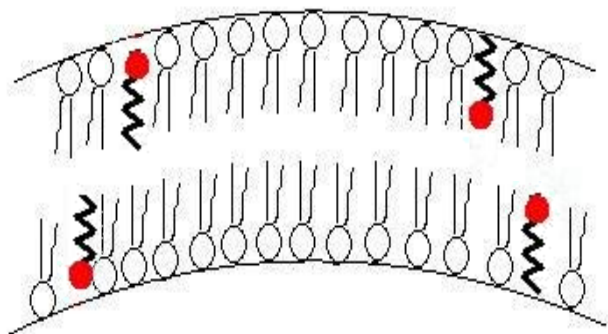
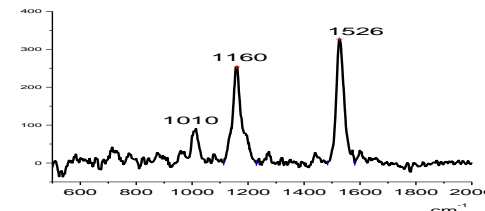
ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ В
ИШЕМИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ МОЗГА,
СЕРДЦА И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ



Доставка лекарств. Липосомы

Метод электронного парамагнитного резонанса и спектроскопии комбинационного рассеяния

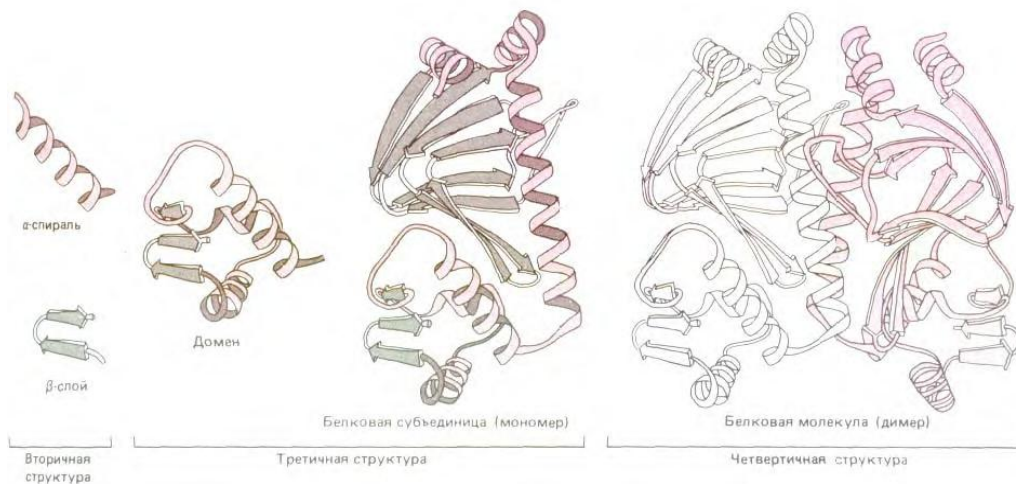
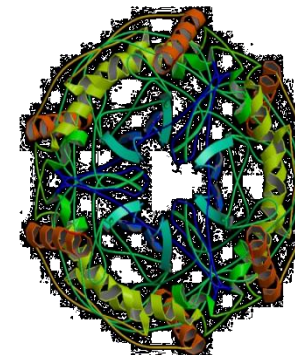
Липосомы со
встроенными
молекулами
каротиноида



Спин-метка	Локализация в мембране	Характеристика мембраны
5-doxylstearinic acid (5-DS)	0.6-0.8 nm	S
16-doxylstearinic acid (16-DS)	2.2nm	T

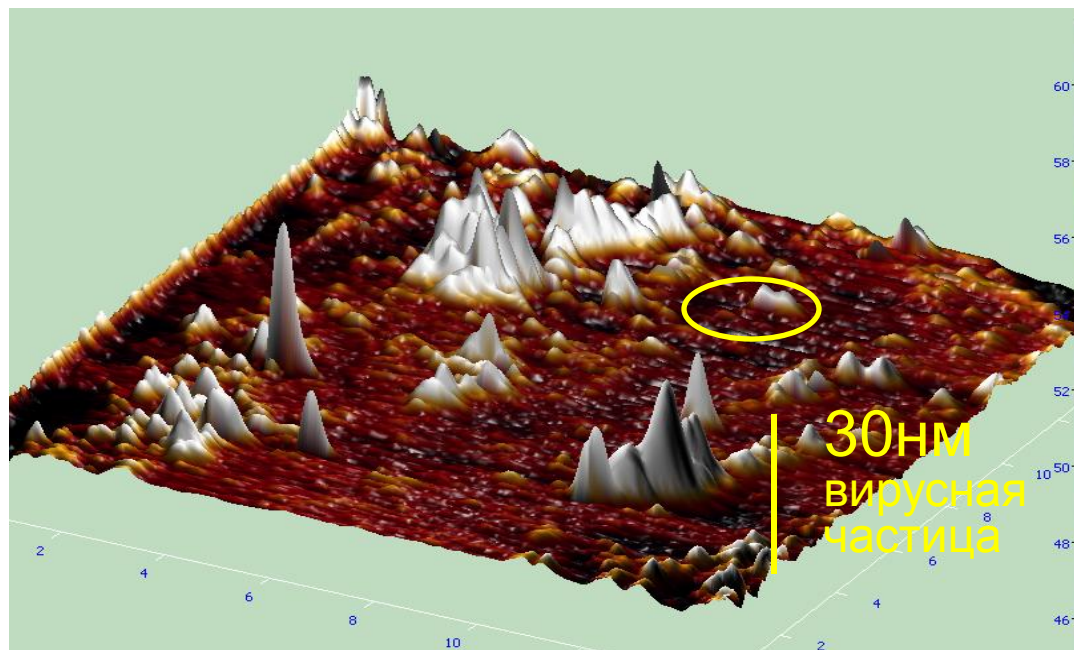
РАСШИФРОВКА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Развитие белковой кристаллографии обеспечивает решение насущных проблем фармакологии
Рентгеноструктурные данные являются основой для рационального поиска и синтеза новых низкомолекулярных соединений – прототипов лекарственных препаратов

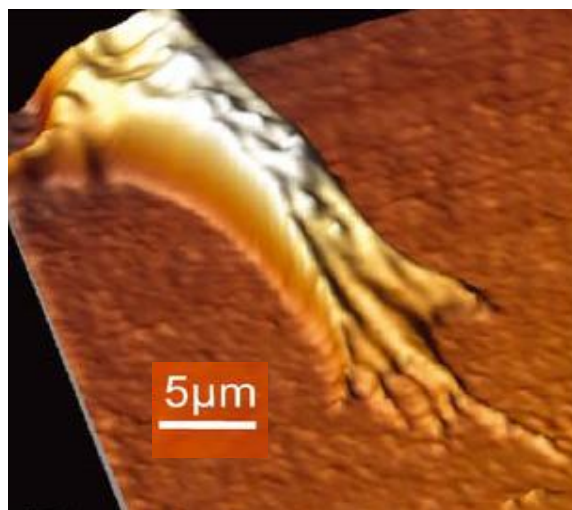


ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНОГО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

- На графитовой подложке зафиксированы антитела (менее 5 нм) к **вирусу гепатита С**, видны прикрепившиеся к ним частицы оболочки вируса размером 20-50 нм



Journal of Neurocytology 33, 251-258 (2004)
Three-dimensional imaging of living and dying
neurons with atomic force microscopy
HELEN A. MCNALLY and RICHARD BEN BORGES



Конус нарастания нейронов в культуре

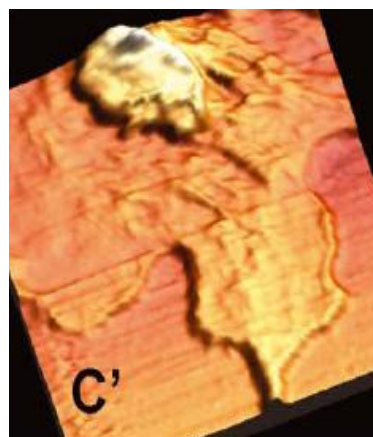
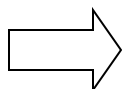
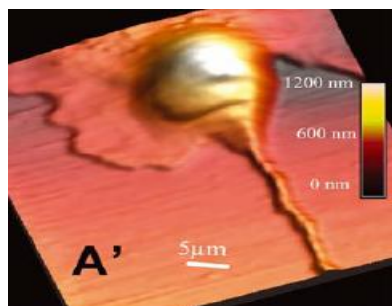
(Digital Instruments Dimension 3100 AFM,
жидкостная ячейка, без фиксации клеток, субстрат - ламинин,
без поддержания газового состава в процессе
измерения)

NANOSLICE TECHNIQUE

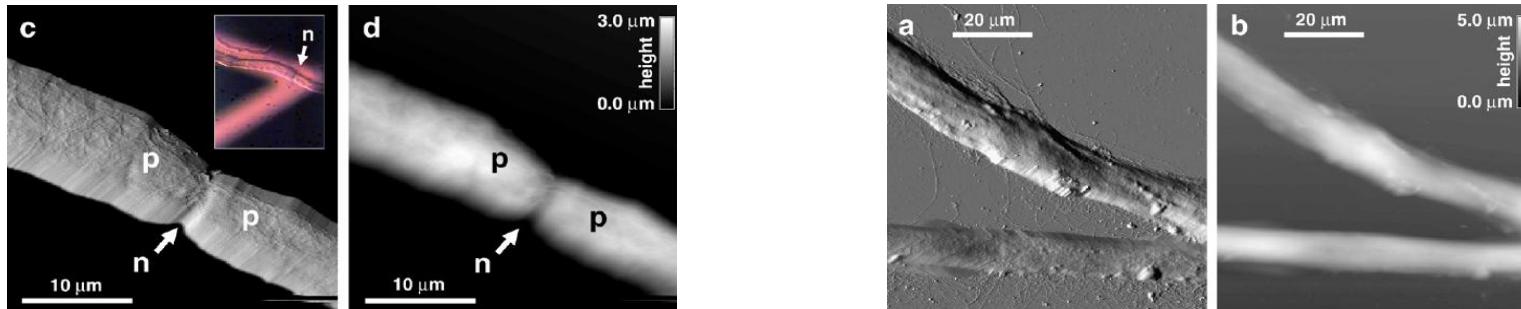
Разрез осуществляется в режиме tapping mode (остановка
сканирования по «медленной» координате). Параметры разреза:
глубина 200-400 нм, ширина 60 нм, длина 1-2 мкм.

В течение 15 мин наблюдается падение высоты клетки и «вытекание» цитоплазмы.

Изображение получено в режиме tapping mode



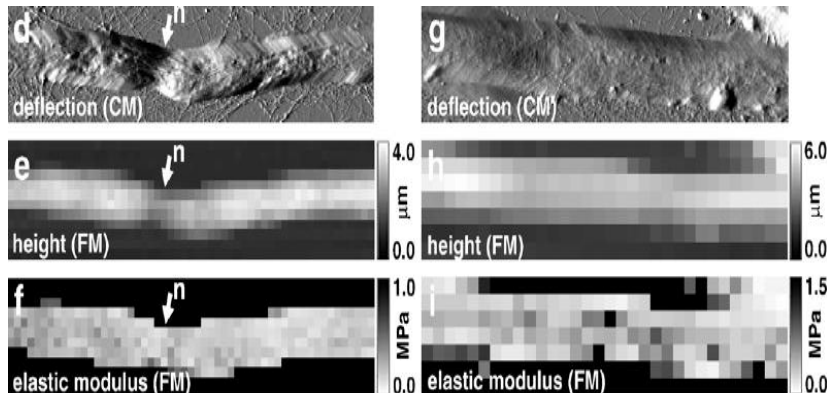
Миелиновые и демиелинизированные нервные волокна



“3D-MFP” AFM (Asylum Research, Santa Barbara)

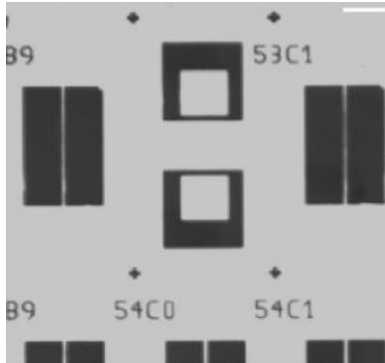
Использован контактный режим для получения топографической картины и режим force mapping для получения комбинированной картины топографии и модуля упругости. Контактный режим: отклонение кантилевера (слева) и высота (справа).

Высота аксона больше, чем диапазон сканирования по z, но получить изображение возможно, если помещать кантилевер на верхнюю точку аксона. В режиме force mapping - локальный модуль упругости для каждой точки поверхности.



Integration of confocal and atomic force microscopy images

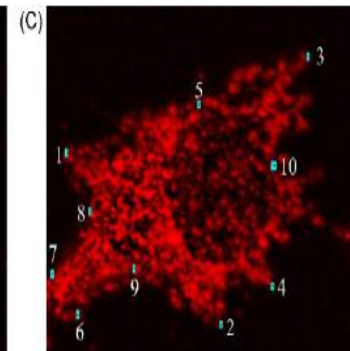
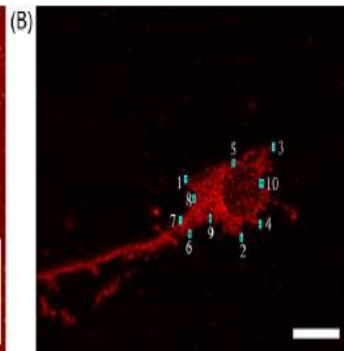
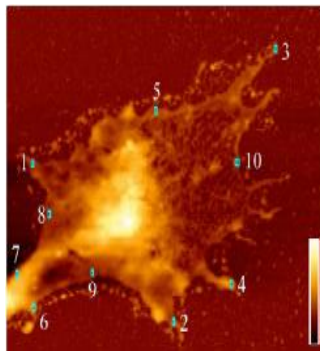
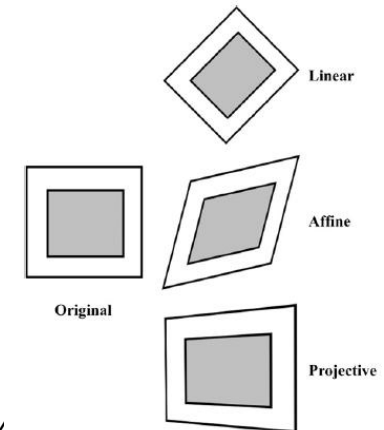
Shripad Kondra, Jummi Laishram, Jelena Ban, Elisa Migliorini,
Valentina Di Foggia, Marco Lazzarino, Vincent Torre, Maria Elisabetta Ruaro



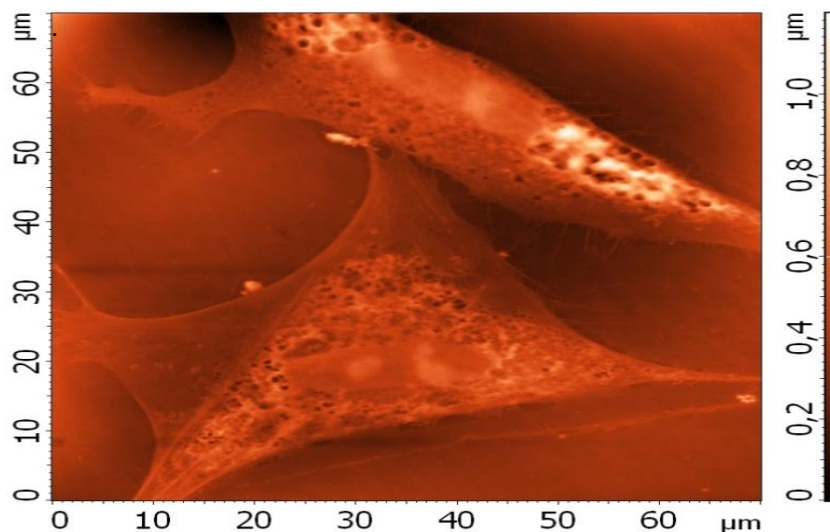
Решается задача совмещения изображений, полученных двумя разными методами - конфокальной и атомно-силовой микроскопией.

Изображение может подвергаться разного рода деформациям.

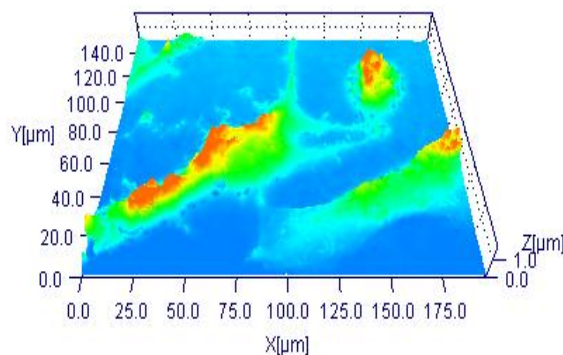
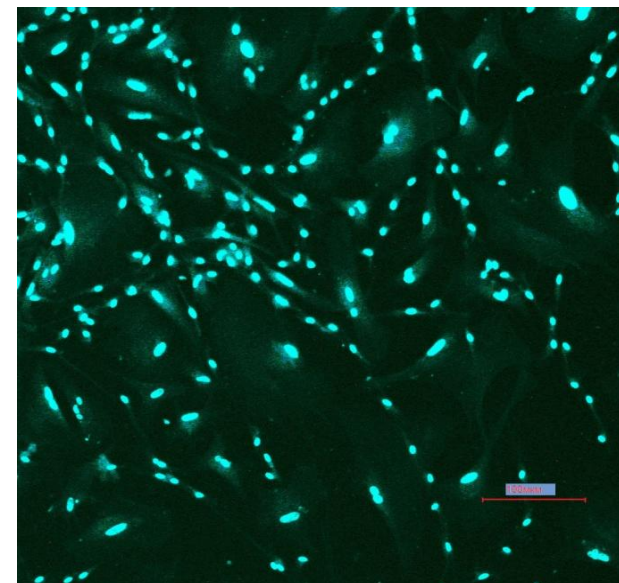
Для совмещения изображений выбираются ключевые точки на обоих изображениях - это особенности клетки или маркеры на поверхности. Потом одно из изображений приводится в соответствие с другим (метод Прокруста)



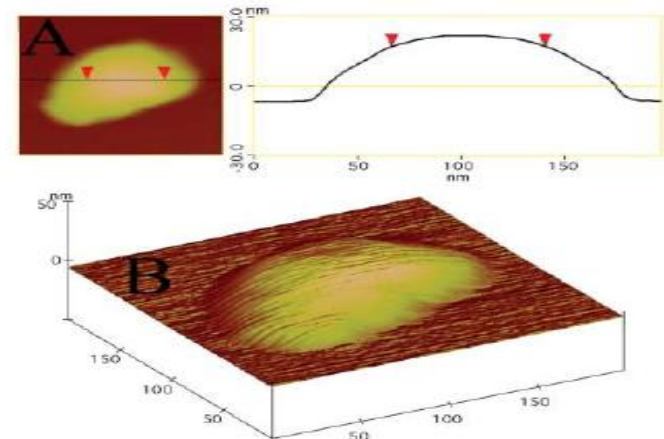
Атомно-силовая микроскопия, конфокальная микроскопия и лазерная интерференционная микроскопия нейронов



E:\mi\data\chicken\240609lon_air\11.m



Взаимодействие фрагмента белка синаптостагмина (экзоцитоз) с отрицательно заряженными липосомами в присутствии кальция. Липосомы иммобилизованы на чипе L1 (покрытие из модифицированного декстрана с липофильными соединениями липосом). Взаимодействие исследовано в процессе соприкосновения кантилевера, покрытого белком, с липосомой и последующего отрыва кантилевера.



Biophysical Journal Volume 85 August 2003 1233–1247 1233

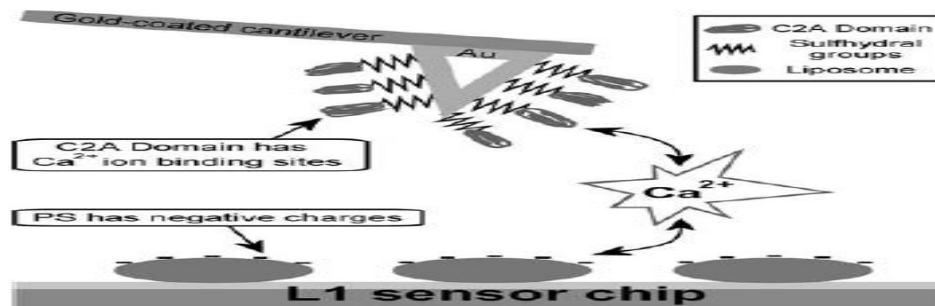
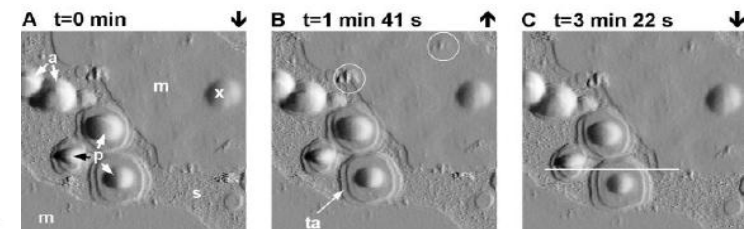
Atomic Force Microscopy and Light Scattering of Small Unilamellar Actin-Containing Liposomes

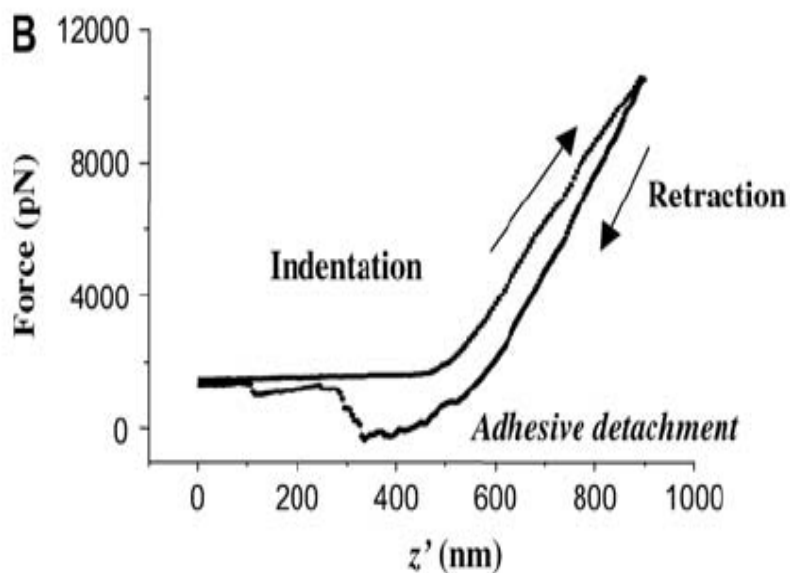
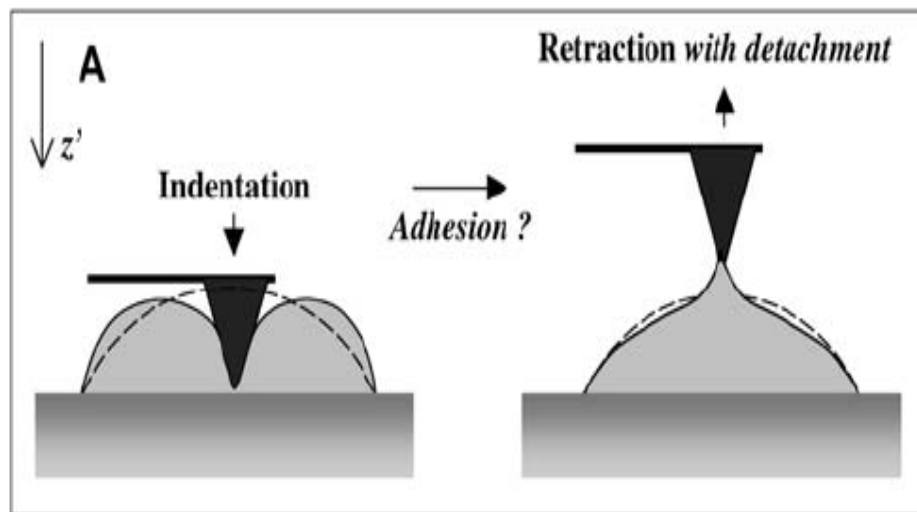
Andre F. Palmer, Philip Wingert, and Jonathan Nickels

Biotechnology Letters (2006) 28: 505–509

Direct force measurement of the interaction between liposome and the C2A domain of synaptotagmin I using atomic force microscopy

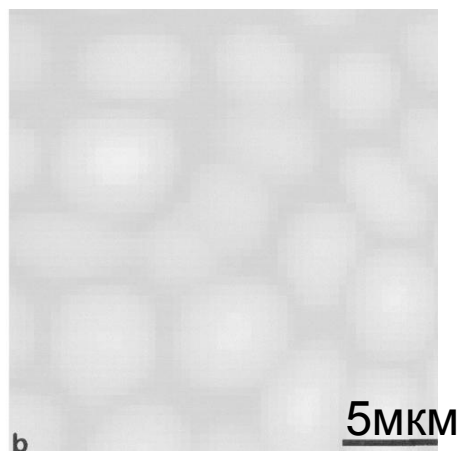
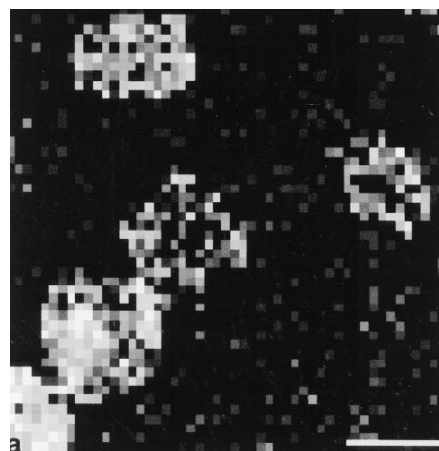
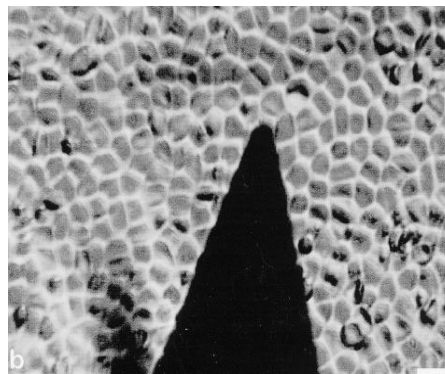
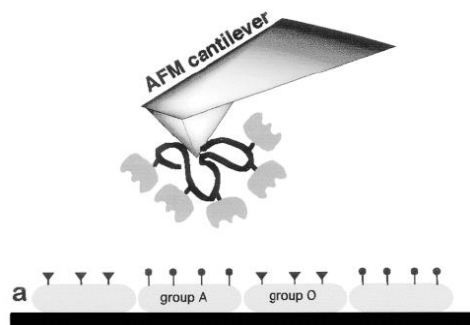
Jong-Ho Park, Eun-Young Kwon, Hyo-II Jung* & Dae-Eun Kim





Исследование
взаимодействия лиганда
с рецептором CD47 на
поверхности эритроцитов.
Суспензия эритроцитов
помещена на подложку,
покрытую полилизинном.

Biophysical Journal Volume 89 November 2005 3203–3213
Indentation and Adhesive Probing of a Cell Membrane
with AFM:
Theoretical Model and Experiments
Shamik Sen, Shyamsundar Subramanian, and Dennis E.
Discher

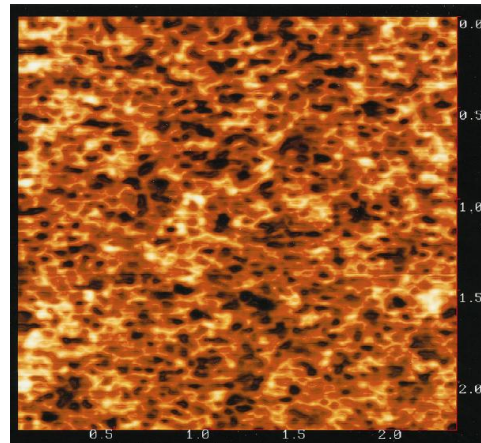


На кантелевер нанесен лектин, взаимодействующий с антигеном группы крови А. Эритроциты не фиксированы, нанесены на подложку с полилизином. Из смеси клеток групп А и О по изображению, на котором отложена сила взаимодействия, можно выделить клетки группы А.

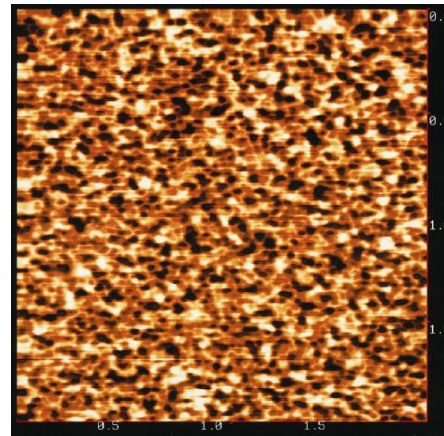
The Journal of Histochemistry & Cytochemistry Volume 48(5): 719–724, 2000

Affinity Imaging of Red Blood Cells Using an Atomic Force Microscope

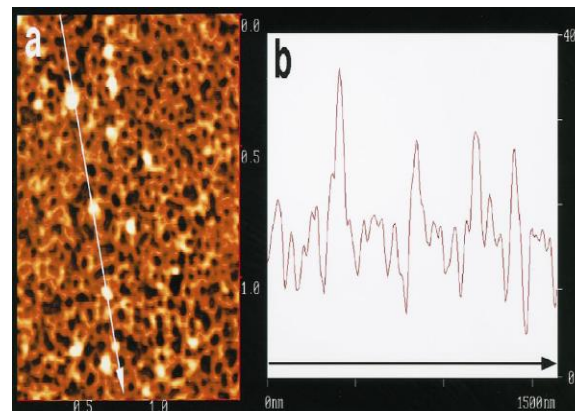
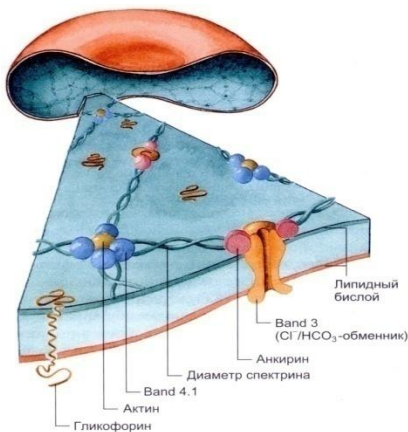
Michel Grandbois, Wolfgang Dettmann, Martin Benoit and Hermann E. Gaub



outside



inside



Замороженные тени эритроцитов.

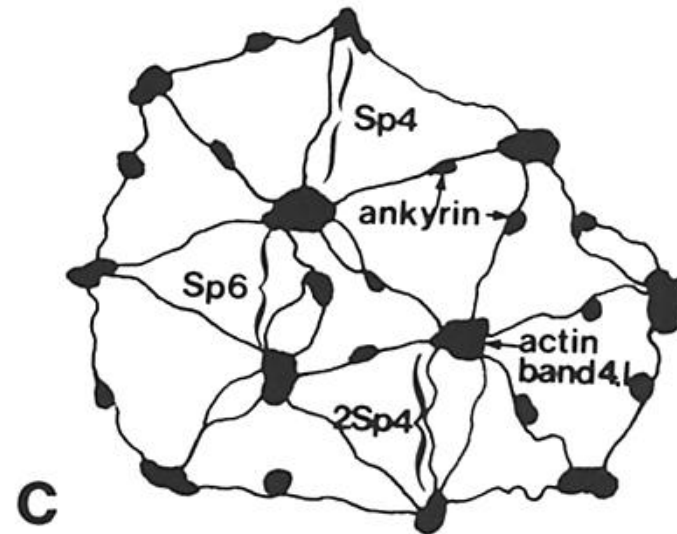
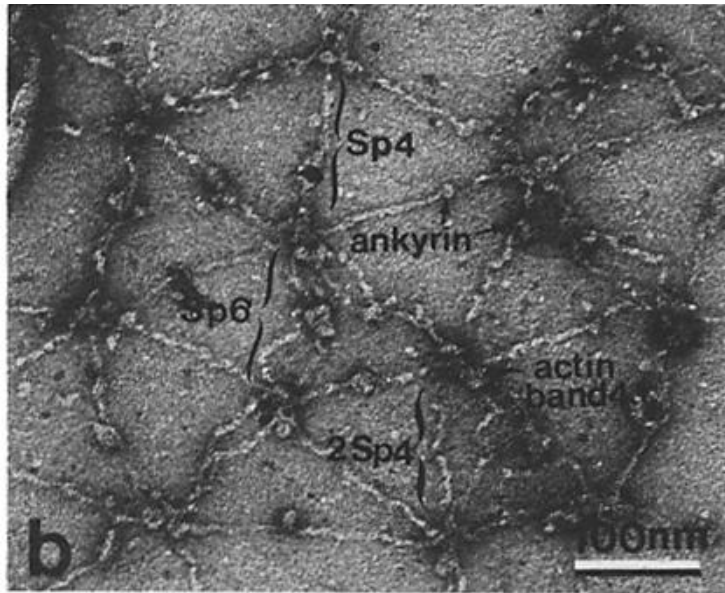
С внешней и с внутренней стороны мембраны видна сеть. Антитела к спектрину с присоединенными частицами золота размером 10 нм показывают, что наблюдаемая сеть включает спектрин, т.е. является цитоскелетом.

Biophysical Journal Volume 74 May 1998 2171–2183

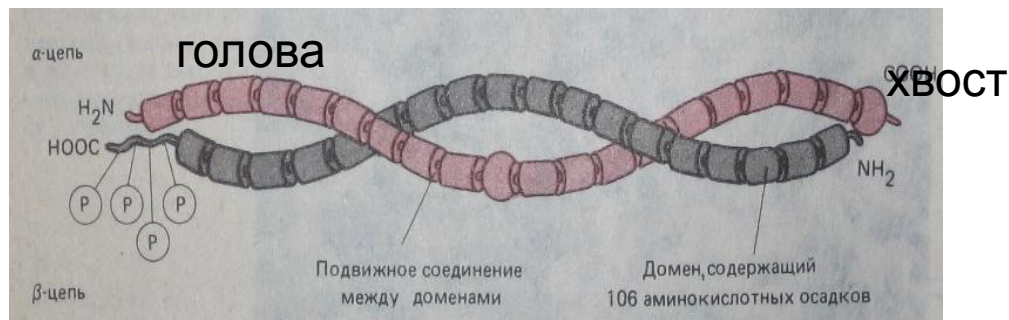
Structure of the Erythrocyte Membrane Skeleton as Observed by Atomic Force Microscopy

Minoru Takeuchi,* Hiroshi Miyamoto,# Yasushi Sako,\$ Hideo Komizu,# and Akihiro Kusumi

Гексагональная спектриновая сеть



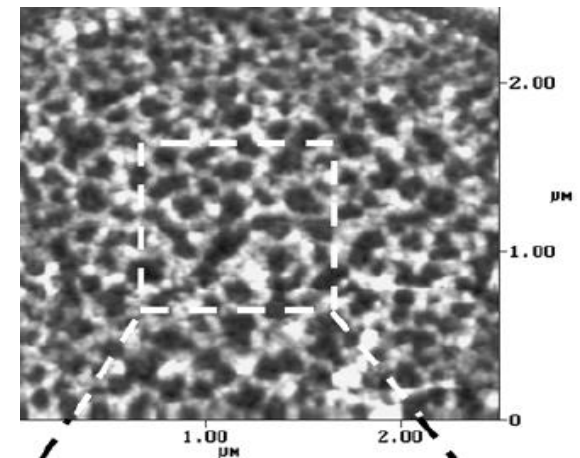
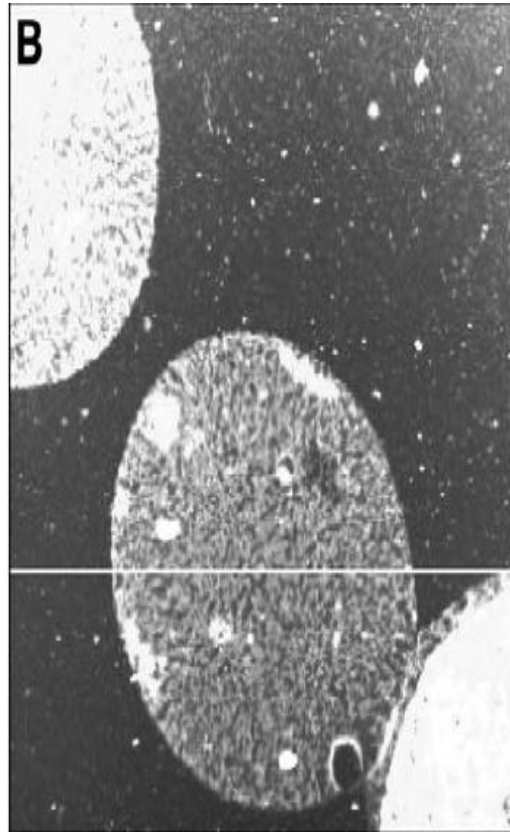
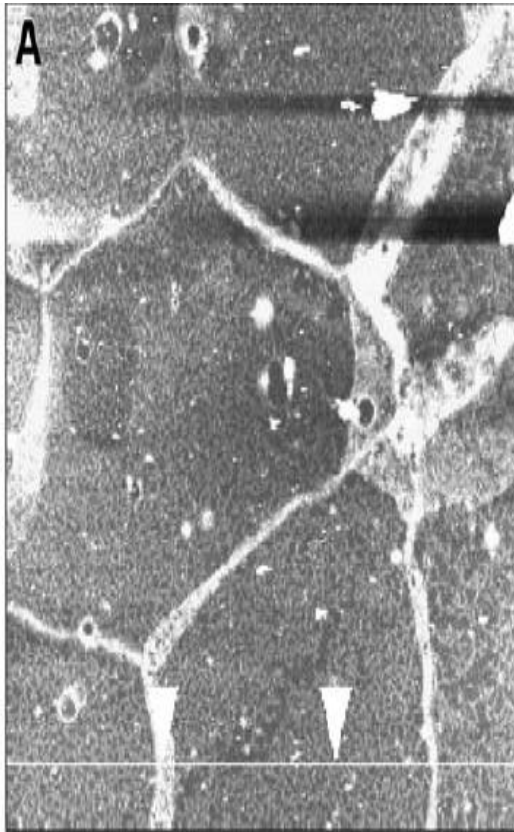
Димер спектрина



Изображения поверхности эритроцита

Sample Preparation and Imaging of Erythrocyte
Cytoskeleton with the Atomic Force Microscopy

Fei Liu,¹ Joel Burgess,¹ Hiroshi Mizukami,² and Agnes Ostafin
Cell Biochemistry and Biophysics Volume 38, 2003



Микроскопия.

Инвертированный оптический микроскоп и сканирующий зондовый микроскоп

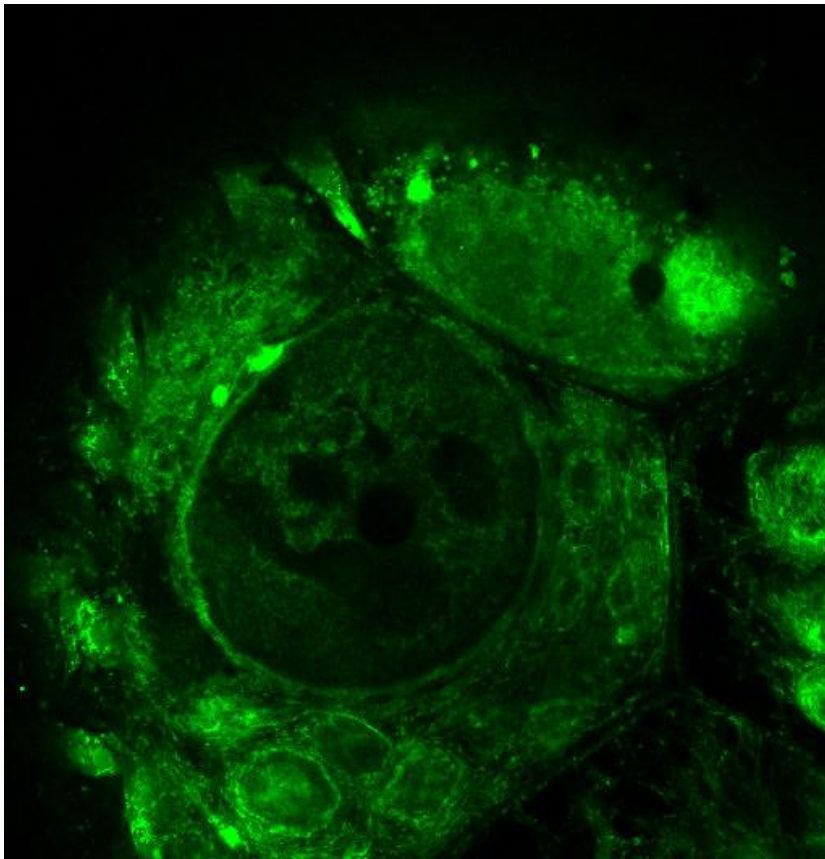


Комплектация для прозрачных образцов

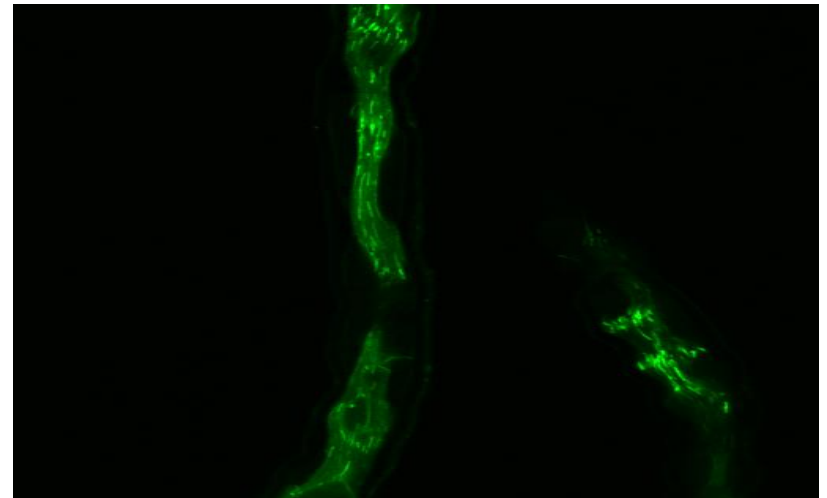
- Высокое оптическое разрешение
- Максимальная эффективность сбора фотонов
- Работа в жидкости
- СБОМ
- Сканирование зондом и сканирование образцом (важно для TERS)
- Подходит для большей части коммерческих инвертированных микроскопов и спектрометров.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия при исследовании морфологии, компартментализации и функционального состояния клеток

Распределение митохондрий в нейронах



Распределение митохондрий в миелиновом нервном волокне



Университет Калькутты, Индия

28 февраля 1928 г.



Sir Chandrasekhara Venkata Raman Kariamanickam Srinivasa Krishnan

1928 г.

МГУ, СССР

21 февраля 1928 г.



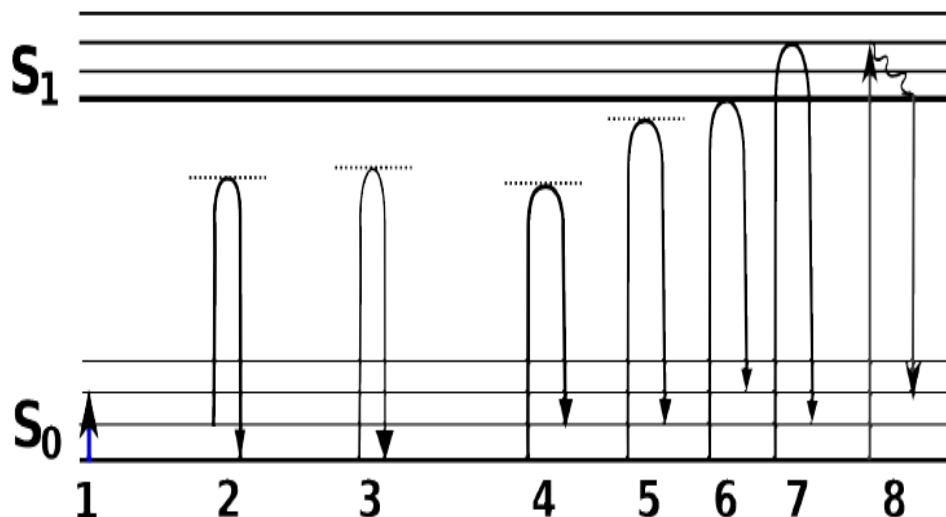
Григорий Самуилович
Ландсберг



Леонид Исаакович
Мандельштам

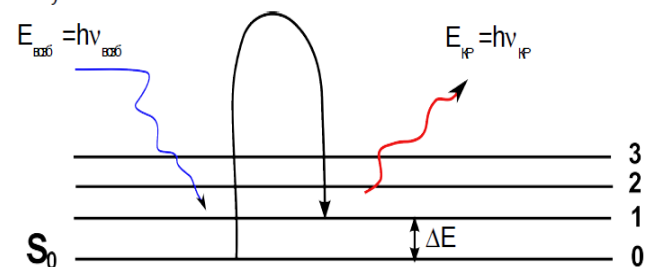
Комбинационное
рассеяния света

Комбинационное рассеяние света (эффект Рамана) — это рассеяние оптического излучения на молекулах вещества, возникающее вследствие неупругого взаимодействия излучения с молекулами и сопровождающееся изменением частоты излучения



- 1 – ИК поглощение света
- 3 – Релеевское рассеяние света
- 2 – анти-Стоксовское комбинационное рассеяние света
- 4-7 – Стоксовское рассеяние света
- 8 - флуоресценция

Разница между энергиями возбуждающего кванта и кванта света КР равна энергетическому зазору между колебательными подуровнями. Спектр КР молекулы несет информацию о переходах между колебательными подуровнями, то есть о колебаниях атомов. По спектрам КР можно оценить конформационные перестройки в молекулах

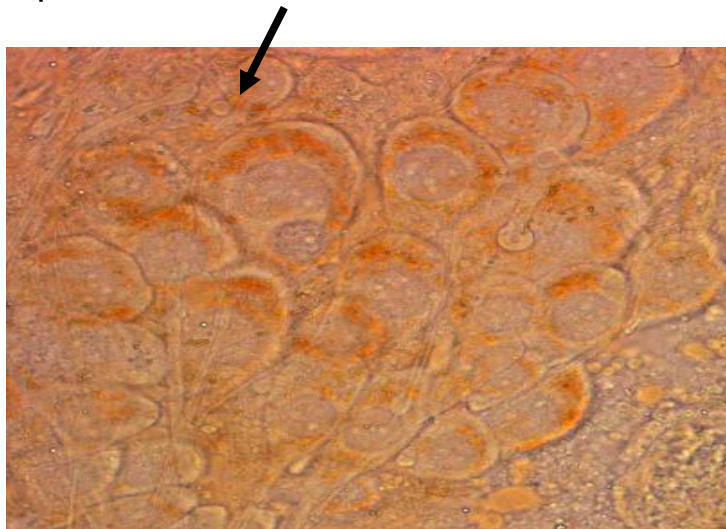


$$\Delta E = E_{\text{кр}} - E_{\text{вб}} = h(\nu_{\text{вб}} - \nu_{\text{кр}}) = h(c/\lambda_{\text{вб}} - c/\lambda_{\text{кр}})$$

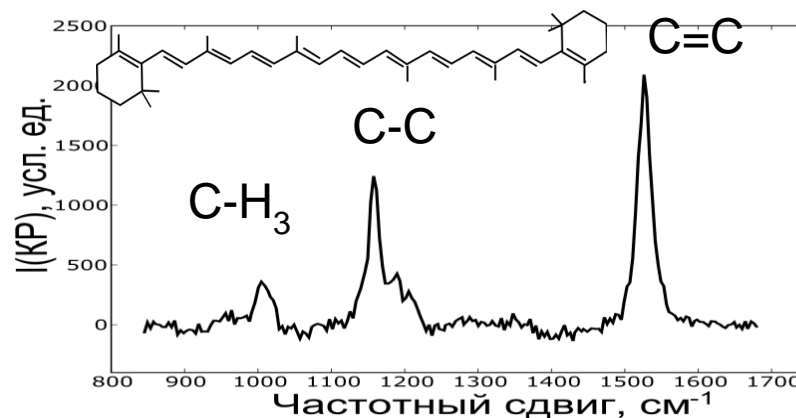
$\Delta \nu = \nu_{\text{вб}} - \nu_{\text{кр}}$ **ЧАСТОТНЫЙ СДВИГ** = frequency shift or wavenumber

Спектроскопия КР-нейрона

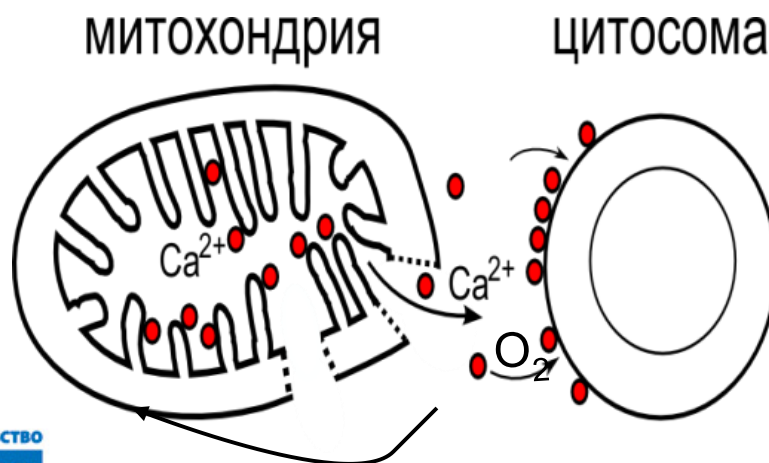
Нейроны: каротин-
содержащие органоиды
ЦИТОСОМЫ



КР-спектр нейронов и структура
 β -каротина

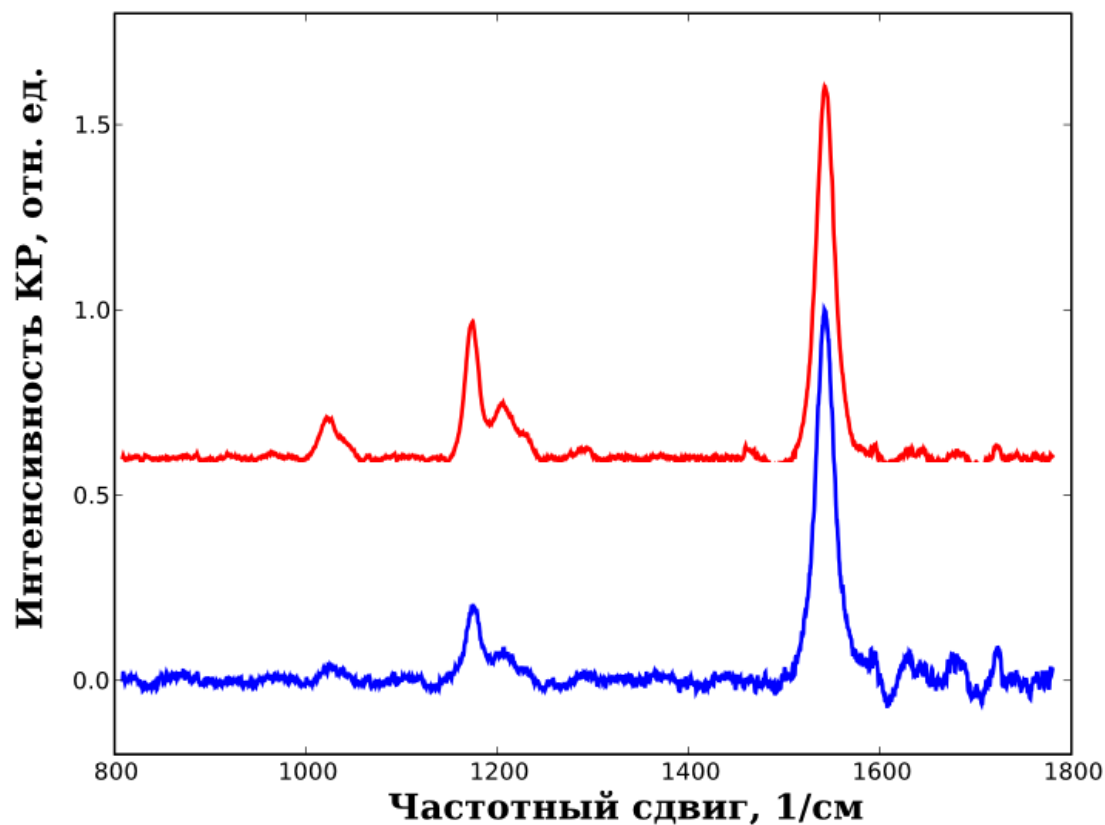


Расположение и взаимодействие
митохондрий и цитосом



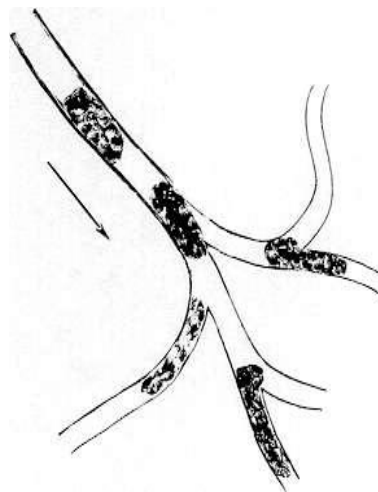
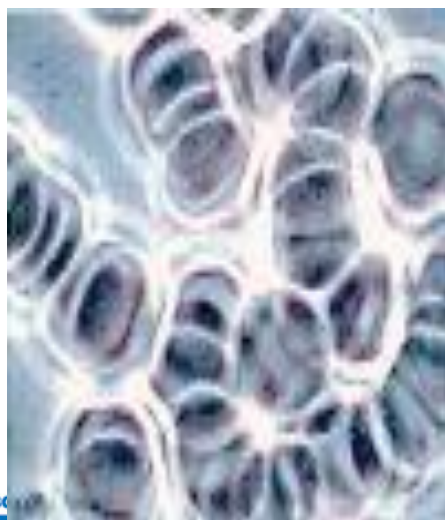
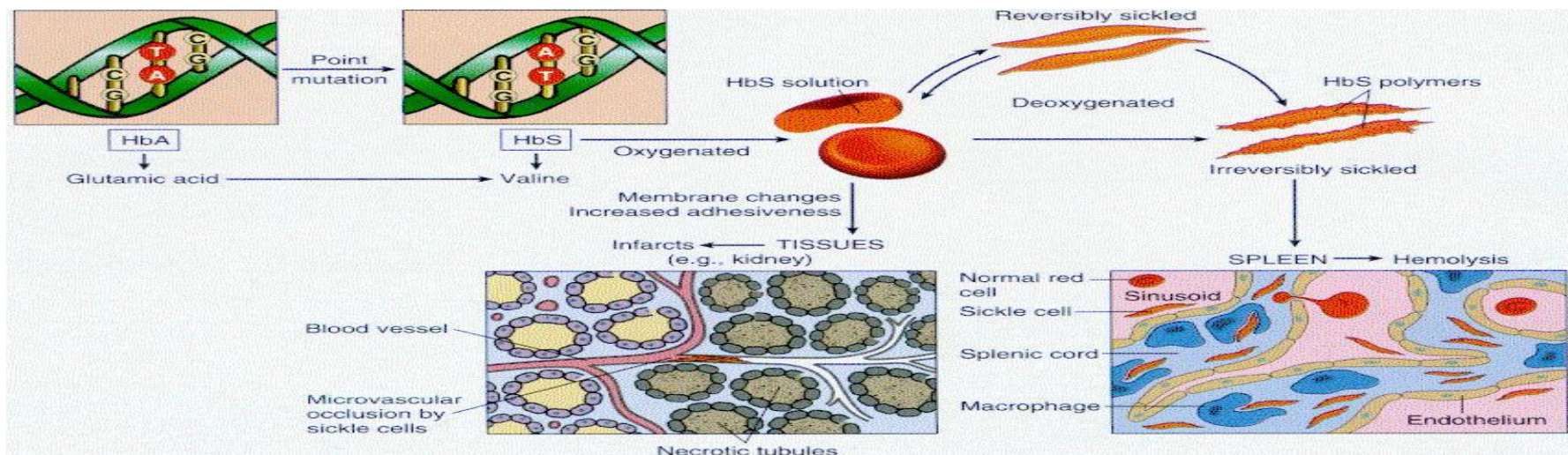
Спектроскопия КР-ооцитов лягушки (β -каротин)

при нормальной осмолярности (синяя кривая)
и при пониженной осмолярности (красная кривая)

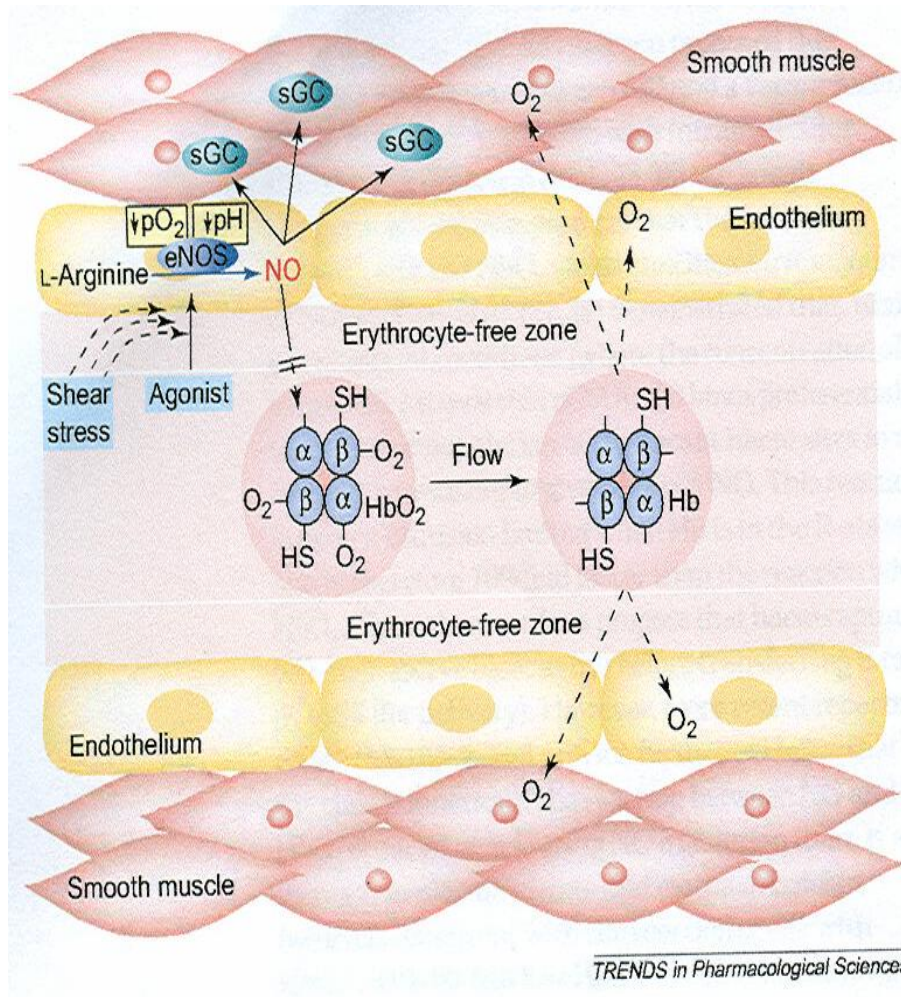


Патология и эритроцит

Серповидноклеточная анемия и “заиливание” крови



Что является причиной гипоксии в норме и при патологии?



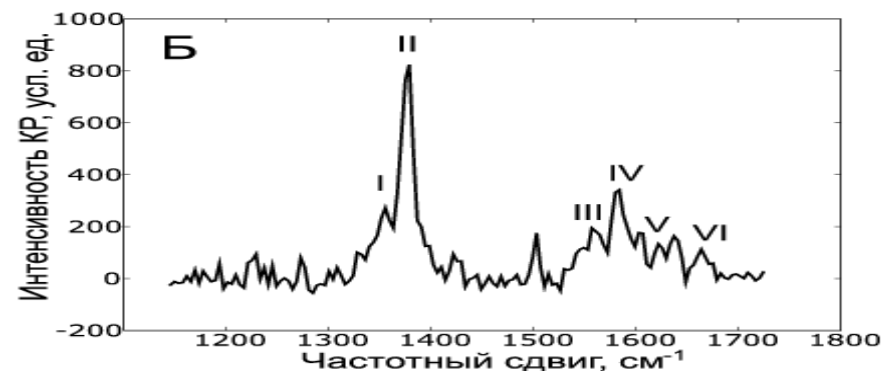
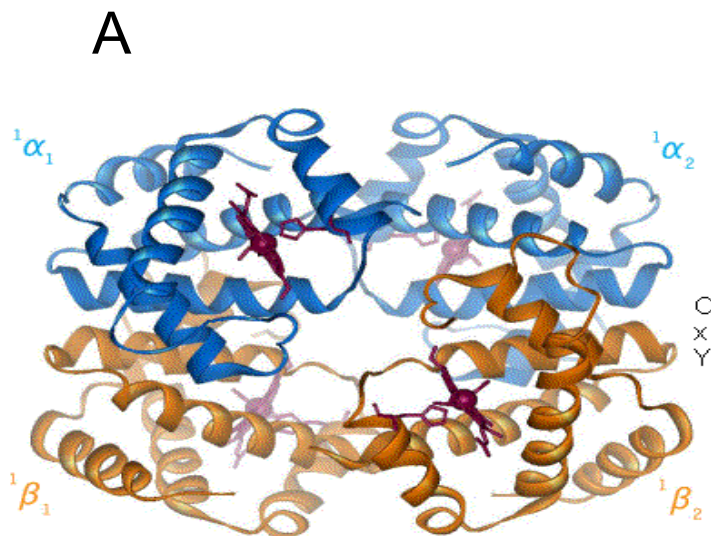
Нарушения гемодинамики:

- Дисфункция сердца
- Изменения сосудов

Клеточная патология – нарушения переноса O_2 эритроцитами:

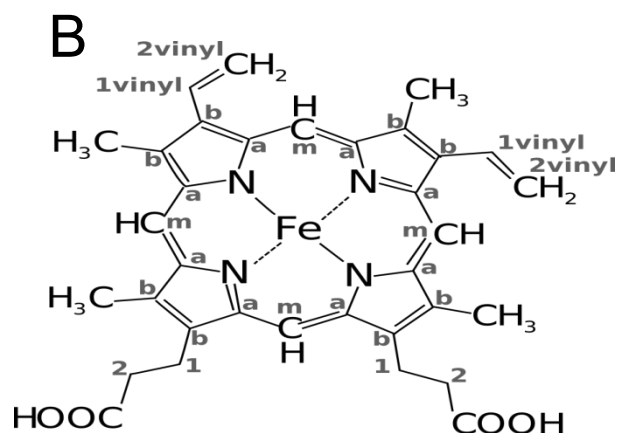
- Снижение проницаемости плазматической мембраны эритроцита для O_2
- Изменение сродства гемоглобина к O_2
- Изменение проницаемости плазматической мембраны эритроцита для ионов натрия, калия, кальция и протонов

О₂-связывающие свойства гемоглобина



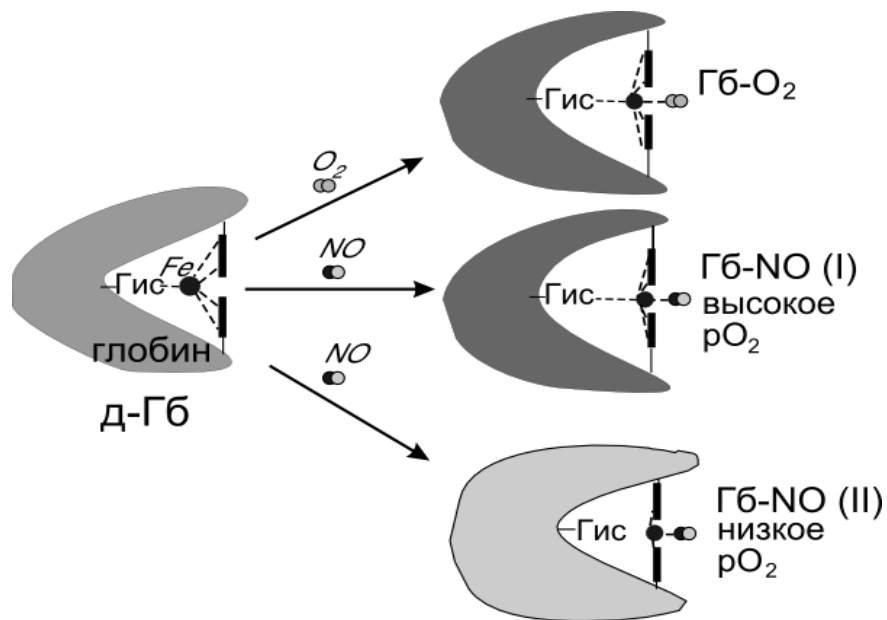
А: Молекула гемоглобина в окси-и дезокси-конформациях

Б: Спектр КР цельной крови. Полосы I, III соответствуют колебаниям связей в молекулах дезоксигемоглобина (д-Гб); полосы II, IV – колебаниям связей в молекулах ксигемоглобина (Hb-O₂). Полосы V, VI соответствуют колебаниям молекулы NO, связанной на Гб (I_I/I_{III})/(I_{II}/I_{IV}) – Сродство Гб к О₂



Комплексы гемоглобина

Нb-O₂ и Нb-NO



Оксигемоглобин – Нb-O₂

Нb-NO комплекс I:
сродство гемоглобина к
O₂ не меняется

Нb-NO комплекс II:
облегчается выделение
O₂,

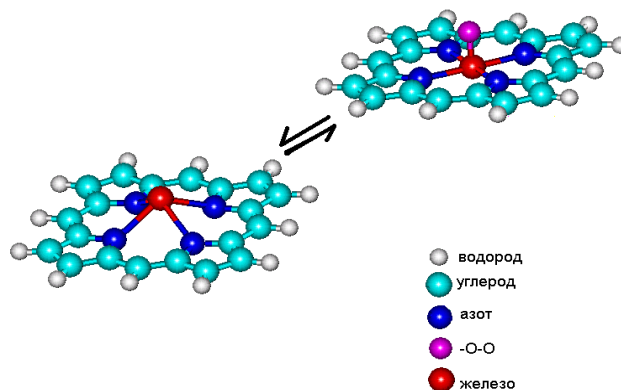
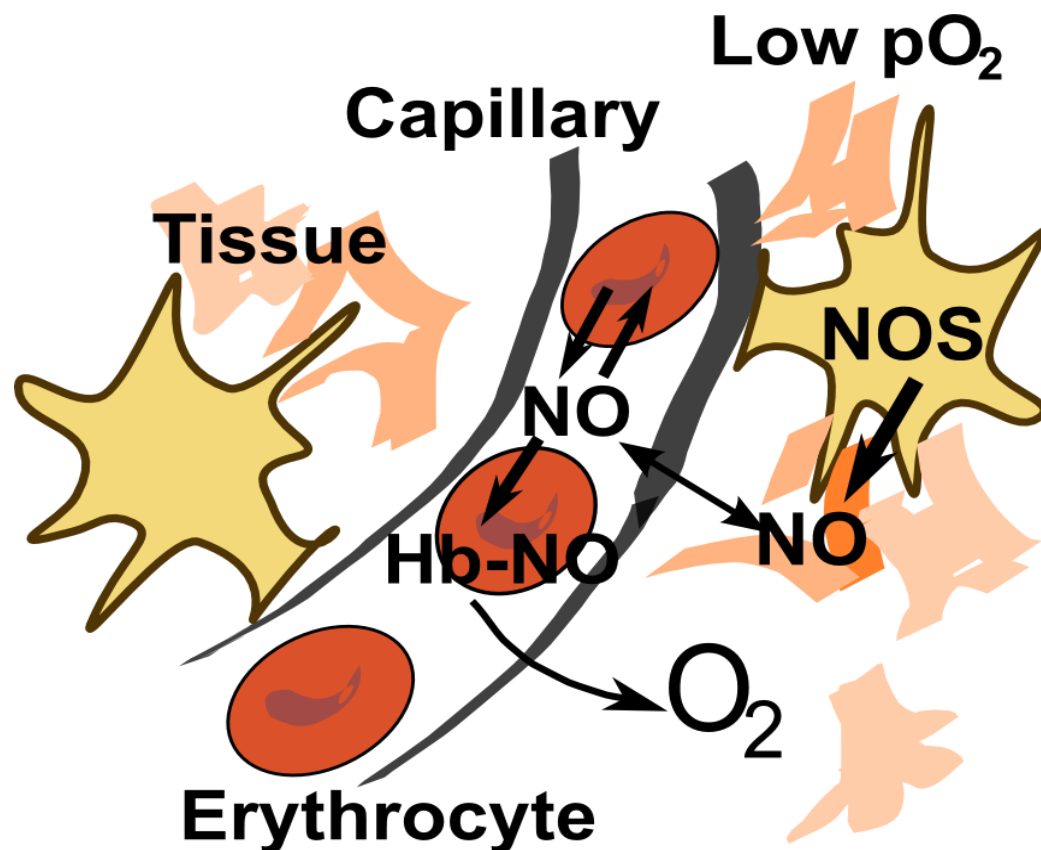
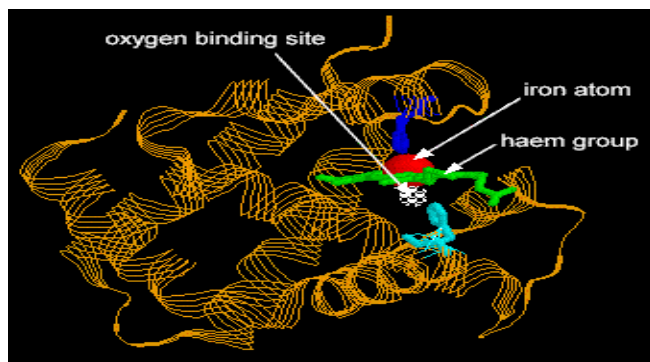
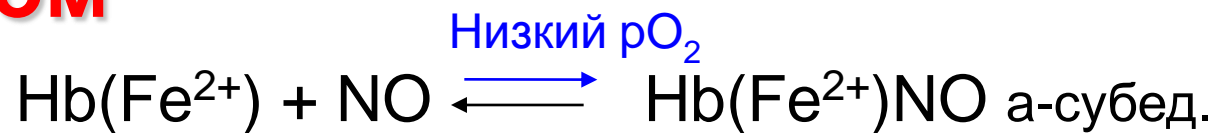
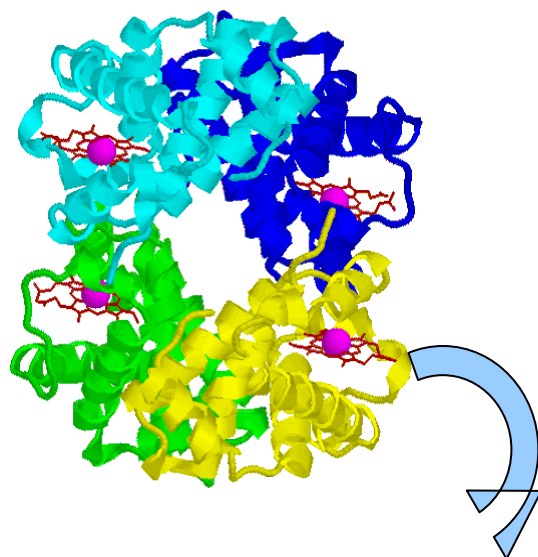


Схема NO-опосредованного усиления выделения O_2 из эритроцитов капилляров в ткани

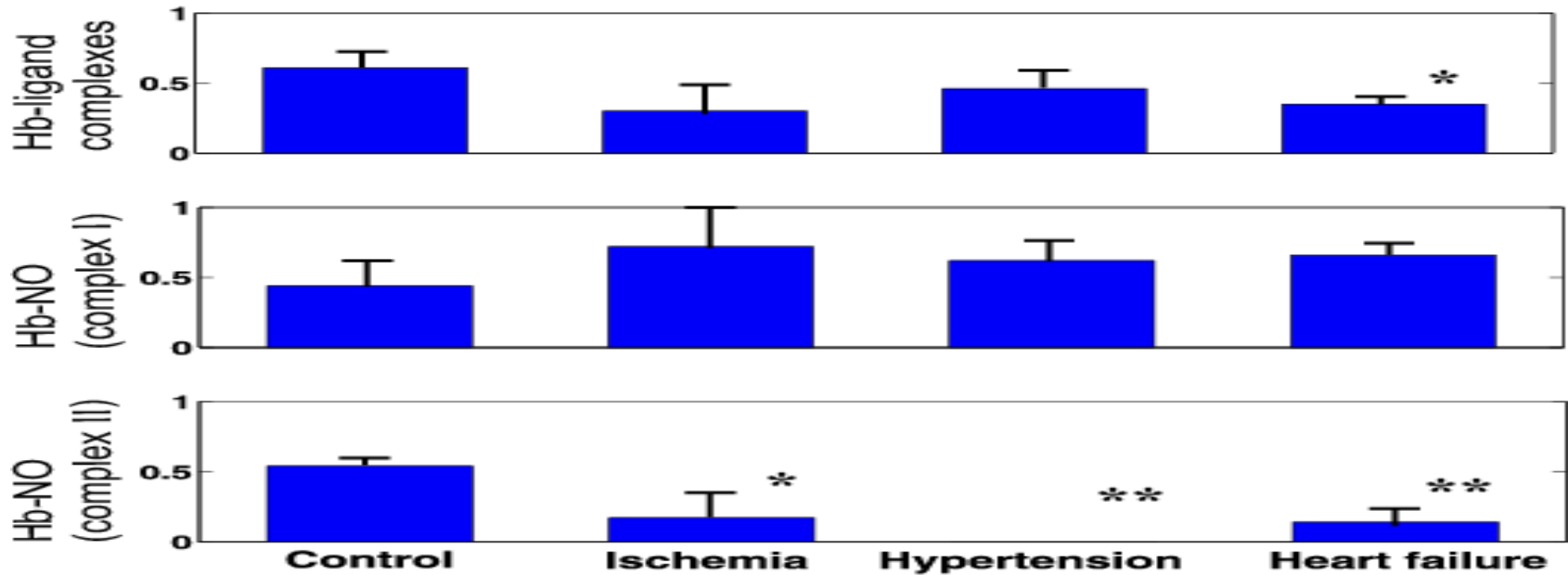


Связывание NO с Гб → Гб-NO (II) (разрыв связи между Fe^{2+} и глобином) → облегчение выделения O_2 , связанного на других субъединицах Гб

Взаимодействие NO с гемоглобином



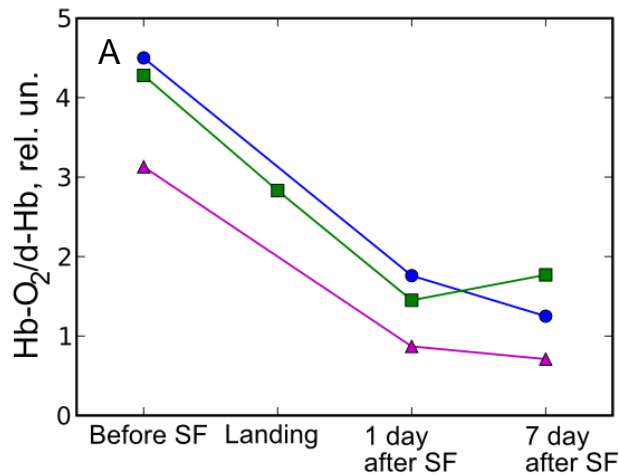
Изменения содержания комплексов гемоглобина при сердечно-сосудистой патологии



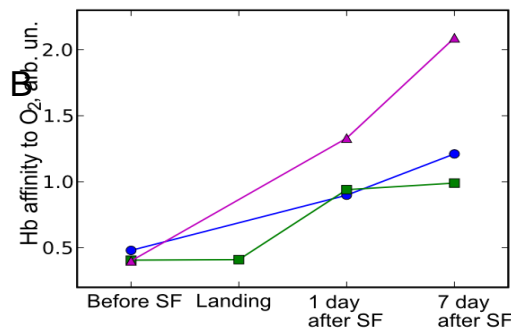
При ИБС, гипертонии и недостаточности кровообращения уменьшается содержание комплексов Hb-NO (II), что снижает сброс O_2

Воздействие длительного космического полета на свойства гемоглобина эритроцитов человека

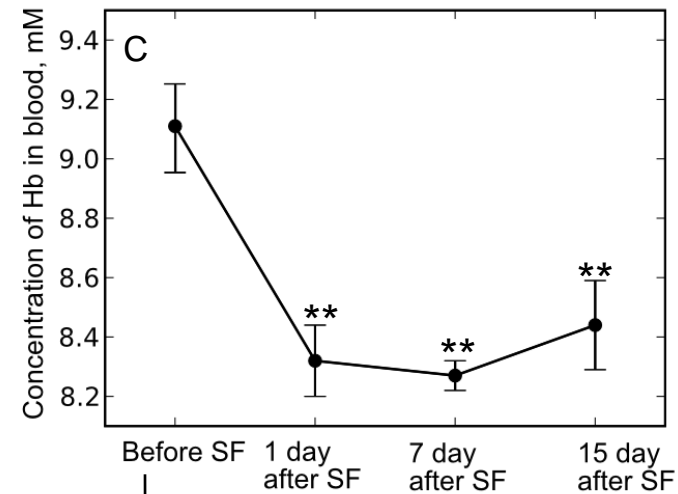
А. Содержание Hb-O₂.



В. Сродство Hb к O₂



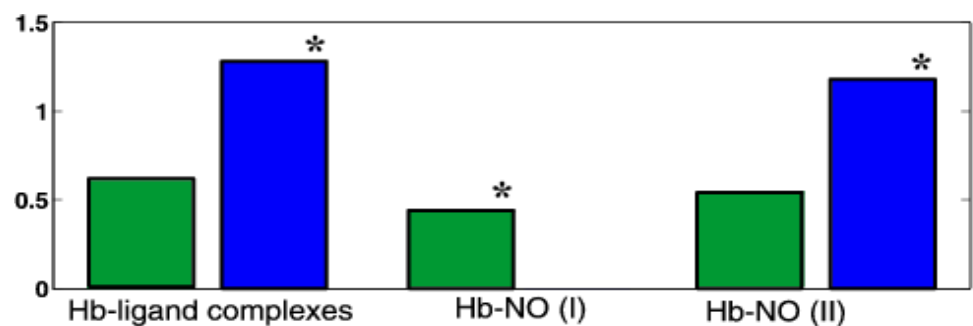
С. Содержание Hb



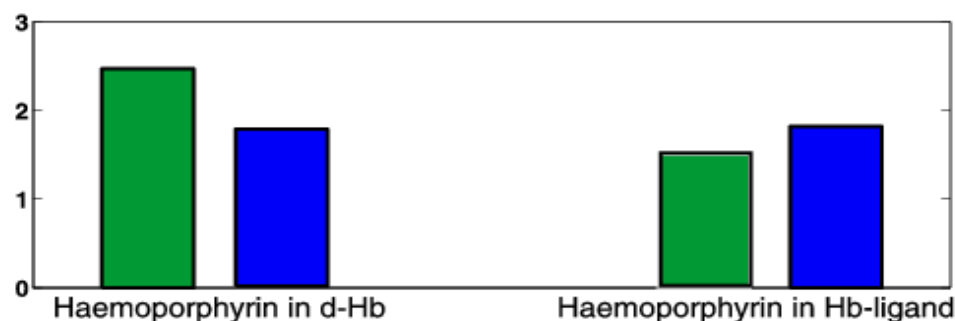
Снижение O₂ в ткани

Тканевая гипоксия

Изменения содержания комплексов гемоглобина людей, проживающих в условиях высокогорья



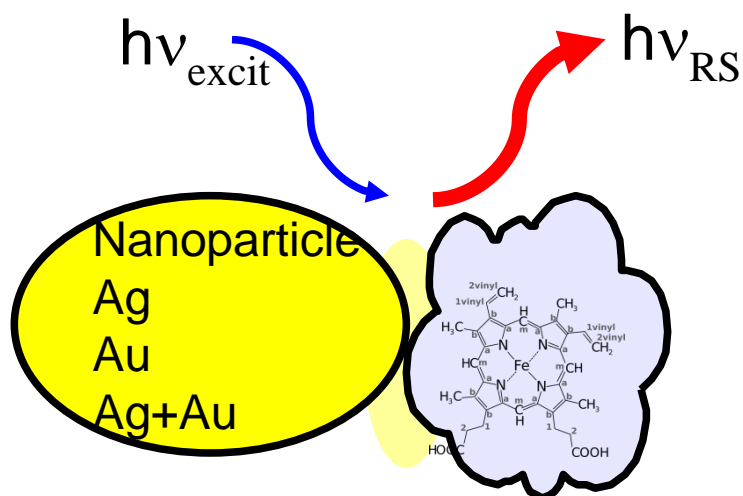
Адаптация, приводящая к насыщению Hb O₂ и стимуляции сброса O₂



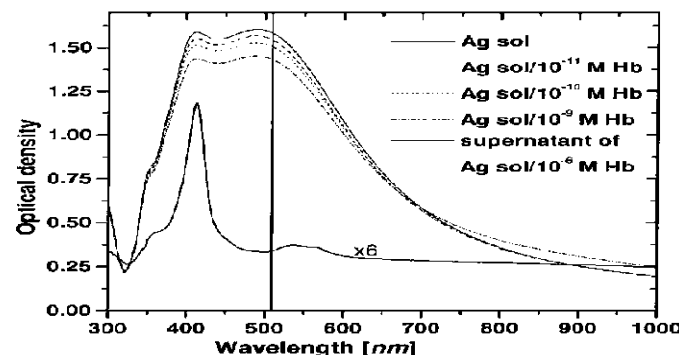
Control
Mountain hypoxia

Горная гипоксия увеличивает содержание комплексов окс-Нб и Нб-NO (II), что усиливает обмен O₂.

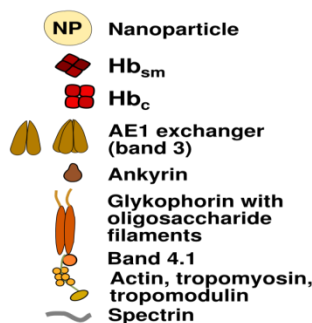
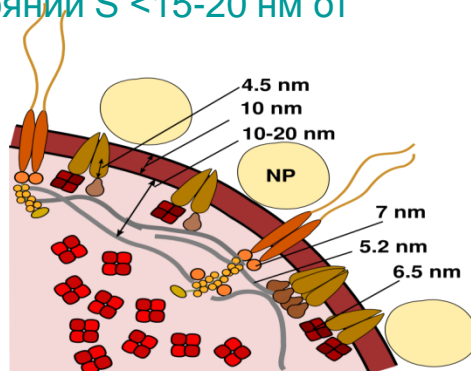
Спектроскопия ГКР для исследования конформации гемопорфирина гемоглобина в эритроцитах



Наночастица является “наноантенной”, улавливающей и многократно усиливающей КР сигнал

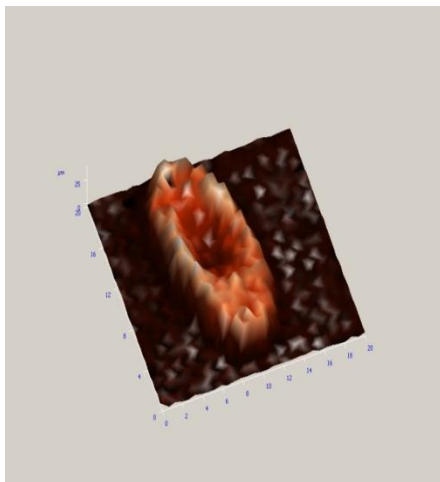
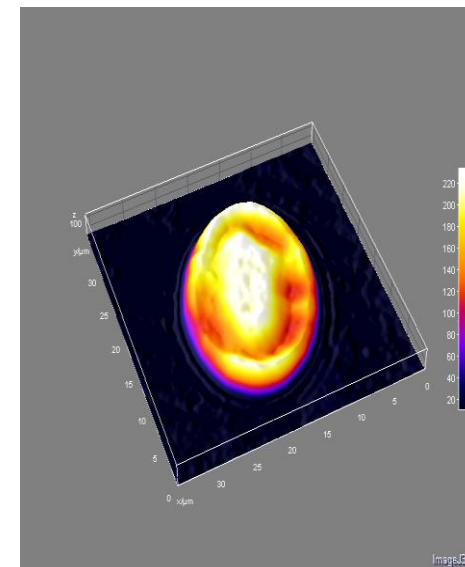
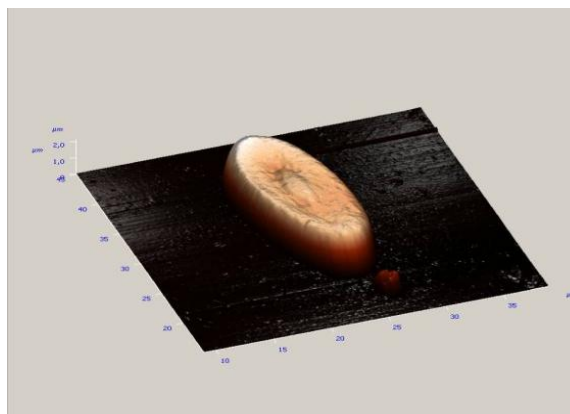


плазмонно-резонансное усиление КР (на расстоянии $S < 15\text{-}20$ нм от частицы)



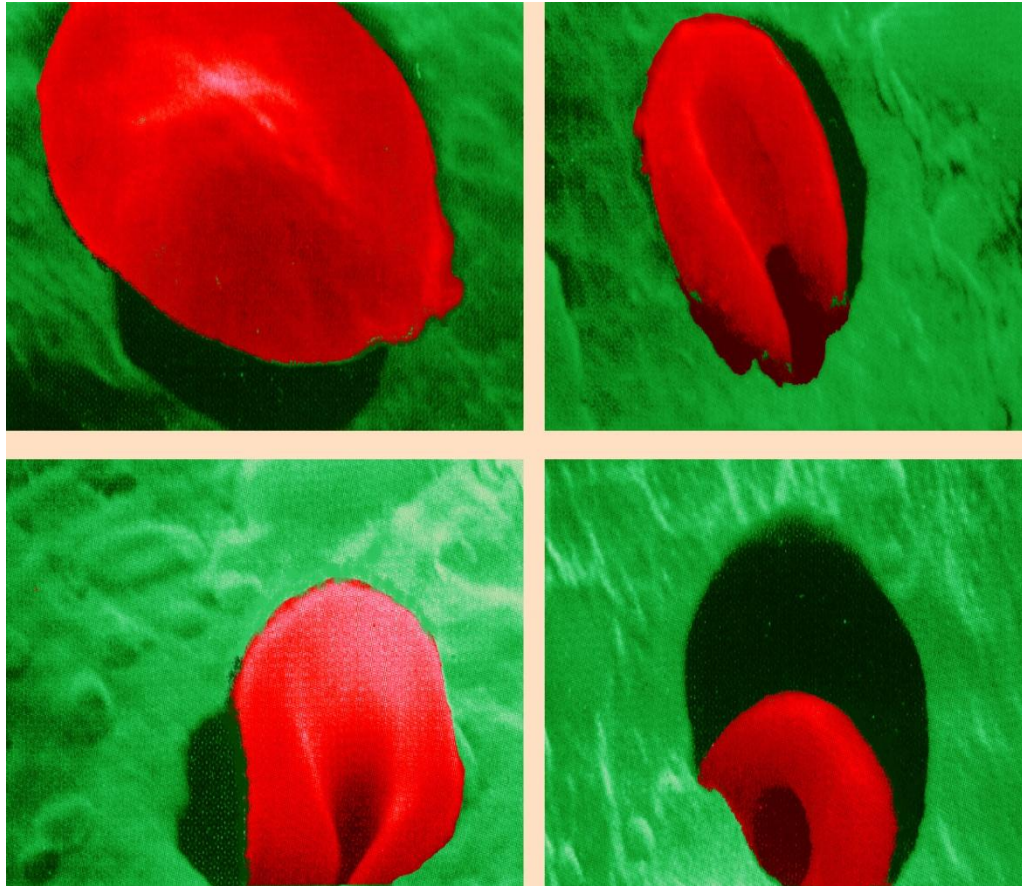
Как исследовать ГКР на отдельной клетке?

Ядерный эритроцит: АСМ (а), ЛИМ (б), КР-микроскопия (в)

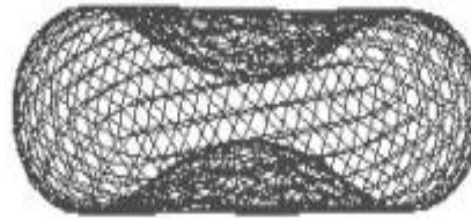
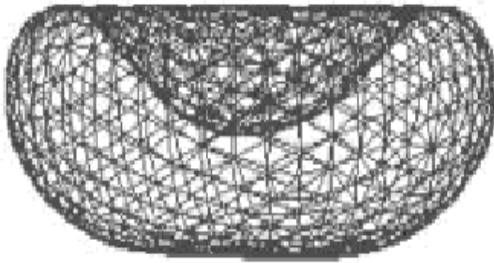


Зачем знать форму и объем эритроцита?

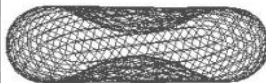
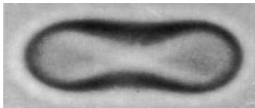
Деформация эритроцита
при входе в узкий капилляр



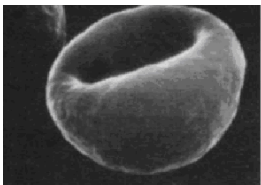
Устойчивые формы «шарика» с дефицитом объема Форма эритроцита определяется: объемом ; площадью поверхности механическими свойствами мембраны .



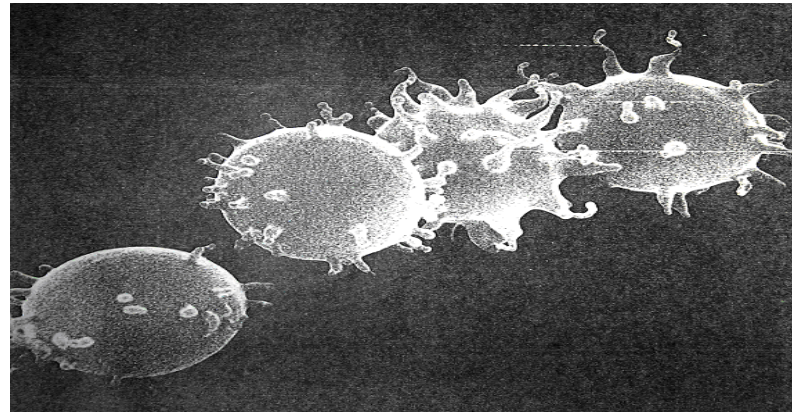
Форма двояко-вогнутого диска - наиболее устойчивая



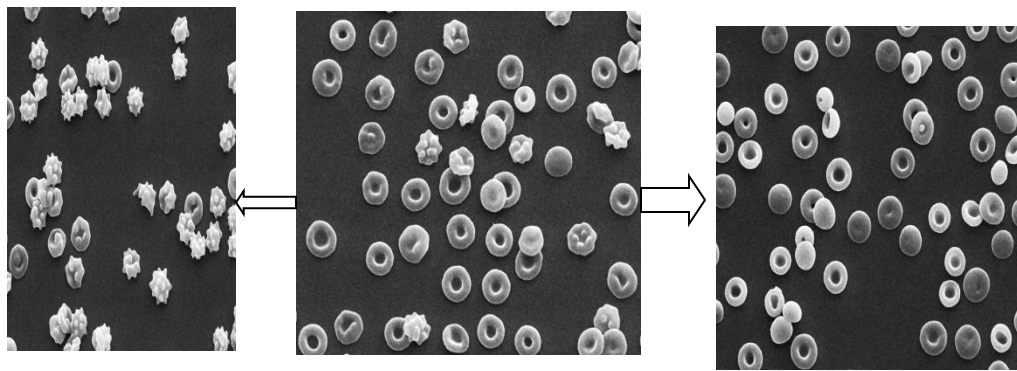
Почти все формы эритроцитов могут быть получены при изменении одного параметра - спонтанной кривизны мембраны



Перераспределение мембранных фосфолипидов:
избыток кальция - активация скрамблазы – образование
ЭХИНОЦИТОВ



Встраивание экзогенных соединений:



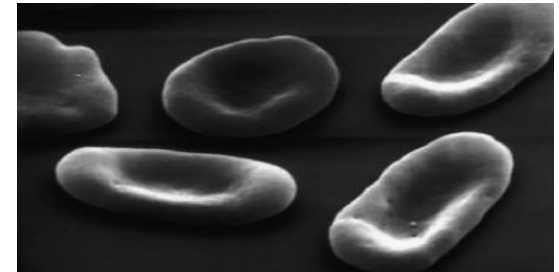
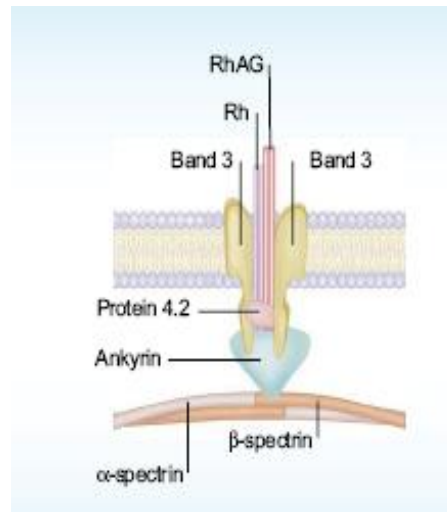
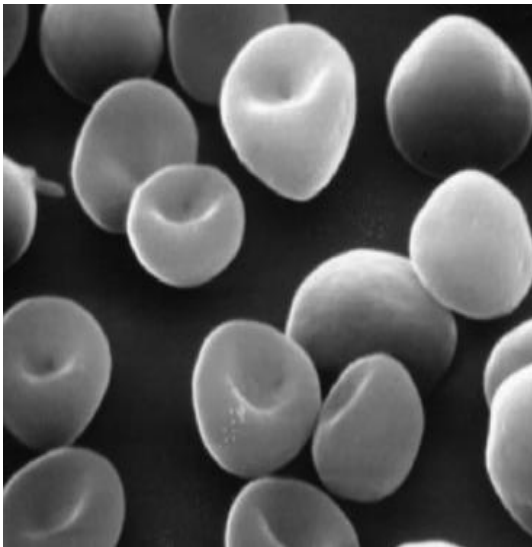
Наследственные заболевания и форма эритроцитов:

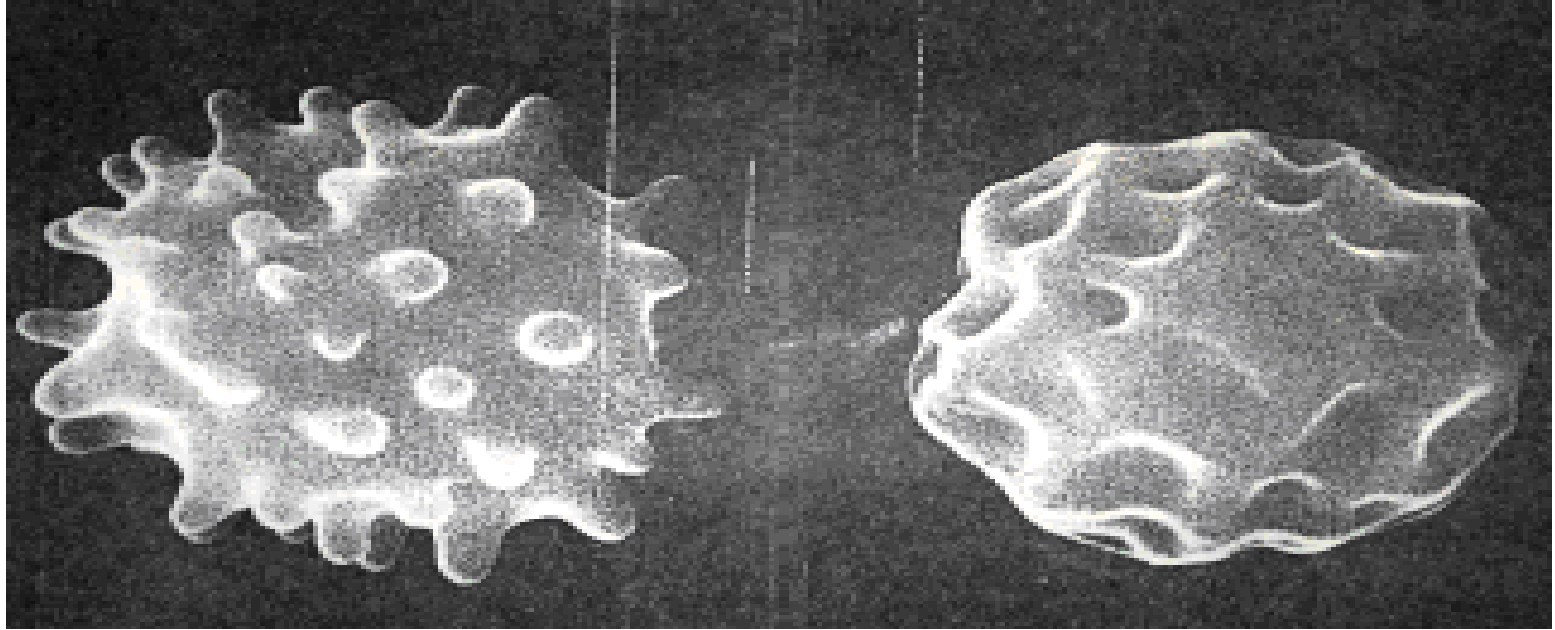
1. Мутации белков мембраны или цитоскелета (сфероцитоз, стоматоцитоз)
2. Мутации гемоглобина (серповидноклеточная анемия, талассемия).

Наследственный сфероцитоз - потеря клеточной мембраны - уменьшение отношения S/V . Клетки удаляются из кровотока в селезенке. Дефект “вертикальной” связи цитоскелета с мембраной.

Стоматоцитоз - увеличение объема эритроцита, нарушение транспорта катионов.

Эллиптоцитоз - нарушение горизонтальных связей (спектрин-спектрин)

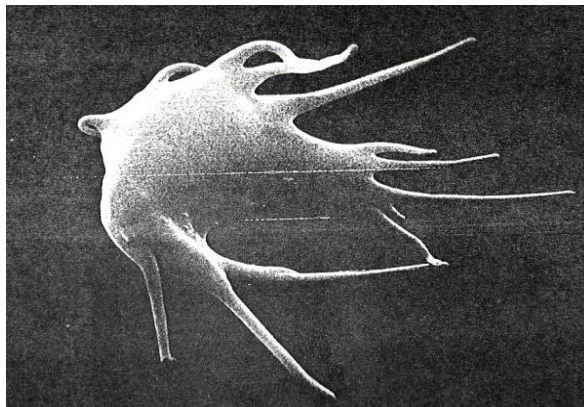
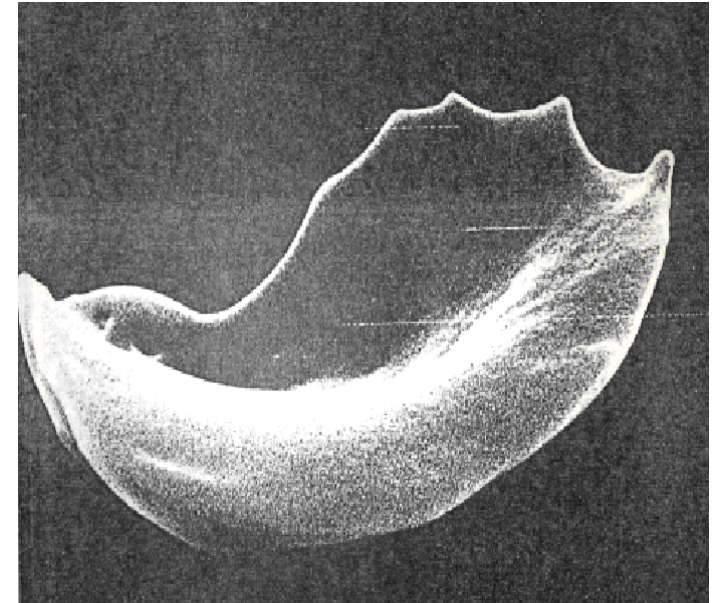
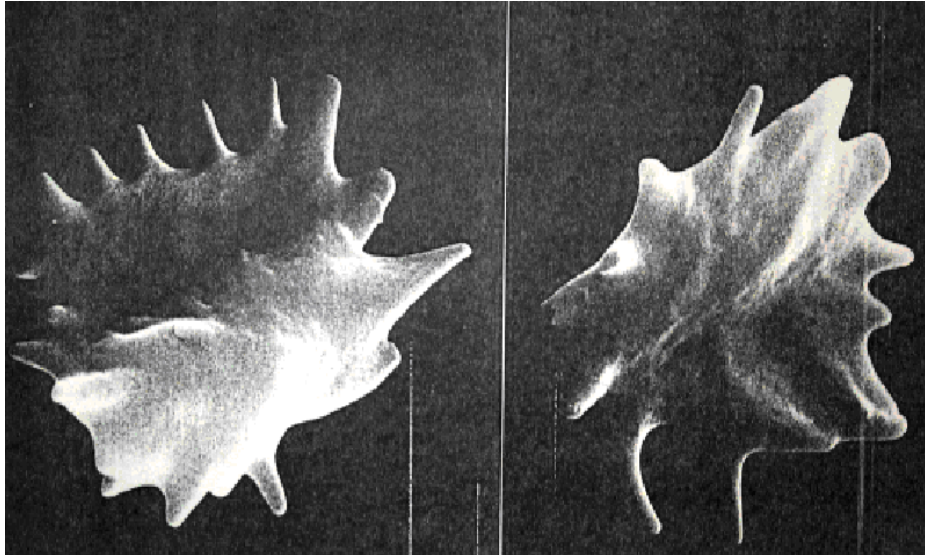




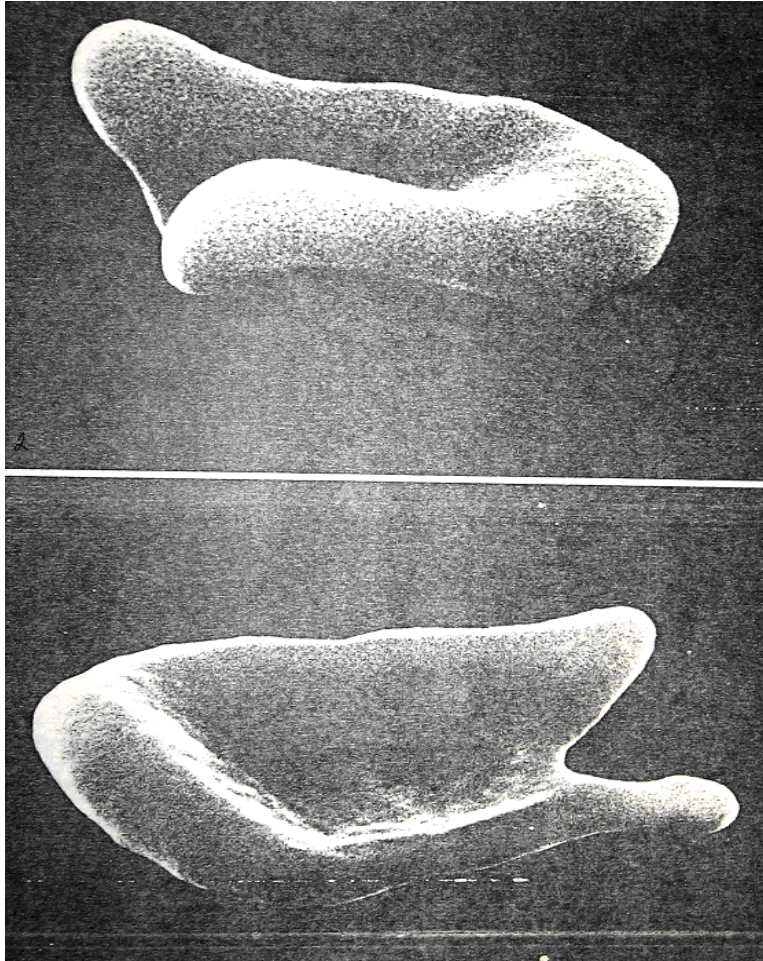
Нормальный и инвертированный ЭХИНОЦИТ

Marsel Bessis, Atlas of Red Blood Cell
Shape. 1974

Дрепаноциты - серповидные клетки

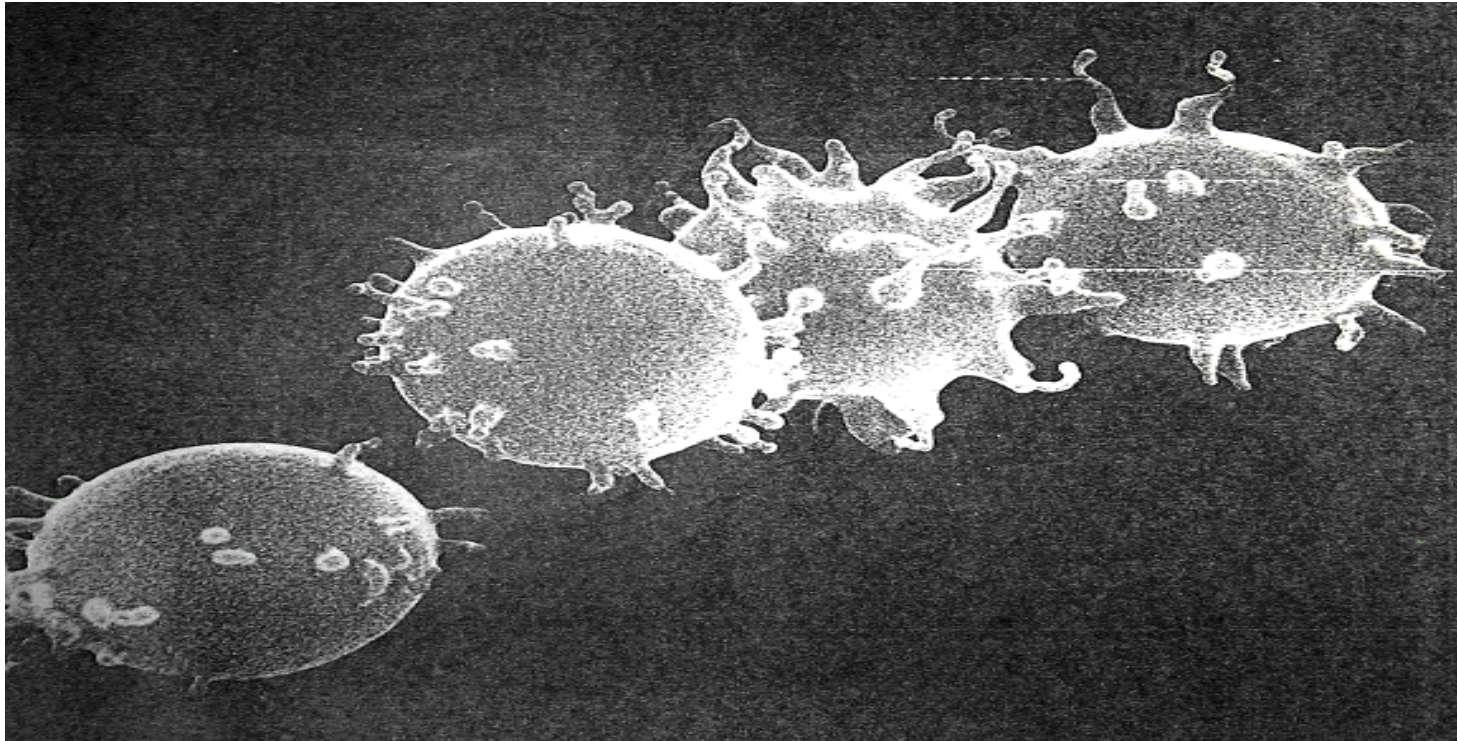


Кератоциты - поврежденные клетки



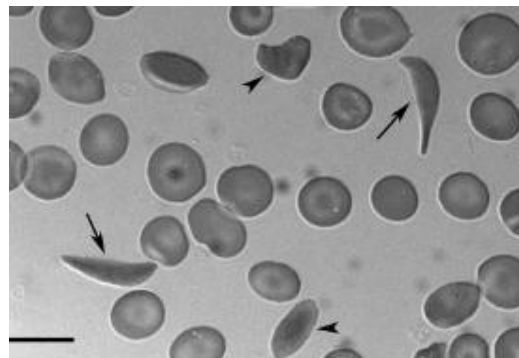
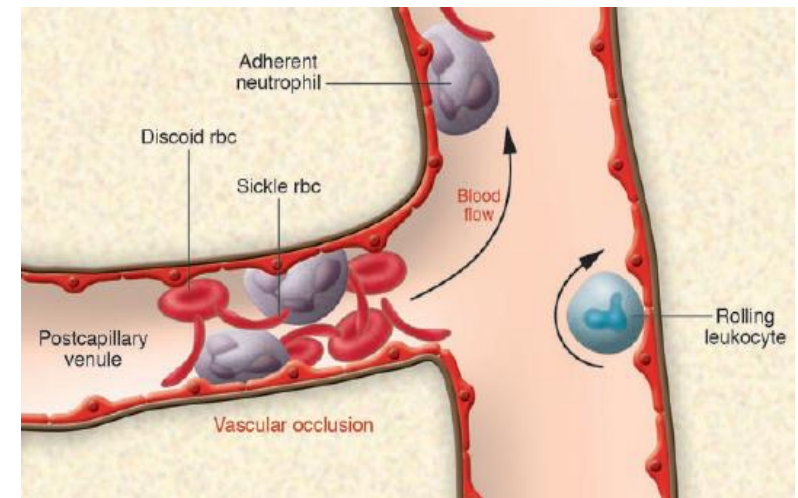
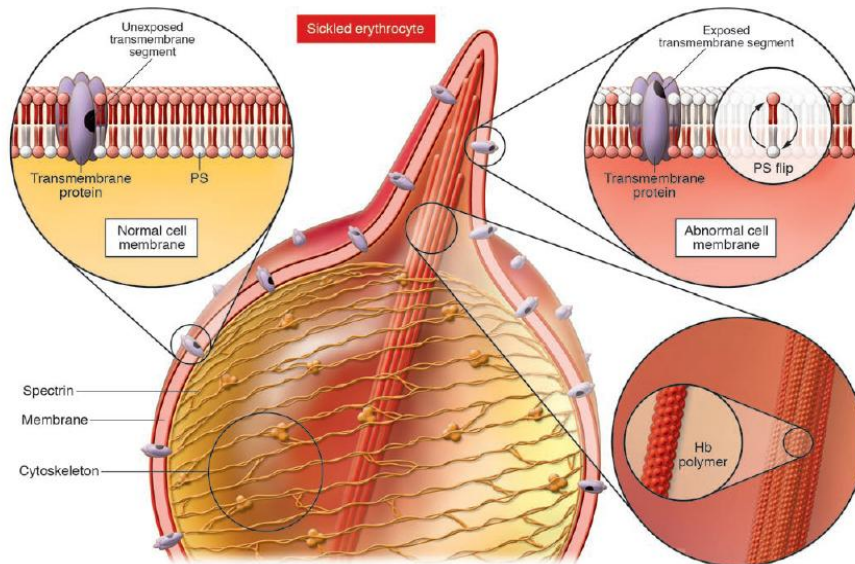
Кодоцит - колоколообразная
клетка с пониженным
содержанием гемоглобина



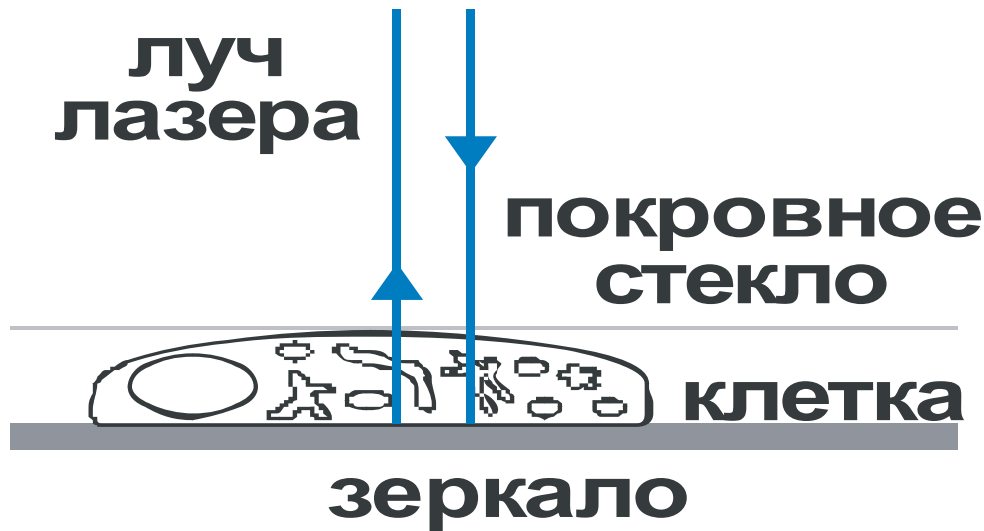


Стареющие клетки, от
которых отщепляются
везикулы

Серповидноклеточная анемия



Измерение наноструктуры цитоплазмы эритроцита



Для измерения оптического изменения фазы прозрачных и полупрозрачных объектов, их помещают на зеркальную подложку. Свет проходит через биологический объект и отражается от подложки, формируя, используя опорную волну, интерференционную картину.

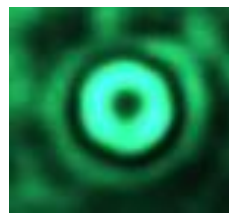
Эритроцит, размещенный на отражающей подложке в физиологическом растворе, является характерным примером измерения прозрачного образца. Содержимое эритроцита представляет собой достаточно однородную массу, поэтому высоту рельефа эритроцита, z можно оценивать, используя формулу:

$$z = \frac{\Phi}{n_2 - n_1}$$

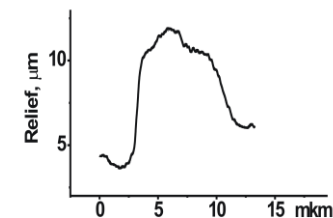
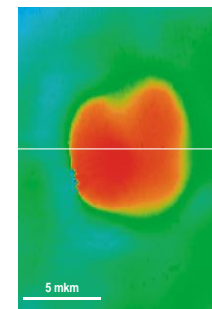
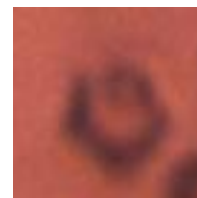
n_1 и n_2 – показатели преломления среды (1,333) и эритроцита (1,39) соответственно

Исследование структуры цитоплазмы эритроцита с помощью интерференционной микроскопии

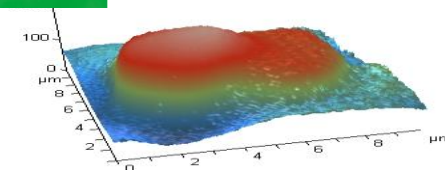
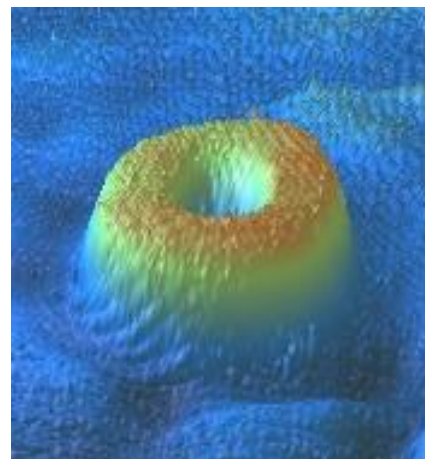
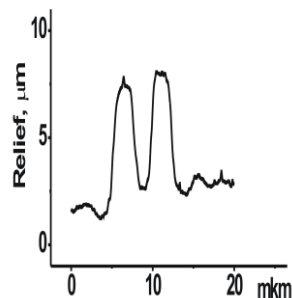
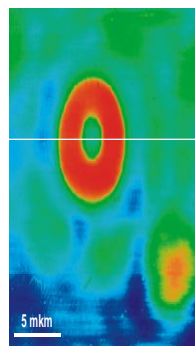
Оптическое изображение, интерференционное изображение, фазовый профиль дискоцита (А) и сфероцита (В)



А



В

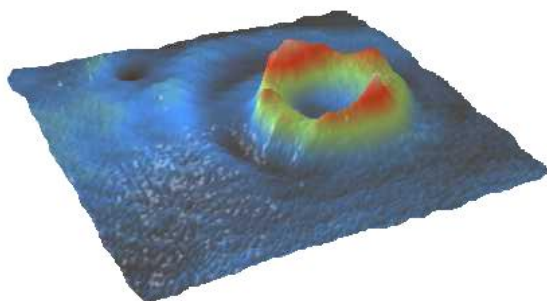
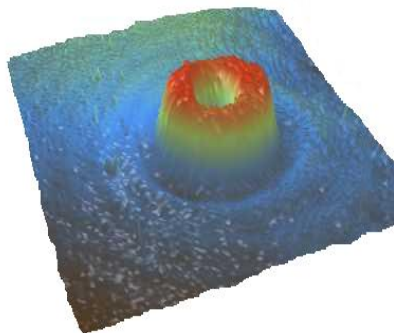


Распределение гемоглобина в эритроците в норме (А) и при недостаточности кровообращения (Б)

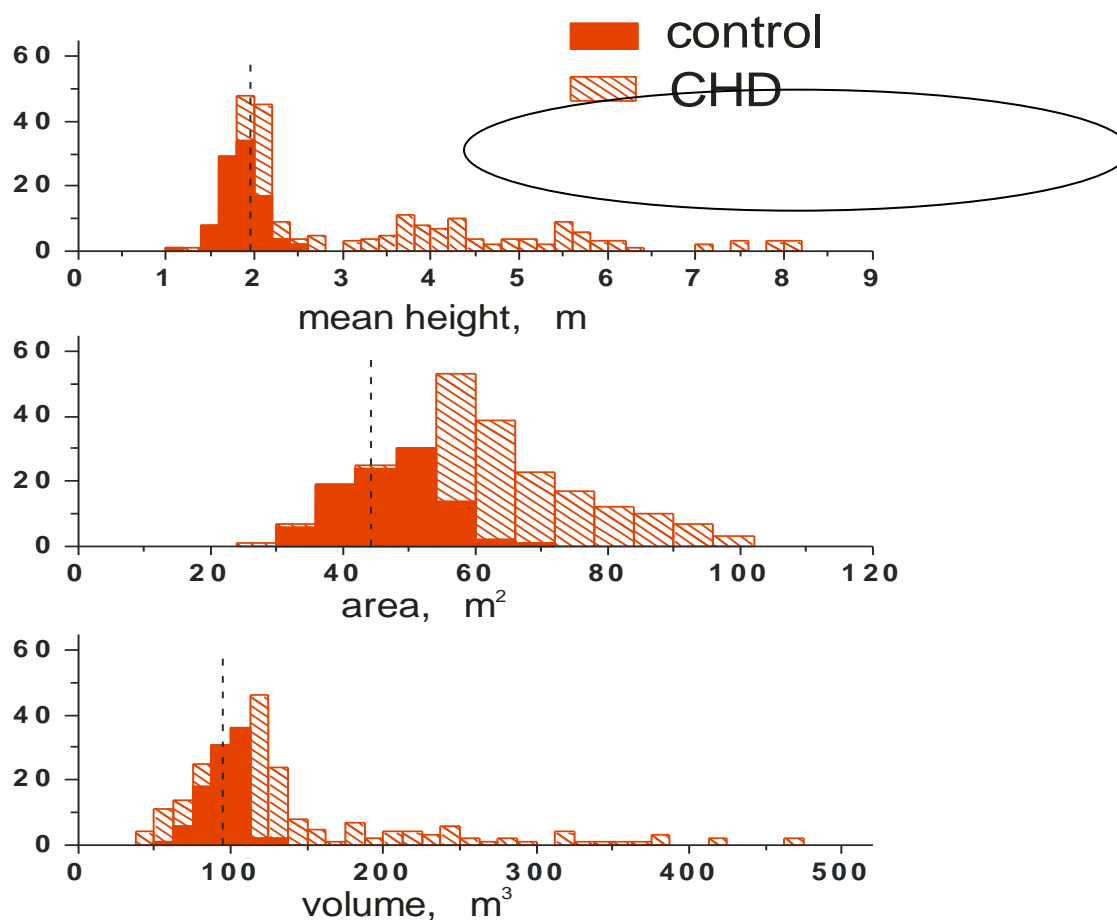
А



Б



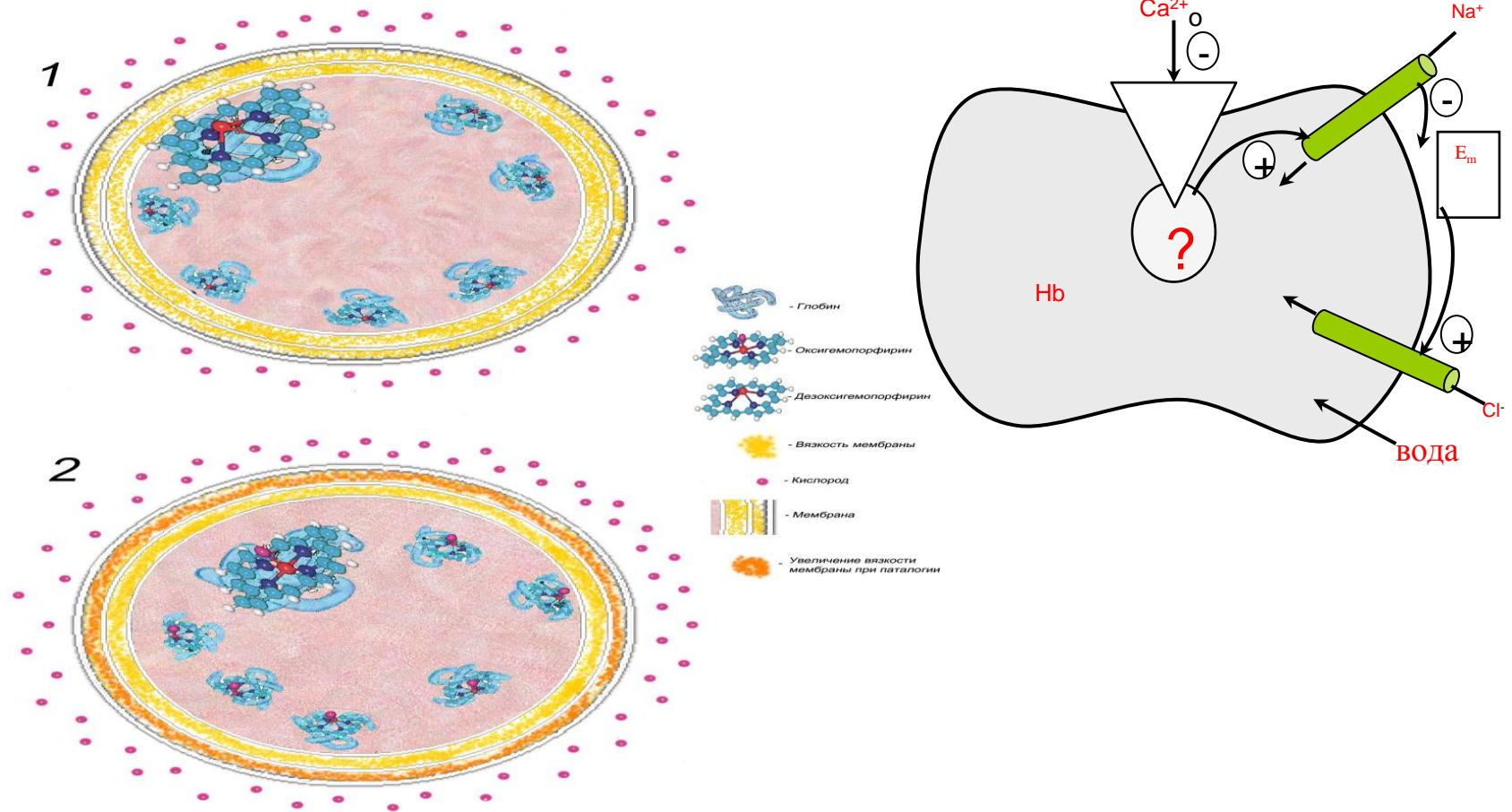
Гистограмма распределения высоты, площади и содержания гемоглобина эритроцита при ИБС



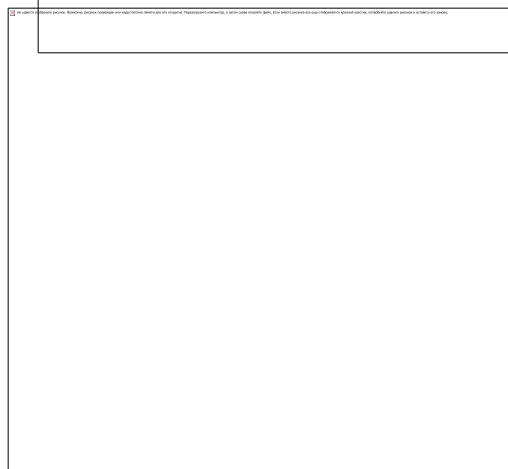
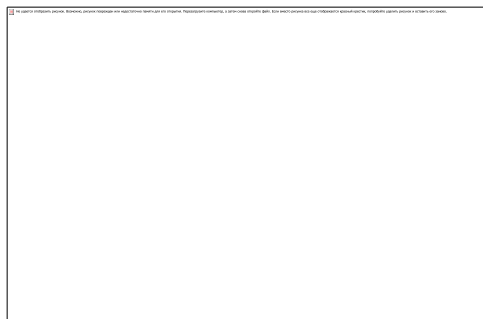
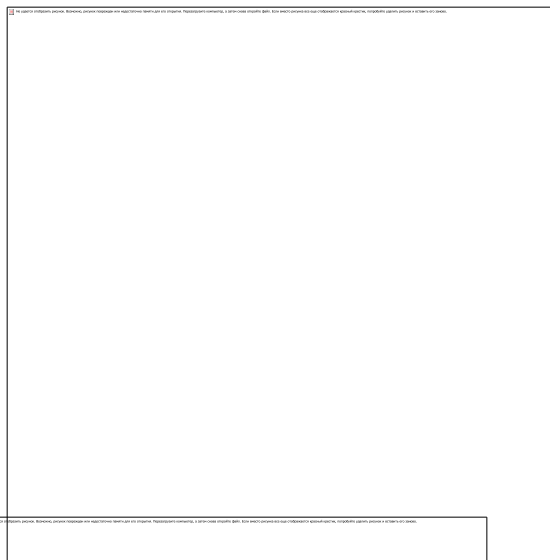
Дополнительные пики на гистограмме соответствуют увеличению уровня агрегации клеток

Увеличение площади эритроцита

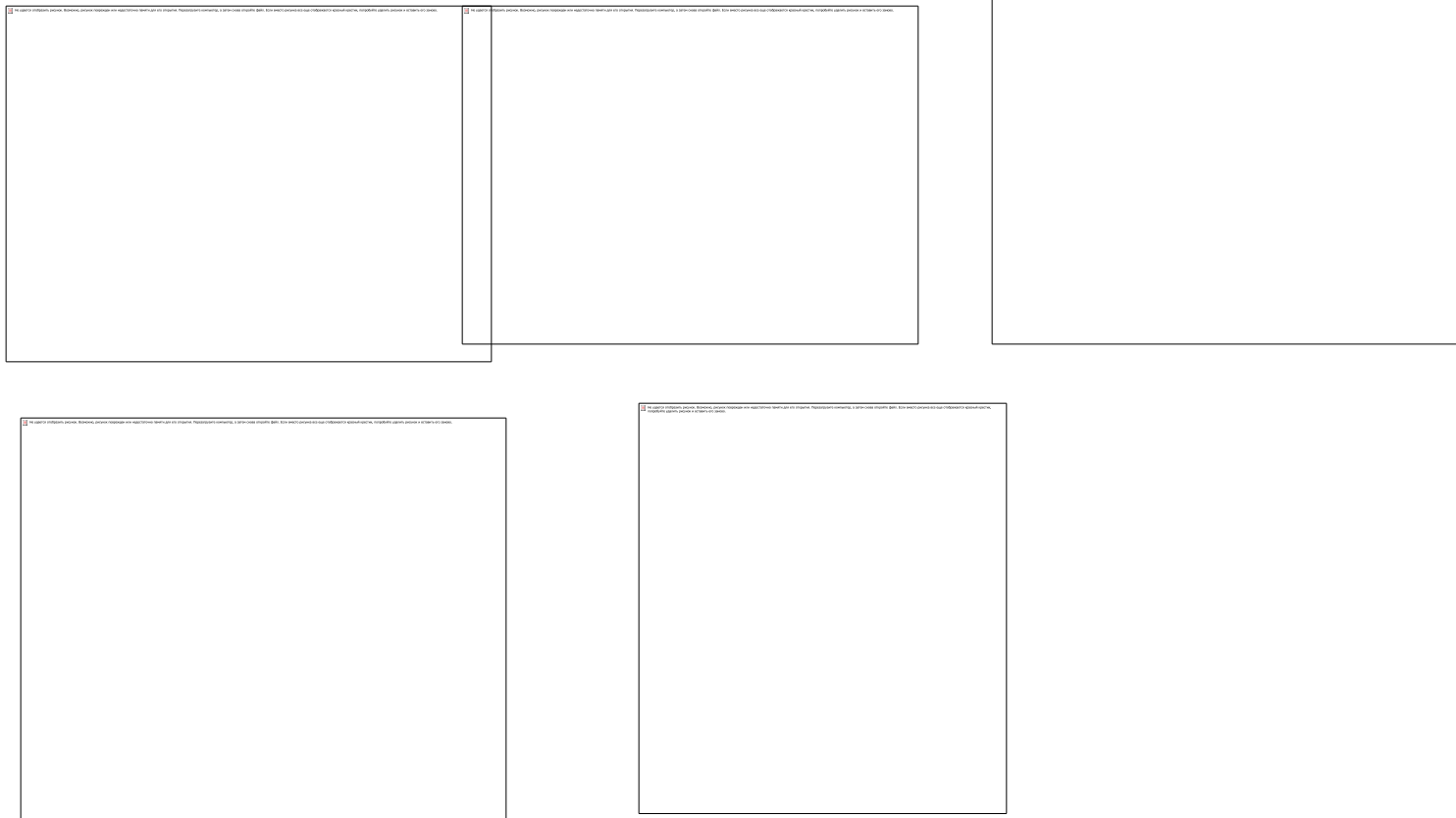
Возможные механизмы регуляции состояния эритроцита



Квантовые точки. Строение белков цианобактерий



Модель гибридного фотоэлектрического преобразователя



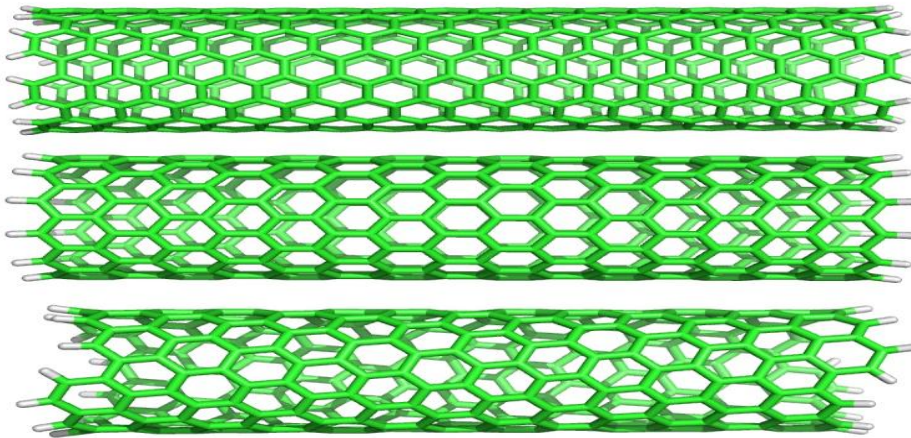
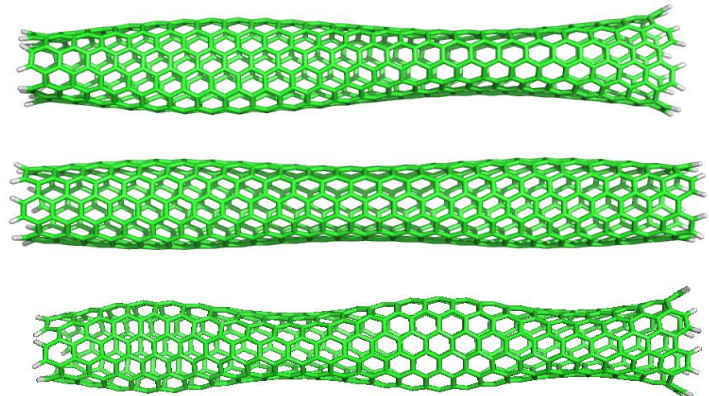
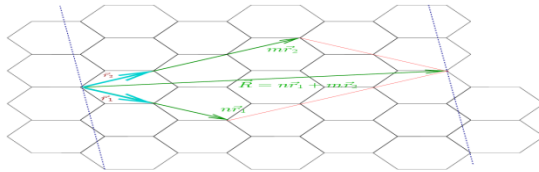
Наномоделирование

Вектора трансляционной симметрии плоского листа графена, при помощи которых задается финальная геометрия нанотрубки.

Нанотрубки с различными типами симметрии. Вверху - "кресло", посередине - "зигзаг", внизу - хиральная нанотрубка. Видны различия в расположении колец и строении края нанотрубки.

Примеры нормальных колебаний нанотрубки.

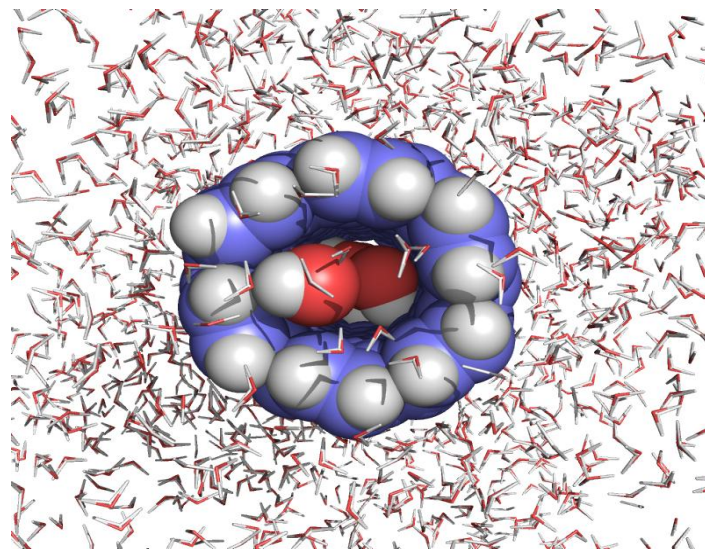
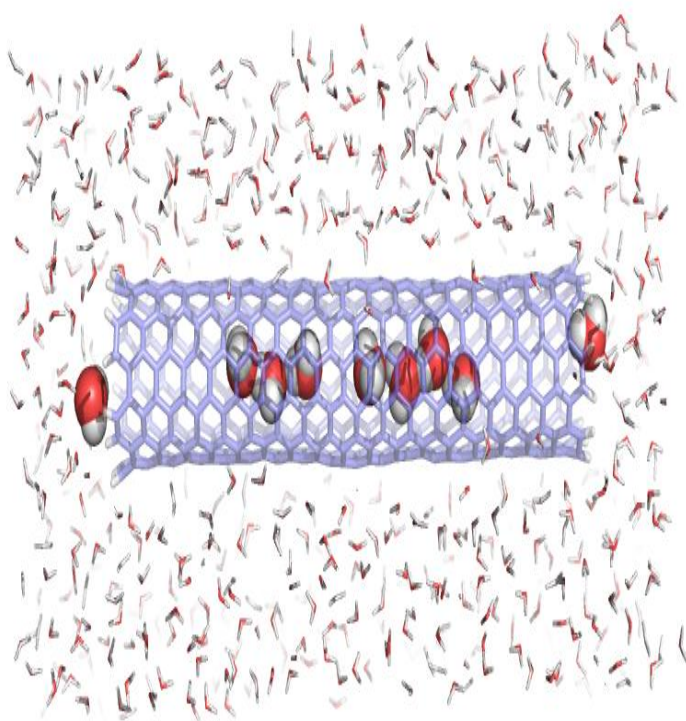
•



Наномоделирование

Цепочки связанных друг с другом водородными связями молекул воды внутри нанотрубки.

Молекулы воды внутри нанотрубки. Видно, что молекулы воды располагаются внутри нанотрубки в весьма ограниченном объеме.



**Спасибо за
внимание !**