

Министерство образования и науки Российской Федерации

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ПЕТРА ВЕЛИКОГО

БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2020

Авторы

Л.М. Попова, Е.Б. Аронова, Ю.Г. Базарнова

Бионанотехнология: уч. пособие / Попова Л.М. [и др.]. – СПб., 2020. – 180 с.

Учебное пособие соответствует образовательному стандарту высшего образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургского политехнического университета по направлениям подготовки магистров 19.04.01 «Биотехнология» по дисциплине «Введение в бионанотехнологию» и бакалавров 19.03.01 «Биотехнология» по дисциплине «Основы бионанотехнологии».

Рассмотрена история формирования нанонауки, приведены пути использования наноразмерных «строительных блоков», нульмерных и одномерных наноструктур. Приведены лабораторные методики получения фуллеренов, углеродных нанотрубок и наночастиц ряда металлов и механизмы их образования. Собраны сведения о медицинской диагностике на основе наноустройств, системах адресной доставки лекарств, различных видах биосенсоров и биочипов, медицинских нанороботах, липосомных биопрепаратах, магнитных наночастицах и основные инструменты для изучения нанообъектов. Высказаны предположения о перспективах использования достижений бионанотехнологии в повседневной жизни человека и различных областях науки и техники.

Предназначено для студентов, аспирантов, преподавателей биотехнологических факультетов вузов.

© Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, 2020

Предисловие

В нашей стране большое внимание на государственном уровне уделяется развитию нанотехнологий. Так, 26 апреля 2007 г. президент России В.В.Путин в послании федеральному собранию назвал нанотехнологии «наиболее приоритетным направлением развития науки и техники». Он предположил, что для большинства россиян нанотехнологии сегодня — «некая абстракция вроде атомной энергии в 30-е годы».

8 октября 2008 г. было создано «Нанотехнологическое общество России», в задачи которого входит «...просвещение российского общества в области нанотехнологий и формирование благоприятного общественного мнения в пользу нанотехнологического развития страны».

6 октября 2009 г. Д.А. Медведев на открытии Международного форума по нанотехнологиям в Москве заявил: «Главное, чтобы не произошло по известному сценарию — мировая экономика начинает расти, экспортный потенциал возрастает, и никакие нанотехнологии не нужны и можно дальше продавать энергоносители. Этот сценарий был бы для нашей страны просто губительным. Все мы должны сделать так, чтобы нанотехнологии стали одной из мощнейших отраслей экономики. Именно к такому сценарию развития я вас призываю» — подчеркнул Д.А. Медведев, обращаясь к участникам форума. При этом особо было отмечено, что «пока эта (государственная) поддержка (бизнеса) носит безалаберный характер, пока мы не смогли ухватить суть этой работы, надо наладить эту работу». Он также подчеркнул, что Роснано до 2015 г. на эти цели будет выделено 318 млрд рублей. Кроме того, Д.А. Медведев предложил Минобрнауки увеличить количество специальностей в связи с развитием потребности в квалифицированных кадрах для нанотехнологий, а также создать госзаказ на инновации и открыть «зеленый коридор» для экспорта высокотехнологичных товаров.

Часть I. ВВЕДЕНИЕ В НАНОТЕХНОЛОГИЮ

Нанотехнологии качественно отличаются от традиционных дисциплин, поскольку на таких масштабах привычные, макроскопические технологии обращения с материей часто неприменимы, а микроскопические явления, пренебрежительно слабые на привычных масштабах, становятся намного значительнее: свойства и взаимодействия отдельных атомов и молекул или агрегатов молекул (например, силы Ван-дер-Ваальса), квантовые эффекты.

Нанотехнология и в особенности молекулярная технология — новые, очень малоисследованные дисциплины. Основные открытия, предсказываемые в этой области, пока не сделаны, тем не менее, проводимые исследования уже дают практические результаты. Использование в нанотехнологии передовых научных достижений позволяет относить ее к высоким технологиям. Нанотехнология — следующий логический шаг развития электроники и других наукоемких производств.

Первые предположения о возможности исследования объектов на атомном уровне можно встретить в книге «Opticks» Исаака Ньютона, вышедшей в 1704 г. В книге Ньютон выражает надежду, что микроскопы будущего когда-нибудь смогут исследовать «тайны корпускул».

Впервые термин «нанотехнология» употребил Норио Танигути в 1974 г. Он назвал этим термином производство изделий размером несколько нанометров. В 1980-х годах этот термин использовал Эрик К. Дрекслер в своих книгах: «Машины создания: Грядущая эра нанотехнологии» («*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*») и «*Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*».

1 Общие представления о нанообъектах и нанотехнологиях

В последнее время термин «нанотехнология» стал очень популярным. Он объединяет разнородные представления и подходы, а также разные методы воздействия на вещество. Поэтому прежде чем перейти к описанию собственно нанотехнологии, необходимо пояснить, о каких объектах и размерах идет речь.

Легко заметить, что название новой науки возникло просто в результате добавления к весьма общему понятию «технология» приставки «нано», означающей изменение масштаба в 10^{-9} (миллиард) раз, то есть 1 нанометр = 1 нм = 10^{-9} м, что составляет одну миллионную миллиметра.

В табл. 1 [2] приведены размеры некоторых известных естественных и искусственных объектов природы в диапазоне размеров от 10 метров до 1 ангстрема $1\text{Å} = 10^{-10}$ м в 10 раз меньше нанометра и соответствует диаметру самого маленького из атомов (атом водорода).

К нанотехнологии принято относить процессы и объекты с характерной длиной от 1 до 100 нм.

Верхняя граница нанообласти соответствует минимальным элементам в больших интегральных схемах (БИС), широко применяемым в полупроводниковой и компьютерной технике. С другой стороны, многие вирусы имеют размер 10 нм, а 1 нм почти точно соответствует размеру белковых молекул (в частности, радиус двойной спирали молекулы ДНК равен именно 1 нм).

Таким образом, нанотехнология объединяет все технические процессы, связанные непосредственно с атомами и молекулами. Именно поэтому она представляется весьма перспективной для получения новых конструкционных материалов, полупроводниковых приборов, устройств для записи информации, ценных фармацевтических препаратов.

Хотелось бы подчеркнуть, что пока невозможно оценить и представить себе масштабы и возможности применения нанотехнологий в целом.

Таблица 1

Место наноразмерных объектов в окружающем нас мире

Увеличение размеров	10 м	Кит	
	1 м	Человек	
	10 см	Птичье гнездо	
	1 см	Таракан	
	1 мм	Муравей; песчинка	
	100 мкм	Толщина листа бумаги; яйцеклетка; крупная амеба	
	10 мкм	Биоклетка; толщина человеческого волоса	
	1 мкм	Эритроцит крови; кишечная палочка	
	100 нм	Минимальный размер элементов БИС	
	10 нм	Вирус; углеродная нанотрубка	
	1 нм	Белковая молекула; диаметр спирали ДНК	
	1 Å	Диаметр атома водорода	

Источник: Ежемесячное информационное издание Кэйданрэн (февраль, 2000 г.)

1.1 Свободная манипуляция атомами и молекулами

Нанотехнологию можно определить как набор технологий или методик, основанных на манипуляциях с отдельными атомами и молекулами (то есть методик регулирования структуры и состава вещества) в масштабах 1-100 нм.

Классическим примером достижений нанотехнологии стала разработка сканирующих туннельных микроскопов (СТМ). Первый такой микроскоп был создан в лаборатории фирмы IBM Бихи и Роллером для исследования особенностей и неоднородностей поверхности монокристаллов кремния. Некоторое представление о работе СТМ рассмотрим на следующем примере (рис.1).

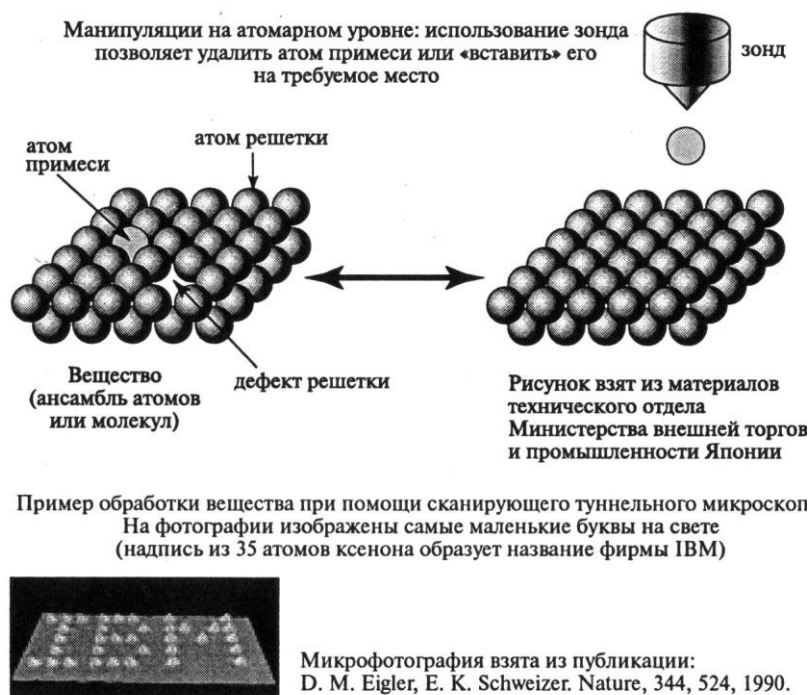


Рис.1 – Манипуляции на уровне атомов

Общие принципы работы СТМ состоят в следующем: экспериментатор подводит тончайший золотой щуп (зонд) на расстояние около 1 микрона (10^{-6} м) к поверхности исследуемого образца, в результате чего между зондом и поверхностью возникает электрический ток, обусловленный квантово-механическим «туннельным эффектом», величина которого меняется в зависимости от состояния изучаемой поверхности (например, из-за наличия на поверхности впадин или выступов). Замеряя величину «туннельного» тока или, наоборот, сохраняя ее постоянной (за счет регулирования потенциала зонда), экспериментатор может «сканировать» поверхность и получать ее прямое «изображение», подобно тому, как электронный луч создает изображение, сканируя поверхность экрана обычного телевизора. Этот метод позволяет не только изучать атомарную структуру поверхности, но и проводить разнообразные и весьма ценные физические эксперименты (например, можно проверить теоретические расчеты, относящиеся к изменению поверхности в определенных условиях и т.д.).

Работая со сканирующим микроскопом описываемого типа, экспериментаторы неожиданно вышли на следующий этап развития, а именно — стали проводить прямые технологические операции на атомарном уровне.

Прикладывая к зонду СТМ соответствующее напряжение, его можно использовать в качестве своеобразного атомного «резца» или гравировального инструмента. Впервые это удалось сделать сотрудникам Армаденской лаборатории фирмы IBM (США) под руководством Д. Эйглера, которые сумели выложить на поверхности монокристалла никеля название фирмы из 35 атомов ксенона. Позднее, в 1991 г. из этого выросла методика перемещения атомов ксенона вверх-вниз (относительно поверхности монокристалла), названная атомным переключением (*atomic switch*). Описанная техника создает много возможностей как для манипуляций на уровне отдельных атомов, так и для изучения их структур и поведения.

1.2 История возникновения нанотехнологии

В 1947 г. был изобретен транзистор, после чего началась эпоха расцвета полупроводниковой техники, и размеры создаваемых кремниевых устройств постоянно уменьшались (интегральные схемы, большие интегральные схемы, сверхбольшие интегральные схемы и т.д.). С другой стороны, одновременно непрерывно возрастали быстродействие и объем магнитных и оптических запоминающих устройств. В частности, плотность записи на жестких магнитных и оптических дисках в 2005 г. достигало 1 Гб/кв.дюйм.

Однако, по мере приближения размеров полупроводниковых устройств к 1 микрону ($1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$), в них начинают проявляться квантово-механические свойства веществ, то есть необычные физические явления («туннельный эффект») (табл.2).

Таким образом, можно с уверенностью предположить, что в ближайшие годы при сохранении нынешних темпов развития вся кремниевая технология

(и связанная с ней промышленность полупроводников) столкнется с проблемами, поскольку быстродействие и степень интеграции в ЭВМ достигнут границ, определяемых известными нам законами физики. Дальнейший прогресс науки и техники требует от исследователей существенного «прорыва» к новым принципам работы и новым технологическим приемам.

Таблица 2

Краткая хронология основных достижений в области нанотехнологии

Год	Существенные достижения в области нанотехнологий
1928	Предложена принципиальная схема устройства сканирующего оптического микроскопа ближнего поля
1932	Создание первого просвечивающего электронного микроскопа
1938	Создание первого сканирующего электронного микроскопа
1959	Р.Ф. Фейнман (США) выдвинул идею создания веществ и объектов методом поштучной атомной сборки
1972	Создано устройство, работающее по принципу микроскопа ближнего поля
1975	Теоретически рассмотрена возможность существования квантовых линий и квантовых точек
1981	Создание сканирующего туннельного микроскопа (СТМ)
1985	Создание первого полевого транзистора с высокой подвижностью носителя (НЕМТ) Химики синтезировали первые фуллерены
1986	Э.К. Дрекслер (США) выдвинул концепцию создания молекулярных машин Создание атомно-силового микроскопа (АСМ)
1991	В Японии началась реализация государственной программы по развитию техники манипулирования атомами и молекулами (проект «Атомная технология»). Получение первых углеродных нанотрубок
1998	Изготовлен элемент памяти электронного запоминающего устройства (с объемом памяти 128 Мбит), работающий при комнатной температуре
2000	США приступили к реализации программы исследований ННИ
2007	В РФ учреждена государственная корпорация «Роснано»

Такой революционный прорыв может быть осуществлен только за счет использования нанотехнологии, которая позволяет создавать целый ряд принципиально новых производственных процессов, материалов и устройств на их основе. Расчеты показывают, что использование нанотехнологий может повысить основные характеристики полупроводниковых вычислительных и запоминающих устройств на три порядка, то есть в 1000 раз.

Однако нанотехнологию не стоит сводить только к локальному революционному прорыву в указанных областях (электроника, информационные технологии). Уже сейчас в нанотехнологии получен ряд исключительно важных результатов, позволяющих надеяться на существенный прогресс в развитии многих других направлений науки и техники (медицина и биология, химия, экология, энергетика, механика и т.п.). Например, при переходе к нанометровому диапазону (то есть к объектам с характерными длинами около 10 нм) многие важнейшие свойства веществ и материалов изменяются существенным образом. Речь идет о таких важных характеристиках, как электропроводность, коэффициент оптического преломления, магнитные свойства, прочность, термостойкость и т.п.

На основе материалов с новыми свойствами уже сейчас создаются новые типы солнечных батарей, преобразователей энергии, экологически безопасных продуктов. Возможно, что именно производство дешевых, энергосберегающих и экономически безопасных материалов станет наиболее важным результатом внедрения нанотехнологий.

Уже созданы высокочувствительные биологические датчики (сенсоры) и другие устройства, позволяющие говорить о возникновении новой науки – нанобиотехнологии и имеющие огромные перспективы практического применения.

1.3 Примеры практического применения нанотехнологий

Нанонаука как единое целое развивается буквально на наших глазах на стыке считавшихся ранее независимыми наук и технологий (информационные технологии, электронная техника, биохимия, атомная спектроскопия, физика и т.д.).

Результатом такого переплетения наук стала серьезная проблема несогласованности подходов, терминологии, определений, методов и научного жаргона. Создание справочников и словарей по нанотехнологии

становится насущной проблемой (в частности, когда речь идет о нарастающем потоке информации на японском и китайском языках).

В феврале 2000 г. на основе доклада Межотраслевой группы по нанонауке, нанотехнике и нанотехнологии (IWGN) Национального совета о науке и технике при президенте США Б.Клинтон подписал программу ННИ (Национальная Нанотехнологическая Инициатива). Эта программа фактически дала старт нанотехнологическому буму во многих странах. В США на эти цели было выделено ≈ 500 млн. долларов.

Нанонаука может быть определена как междисциплинарная наука, относящаяся к фундаментальным физико-химическим исследованиям объектов и процессов с масштабами в несколько нанометров.

Нанотехнология – совокупность прикладных исследований нанонауки и их практических приложений, включая промышленное производство и социальное использование.

1.4 Естественные границы развития современной микроэлектроники

Современная полупроводниковая техника основана на методах и технологиях микроэлектроники. Электроника как самостоятельное направление возникло около 1900 г. и продолжало бурно развиваться в течение всего прошлого столетия. Важной вехой в ее истории стало изобретение транзистора в 1947 г., в результате размеры используемых элементов составили около 75 мкм.

В настоящее время техника миниатюризации развилась до деталей схем размером около 0,2 мкм. Тенденция к уменьшению размеров сохраняется (от 100 до 50 нм). Однако существующие технологические приемы уже не в состоянии обеспечить эффективное производство элементов электронных схем с точностью до 100 нм.

В драйвере жесткого диска плотность записи на 1 кв.дюйм площади магнитного диска уже составляет 15 Гб (1 Гб = 10^9 бит) и через несколько лет

– 1 Тб (10^{12} бит). Эти параметры выводят на некоторые физические пределы существующих технологий.

Так, например, при плотности в 1 терабит запись 1 бита информации соответствует промежуткам длиной около 20 нм, что невозможно реализовать ни в одной из существующих систем магнитной записи. Дело в том, что при предельной плотности записи 1 бит информации может быть связан с состоянием отдельного магнитного домена. На меньших промежутках запись станет неустойчивой из-за термических флуктуаций.

С другой стороны, на драйверах цифровых дисков многократного использования (*DVD, digital videodisk*) и оптических дисков (*ODD, optical digital disk*) плотность записи может достигать нескольких десятков гигабит и выше. Плотность записи при этом лимитируется длиной волны используемого света, так как при меньших длинах волн считывание становится невозможным (этот фактор в оптике называют дифракционным пределом разрешения).

Нанотехнология позволяет преодолеть эти сложности (за счет перехода к атомарному уровню обработки и регулирования состава материалов) и записать, например, 1 бит информации на диске порядка нескольких нанометров. Для этого нам необходимо перейти к производству новых материалов с повышенными функциональными характеристиками. Поэтому можно считать, что перспективы развития электроники определяются именно возможностями нанотехнологий.

1.5 Создание объектов по принципу «сверху-вниз» и «снизу-вверх»

Существуют два подхода к обработке материалов (веществ) и созданию планируемых изделий. Эти подходы принято условно называть технологиями «сверху-вниз» и «снизу-вверх» (рис. 2).

Подход «сверху-вниз» основан на уменьшении размеров физических тел механической или иной обработкой, вплоть до получения объектов с

ультрамикроскопическими, нанометровыми параметрами. Например, некоторые полупроводниковые устройства, структура которых создается фотолитографической обработкой. При фотолитографии полупроводниковая заготовка подвергается обработке лазерным лучом, что позволяет получить в ней заранее спланированную конфигурацию схемы. Разрешающая способность (то есть минимальный размер элементов изготавливаемой схемы) определяется при этом длиной волны лазерного излучения (самый минимум примерно 100 нм – очень сложный и трудоемкий).

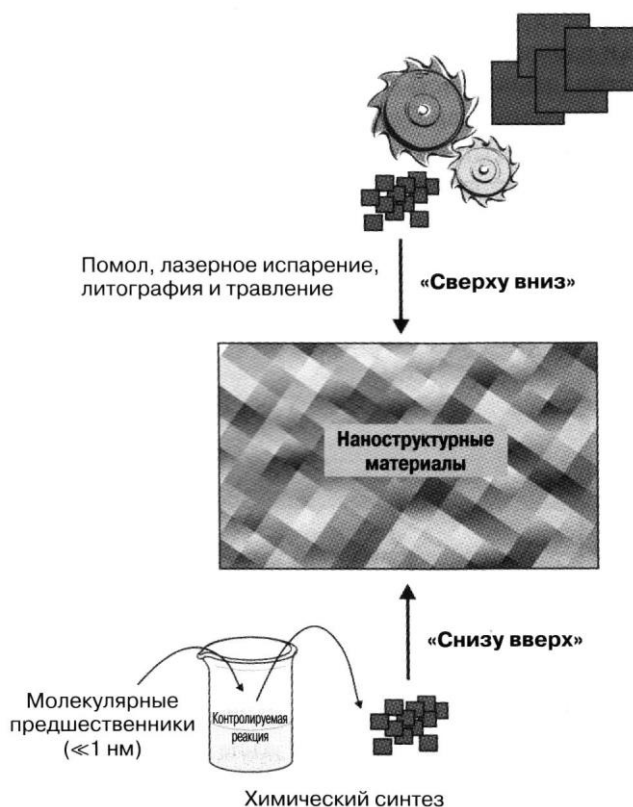


Рис. 2 – Сравнение подходов «сверху-вниз» и «снизу-вверх» получению наноматериалов

Идея технологии «снизу-вверх» заключается в том, что сборка создаваемой конструкции осуществляется непосредственно из элементов «низшего порядка» (атомов молекул, структурных фрагментов биологических клеток и т.п.), располагаемых в требуемом порядке, этот подход можно считать «обратным» по отношению к привычному методу миниатюризации «сверху-вниз», когда мы просто уменьшаем размеры деталей. Например, поштучная укладка атомов на кристаллической

поверхности при помощи сканирующего туннельного микроскопа или других устройств этого типа. Метод позволяет наносить друг на друга не только отдельные атомы, но и слои атомов. Однако метод пока имеет низкую эффективность и производительность.

1.6 Суть «туннельного эффекта»

Еще в XVII в. И. Ньютон сформулировал законы классической механики, которая остается самой наглядной из наук и оперирует макрообъектами.



Рис. 3 – Туннельный эффект

В свою очередь нанотехнологии относятся к микромиру, законы которого определяются механикой атомов и молекул. Электрон, обладая двойственной природой, в определенных условиях может проникать через преграду. Это явление получило название «туннельный эффект» и является предметом изучения квантовой физики.

Теоретически эффект был предсказан еще в 1928 г. знаменитым физиком Г. Гамовым. Он ввел представление об этом эффекте для объяснения α -распада, который наблюдается при сближении атомов. Электроны при сближении атомов могут покинуть свои оболочки, не обладая при этом необходимой энергией. Возможность таких переходов объясняется волновой природой электронов. Электрон как бы находит в стене туннель и проскакивает через него (в качестве стенки выступает электростатический потенциал ядра) (рис. 3).

Вопросы для самоконтроля

1. Свободная манипуляция атомами и молекулами.
2. История возникновения нанотехнологии.
3. Примеры практического применения нанотехнологий.
4. Естественные границы развития современной микроэлектроники.
5. Создание объектов по принципу «сверху-вниз» и «снизу-вверх».
6. Суть «туннельного эффекта».

2 Электронные микроскопы

Минимальные объекты, которые можно разглядеть при помощи человеческого глаза, имеют размер около 0,1 мм, а для разглядывания и изучения более мелких предметов используется очки или лупы, а затем и сложные конструкции из оптических линз, называемые оптическими микроскопами. Независимо от вида используемых линз и способа их соединения, разрешающая способность таких приборов ограничивается основным правилом оптической техники, сформулированным еще в 1873 г. (так называемый дифракционный предел разрешения Рэля), в соответствии с которым минимальные размеры различаемых деталей рассматриваемого объекта не могут быть меньше, чем длина света, используемого для освещения (табл.4). Поскольку самые короткие длины волн диапазона соответствуют примерно 400 нм, разрешающая способность оптических микроскопов принципиально ограничена половиной этой величины, то есть составляет около 200 нм. Единственным выходом из возникшей ситуации стало создание приборов, в которых используются волновые излучения с меньшей длиной волны, то есть излучения не световой природы.

Как известно, электрон можно рассматривать в качестве волны, которую можно преобразовывать с помощью электрических или магнитных линз. На этом основан принцип действия электронных микроскопов, позволяющих значительно расширить возможности исследования веществ на микроскопическом уровне (за счет увеличения разрешающей способности на порядки). В электронном микроскопе вместо света используются сами электроны, представляющие собой в данной ситуации излучение со значительно более короткой длиной волны. В таких устройствах вместо стеклянных линз, естественно, применяются электронные линзы (то есть поля соответствующей конфигурации). Электронные пучки не могут распространяться без рассеяния даже в газовых средах, поэтому внутри

электронного микроскопа, вдоль всей траектории электронов, должен поддерживаться высокий вакуум.

Электронные микроскопы разделяются на два больших класса по методике применения: просвечивающие электронные микроскопы (ПЭМ) и сканирующие (СЭМ). Основное различие между ними заключается в том, что в ПЭМ электронный пучок пропускается через очень тонкие слои исследуемого вещества, с толщиной менее 1 мкм (как бы «просвечивая» эти слои насквозь), а в сканирующих микроскопах электронный пучок последовательно отражается от маленьких участков поверхности (структура поверхности и ее характерные особенности могут быть определены при этом регистрацией отраженных электронов или вторичных электронов, возникающих при взаимодействии пучка с поверхностью).

Работа с электронными микроскопами является достаточно сложной, в первую очередь из-за необходимости тщательной подготовки образцов и обеспечения высокого вакуума внутри всей экспериментальной установки. Этих недостатков лишены сканирующие электронно-зондовые микроскопы (СЭЗМ), разработанные в 1970 г.

Таблица 4

Основные этапы развития техники микроскопии

	Год	Результаты
Оптическая микроскопия	1873	• Изобретение Э. Аббе и др. конструкции современного оптического микроскопа, разрешающая способность которого определяется лишь дифракционными пределами, связанными с длиной волны излучения оптического диапазона (~ 200 нм) • Развитие идей, связанных с не световой оптикой и поиски новых решений
Электронная микроскопия	1924	• Разработка теории волновой природы электронов
	1932	• Создание первого электронного микроскопа (М. Кнолл и Э. Руска)
	1935	• М. Кнолл предложил идею сканирующего электронного микроскопа
	1938	• Создание М. фон Арденне первого сканирующего электронного микроскопа
Сканирующая зондовая микроскопия	1972	• Реализация идеи сканирующего туннельного оптического микроскопа ближнего поля (СОМБП)
	1981	• Изобретение сканирующего туннельного микроскопа (СТМ)
	1986	• Изобретение атомарно-силового микроскопа (АСМ)
	1992	• Усовершенствование конструкции СОМБП, позволяющее довести пространственную разрешающую способность до 1/40 от длины облучающей волны*
* В настоящее время, используя специальную методику травления торцов оптических волокон, пространственную разрешающую способность удалось снизить до 20 нм.		

2.1 Принципы работы просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ)

Электрон, ускоренный в поле высокого напряжения, может рассматриваться в качестве волны и ее легко фокусировать, используя осесимметричные электрические или магнитные поля. На этом принципе основано действие ПЭМ, конструкция которого похожа на схему обычного оптического микроскопа, где вместо лучей света используются электроны. Первое устройство было создано в 1932 г. немецкими учеными М. Кноллом и Е. Руска.

В таком микроскопе источник света заменен на электронную пушку (источник электронов). Испускаемые пушкой электроны проходят через электронную линзу-конденсор (регулирующую интенсивность потока излучения и освещаемую площадь поверхности исследуемого образца), а затем через линзу-объектив проектируются на люминесцентный экран, под которым располагается фотокамера, позволяющая переводить получаемую на экране картину в привычное фотографическое изображение. По всей траектории прохождения электронов в установке должен поддерживаться высокий вакуум.

Известно много конструкций источников высокоэнергетических электронов, наиболее простой и надежной из которых является раскаленная вольфрамовая проволока. В сложных электронных микроскопах с высоким разрешением излучение создается потоком электронов, испускаемых поверхностью кремниевого чипа (кристалла) под воздействием сильного электрического поля (эмиссия под воздействием поля). Исследуемые в ПЭМ образцы должны быть очень тонкими, поскольку именно их толщина определяет размер деталей на изображении. Требуемые сверхтонкие пластины вырезают по довольно сложным методикам либо изготавливают другими, специальными методами (ионное фрезерование и т.п.).

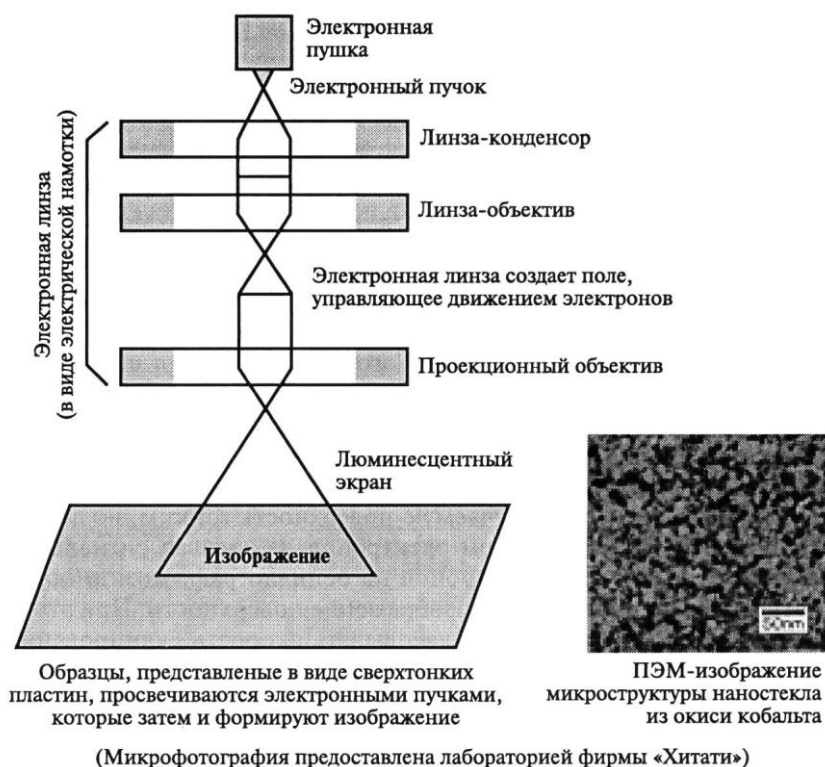


Рис. 4 – Принцип работы просвечивающего электронного микроскопа

Электронный луч, просвечивая тонкий слой вещества, позволяет получать прямое изображение дефектов или неоднородностей кристаллической структуры во внутренней части образца. Анализ дифракционных картин дает возможность установить периодичность атомных структур, а также ориентацию кристаллов. Разрешающая способность новейших ПЭМ уже составляет около 0,2 нм, что подводит к получению фотографий отдельных атомов и молекул.

На рис. 4 приведено изображение структуры вещества сверхтонкой пластинки из наностекла, образованного кристаллическими зернами оксида кобальта с помощью ПЭМ. На изображении можно выделить и рассмотреть морфологические особенности с размерами менее 50 нм.

2.2 Сканирующие электронные микроскопы

Следующим поколением электронных микроскопов стали сканирующие электронные микроскопы (СЭМ), похожие по принципу действия на

обычный телевизор. Первоначально СЭМ сильно отставали в развитии от описанных просвечивающих электронных микроскопов (несмотря на то, что идея сканирования электронных микроскопов была предложена М. Кноллом еще в 1935 г., а первая действующая установка данного типа была создана М. фон Арденне в 1936 г., т.е. практически одновременно с ПЭМ). Несмотря на это, по разным техническим причинам именно ПЭМ стали основным направлением развития электронных микроскопов.

Интерес к сканирующей электронной микроскопии возродился лишь к началу 60-х годов. Метод состоит в том, что поверхность тела сканируется электронным пучком, создаваемым внешним источником под напряжением порядка нескольких десятков киловольт. Облучаемая при таком сканировании поверхность кристалла начинает излучать либо вторичные электроны, либо кванты света, которые регистрируются, усиливаются, преобразуются по интенсивности и т.п., после чего подаются на экран электронно-лучевой трубки, создавая видимое изображение поверхности.

Методы получения увеличенного изображения в сканирующих электронных микроскопах значительно отличаются от методов, используемых в оптической и просвечивающей электронной микроскопии. Как показано на рис. 5, при облучении поверхности узким электронным пучком происходит эмиссия вторичных электронов. Сканируя изучаемую поверхность тонким, но достаточно интенсивным пучком электронов, и подавая сигналы от детектора вторичных электронов на осциллограф, можно получать на экране увеличенное изображение поверхности. При этом необходимо согласовывать скорость сканирования поверхности и скорость сканирования экрана осциллографа. Облучающий пучок электронов создается электронной пушкой, после чего проходит последовательно управляющую линзу-конденсатор, отклоняющую катушку, линзу-объектив и создает на поверхности образца небольшое освещенное пятно, размеры которого можно регулировать управляющей системой. При этом возникают вторичные и отраженные электроны, число которых зависит от

интересующих нас характеристик поверхности (шероховатость, атомный состав, электрический потенциал освещаемого участка кристалла и т.п.). Замеряя и анализируя интенсивность таких электронов, можно получить на мониторе увеличенную картину конкретного участка поверхности и перевести его в фотографическое изображение. Аналогично для просвечивающих электронных микроскопов, внутри СЭМ тоже необходимо поддерживать высокий вакуум.

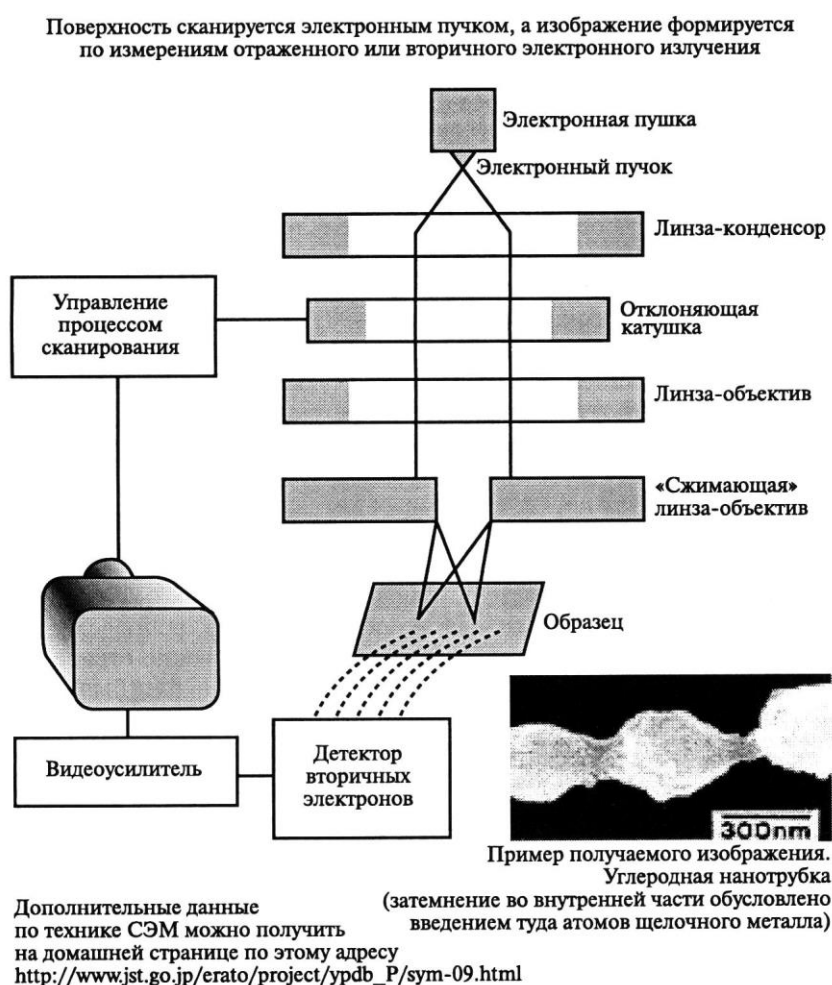


Рис. 5 – Принципы работы сканирующего электронного микроскопа

Хотя развитие техники сканирующих электронных микроскопов долгое время отставало от развития просвечивающих, за последние годы техника СЭМ достигла высоких результатов. Были созданы новые типы специализированных СЭМ (высокого разрешения для исследования

полупроводников, с повышенной точностью контроля длины волны и т.д.), а их разрешающая способность уже достигла 0,5 нм. Примером возможностей современных СЭМ может служить приведенная в правой нижней части рис. 5 микрофотография углеродной нанотрубки.

2.3 Сканирующие зондовые микроскопы

Существует много типов устройств, называемых сканирующими зондовыми микроскопами, среди которых стоит отметить сканирующий туннельный микроскоп (СТМ), атомарно-силовой микроскоп (АСМ), сканирующий оптический микроскоп ближнего поля (СОМБП) и т.п. Характерной особенностью этих микроскопов является то, что они сканируют поверхность исследуемого образца при помощи зонда или щупа в виде крошечной металлической иголки (рис. 6). Такие микроскопы обладают повышенной разрешающей способностью (по сравнению с обычными электронными микроскопами) по отношению к вертикальной координате изучаемого объекта. В частности, они могут создавать изображение профиля поверхности твердого тела с точностью до размеров отдельного атома или молекулы. Например, уже самый первый сканирующий туннельный микроскоп, созданный в 1981 г. сотрудниками лаборатории фирмы ИБМ (IBM) в Цюрихе (Швейцария) позволил фиксировать положения конкретных атомов. В таких микроскопах атомарная структура изучается за счет регистрации туннельного тока, протекающего между зондом и изучаемым участком поверхности. Величина туннельного тока определяется структурными особенностями этой поверхности, имеющими атомарные размеры, вследствие чего по изменениям туннельного тока при сканировании можно воссоздать соответствующее изображение.

Поскольку в этом методе измеряется электрический ток, его можно применить только для исследования электропроводящих материалов и поверхностей, что существенно ограничивает возможности исследований.

Однако уже в 1986 г. была разработана конструкция атомарно-силового микроскопа (АСМ), который позволяет получать изображения и материалов-изоляторов. В АСМ измеряются силы взаимодействия между атомами зонда и атомами поверхности (радиус действия этих сил также соответствует атомарной точности). Дальнейшим развитием идеи СЗМ стали сканирующие оптические микроскопы ближнего поля.

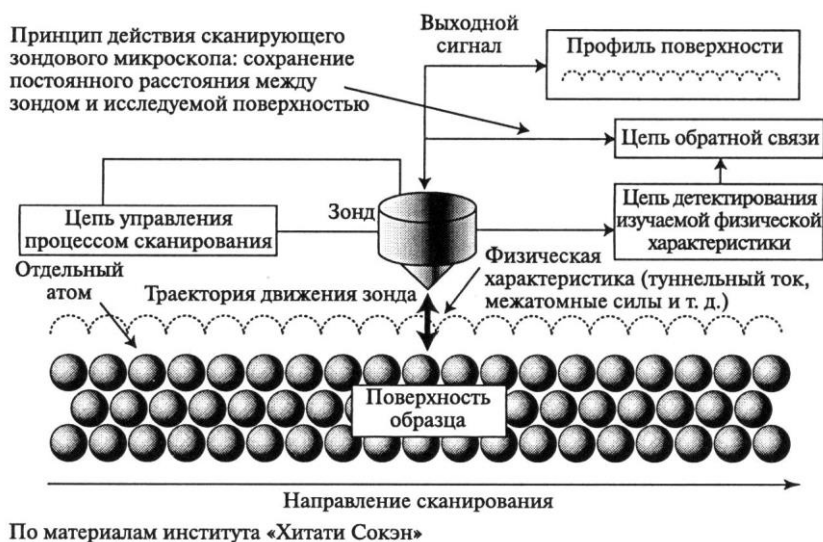


Рис. 6 – Принципы работы сканирующего зондового микроскопа

Сканирующие зондовые микроскопы могут использоваться не только для изучения поверхностей с атомарной точностью, но и для работы в других режимах (например, для измерения электрического или магнитного полей, распределения электростатического потенциала поверхности и т.п.). Их применение уже стимулировало значительный прогресс в исследованиях разнообразных полупроводниковых, металлических и биологических материалов. Помимо этого, в последнее время технику СЗМ стали использовать и для гораздо более важных целей, а именно, для сверхточной обработки поверхностей материалов и для целенаправленной манипуляции отдельными атомами и молекулами. Это открывает исключительно заманчивые перспективы и в научных, и в технологических исследованиях (совершенно новые возможности обработки вещества, модификация свойств поверхности, повышение точности обработки и многое другое).

2.4 Принцип работы сканирующего туннельного микроскопа

Самый первый сканирующий туннельный микроскоп был создан в Цюрихе сотрудниками лаборатории фирмы ИБМ (IBM) Г. Бинингом и Г. Рорером. Принцип его действия основан на «туннельном эффекте», позволяющим наблюдать и даже контролировать положение отдельных атомов, то есть работать с точностью до нескольких ангстрем ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$), которая на сегодняшний день является максимальной для всех существующих научных и технических методов.

Главным элементом сканирующих туннельных микроскопов выступает очень тонкий металлический зонд (щуп или просто игла),двигающийся вдоль поверхности. Между зондом и поверхностью приложено электрическое напряжение, в результате чего возникает туннельный ток, величина которого позволяет фиксировать неоднородности или иные особенности исследуемой поверхности. При этом зонд должен находиться на расстоянии 1 мкм (10^{-6} м) от образца, что является условием возникновения и поддержания туннельного тока (при более малых расстояниях возникает сильный электрический ток обычного типа, а при больших – туннельный ток становится исчезающе малым). Положение зонда определяется некоторым фиксированным значением туннельного тока. В процессе сканирования зондом (аналогично лучу в электронной трубке телевизора) получается высокоточная картина состояния поверхности. При идеальной остроте зонда (когда на его острие будет находиться только один атом) точность описания будет соответствовать отдельным атомам. Небольшие изменения величины туннельного тока могут означать, например, изменения ориентации атома на поверхности и т.п.

В реальных установках нет возможности использовать столь тонкие, атомарные зонды, применяются пьезоэлементы из специальной керамики, в которой изменения приложенного электрического напряжения вызывают механическое сжатие. Такие пьезоэлементы уже широко применяются и в

бытовой технике, когда необходимо перевести электрические сигналы в механические колебания (например, для подачи звуковых сигналов в электронных часах и других устройствах). Технические проблемы работы с СТМ обусловлены тем, что движение зонда вдоль поверхности должно регистрироваться и контролироваться с исключительно высокой, атомарной точностью.

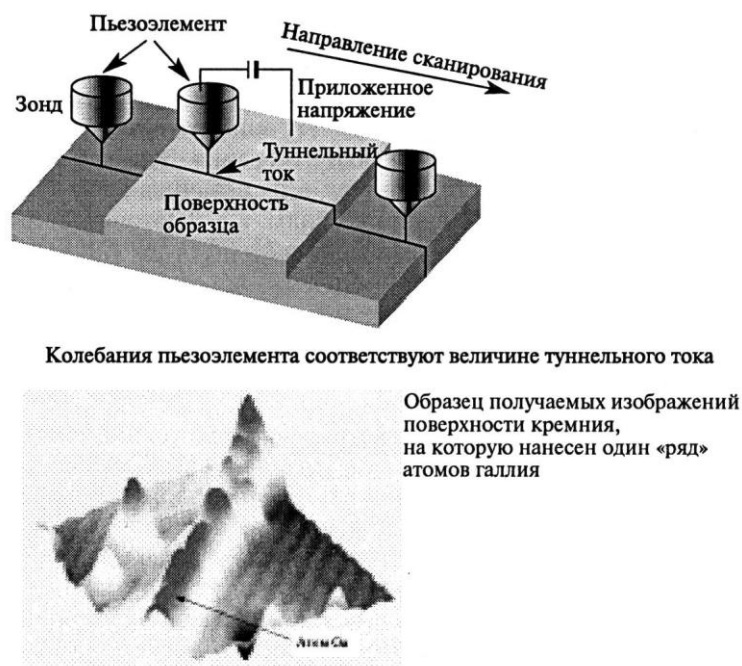


Рис. 7 – Принципы работы сканирующего туннельного микроскопа

На рис. 7 проведена принципиальная схема работы сканирующего туннельного микроскопа и пример получаемых при этом СТМ-изображений поверхности. Изображение соответствует поверхности кристаллического кремния, на которую нанесен один слой атомов галлия.

2.5 Работа атомно-силового микроскопа

Как уже отмечалось, сканирующие туннельные микроскопы могут применяться только для изучения поверхности проводников. Этот существенный недостаток методики стимулировал дальнейшие разработки, в результате чего уже в 1986 г. одновременно в двух исследовательских центрах: в цюрихской лаборатории фирмы ИБМ и в Стэнфордском

университете в США был создан новый тип электронного микроскопа, позволяющий изучать поверхность изоляторов. В этом устройстве, получившем название атомарно-силового микроскопа (АСМ), используются измерения межатомных сил. В АСМ зонд прикреплен к концу плоской пружины (кронштейна) и его положение определяется величиной межатомных сил, возникающих между острием зонда и атомами поверхности. Таким образом, в этом приборе измеряемой физической величиной выступают непосредственно силы взаимодействия между атомами, величина которых определяется шероховатостью конкретного участка поверхности в точке измерения. Эти силы являются отталкивающими по характеру, а их величина может быть выражена в привычных единицах силы – ньютонах (в абсолютном значении эти силы соответствуют наноньютонам, нН). В остальном принцип действия атомарно-силового микроскопа остается прежним: поверхность сканируется зондом с тщательной регистрацией положения и контролем расстояния между зондом и образцом, после чего полученная информация переводится в изображение.

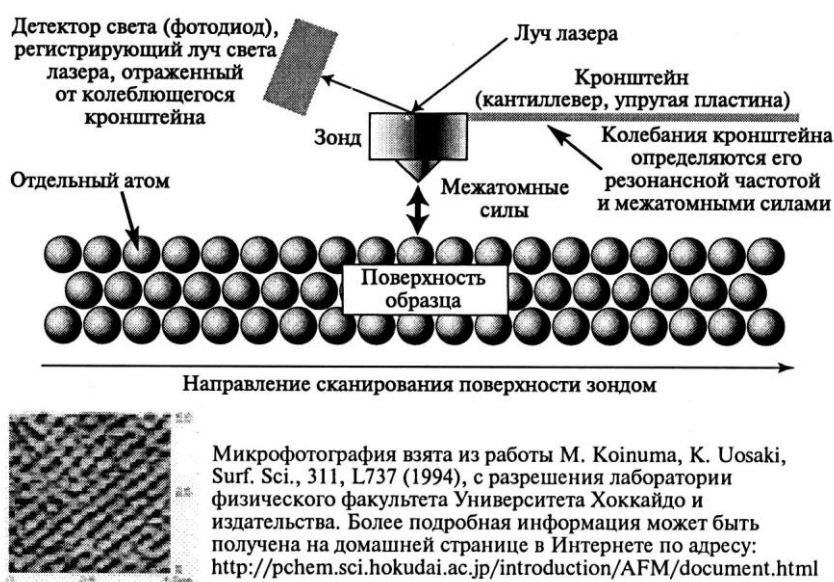


Рис. 8 – Принципы работы атомно-силового микроскопа

Величина межатомных сил, возникающих между острием зонда и атомами конкретного участка шероховатой поверхности, соответствует степени изгиба пластины-кронштейна, которую можно измерить с высокой

точностью, регистрируя отраженный пластиной лазерный луч при помощи обычного оптического детектора (фотодиод), как показано на рис. 8.

АСМ позволяет получать изображение поверхности с очень высокой точностью (вплоть до ангстремов), превышающей точность сканирующих туннельных микроскопов. Это объясняется тем, что в АСМ нет ограничений на близость острия зонда к исследуемой поверхности, так как АСМ применяют для изучения материалов-диэлектриков, в которых токи не возникают. Изобретение АСМ стало очень важной вехой в изучении атомарной структуры непроводящих материалов вообще. Кроме того, точность АСМ может быть повышена за счет улучшения характеристик материала кронштейна. Возникающие в кронштейне слабые упругие напряжения регистрируются с достаточно высокой точностью (около 1 нН), что соответствует атомарному уровню разрешения для структуры. Информация о поверхности проводящих материалов, получаемая с помощью АСМ, может рассматриваться как дополнительная по отношению к результатам измерений сканирующим зондовым микроскопом, что создает дополнительные возможности для анализа и сравнения данных. В последнее время АСМ стали применять в экспериментах по измерению некоторых других характеристик поверхности (например, магнитных или электростатических сил, а также адсорбционных и иных параметров). В нижней части рис. 8 показано АСМ-изображение поверхности электрода, изготовленного из арсенида галлия (GaAs). Расстояние между атомами в решетке составляет около 0,4 нм, что вполне достаточно для их индивидуальной идентификации.

2.6 Принцип работы сканирующего оптического микроскопа ближнего поля (СОМБП)

История развития сканирующих оптических микроскопов ближнего поля (и связанных с ними сканирующих зондовых микроскопов) является достаточно длительной, поскольку теоретически основной принцип их

действия был разработан еще в 1928 г. Первые конструкции устройств таких типов были предложены в 1956 г., однако из-за технических сложностей (связанных, главным образом, с использованием микроволновой техники с длинами волн около 3 см) первые практические испытания и эксперименты по методике ближнего поля были проведены лишь в 1972 г.

С 1981 г. фактически началась эпоха бурного развития зондовых электронных микроскопов (СТМ, АСМ, СЗМ), что еще на какое-то время отвлекло внимание от оптических микроскопов ближнего поля и задержало их развитие, однако позднее, в начале 90-х г. интерес к СОМБП возродился, что можно связать с заметным прогрессом в технике изготовления и обработки оптических волокон. В 1992 г. на СОМБП была получена пространственная разрешающая способность в $1/40$ от длины волны падающего света, и в настоящее время, применяя для заострения концов оптических волокон сложную технику травления, эту величину можно довести до 20 нм.

В СЗМ поверхность образца сканируется зондом (по аналогии с калькированием). Уже отмечалось, что такое сканирование нельзя осуществить оптическими микроскопами, поскольку разрешающая способность последних ограничена длиной волны видимого света (дифракционный предел) и не может быть выше нескольких сотен нм.

Принцип работы СОМБП связан с тем, что на очень близких расстояниях от поверхности зеркала (то есть на расстояниях много меньших длины волны падающего света) в области ближнего поля возникают «постоянно рождающиеся» (*ever nascent*) волны, обусловленные полным отражением света от облучаемой поверхности.

Интенсивность такого излучения ближнего поля резко падает с увеличением расстояния от поверхности, однако длина его волны при этом не изменяется. Такое излучение можно рассматривать в качестве независимого отраженного луча, пользуясь обычными приемами (например, при помощи собирающей линзы и фотоэлектронного умножителя). Метод

позволяет сканировать поверхность образца, аналогично туннельному и атомарно-силовому микроскопу, а его разрешающая способность при этом соответствует длинам «порождаемых» волн. СОМБП позволяет получать оптическую информацию о строении поверхности образца в нанометровом масштабе и поэтому представляется весьма перспективным для исследований и применения в области оптических запоминающих устройств со сверхвысокой плотностью записи, а также для технологий оптической микрообработки поверхностей. На рис. 9 представлена СОМБП-фотография, иллюстрирующая формирование 1 бита информации за счет фазовых переходов в записывающей среде.



Рис. 9 – Принцип работы сканирующего оптического микроскопа ближнего поля

Вопросы для самоконтроля

1. Принципы работы просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ).
2. Сканирующие электронные микроскопы.
3. Сканирующие зондовые микроскопы.
4. Принцип работы сканирующего туннельного микроскопа.
5. Работа атомно-силового микроскопа
6. Принцип работы сканирующего оптического микроскопа ближнего поля (СОМБП).

3 Инструменты для создания наноструктур

3.1 Наноскопическая литография

Литография (от греч. *litos* – камень и *grapho* – пишу) – способ печатания, при котором рисунок наносят на плоскую поверхность специального камня (известняка) жирным веществом, а пробельные участки увлажняют и делают таким образом невосприимчивыми к краске.

Многие разновидности мелкомасштабной литографии работают примерно по описанной схеме. В общих методах, используемых для создания современных компьютерных чипов, обычно применяется оптическая или рентгеновская литография, в которой маска делается химическими методами, а затем свет, проходя сквозь эту маску, создает нужную структуру чипа. Чтобы понять это, можно провести аналогию с шелкотрафаретом для футболки.

Наноскопическая литография в действительности не может использовать видимый свет, поскольку длина волны видимого света составляет всего 400 нм, поэтому структуры, имеющие меньший размер, трудно получить непосредственно этим методом. Это одна из причин того, что применение закона Мура в наном мире требует совершенно новых методов подготовки.

Закон Мура – объем пространства, необходимый для установки транзистора на чип, сокращается вдвое примерно каждые 18 месяцев.

Существует несколько методов получения мелкомасштабных литографий, например, импринт-литография. Этот метод работает также как резиновая печать, которую можно увидеть в канцелярии. На резиновой (в данном случае используется резиноподобный кремниевый-кислородный полимер) поверхности вырезается узор, а затем поверхность «резинки» покрывается молекулярными чернилами, после чего можно получить отпечаток, например, на бумаге. Так, мелкомасштабные печати используются на металле, полимере, керамике и др. Мелкомасштабная печать сложнее, но намного дешевле, и ее можно использовать для получения множества копий.

Изначально печати работали в микронном масштабе, но недавние достижения принесли эту технологию в наномир.

3.2 Перьевая нанолитография

Один способ построения произвольных структур на поверхностях – это записать их точно так же, как записываются чернильные линии с помощью перьевой ручки. Чтобы сделать такие линии в наномасштабе, необходимо иметь наноручку. Зонды атомного микроскопа являются идеальными наноручками. В честь перьевых ручек данный метод в наномире был назван перьевой нанолитографией (*dip pen nanolithography DPN*). Принцип перьевой нанолитографии иллюстрируется на рис. 10. В перьевой нанолитографии резервуар «чернил» (атомов или молекул) хранится на кончике сканирующего зонда, который передвигается по поверхности, оставляя за собой линии и узоры.

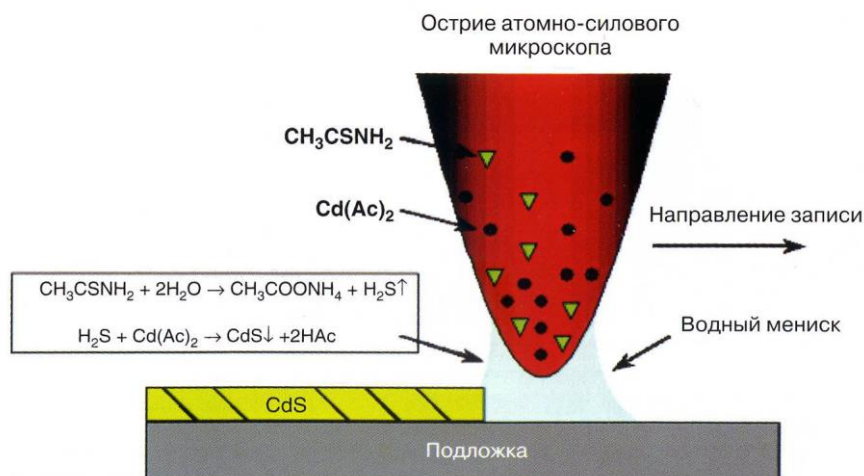


Рис. 10 – Принцип нанолитографии в применении к нанесению наноструктур CdS на поверхности слюды и SiO₂

Перьевая нанолитография, разработанная Ч. Миркиным и его сотрудниками в Нортвестернском университете, имеет несколько преимуществ, важнейшими из которых являются такие: в качестве наночернил можно использовать почти все, что угодно, а писать можно практически на любой поверхности. Кроме того, перьевую нанолитографию

можно использовать для получения практически любой структуры с произвольной детализацией или сложностью, поскольку щупами АФМ относительно легко манипулировать. Данный факт делает перьевую нанолитографию предпочтительной техникой при создании новых и сложных структур в небольших объемах. Недостаток процесса – он очень медленный, в отличие от импринт-литографии. Это похоже на разницу между ручными иллюстрациями и ранней полиграфией. Чтобы улучшить такое положение дел, проводятся различные исследования, которыми, в основном, занимается развивающаяся компания Наноинк (*NanoInk*).

3.3 Электронно-лучевая литография

Уже говорилось, что современная промышленная литография с помощью света ограничивается созданием элементов, не превышающих используемую длину волны. Несмотря на то, что данное ограничение можно в принципе обойти, используя свет с меньшей длиной волны, подобное решение может привести только к проблемам. Свет с меньшей длиной волны имеет большую энергию, так что могут возникнуть неприятные побочные эффекты, такие как сдувание элемента, который пытаются создать непосредственно с поверхности (как поливать цветы из пожарного шланга).

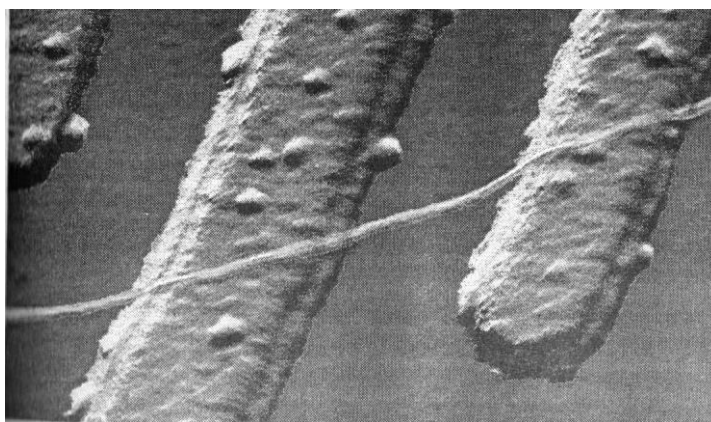


Рис. 11 – Два электрода, полученные с использованием электронно-лучевой литографии. Светлая горизонтальная структура – углеродная нанотрубка

Альтернативой является использование электронов вместо света. Данная электронно-лучевая литография может применяться для создания структур в наномасштабе. На рис. 11 показано два электрода, сделанных с использованием электронно-лучевой литографии для спрямления платиновых нанопроводов. Структура, пересекающая наноскопические электроды – это одна молекула, углеродная нанотрубка.

Электронно-лучевая литография также применяется в современном производстве микроэлектроники и является подходом, который мог бы позволить выполнять закон Мура, пока наноскопические свойства не займут соответствующее место.

3.4 Молекулярный синтез

Производство молекул с конкретными молекулярными структурами является одной из наиболее активных и удивительных отраслей химии. Молекулярный синтез включает создание специфических молекул для специальных либо для чисто научных целей, либо для целей специальных приложений. Значительная работа по молекулярному синтезу выполняется в фармакологических компаниях и многие современные лекарства, включая *пенициллин*, *липитор*, *таксол* и *виагру*, являются продуктами сложного органического синтеза.

Производство наноструктур с заданной геометрией в определенных местах поверхности означает следующий шаг к формированию молекул. Помимо получения наноструктур с конкретными химическими свойствами и создания молекул наноскопический синтез должен также включать вопросы физических свойств при построении наноструктур. Например, некоторые технологии доставки медикаментов включают получение активных элементов от лекарств и упаковку их в наноскопические оболочки, что позволяет проходить им в те участки тела, куда они не могли проникнуть раньше. Чтобы это сделать, лекарство должно вводиться в молекулярную

оболочку и здесь есть только физическое взаимодействие между двумя указанными элементами без химической связи.

Все техники, включающие манипуляции отдельными атомами, слишком медленные, громоздкие, особенно если нужно создать массивный материал или даже достаточное количество инкапсулированного лекарства для лечения человека.

3.5 Самосборка

Проблема большинства технологий при сборке наноструктур заключается в том, что они очень напоминают ручную работу. В любом случае необходимо пытаться реализовать наши желания на данных очень маленьких объектах манипулировать ими и настраивать их так, как нам того хочется. Было бы замечательно, если бы было можно смешать реагенты и получить наноструктуры, просто позволив молекулам рассортировать самих себя.

Метод реализации именно такого сценария называется самосборкой. Принцип самосборки состоит в том, что молекулы всегда стремятся перейти на самый нижний из доступных для них уровней энергии. Если этого можно добиться, соединившись с другими молекулами, молекулы соединятся. Если поможет переориентация их физических положений, молекулы переориентируются.

Для молекулы это означает, что она пытается минимизировать другие типы энергии. Согласно закону Кулона, это чаще всего силы, определяемые взаимодействием зарядов. Методы самосборки основываются на идее создания таких компонентов, которые подобно стрелке компаса, естественно организуют себя так, как требуется нам.

Силы, задействованные в самосборке, обычно слабее связывающих сил, удерживающих молекулы вместе. Это слабые взаимодействия кулоновского типа, которые повсеместно проявляются в природе. Например, водородная

связь, которая связывает водород одной молекулы жидкой воды с атомом кислорода другой и не дает молекулам стать водяным паром при комнатной температуре. Водородные связи также помогают удерживать белки в определенной трехмерной структуре, что необходимо для выполнения их биологической функции.

Существуют и другие слабые взаимодействия, включая гидрофобные, позволяющие маслу (нефти) разливаться на поверхности воды. Мультиполярные взаимодействия возникают между структурами, каждая из которых не имеет полного заряда (так что это не похоже на электронное взаимодействие с другими электронами, которое является сильным кулоновским взаимодействием). Такие обычно слабые мультиполярные взаимодействия достаточно сильны для того, чтобы создавать очень сложные структуры.

При самосборке наноконструктор вводит определенные атомы и молекулы на поверхность или на ранее собранную наноструктуру, затем молекулы выравнивают себя в определенных положениях, иногда формируя слабые связи, а иногда – сильные ковалентные связи, минимизируя общую энергию.

Большим преимуществом самосборки является возможность подготовки больших структур без необходимости настраивать отдельные наноструктуры (что приходится делать при построении нанообъектов с помощью атомного микроскопа, сканирующего микроскопа и перьевой литографии). Самосборка почти наверняка станет предпочтительным методом создания больших наноструктурных массивов, таких как компьютерные запоминающие устройства и логические схемы, которые должны возникнуть, если закон Мура будет выполняться на протяжении следующего десятилетия.

Самосборка не ограничивается сферой электроники. Самособирающиеся структуры можно использовать для таких прикладных отраслей, как защита поверхности от коррозии или придание поверхности таких свойств, как скользкость, липкость, влажность и сухость.

Самосборка – это самая важная из всех технологий нанопроизводства из-за ее универсальности, способности производить структуры на различных масштабах длины и низкой стоимости.

3.6 Наноскопическое выращивание кристаллов

Другой разновидностью самосборки является выращивание кристаллов. Кристаллы, подобные солям и состоящие из ионов, называются ионными. Кристаллы, состоящие из атомов, называются атомными, а из молекул – молекулярными. Таким образом, хлорид натрия (NaCl) – это ионный кристалл, а сахароза ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) – это молекулярный кристалл.

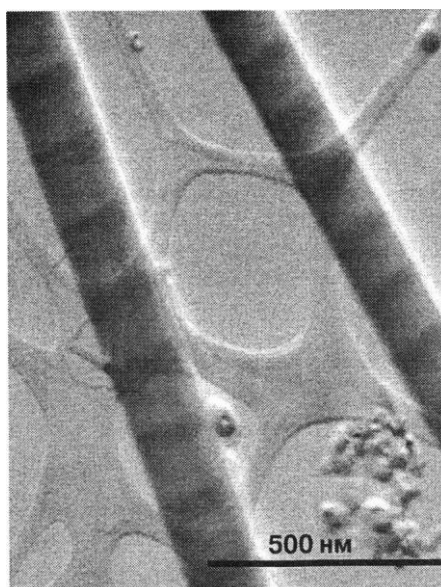


Рис. 12 – Два параллельных нанопровода. Светлый цвет – кремний, темный – кремний/германий

Выращивание кристаллов – это частично наука, частично искусство. Кристаллы можно выращивать из раствора, используя кристаллы-зародыши, путем введения небольшого кристалла (затравки) в среду, где имеются компоненты этого материала (обычно это раствор), после чего происходит контролируемый рост более крупного монокристалла. Кремниевые блоки, используемые для создания микрочипов, создаются, или «выращиваются», именно таким образом.

Разумно выбирая кристаллы-зародыши и условия роста, можно сделать так, чтобы кристаллы имели необычные формы. Ч. Либер с сотрудниками в Гарвардском университете использовали наноразмерные кристаллы для выращивания длинных, стержнеподобных кристаллов углеродных нанотрубок, таких структур, как фосфид иридия или арсенид галлия, и таких атомных кристаллов, как кремний. Данные нанопровода (один представлен на рис. 12) имеют поразительные проводящие свойства, а также используются во многих областях оптики и электроники.

3.7 Полимеризация

Полимеризация является широко используемой схемой для получения наноразмерных материалов и даже более крупных, например, действие эпоксидного клея заключается в создании длинноцепочечных полимеров при смешивании двух компонентов эпоксидной смолы.

Обычно такие промышленные полимеры, как полистирол, полиэтилен или поливинилхлорид, получают построением очень больших молекул с различными структурами, идущими последовательно. Управляемая полимеризация, в которой один мономер последовательно соединяется с другим, очень важна для построения специфических заданных структур.

Построение цепочек ДНК важно по многим соображениям. В современной биотехнологии данные цепочки используются для создания новых биологических структур (лекарственные препараты, биосовместимые материалы, белки), основанных на способности бактерий воспроизводить себя. Синтезированные шаблоны ДНК вводятся в ДНК бактерии, и бактерия затем производит множество копий данного белка. Модификация ДНК бактерии производится с использованием ряда химических превращений. Генные машины подготавливают специфические короткие олигонуклеотиды для модификации ДНК бактерии, продолжая этот процесс для создания выбранного белка. Это позволяет эффективно строить белковые фабрики для

получения практически любого выбранного протеина. Пример того, как это можно использовать - получение белка инсулина для лечения диабета.

Комбинация конкретных коротких цепочек ДНК и самосборка широко используются для получения материалов, в которых единственная цепочка ДНК связывается с другой цепочкой ДНК. Данный процесс, называемый скрещиванием, показан на рис. 13.

Основание ДНК *A* всегда образует пару с *T*, а *G* – с *C*. На рис. 13 идеальное соответствие слева дает более плотную, более сильную связь, чем неидеально согласованный набор. Данный тип самосборки является подарком природы – именно так ДНК дублируется, что позволяет клеткам делиться. Многие разновидности данного дополнительного молекулярного распознавания используются в нанонауке.

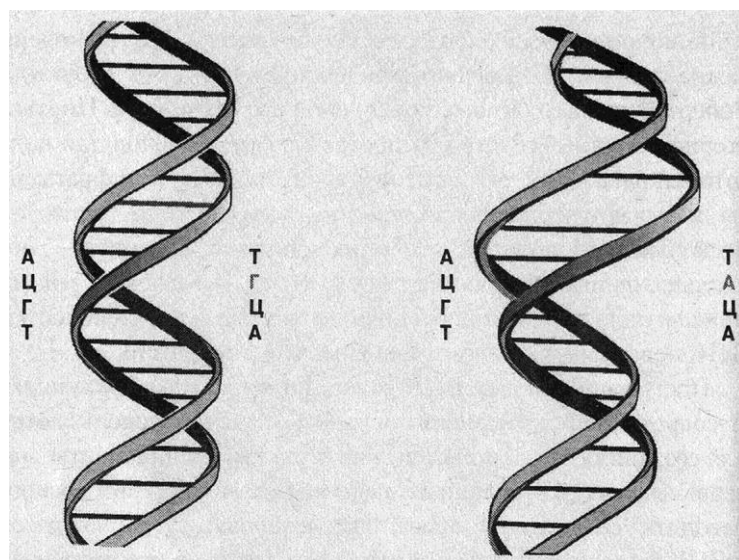


Рис. 13 – Схема процесса скрещивания ДНК. Слева показано, как цепочка ДНК правильно связывается со своим дополнением, а справа – как из-за ошибки не может возникнуть связь

3.8 Нанокирпичики и строительные блоки

Наноструктуры должны собираться из компонентов. Фундаментальными составляющими являются атомы 91 встречающегося в природе элемента. Но начинать с отдельных атомов неэффективно. Преимущества и недостатки этого подхода раскрываются при построении

наноструктур атомного масштаба с использованием сканирующих микроскопов, особенно, если пытаться создать микроскопический объем материала, а не построить единую наноскопическую машину. Р. Смэлли – лауреат Нобелевской премии 1996 г. за работу с наноструктурами, оценил, что наномашине потребуется 19 миллионов лет, чтобы получить несколько десятков граммов материала, составляя его атом за атомом, поскольку число атомов в подобной структуре составляет число с 23 нулями. Если бы размер одного атома был равен по объему чайной ложке воды, такое число атомов было бы сравнимо по размерам с Тихим океаном.

Исключительно важной особенностью наноматериалов состоит в возможности очень плавного изменения их фундаментальных свойств (например, намагниченности, оптических свойств, в частности, окраски, точки плавления – см.рис. 14, твердости и т.д.) по отношению к объемным материалам того же химического состава. В то время как изменения объемных свойств, например, точки плавления и жесткости, связано с поверхностным взаимодействием наночастиц, зависимость электронных свойств от размера возникает за счет квантовых эффектов.

Обычно наноструктуры строятся, начиная с больших компоновочных блоков или молекул. Иногда эти части – обычные небольшие молекулы. Слабое взаимодействие тиольной группы с поверхностью золота часто используется для построения вязких клейких или обычных пленкообразных длинных молекул, связанных через атом серы с поверхностью золота. Данные молекулы называются алкантиолами. Алкильная часть представляет собой длинную углеродную цепочку, тиольная группа связывается (самособирается) на поверхности золота с формированием монослоя. Монослой может иметь нанометровую толщину и значительные длину и ширину. Он построен не из отдельных атомов, а из молекул на поверхности золота.

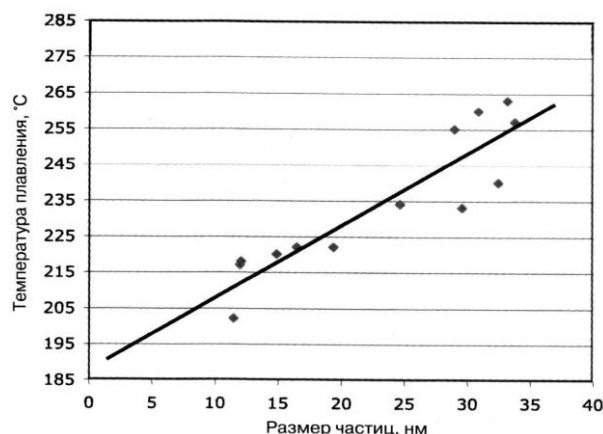


Рис. 14 – Снижение температуры плавления золота как функция диаметра наночастиц. Точка плавления объемного золота составляет 1064 °C

Помимо отдельных молекул того типа, что повсеместно используются в традиционных химических лабораториях, для сборки наноструктур используются некоторые совсем новые полумолекулярные строительные блоки. Двумя такими наноструктурами являются углеродные нанотрубки (впервые полученные С. Идзсимой в Токио) (рис. 15) и наностержни, которые можно сделать из кремния, других полупроводников, металлов или даже диэлектриков. Данные наностержни производятся с использованием нестандартных методов химии растворов, но затем они могут самособираться в большие наноразмерные структуры.

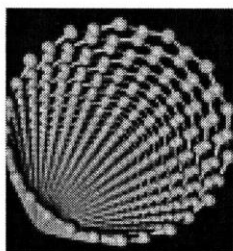
Открытие углеродных нанотрубок профессором Сумио Идзсима —
важное событие в истории мировой науки!

Научные задачи

Модификация полупроводников
Получение материалов с высоким магнитным сопротивлением
Возможность адсорбции и удержания водорода
Изменение проводимости металлов
Получение и организация производства полупроводников, водород-удерживающих материалов и т. п. для конкретных изделий (электроника, топливные элементы и т. д.)

Технические проблемы

Изготовление однослойных углеродных нанотрубок
Организация крупномасштабного промышленного производства



Модельная структура углеродной нанотрубки
Фотография предоставлена фирмой
«Нихон дэнки кабусики кайся»

Рис. 15 – Углеродные нанотрубки

Известны два основных типа первичных наноразмерных строительных блоков, которые составляют основу материалов и устройств:

- нульмерные (0Д – наночастицы, нанокластеры, нанокристаллы);
- одномерные (1Д – нанотрубки, нановолокно, нанопроволока).

Непосредственное введение этих нанодеталей в существующие материалы для улучшения их свойств часто называется инкрементальной нанотехнологией. Однако самосборка наноразмерных строительных блоков в двух-трехмерные структуры может привести к совершенно новым устройствам и функциональным возможностям, и носит название эволюционной нанотехнологии.

Вопросы для самоконтроля

1. Наноскопическая литография.
2. Перьевая нанолитография.
3. Электронно-лучевая литография.
4. Молекулярный синтез.
6. Наноскопическое выращивание кристаллов.
7. Полимеризация.
8. Нанокирпичики и строительные блоки.

4 Нульмерные наноматериалы

Нульмерные структуры – это простейшие типы строительных блоков, их диаметр составляет менее 100 нм.

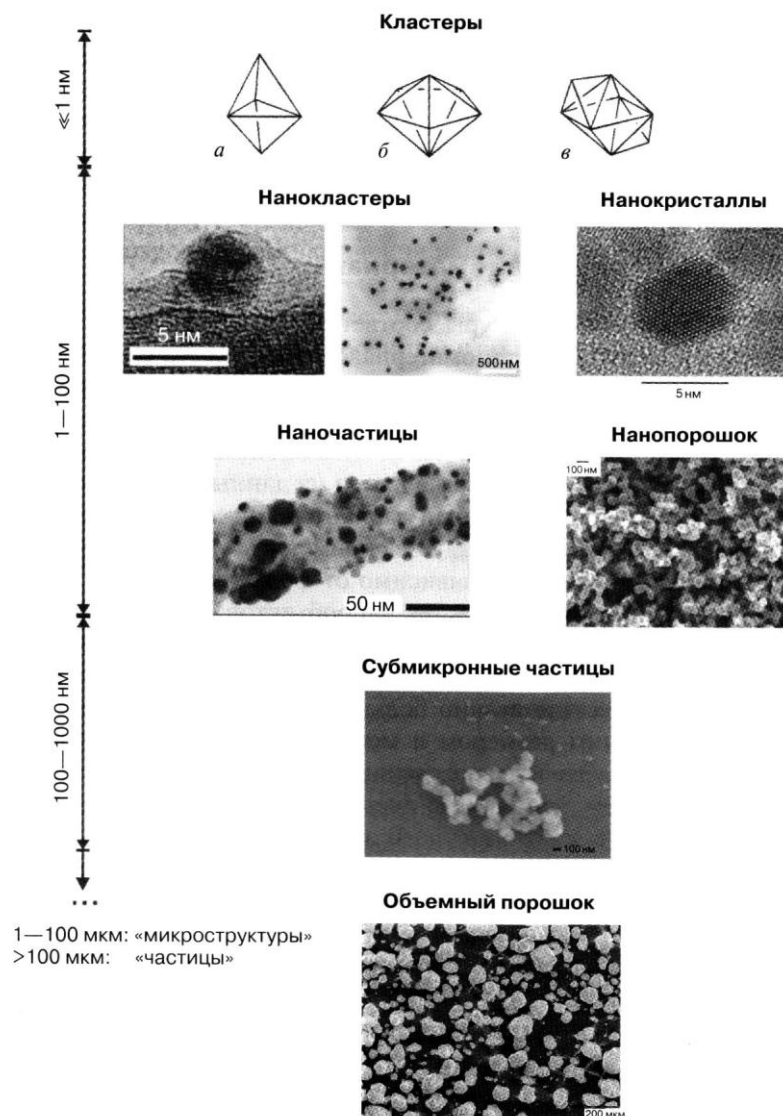


Рис. 16 – Номенклатура нульмерных наноструктур. Показаны клеточные молекулы молекулярных *кластеров* с точно определенным размером: *а* – $[\text{Os}_5(\text{CO})_{60}]$; *б* – $[\text{Os}_5(\text{CO})_{18}]$; *в* – $-\text{Os}_5(\text{CO})_{22}]^{2-}$. Напротив, термин *нанокластер* следует применять к нульмерным структурам с гомогенным распределением по размеру. *Наночастицы* обладают большим разнообразием размеров и форм. *Нанокристаллы* обладают четкой упорядоченной структурой, как показано на примере индивидуального нанокристалла CdSe. В отличие от нанокристаллов, *нанопорошок* состоит из наноразмерных аморфных частей. Диапазон размеров между нано- и макро- носит название субмикронного. Деление масштаба на фотографии объемного порошка составляет 200 мкм

Термин «наночастицы» (рис. 16) рекомендуется применять для обозначения всех нульмерных независимо от формы и размера, если он укладывается в нанодиапазон, а также нанообъектов, которые аморфны и

обладают неправильной формой (нульмерные объекты более 10 нм с дисперсией по размеру $\geq 15\%$). Для объектов с меньшим размером и меньшей дисперсией больше подходит название «нанокластеры». По аналогии с объемными материалами, агломерат некристаллических наноразмерных субъединиц следует называть «нанопорошком».

Важно знать разницу между наночастицами (нанокластерами) и традиционными коллоидами (табл. 5). Он применяется к суспензиям жидких и твердых тел (молоко, краски, масло, дым, туман и т.д.). Хотя в обоих случаях размеры частиц оказываются в нанодиапазоне, основная разница между нано- и коллоидными частицами состоит в том, что размер и состав наночастиц и нанокластеров в отличие от коллоидов можно контролировать, например, нанокластеры: $\text{Os}_5(\text{CO})_{60}$; $\text{Os}_5(\text{CO})_{18}$ и $\text{Os}_8(\text{CO})_{22}$.

Таблица 5

Сравнение нульмерных наноструктур и традиционных коллоидных систем

Наночастицы, нанокластеры	Коллоиды
Размер 1-100 нм (нанокластеры 1-10 нм)	Размер обычно превышает 10 нм
Гомогенный химический состав	Состав, как правило, определяется нечетко
Дисперсия распределения по размеру не более 15 % (для нанокластеров меньше, чем для наночастиц)	Дисперсия больше 15 %
Воспроизводимый синтез (контроль размера, формы и состава)	Низкая воспроизводимость, особенно формы и размера частиц
Воспроизводимые физические свойства и каталитическая активность	Свойства практически невозпроизводимы (например, каталитические)
Растворимы в полярных (или неполярных) растворителях (в зависимости от катализатора)	Как правило, растворимы только в полярных растворителях
Наружные поверхности не содержат сорбированных молекул	Содержат поверхностные активные группы (-ОН, -Х и т.д.)

Предложенная номенклатура относится к аморфным нульмерным наноструктурам. По аналогии с объемными материалами, любой кристаллический наноматериал следует считать нанокристаллическим. Этот термин следует относить лишь к монокристаллическим материалам, если часть его все же аморфна, уместнее, в зависимости от размеров, пользоваться термином «наночастица» или «нанокластер». Для определения

кристалличности наноматериалов используется просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), особенно в сочетании с электронной дифракцией (рис. 17).

Особым случаем нанокристаллов полупроводников являются «квантовые точки» (рис. 18). Обычно размер этих нанообъектов составляет 1-30 нм, в зависимости от состава. Квантовые точки находят применение в качестве сенсоров, а также рабочих тел лазеров и светоизлучающих устройств.

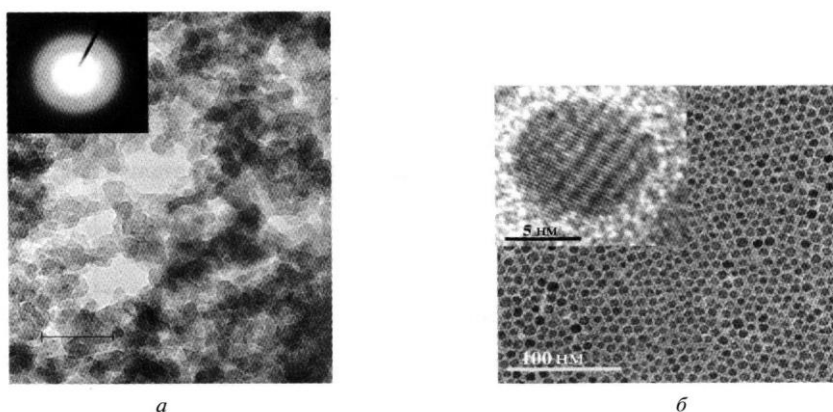


Рис. 17 – Изображения аморфных нанокластеров (а) и нанокристаллов (б) в просвечивающем электронном микроскопе. На врезке (а) – данные электронной дифракции выделенной области: отсутствие четких отражений указывает на аморфную природу. Цена деления масштаба 20 нм. На врезке (б) видны плоскости кристаллической решетки

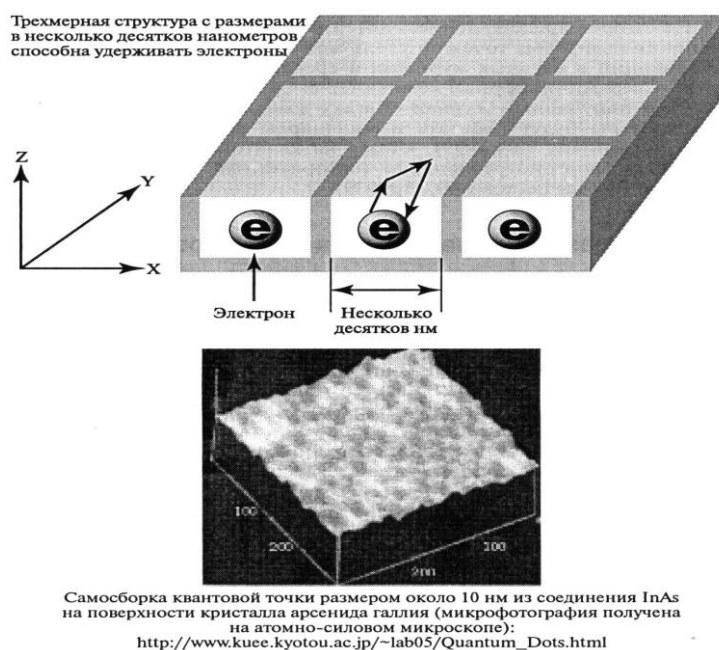


Рис. 18 – Квантовые точки

Современные диски с высокой плотностью записи (*HD-DVD*, *Blu-ray* и т.д.) можно считывать только с помощью синего луча лазера, основанного на квантовых точках. Будущее этих материалов относится к созданию оптических компьютеров и высокоэффективных солнечных батарей.

4.1 Первые сложные нульмерные структуры: фуллерены

Современная «нанотехнологическая революция» в середине 1980-х годов получила дополнительное ускорение в связи с открытием углеродных нанокластеров, названных фуллеренами (например, C_{60} , рис. 20).

За это открытие Р. Смоли, Р. Керлу и Г. Крато была присуждена Нобелевская премия по химии за 1996 г. В настоящее время фуллерены применяются как контрастные материалы (агенты) в томографии (используется внутренний объем их молекул), для точечной доставки лекарств (за счет функционализации поверхности), при создании сверхпроводников, а также светоактивируемых противобактериальных средств. Термин «фуллерен» относится к целому классу клеточных углеродных кластеров, содержащих точно 12 пятичленных циклов и переменное количество шестичленных (например, в молекуле C_{60} 20 шестичленных циклов).

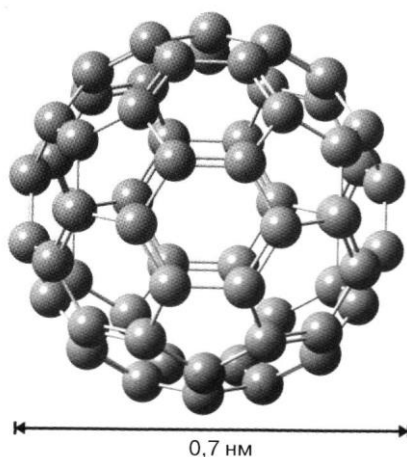


Рис. 19 – Молекулярная структура C_{60} , содержащая конденсированные пяти- и шестичленные циклы из sp^2 -гибридных атомов углерода. Это самый энергетически выгодный изомер C_{60} (общее их число составляет 1812)

Фуллерен, как и многие другие важные материалы, например, тефлон или нейлон, был получен случайно. Он образовался в экспериментах по имитации атмосферы богатых углеродом красных звезд-гигантов. В результате вновь открытый C_{60} был назван «небесной сферой, упавшей на землю».

Экспериментальная установка состояла из лазерного испарителя графитовой мишени в потоке гелия, где испаренные атомы объединялись в кластеры. Газ охлаждался за счет сверхзвукового расширения и попадал во времяпролетный масс-спектрометр (рис. 20 а). Для получения других продуктов к газу-носителю можно добавлять и реакционноспособные примеси, например, азот или водород. В настоящее время этот способ в зависимости от природы мишени и состава газового потока применяется для получения нанокластеров самых различных металлов полупроводников (например, кремния) и изоляторов (например, корунда).

Первый синтез большого количества фуллерена был проведен в 1989 г. Хаффманом и Кречмером. При этом удалось получить достаточное количество C_{60} , чтобы подтвердить его икосаэдрическую структуру.

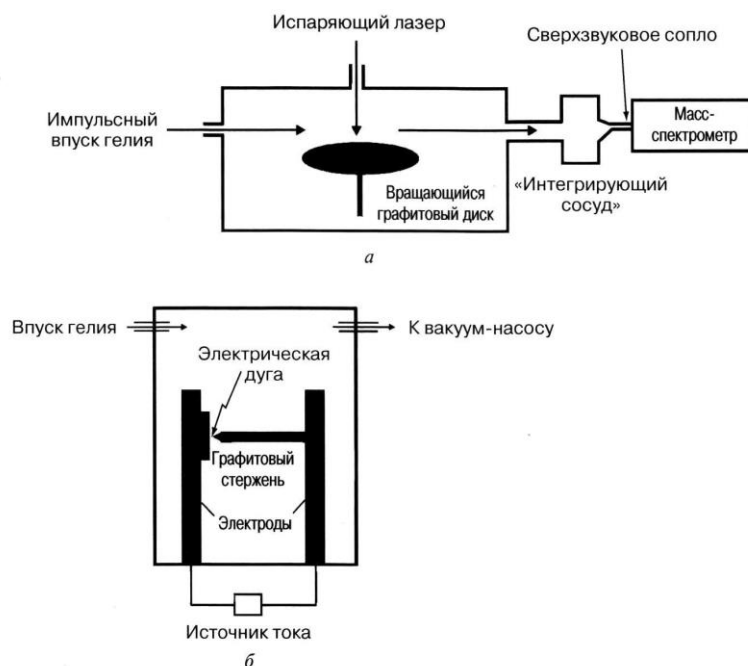


Рис. 20 – Схематическое изображение первых установок по получению фуллеренов: *а* –система ультразвукового лазерного испарения Смоли-Керла; *б* – электродуговая установка Хаффмана-Кречмера

Их метод заключается в горении электрической дуги между графитовыми электродами в атмосфере гелия под давлением около 10 МПа (100 атм.) (рис. 20 б). Позже были разработаны и другие методики, например, высокотемпературное сгорание бензола и графитово-дуговой процесс (рис. 21 [1]), что позволило упростить и удешевить процесс.

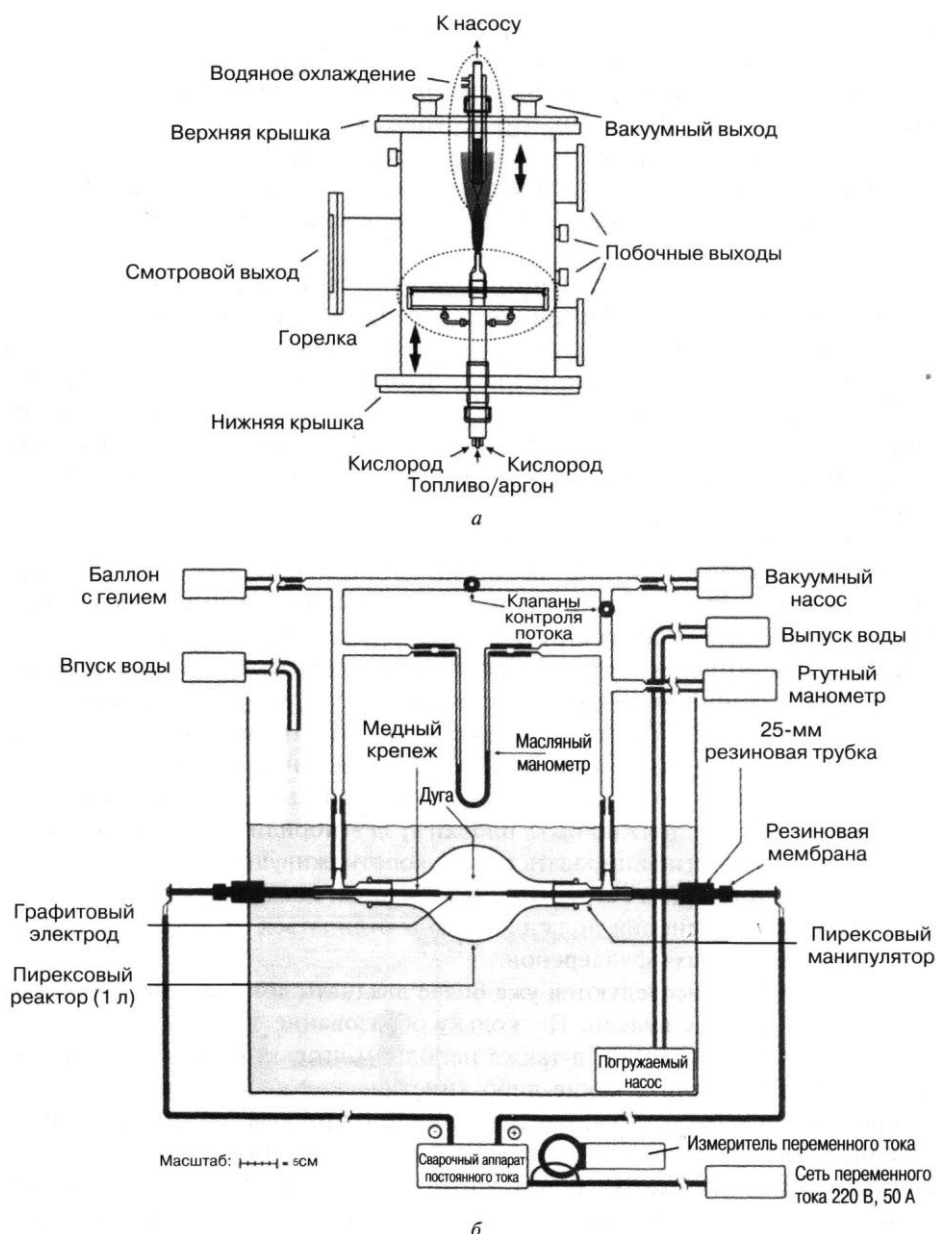


Рис. 21 – Современные реакторы для получения фуллеренов:
 а – камера низкого давления для пиролиза топлива; б – усовершенствованная система дугового испарения

C_{60} представляет собой наименьший по размеру фуллерен, подчиняющийся правилу изомерных пятичленных циклов (структуры, в

которых пятичленные циклы конденсируются только с шестичленными, энергетически более выгодны). Квантово-химические расчеты показывают, что π -связи, общие для двух шестичленных циклов, обладают высокими положительными резонансными энергиями и порядками связей, то есть ароматичностью и стабильностью. В то же время π -связи, общие для двух пятичленных циклов, обладают большими отрицательными резонансными энергиями, очень малым порядком связей и низкой стабильностью. Эта разница скорее всего связана с гораздо большей напряженностью структур с соседними пятичленными циклами. По данным расчетов неикосаэдрические структуры C_{60} (более 1800 вариантов) энергетически менее выгодны, чем основная структура, по меньшей мере, на 2 эВ.

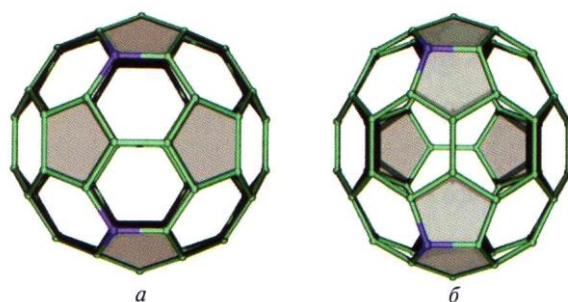


Рис. 22 – Структура $C_{58}N_2$: соответствующая (а) и нарушающая (б) правило изолированных пятичленных циклов. Структура (б) выгоднее структуры (а) на 12,5 ккал/моль

Недавно было обнаружено, что соединения, в которых сочлененные пятичленники содержат общий атом азота (например, $C_{58}N$) (рис. 22) могут оказаться устойчивее, чем C_{60} . Вероятно, напряжение спадает за счет пирамидальной конфигурации атома азота (sp^3 -гибридизация, в то время как окружение атома углерода должно быть плоским, sp^2 -гибридизация). К настоящему времени удалось идентифицировать только короткоживущие азофуллерены $C_{59}N$ и $C_{59}N_2^-$; поиск устойчивых структур продолжается, поскольку ожидаемые свойства и области применения должны сильно отличаться от того, что известно для «чисто углеродных» фуллеренов.

Хотя фуллерены исследуются уже более двадцати лет, механизм их образования и роста все еще неясен. Но выявлено, что процесс роста начинается с образования коротких линейных молекул (рис. 23). С ростом цепи молекулы замыкаются в более устойчивые циклы. Например, для молекул C_n с $n = 6$ и $n \geq 10$ (особенно $n = 10, 14, 18$ и т.д.) образуются циклические структуры, что особенно выгодно из-за ароматичности плоских циклов, содержащие $(4n+2)$ π -электронов ($n = 1, 2, 3$ – по правилу Хюккеля). При $n \geq 30$ изомерные циклы самоорганизуются в графитоподобные слои (рис. 24). Механизм «пятиугольной дорожки» предполагает образование фрагментов слоев, содержащих как пяти-, так и шестичленные циклы. Процесс роста завершается при замыкании структур с образованием молекул фуллеренов.

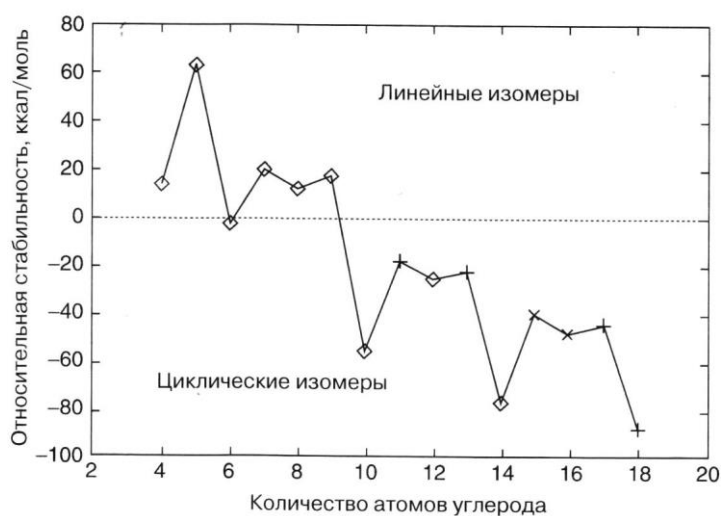


Рис. 23 – Относительная стабильность линейных кластеров углерода относительно моноциклических как функция количества атомов

Примером такого соединения является $C_{60}@C_{240}$. Символ @ означает, что молекула C_{60} находится внутри молекулы C_{240} . Известны и трехслойные фуллерены $C_{60}@C_{240}@C_{560}$. Хотя очень малые количества многослойных фуллеренов содержатся уже в саже, образованной при лазерном испарении, их выход можно увеличить при ее сублимации в вакууме при высоких температурах (около 1200°C).

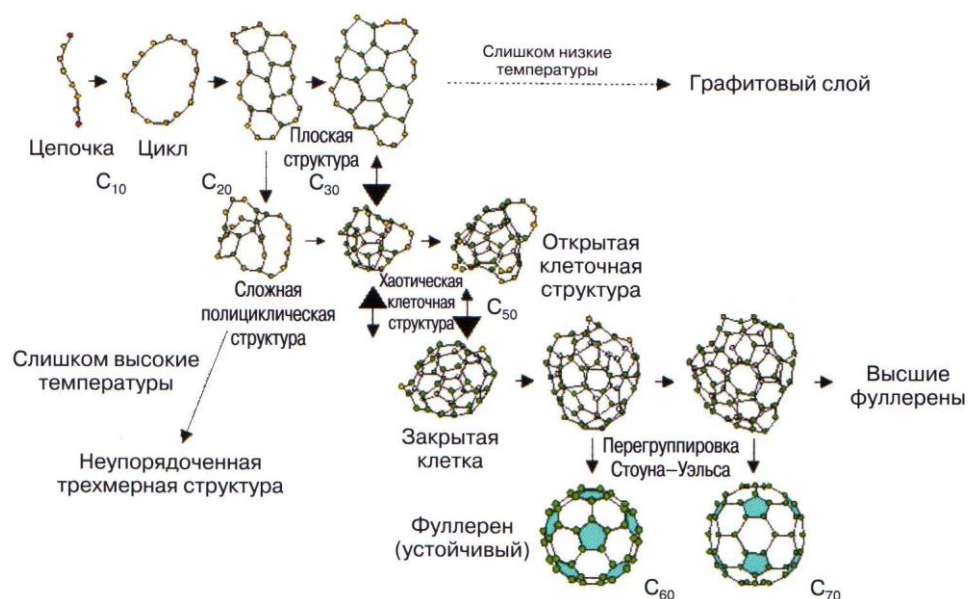


Рис. 24 – Предполагаемый механизм образования молекул фуллерена

Важно отметить, что структура фуллерена может служить затравкой для роста следующих графитоподобных слоев и образования многослойных фуллеренов (рис. 25).

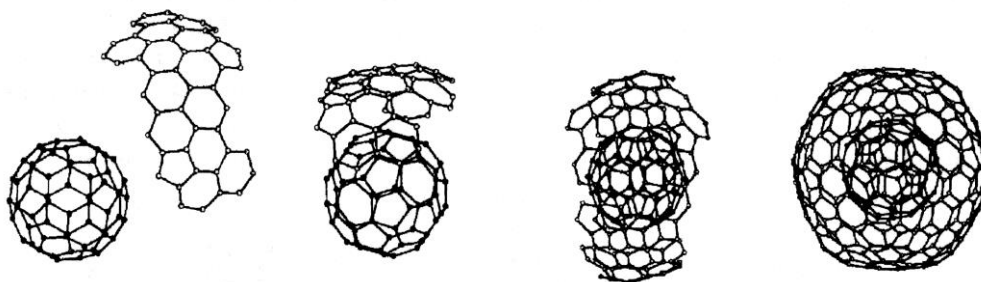


Рис. 25 – Предложенный механизм образования «луковичного» фуллерена $C_{60}@C_{240}$

Хотя грубые методы получения фуллеренов (испарение или неполное сгорание) используются чаще всего, органики-синтетики уже длительное время предпринимают поиски поэтапных мягких (растворных) синтетических подходов. В 1999 г. на этом пути был достигнут важный результат – получение чашеобразных молекул, состоящих из изолированных шестичленных циклов, окруженных пятичленными (рис. 26).

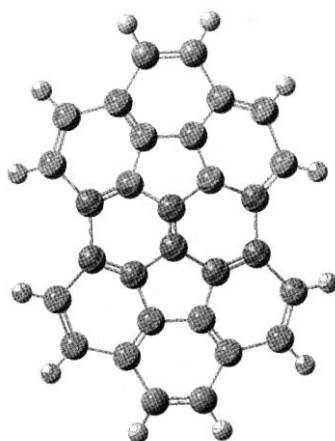


Рис. 26 – Структура «полуфуллере» $C_{30}H_{12}$

В начале 2002 г. был проведен двенадцатистадийный синтез хлорсодержащего предшественника C_{60} , вакуумный пиролиз которого завершился синтезом фуллере (рис. 27). Выход составил менее 1 %, что не приемлемо для промышленного производства. Тем не менее, это весьма важное открытие. Кроме того, были обнаружены производные, содержащие ионы различных металлов внутри клетки – эндоэдральные фуллерены (эндофуллерены).

К настоящему времени во внутреннюю полость удалось ввести атомы щелочных, щелочно- и редкоземельных металлов, элементов подгруппы азота, благородных газов, а также нейтральные молекулы – CO, H_2 , H_2O . Данные расчетов показывают, что внедренные атомы инертных газов и небольшие ионы (Li^+ , F^- , Cl^-) стабилизируют фуллереновые клетки, в то время как более крупные частицы (Rb^+ , Bg^- , I^-) дестабилизируют их.

Металлофуллерены ($M@C_n$) обычно получают лазерным испарением графитовых дисков, пропитанных солями металлов (при температуре около $1200\text{ }^{\circ}C$) или при горении электрической дуги между электродами, содержащими добавку металла.

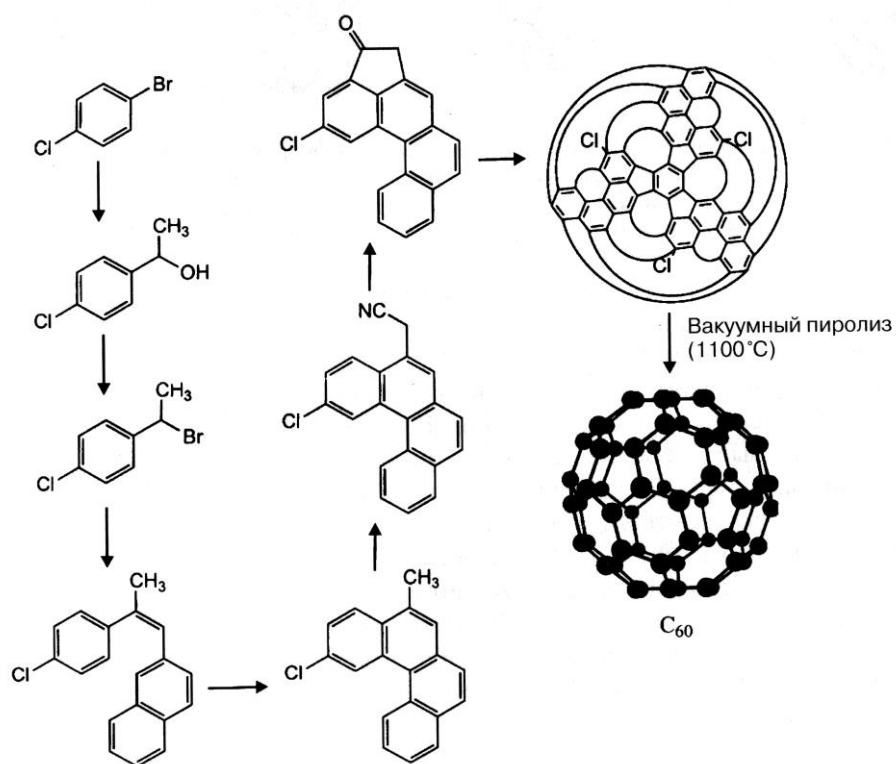


Рис. 27 – Схема синтеза C₆₀

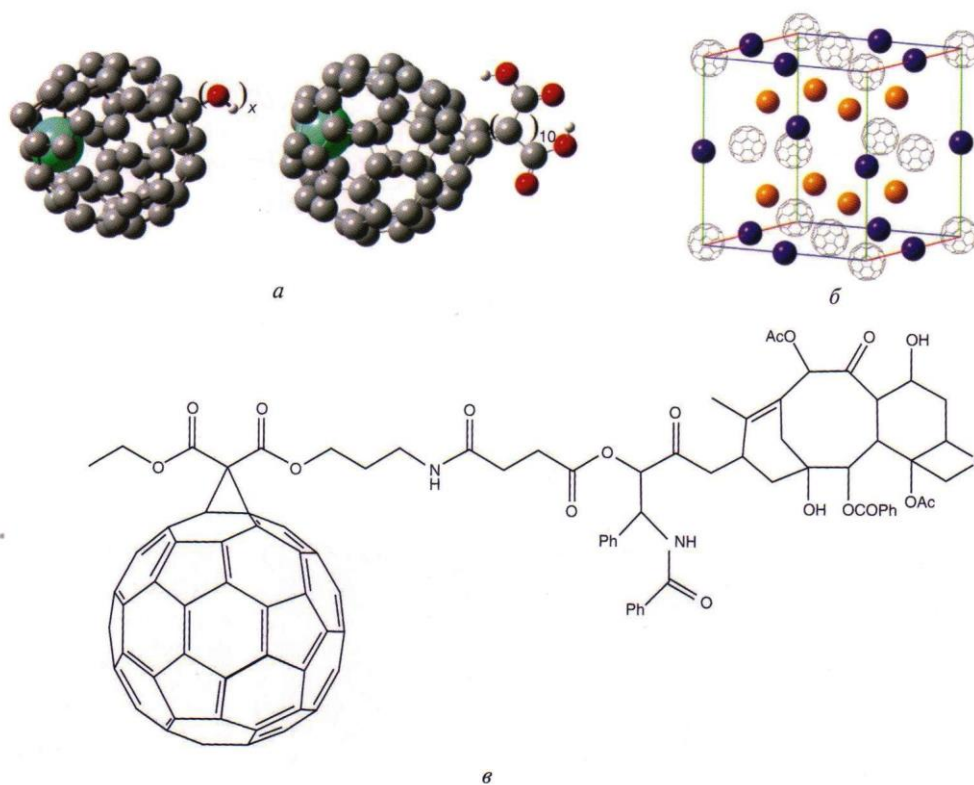


Рис. 28 – Примеры применения фуллеренов:
а – Gd³⁺@C₆₀-(OH)_х (х ≈ 27) и Gd³⁺@C₆₀-(СООН)₁₀, используемые как контрастные вещества в томографии; *б* – элементарная ячейка ионного фуллерида Cs_хRb_уC₆₀, обладающего сверхпроводимостью; *в* – структура C₆₀, модифицированного противораковым препаратом (паклитаксель)

Примером металлофуллерена может служить $Gd@C_{60}$ ($Gd^{3+}@GdC_{60}^{3-}$) (рис. 28 а), которые нередко используются как контрастные агенты при проведении томографических исследований.

Возникает вопрос, как атом металла попадает внутрь клетки? Мелкие атомы и ионы, например, He или H^+ , проникают непосредственно через пяти- или шестичленные циклы. Однако для внедрения более крупных атомов и ионов необходимо разорвать часть связей углерод-углерод по так называемому оконному механизму (рис. 29). Поскольку фуллерены с конденсированными пятичленными циклами обладают большей энергией, для этих структур процесс внедрения должен протекать легче. Это вызвало большой интерес к синтезу «нетрадиционных» металлофуллеренов, например, $Sc_2@C_{66}$. В отличие от пустого каркаса C_{66} , эти структуры вполне устойчивы, поскольку внедренные атомы металла передают часть электронной плотности на фуллереновую клетку, связь C–C между соседними пятичленными циклами несколько растягивается и напряжение в структуре уменьшается.

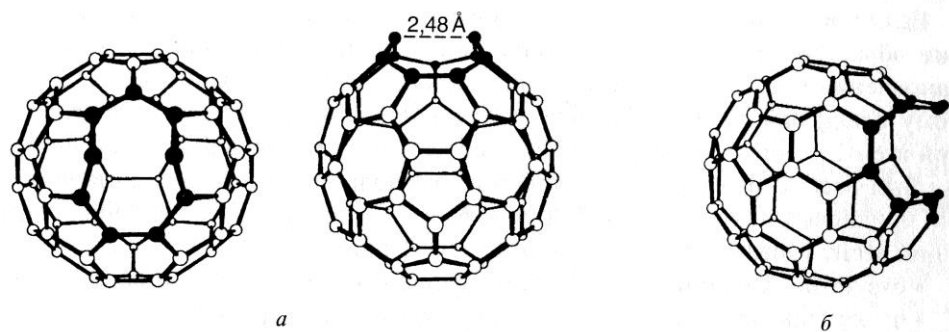


Рис. 29 – Теоретически постулированные интермедиаты при образовании эндофуллеренов: а – девятичленный цикл, образованный при разрыве общей грани пяти- и шестичленного циклов; б – образование большей 13-членной апертуры при разрыве двух связей

Крупные ионы, например, Cs^+ , Y^{3+} , Ln^{3+} , внедряются необратимо, скорее всего, по другому механизму. Для их введения необходимо разорвать одну связь C–C, что увеличивает энергетический барьер. Для металлофуллеренов типа $y@C_{82}$ недавно был предложен механизм «залечивания дыр», расчеты

показывают образование фуллерена C_{76} с открытой структурой и небольшого фрагмента YC_6 , который залечивает отверстие (рис. 30).

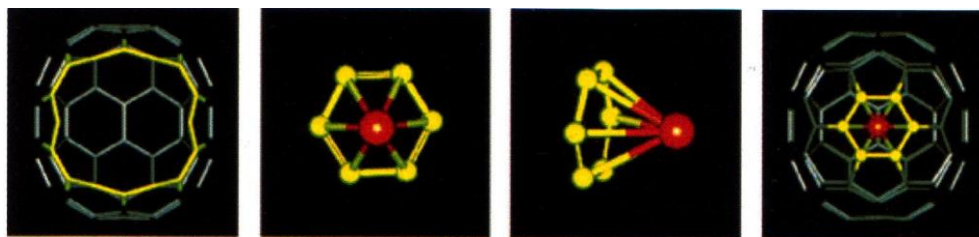
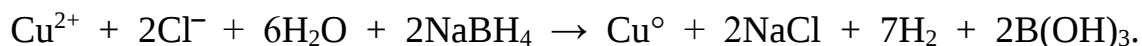


Рис. 30 – Рассчитанные структуры интермедиатов механизма «залечивания отверстия» при получении эндофуллеренов. Слева направо: открытая клетка C_{76} , вид фрагмента YC_6 сверху и снизу, конечный эндофуллерен $Y@C_{82}$

4.2 Растворный синтез нульмерных наноструктур

Большинство рассмотренных методов включает использование жестких условий (лазерное или дуговое испарение, пиролиз и т.п.). Наиболее предпочтительны методы роста наночастиц металлов и их соединений в мягких условиях при комнатной температуре. Это невозможно для нанокластеров углерода, так как исходное вещество (графит) построено из прочных ковалентных связей, для разрыва которых необходимо подвести большое количество энергии.

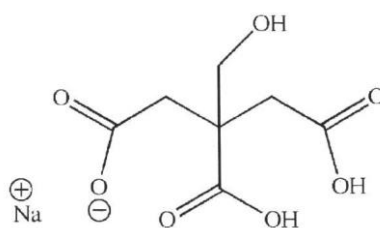
Рост наночастиц металлов легко протекает в обычных условиях и средах при использовании мягких восстановителей (как правило, $NaBH_4$, водорода или гидразина). Например, для меди:



Теоретически любой металл, стандартный потенциал которого выше, чем у восстановителя (например, для BH_4^- $E^\circ = -0.481$ В), может быть восстановлен. Это положение относится как к большинству переходных металлов $3d$ -ряда, так и многим другим, в том числе и непереходным (с основной восстановительной реакцией конкурируют побочные: образование боридов) выход также зависит от pH среды. Если провести эту реакцию без особых предосторожностей, вместо наночастиц образуется металлическая

пленка или объемный порошок. По мере восстановления ионы металла немедленно агрегируются в большие частицы. Поэтому ключевым звеном процесса роста наночастиц является стабилизирующий агент, который изолирует растущие частицы друг от друга (например, использование полиоксоанионов для стабилизации иридиевых нанокластеров). Желательно, чтобы стабилизирующий агент удовлетворял следующим положениям:

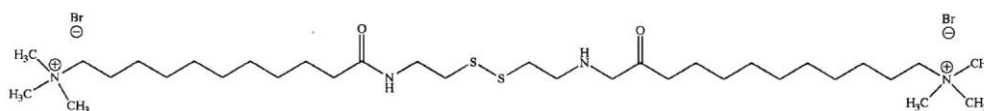
- отсутствие реакции с растущим нанокластером и пассивация поверхности;
- четко определенная химическая структура (форма, размер), что позволяет контролировать рост нанокластера внутри оболочки стабилизатора;
- в состав входят только легкие элементы, то есть оболочка не мешает исследованию кластера. Это также облегчает удаление оболочки (если оно необходимо) при относительно низких температурах;
- возможность настройки свойств, определяющих растворимость и селективность сорбционных свойств к внешним воздействиям. Это может способствовать контролируемой самосборке наночастиц на подложках за счет селективной хемосорбции.



I

В водных растворах в качестве стабилизаторов чаще всего используют органические лиганды. Например, в процессе Туркевича, разработанном еще в начале 1950-х годов для получения коллоидов, зародыши кластеров золота стабилизируются цитратом натрия (I). Этим методом можно получить частицы диаметром 10-20 нм. Поскольку золото восстанавливается очень легко (для AuCl_4^- $E^\circ = + 1,00 \text{ В}$), цитрат выступает в роли стабилизатора и восстановителя. В настоящее время при получении наночастиц золота

диаметром меньше 10 нм чаще используется катионный стабилизатор – бис(11-триметиламмонийдеcanoиламиноэтил)дисульфодибромид (TADDD, II):



II

Если в качестве восстановителя взять NaBH_4 , дисульфидная группа расщепляется и образуется связь S–H. Молекула меркаптана хемосорбируется на поверхности кластеров и препятствует их слипанию (золото, как и другие благородные металлы Ag, Pt – отличаются сродством к сере и ее аналогам).

Большой интерес привлекло использование дендримеров с совершенной структурой, например, поли(амидоаминов) (РАМАМ) как стабилизирующих шаблонов роста нанокластеров (рис. 31). Изменяя природу периферических групп и порядок генерации, можно достаточно точно регулировать размер нанокластеров.

Дендример или арборол – макромолекула с симметричной деревообразной с регулярными ветвлениями структура. Ветви дендримера имеют общую центральную группу. Дендример первого поколения (первой генерации) имеет одну точку ветвления в каждой ветви, второго поколения – две точки ветвления и т.д. Такое строение дендримеров достигается в ходе многоступенчатого процесса их синтеза. Дендримеры активно исследуются с 1980-х годов и с тех пор получены уже сотни различных типов.

Дендримеры с концевыми аминогруппами, а также разветвленные молекулы полимеров могут использоваться в качестве шаблонов для образования хелатов с ионами M^{++} и дальнейшего восстановления. Размер образующихся наночастиц довольно велик, при этом сохраняется возможность дальнейшей агломерации. Это особенно актуально при использовании сильно разветвленных полимеров с хаотичной структурой, поскольку образующиеся частицы отличаются высокой полидисперсностью.

С другой стороны, если концевые amino-группы протонированы ($-\text{NH}_3^+$) или замещены гидроксильными группами ($-\text{OH}$), продукты восстановления ионов металлов втягиваются во внутреннее пространство дендримера. Это приводит к существенно меньшим размерам наночастиц и низкой полидисперсностью (рис. 31).

Кроме состава поверхности и pH раствора, очень большое значение при росте наночастиц имеет порядок генерации дендримера. С ростом степени ветвления увеличивается и плотность заполнения поверхности, что затрудняет или препятствует проникновению H^+ (M^{n+}) внутрь структуры дендримера.

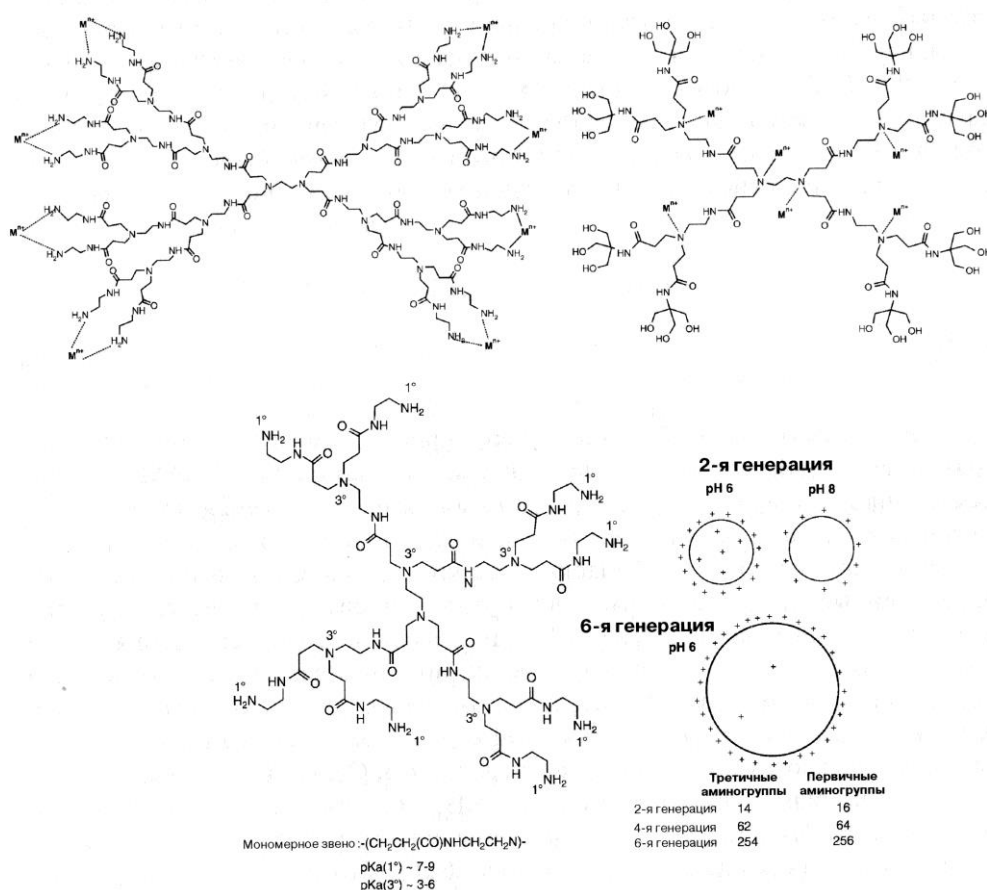


Рис. 31 – Молекулярная структура дендримера PAMAM второй генерации (G2) с поверхностью, модифицированной аминогруппами. Показаны положения ионов металла, связанных первичными аминогруппами (этап, предшествующий восстановлению). Для сравнения представлена структура G2-PAMAM с поверхностью, модифицированной гидроксильными группами; атомы металла координируются преимущественно к внутренним третичным аминогруппам. Справа внизу показано положение протонированных аминогрупп при различных pH. С увеличением порядкового номера генерации плотность групп на поверхности возрастает, и доступность внутренних аминогрупп (как для протонов, так и для атомов металла) уменьшается

С другой стороны, при малых генерациях образующиеся кластеры легко выходят наружу из-за практически открытой структуры. Для роста наночастиц оптимальны дендримеры РАМАН 4-6 генерации, (G4-G6), обладающие свойствами «молекулярных контейнеров» (рис. 32).

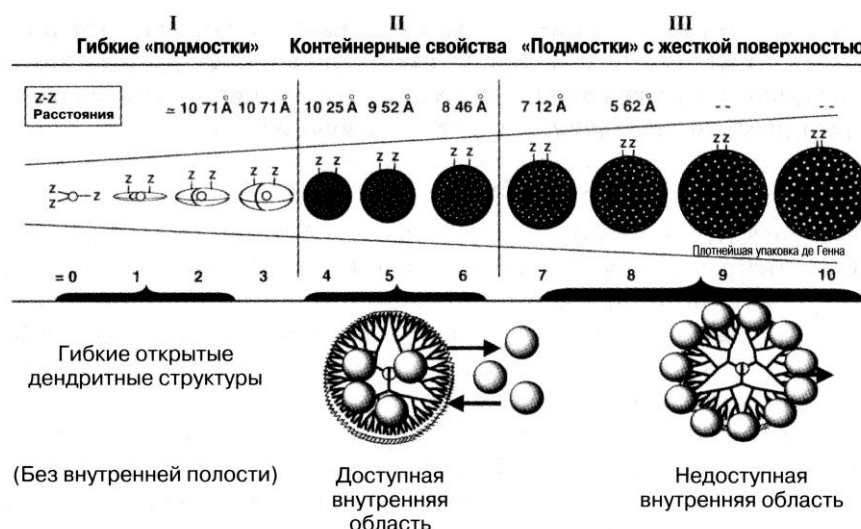


Рис. 32 – Относительный размер и поверхностная плотность дендримеров РАМАН. Показан наиболее подходящий диапазон для роста наночастиц (4-6 генерация)

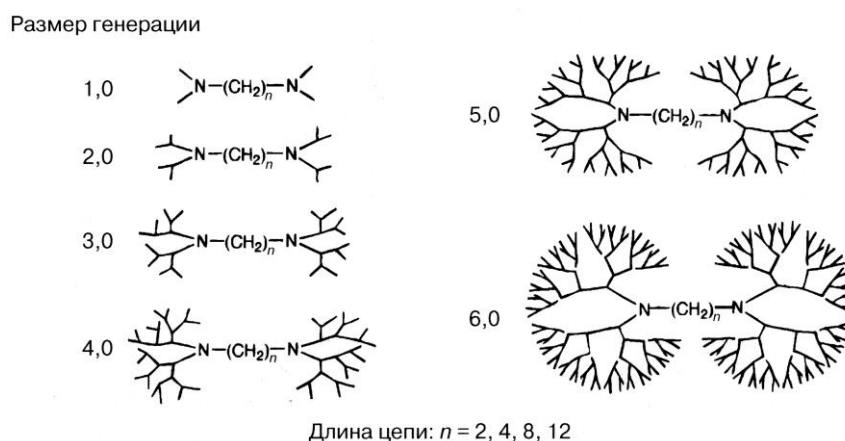
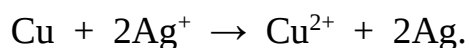


Рис. 33 – Молекулярные структуры дендримеров с остовами, модифицированными длинными алифатическими цепями. В отличие от традиционных дендритных структур с небольшими ядрами, при увеличении порядка генерации в этих структурах сохраняется открытый канал, по которому частицы из раствора могут проникать во внутреннюю область дендримера

Исключительная гибкость дендримерной архитектуры появляется в возможности модификации ее ядра, что позволяет изменять растворимость и облегчает проникновение частиц через поверхность при высоких генерациях (рис. 33). Поскольку к настоящему времени достаточно легко получить дендримеры с практически любым составом ядра и поверхности, то проблемы получения наночастиц с заданным составом, размером, формой и растворимостью, и извлечения их из середины дендримера (что важно, например, для контроля высвобождения лекарственных агентов под внешними воздействиями), можно считать практически решенными.

Рост нанокластеров на дендритных шаблонах в значительной степени определяется степенью закомплексованности исходных ионов металла. Например, невозможно вырастить наночастицы серебра, используя РАМAM с гидроксильными группами на поверхности, поскольку Ag^+ достаточно слабо связывается с третичными аминами. Однако, если внутри структуры уже получены зародыши Cu^0 , легко протекает реакция вытеснения, связанная с окислением меди, которое приводит к образованию зародышей Ag^0 :

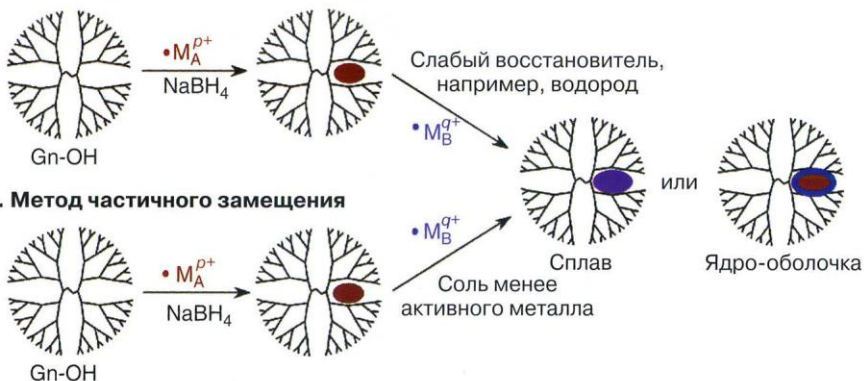


Кроме простых металлов из растворов смеси солей, можно получить наночастицы интерметаллических соединений. Например, биметаллические нанокластеры внутри дендримеров можно получить одним из трех способов (рис. 34). Кроме простых структур типа «ядро-оболочка», этот метод может быть пригодным и для получения многослойных (луковичных) наночастиц.

1. Метод совместного комплексования



2. Последовательный метод



3. Метод частичного замещения

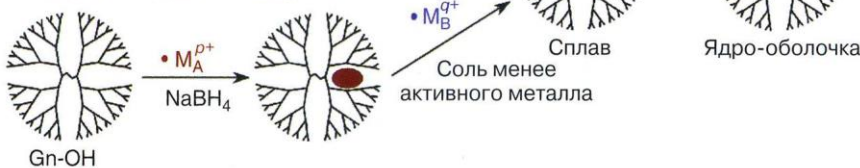
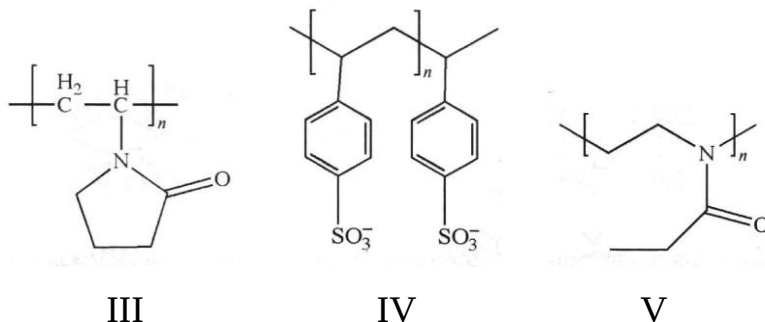


Рис. 34 – Схематическое представление трех методов получения биметаллических наночастиц внутри дендримеров

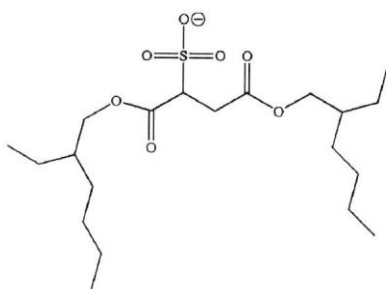
В качестве стабилизаторов можно использовать полимеры, например, поливинилпирролидон (III), полистиролсульфонат натрия (IV) и поли(2-этил-2-оксазолин) (V), которые пригодны для получения наночастиц различных сплавов. Этот исключительно мягкий подход назван *металлургией в колбе*. Поскольку отдельные наночастицы находятся в непосредственном контакте друг с другом и обладают высокой реакционной способностью поверхности и низкими точками плавления, высокотемпературный отжиг, в отличие от объемных сплавов, не нужен. Также найдено, что поливинилпирролидон способствует росту частиц Au@Ag типа «ядро-оболочка», а также серебряных нанопроволок и нанотрубок.



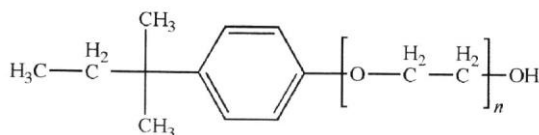
При синтезе наноструктур в неполярных растворителях применяются стабилизаторы, соединяющие алкильные цепочки, а не концевые

гидроксильные группы. Одним из первых классов соединений были меркаптаны (тиолы) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, концевая группа которых прочно связывается с наночастицами, а длинный органический фрагмент направлен в среду растворителя. Хотя эти стабилизаторы хорошо предотвращают агрегацию коллоидов даже после удаления растворителя, контролировать дисперсию размера все же затруднительно.

Для контроля роста наноструктур в последнее время используются системы, содержащие шаблон – нанореактор. Каждый, кому приходилось мыть посуду или стирать ткани, имеют опыт использования стабилизаторов, называемых поверхностно-активными или мицеллообразователями. Эти вещества содержат как полярную ($-\text{OH}$, катионную или анионную) группу, так и неполярные (алифатические) углеводородные цепочки. Принцип действия мыл и других ПАВ состоит в том, что молекулы сорбируются гидрофобными концевыми группами к поверхности частицы грязи, в то время как их полярные концевые группы направлены в водную среду. При таком воздействии частица грязи легко отрывается от поверхности волокна ткани и переходит в суспензию. Таким же способом в двухфазной водно-масляной смеси можно стабилизировать водную микроэмульсию масла, например, с помощью бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия (часто обозначается как АОТ, VI) или неионогенного ПАВ, «Тритон X» (VII):



VI



VII

Поскольку большинство исходных веществ, применяемых для роста наночастиц из растворов – ионные соли металлов, то обычные мицеллы не

эффективны, так как реагенты не сосредоточены внутри них. Чтобы собрать ионы металлов внутрь «нанореактора», в котором протекают последующие реакции окисления, восстановления и т.д., используются обратные мицеллы (рис. 35), ядром которых служит водная среда.

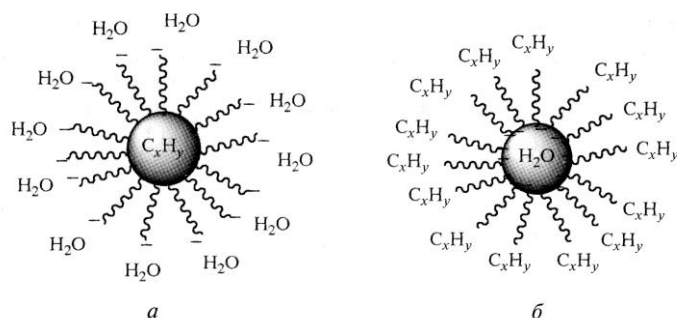


Рис. 35 – Схематическое представление «традиционных» мицелл, применяемых для захвата органических масел и загрязнителей и образованных анионами ПАВ (а), и обращенных мицелл, применяемых для создания водных нанореакторов в неполярных средах (б)

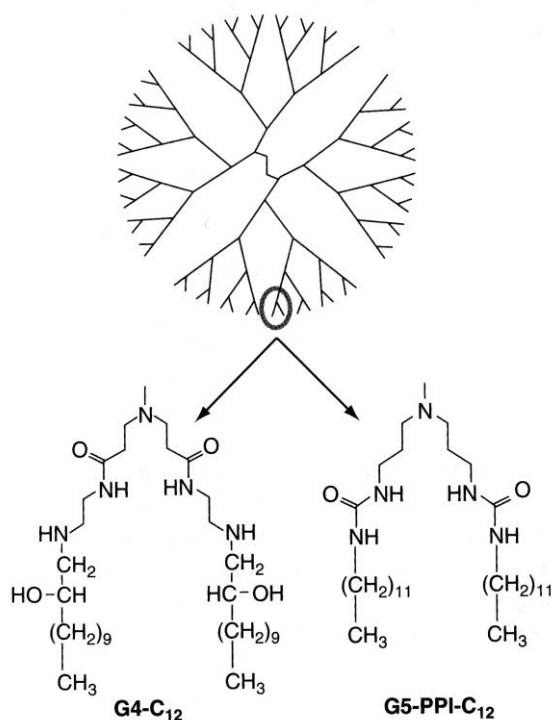


Рис. 36 – Модифицированные гидрофобными группами дендримеры РАМAM (G4-C12) и пропиленмина (PP), используемые в качестве шаблонов для роста нанокластеров золота

В качестве таких мицелл часто используют дендримеры PAMAMOS или PAMAM с гидрофобной поверхностью (модифицированная додецильными группами, рис. 36).

Заключать ионы металлов перед восстановлением внутрь дендримера не всегда обязательно. Например, восстановленный металл может захватываться предшественниками полимеров, как, например, при образовании живых радикалов на поверхности наночастиц золота (рис. 37).

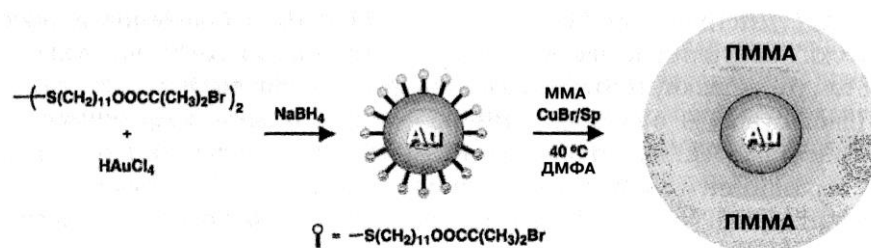


Рис. 37 – Схема процесса образования наночастиц золота, покрытых инициаторами свободно-радикальной полимеризации, которые затем превращаются (в процессе поверхностно-контролируемой живой полимеризации) и наноструктуры типа «металл в полимерной матрице»

При этом образуется густая полимерная «щетка», которая окружает наночастицу металла и эффективно защищает ее от слияния с другими частицами. Характер последующей упаковки частиц и реакционной способности их поверхности можно тонко варьировать за счет изменения природы полимерного покрытия.

В последние годы разработаны достаточно сложные стабилизаторы типа *кросс-связанных (поперечно сшитых) мицелл*. Эти наноструктуры состоят из полимерного ядра, кросс-связанного с одним или несколькими внешними полимерными слоями (рис. 38). В этом случае можно получить и полую *нанооболочку*, удалив материал ядра химическим или термическим путем. Такие строительные наноблоки представляют огромный интерес для медицины, хранения водорода, ионного обмена и микроэлектроники.

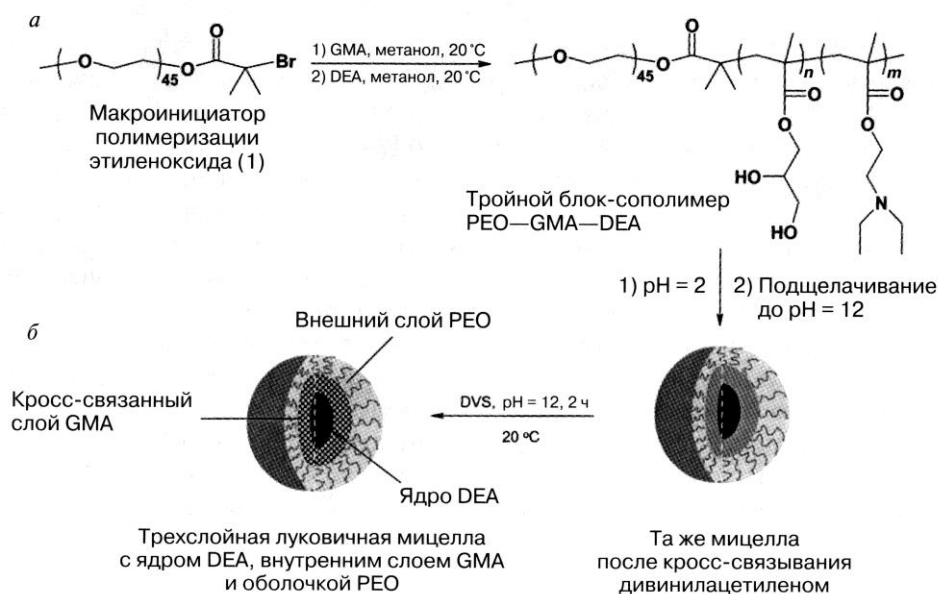


Рис.38 – Схема синтеза трехслойных кросс-связанных мицелл. Показано образование мицелл блок-сополимера полиэтиленоксид (PEO) – глицирилметакрилат (GMA) – 2-(диэтиламиноэтил)метакрилат (DEA) с образованием луковичной наноструктуры

Другая стратегия получения нанооболочек состоит в нанесении тонких металлических покрытий на шаблоны – сферы из кварца или полистирола, которые потом растворяют, соответственно, во фтороводородной кислоте или толуоле. Используется и обратная ситуация, когда покрытие (керамическое или полимерное) наносят на металлические наносферы, которые растворяют в кислоте с образованием неметаллических нанооболочек. Однако, если ядро достаточно велико, то образующаяся оболочка подвергается при его удалении серьезным деформациям.

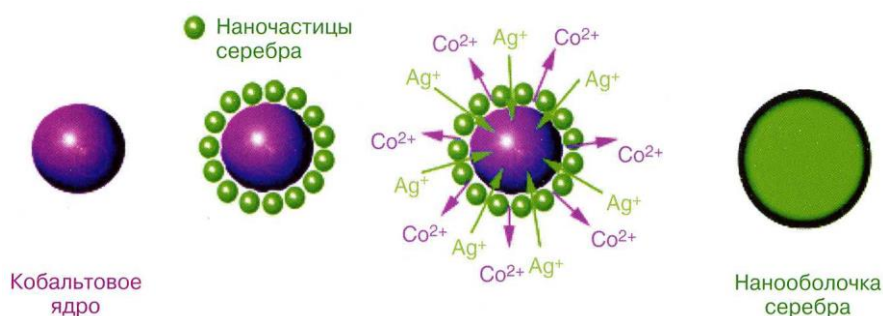


Рис. 39 – Схема образования нанооболочек серебра на шаблоне наночастиц кобальта. Нанооболочка серебра образуется за счет окислительно-восстановительного процесса и окисления кобальтового ядра

Недостаточную прочность нанооболочек удалось повысить с использованием удаляемых ядер малых размеров. Примером может служить получение серебряных оболочек на шаблонах из кобальта (рис. 39).

Нульмерные наноструктуры получают не только из металлов, но и из оксидов, сульфидов и т.д. Наночастицы оксидов используются в самых разных областях – как материалы магнитных носителей информации высокой плотности, гетерогенные катализаторы, газовые сенсоры, электролиты литиевых батарей и топливных элементов.

4.3 Самосборка нульмерных наноструктур в упорядоченные массивы

От проблемы получения и стабилизации нульмерных структур перейдем к созданию более сложных структур на их основе. Вспомним, что подход «снизу-вверх» состоит в разработке поэтапных методов создания сложных структур из индивидуальных наноразмерных блоков.

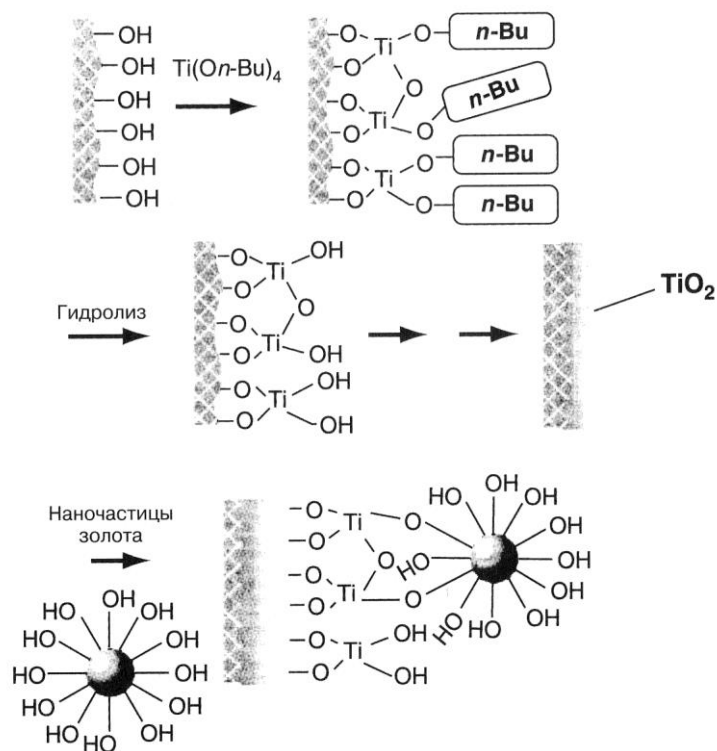


Рис. 40 – Схема процесса хемосорбции наноструктур на поверхности TiO_2 , модифицированную гидроксильными группами. Гидроксильные группы на поверхности наночастиц способствуют адсорбции и образованию кислородных мостиков

Очевидно, что максимальный контроль за свойствами получаемого устройства достигался бы при его сборке на атомном уровне, современным технологическим возможностям оптимально соответствует нанокластер, состоящий из 50 атомов и больше.

Для предотвращения слипания наночастиц используются стабилизаторы. Эти вещества могут служить и удобной «привязкой» для присоединения наночастицы к заданной поверхности. При модификации поверхности реакционноспособными функциональными группами ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) она становится способной к хемосорбции свободных концевых групп молекул стабилизатора (рис. 40). Если наночастицы окружены молекулами стабилизатора строго определенного размера, расстояние между наночастицами в слое будет одинаковым и хорошо предсказуемым (рис. 41). Хотя чаще всего при этом образуются двухмерные структуры (упорядоченные поверхностные слои), можно получать и одномерные (цепочечные) структуры. Например, наночастицы золота, стабилизированные длинноцепочечным полиэтиленоксидом, содержащим SH-группы, образуют линейную цепочку за счет взаимодействия с сульфатными (кислотными) группами полисахаридов (например, сульфата хондроитина C, VIII (рис. 42 и 43).

Самый распространенный способ получения трехмерных наноструктур (например, тонких наноструктурированных пленок) состоит в послойной самосборке, которая была впервые использована Деккером в начале 1990 г. Этот метод основан на последовательной адсорбции частиц с комплементарными функциональными группами (или зарядами) различными поверхностями. Такие пленки могут применяться для самых разных целей – от самоочищающихся поверхностей, утилизации отравляющих веществ и конверсии солнечной энергии до точечной доставки лекарств и оптоэлектронных устройств.

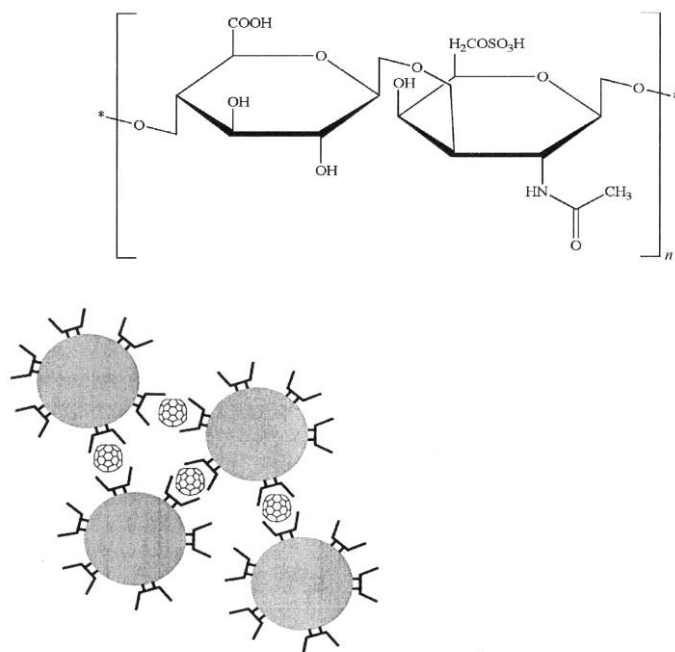


Рис. 41 – Схема задания расстояния между стабилизированными наночастицами золота за счет образования комплексов внедрения фуллерена



Рис. 42 – Изображение одномерного множества наночастиц золота, образованных при взаимодействии с полиэтиленоксидом и полиполисахаридами, в просвечивающем электронном микроскопе

Недавно тонкие наноструктурированные пленки были получены последовательным нанесением слоев наночастиц золота, стабилизированных циклодекстрином, и дендримеров с адамантильными терминальными группами (рис. 43). Каждые два последовательных слоя увеличивают толщину пленки на 2 нм, что позволяет очень точно контролировать толщину получаемого покрытия.

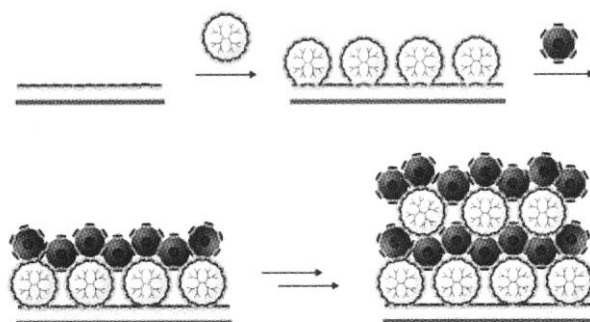


Рис. 43 – Послойный рост наночастиц золота, стабилизированных циклодекстрином (темные сферы), и дендримеров полиэтиленимина с адамантильными концевыми группами

Касаясь самосборки, невозможно обойти недавно полученные молекулы, способные перемещаться по поверхности («наномашины»). Эти «транспортные средства наномира» представляют собой органические молекулы, содержащие фуллерены в качестве «наноколес» (рис. 44).

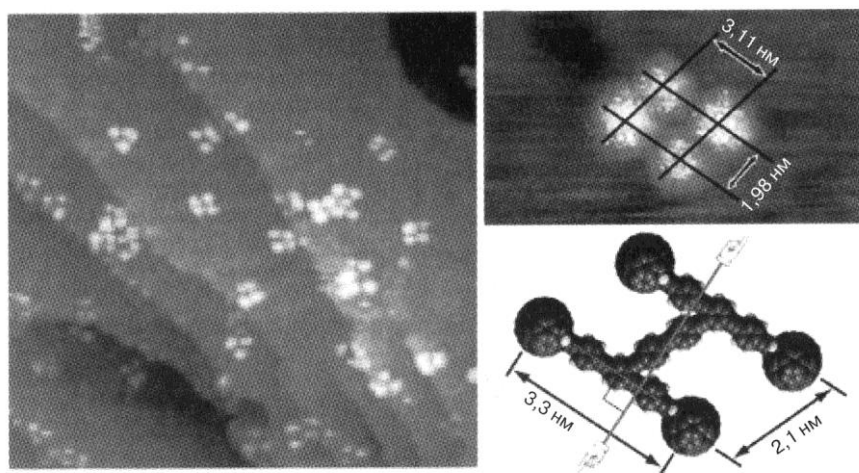


Рис. 44 – Изображения и размеры наномашины на поверхности золота (111). Яркие пятна - фуллереновые «колеса»

Поместить наномашины на золотую поверхность достаточно просто, распылив их толуольную суспензию. Из-за высоких сил адгезии между фуллеренами и металлической поверхностью молекулы самопроизвольно «приземляются» на поверхность на все четыре «колеса». «Оси» состоят из алкильных групп, содержащих тройные связи, которые позволяют «колесам» вращаться.

В результате при изменении температуры «машина» перемещается по поверхности. Хотя современные «наномашины» способны лишь к прямолинейному поступательному движению, это достижение знаменует начало применения наномашин в различных областях.

Вопросы для самоконтроля

1. Классификация наноразмерных строительных блоков. Нульмерные структуры: наночастицы, нанокластеры и нанокристаллы (основные параметры и агрегатное состояние).
2. Сопоставление нульмерных наночастиц и традиционных коллоидных частиц. Понятие «квантовые точки».
3. Первые сложные нульмерные структуры – фуллерены. Краткая характеристика, история создания, схемы первых установок по синтезу фуллеренов.
4. Разновидности фуллеренов: одно-, двух и трехслойные. Современное состояние химии фуллеренов (различные производные - эндофуллерены, металлофуллерены). Способы введения атомов металла во внутреннюю полость фуллерена.
5. Понятие о растворном синтезе. Требование к стабилизирующим агентам нанокластеров.
6. Примеры использования цитрата натрия, TADDD и NaBH_4 для получения наночастиц золота и др. благородных металлов.

7. Понятие о дендримерах. Перспективы использования дендримеров в качестве стабилизаторов шаблонов роста нанокластеров. Понятие о нанореакторах и кросс-связанных стабилизаторах.
8. Самосборка нульмерных наноструктур в упорядоченные массивы. Понятие о наномашинах.

5 Одномерные наноструктуры

Вторая многочисленная группа наноразмерных строительных блоков называется одномерными – это материалы, два размера которых находятся в нанообласти, в отличие от третьего, которое гораздо больше.

Существуют нанотрубка, нановолокно, нанопроволока, наностержень. Все эти структуры объединяет одна особенность: их диаметр располагается в диапазоне 1-100 нм, в то время как длина может достигать нескольких микрон. Нанотрубка – это одномерная структура, полая внутри; остальные наноструктуры не содержат внутренней полости. Термин «нановолокно» применяют для аморфных (и как правило, непроводящих) одномерных наноструктур, например, полимеров и др. неграфитизированных углеродистых нанообъектов. Напротив, термин «нанопроволока» означает, что нанообъект является кристаллическим и обладает проводящими или полупроводящими свойствами.

Под наностержнем будем понимать типичную одномерную наноструктуру, длина которой сопоставима по порядку величины с шириной (то есть все размеры которой находятся в области 1-100 нм). Как следует из названия, наностержни обладают достаточной жесткостью. Поскольку кристаллические наностержни характеризуются той же формой, что и игольчатые монокристаллы, термин «нанокристалл» подходит для них лучше (или более точно «стержнеобразный нанокристалл»). В то время как нанотрубки, нановолокно и нанопроволоки обычно получают в виде спутанных клубков, наностержни не обнаруживают отклонения от линейности. Наностержни могут наслаиваться друг на друга с образованием сложных двух- и трехмерных структур, что достаточно сложно при работе с другими одномерными структурами, по виду больше напоминающими вермишель.

5.1 Углеродные нанотрубки

Углеродные нанотрубки – наиболее полно изученные одномерные наноматериалы. Они были впервые обнаружены в 1991 г. и состоят из графитовой сетки (или нескольких сеток), образованной sp^2 -гибридными атомами углерода (то есть графена), закрученной в трубку. Исходя из количества листов, составляющих нанотрубки, их классифицируют на одностенные, двустенные и многостенные (рис. 45). Диаметр углеродных нанотрубок меняется в диапазоне от 1 нм (одностенные) до более 30 нм (многостенные), при этом отношение длины к диаметру варьируется от 10^2 до 10^6 и более. Хотя диаметр нанотрубок на несколько порядков меньше, чем диаметр человеческого волоса, их прочность на разрыв примерно в 20 раз выше, чем у стали. Это свойство обусловлено очень прочными связями между sp^2 -гибридными атомами углерода.

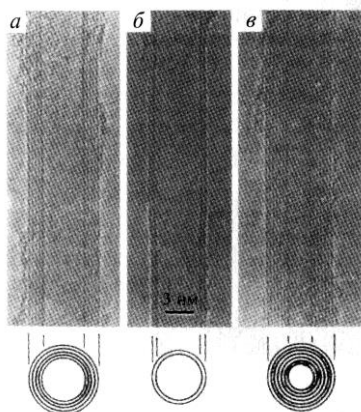


Рис. 45 – Изображение многостенных (*а* – пятистенных, *б* – двухстенных, *в* – семистенных) нанотрубок в просвечивающем электронном микроскопе. Расстояние между отдельными концентрическими цилиндрами составляет 0.34 нм, что равно расстоянию между соседними слоями в графите

Электропроводящие свойства одностенных нанотрубок могут изменяться от металлических до полупроводниковых в зависимости от способа сворачивания графена (рис. 46). В частности, диаметр и спиральность нанотрубки однозначно определяются вектором хиральности (вектором Хамада) C , связывающим кристаллографически эквивалентные узлы графеновой решетки. Для определения направления и длины вектора

хиральности используются индексы n и m . Если $n=0$, конформация нанотрубки называется зигзагообразной; при $n=m$ конфигурация называется креслообразной. В промежуточных случаях нанотрубки называют просто хиральными.

$$C = na_1 + ma_2,$$

где n и m – целые числа, означающие количество векторов элементарной ячейки вдоль направлений в кристаллической решетке графена; a_1 и a_2 – векторы элементарной ячейки графена.

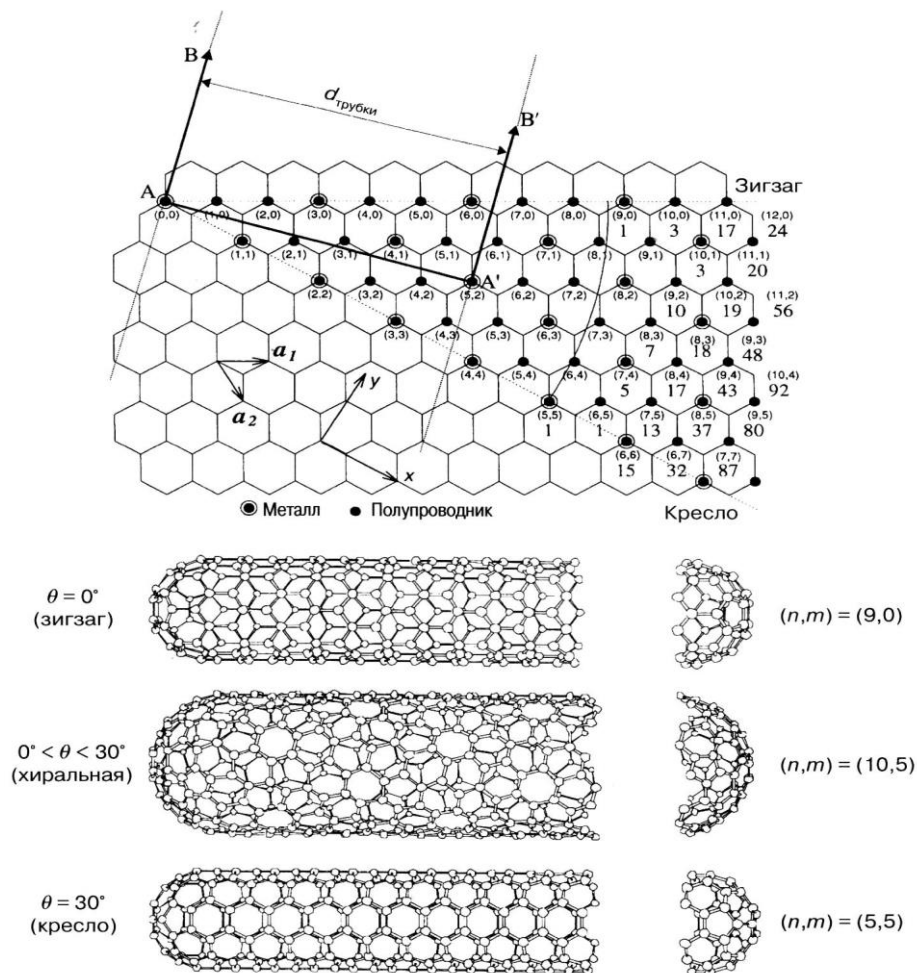


Рис. 46 – Графеновые сетки нанотрубок. Показаны индексы вектора Хамада (n, m). Пунктирные линии обозначают хиральность трубок от $\theta=0^\circ$ (зигзагообразная) до $\theta=30^\circ$ (креслообразная). Для величины $0^\circ < \theta < 30^\circ$ нанотрубки хиральны. Для каждого вектора указана электропроводность (металлический или полупроводниковый характер). Величины, приводимые под обозначениями ряда векторов, указывают количество различных «крышек», которыми может быть закрыта данная (n, m) -трубка. В качестве примера показано образование трубки (5,2). Вектора AB и $A'B'$, перпендикулярные вектору хиральности AA' , при сворачивании графенового слоя накладываются друг на друга. Диаметр нанотрубки, соответственно, оказывается равен расстоянию между осями AB и $A'B'$

Проводимость некоторых металлических одностенных нанотрубок превышает проводимость меди в 1 000 раз.

По данным расчетов зигзагообразные трубки и трубки с $m = 0$ обладают металлической проводимостью, при n , кратном 3, а в случае с другими n наблюдаются полупроводниковые свойства. Хиральные нанотрубки обладают металлической проводимостью, если $2n + m$ кратно трем, в остальных случаях также наблюдаются полупроводниковые свойства.

Креслообразные нанотрубки обладают металлической проводимостью при $n = m$ (рис. 47). По данным расчетов тип проводимости нанотрубок зависит исключительно от величин m и n ; это означает, что самые незначительные изменения в структуре могут приводить к очень существенным изменениям в проводимости. Например, ширину запрещенной зоны полупроводниковых нанотрубок можно тонко варьировать в диапазоне от 10 мэВ до 1 эВ, не прибегая к легирующим добавкам (в отличие от объемных полупроводников типа кремния). Для полупроводниковых нанотрубок с одинаковой хиральностью ширина запрещенной зоны обратно пропорциональна диаметру.

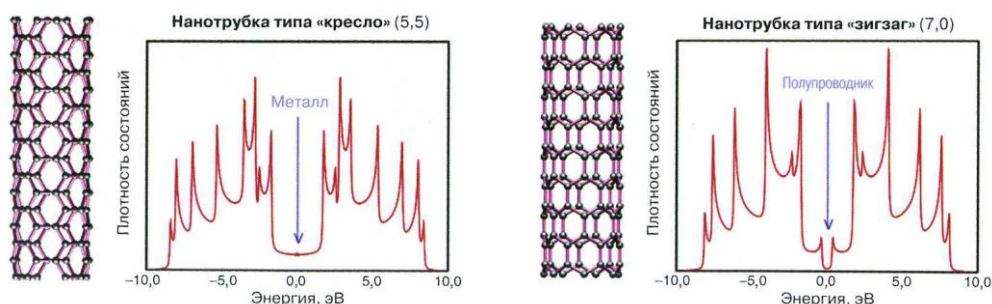


Рис. 47 – Плотность состояний и обусловленные ею электронные свойства нанотрубок типа «кресла» и типа «зигзаг»

Как уже отмечалось, традиционные кремниевые микроэлектронные устройства достигнут своего предела в течение ближайших 10-15 лет, поэтому уже сейчас ставится вопрос об альтернативных материалах. Вероятно, роль соединительных проводов будут играть именно нанотрубки или другие полупроводниковые одномерные наноструктуры, например, нанопроволоки.

Поскольку углеродные нанотрубки обладают высокой электропроводностью и достаточно острыми концами, они обладают наилучшей известной полевой эмиссией. В общем, чем меньше радиус кривизны «крышки» нанотрубки, тем выше напряженность электрического поля, что соответствует более высокой полевой эмиссии при сравнительно низких напряжениях. Это свойство уже сейчас используется для создания плоских дисплеев с полевой эмиссией. Хотя плазменные и жидкокристаллические экраны пока более популярны, они обладают существенными недостатками. Плазменные экраны характеризуются большим весом, высоким энергопотреблением и подвержены выгоранию – постепенной деградации. С другой стороны, ЖК экраны достаточно дороги и обладают большим временем отклика, что ухудшает качество быстро меняющегося изображения.

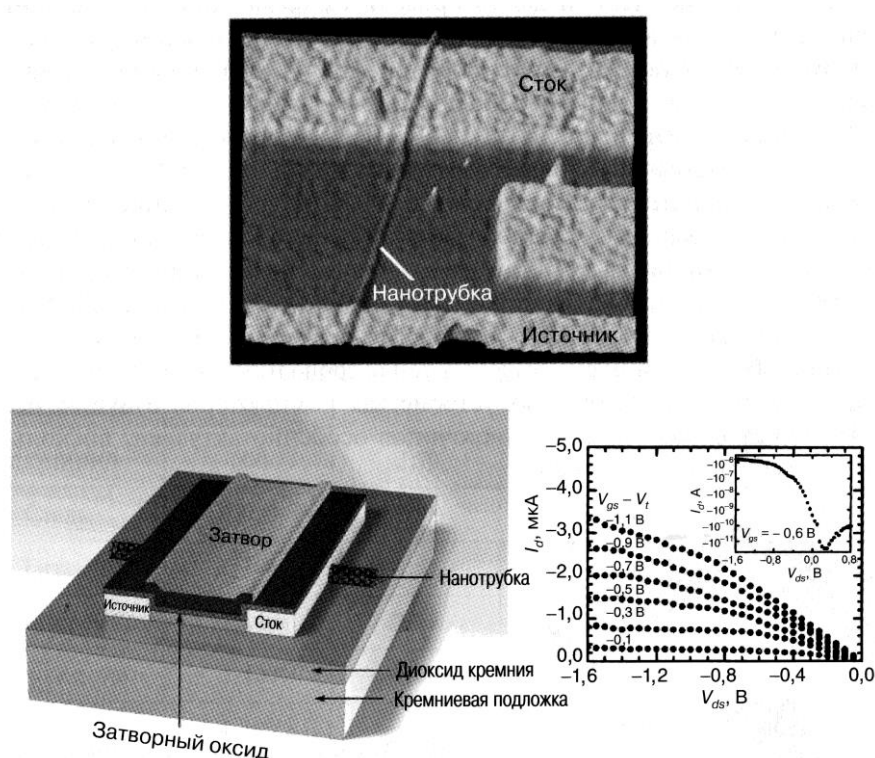


Рис. 48 – *Вверху*: изображение полевого транзистора на нанотрубках в атомно-силовом микроскопе. Электроды источника и стока нанесены на тонкую пленку SiO_2 , выращенную на кремниевой подложке, которая служит затвором. *Внизу*: полевой транзистор с верхним затвором; толщина оксидной пленки составляет 15 нм, длина нанотрубки – 300 нм. Приведены, диэлектрические характеристики устройства при комнатной температуре. На врезке показана зависимость напряжения на выходе от напряжения на входе

Наилучшее качество изображения сохраняют традиционные экраны с электронно-лучевой трубкой. Замена этой технологии новой, основанной на нанотрубках, представляет собой очевидный этап развития устройств визуализации. Вместо использования одной электронной пушки в экранах на основе нанотрубок каждый пиксель экрана будет снабжен собственной пушкой-нанотрубкой, что резко повысит качество и разрешение изображения. Кроме того, подобные устройства будут потреблять заметно меньше энергии и будут намного легче. Первые опытные образцы уже есть.

Еще одна область применения углеродных нанотрубок – создание полевых транзисторов нового поколения. В конце 90-х годов нанотрубка служила мостиком между двумя электродами из благородных металлов (рис. 48. верх.ч.). Однако характеристики были неудовлетворительные (большое сопротивление и небольшие токи). Сотрудники ИБМ (IBM) изменили конструкцию: поместили полупроводящие одностенные нанотрубки непосредственно на поверхность окисленной кремниевой подложки с последующим нанесением источника и стока (электроды из кобальта и титана, рис. 48. нижн.ч.). При последующем отжиге взаимодействие между нанотрубкой и электродами усиливается и контактное сопротивление снижается. Характеристики транзисторов на нанотрубках существенно превышают таковые у кремниевых транзисторов, поскольку параметры транзисторов на нанотрубках постоянно улучшаются. Эта технология «созреет» как раз к моменту, когда кремниевая технология достигнет предела. Также нанотрубки обладают и очень высокой теплопроводностью, что предполагается использовать в охлаждающих установках компьютеров будущих поколений.

Углеродные нанотрубки обладают и другими уникальными свойствами: это самые прочные и жесткие материалы (табл.6). Наличие замкнутой полости приводит к необычным деформациям в ответ на приложенное механическое напряжение (рис. 49). Это приводит к изменению их электронных свойств, что дает возможность использовать нанотрубки в

качестве сенсоров. Однако, исследования многостенных нанотрубок показали, что сопротивление напряжению оказывает лишь наружная стенка, а пучки и связки (рис. 50) по сравнению с отдельными нанотрубками обладают заметно меньшим модулем Юнга из-за слабого взаимодействия между ними. Таким образом, хотя отдельные одностенные нанотрубки обладают модулем упругости вплоть до 1,2 ТПа, для пучков диаметром 15-20 нм он снижается до 100 ГПа. Сейчас предпринимаются попытки распределить нагрузку по пучку более равномерно, например, за счет кросс-связывания стенок многостенных трубок и отдельных одностенных трубок.

Таблица 6

Удельная прочность на разрыв различных наноматериалов

Материал	Прочность на разрыв, МПа	Плотность, кг/дм ³	Удельная прочность, кН · м/кг*	Длина разрыва, км**
Цемент	10	2,30	4,34	0,44
Резина	15	0,92	16,3	1,66
Латунь	580	8,55	67,8	6,91
Нейлон	75	1,15	97,3	9,92
Полипропилен	80	0,90	88,9	9,06
Алюминий	600	2,70	222	22,7
Сталь	2,000	7,86	254	25,9
Титан	1,300	4,51	288	29,4
Карбид кремния	3,440	3,16	1,088	110
Стекловолокно	3,400	2,60	1,307	133
Графит	4,300	1,75	2,457	250
Кевлар***	3,620	1,44	5,246	534
Углеродные нанотрубки	62,000	1,34	46,268	4,716

* Прочность, отнесенная к плотности материала.

** Длина ленты одинаковой ширины, которая при подвешивании за один конец разрывается под собственной тяжестью.

*** Синтетическое волокно, используемое для пуленепробиваемых жилетов, состоящее из поли-(пара-фенилентерефаламида).



Рис. 49 – Моды деформации одностенных нанотрубок, обуславливающие высокую упругость. Такое поведение, вероятно, является следствием гибкости графитовых слоев и легкости регибридизации атомов углерода из состояния sp^2 в состояние sp^3

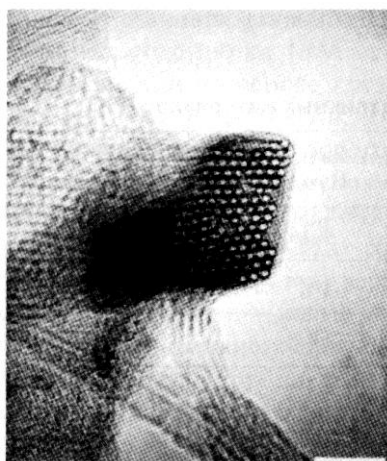


Рис. 50 – Изображение пучка одностенных нанотрубок, полученного самосборкой, в высокоразрешающем просвечивающем микроскопе (цена масштабного деления 10 нм)

Уникальные механические свойства нанотрубок уже нашли применение при создании армированных полимеров. Полученные материалы представляют собой композиты с низкой плотностью и высокой прочностью. К настоящему моменту разработано большое число композитов на основе углеродных волокон – детали самолетов и космических аппаратов, корпуса гоночных автомобилей, рамы велосипедов, рыболовные удочки, корабельные мачты, автомобильные пружины и т.д.; все эти материалы содержат объемные углеродные волокна диаметром 5-10 мкм. Хотя эта технология развивается уже с начала 50-х годов, заметно большее отношение длины к диаметру нанотрубок существенно расширяет возможности армирования.

Использование нанотрубок в текстильной промышленности имеет большие перспективы, но перед этим необходимо превратить сырой продукт (порошок) в волокно и пряжу. Возможное решение – перевести процесс прядения на наноуровень. В первых экспериментах многостенные нанотрубки, выросшие наподобие бамбукового леса, были вытянуты в волокна и спрядены в прочные и очень гибкие нити (рис. 51). Одним из возможных применений является «суперамуниция» будущего солдата. Эта униформа будет обладать целым рядом функций, включая реакцию на внешнее воздействие (дегазацию ОВ, контроль внутреннего климата и т.д.).

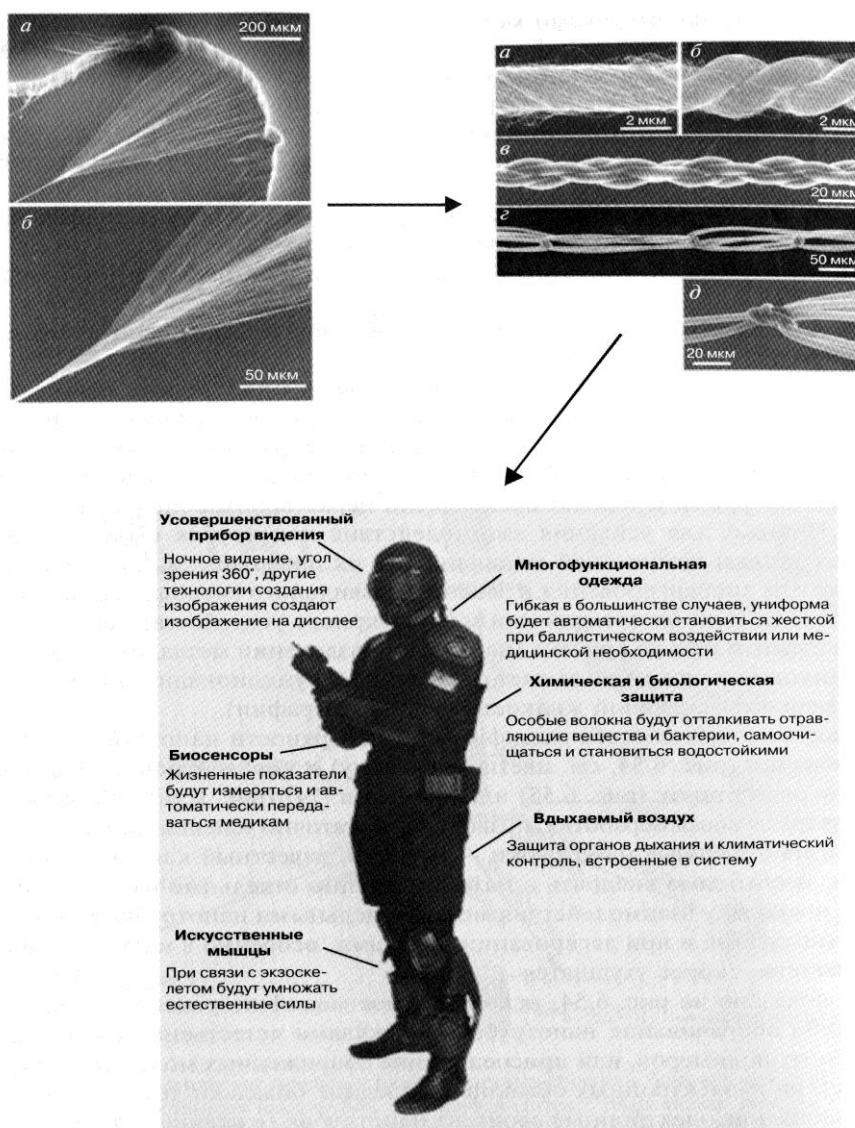


Рис. 51 – Вверху: изображение процесса прядения нитей из многостенных нанотрубок в сканирующем электронном микроскопе и изображение нитей с большим увеличением

Кроме повышения прочности и жесткости, при введении углеродных нанотрубок в полимерную матрицу получаемый материал приобретает электропроводность, улучшается теплопроводность, повышается его устойчивость к действию растворителей, снижается температура стеклования полимера (t_g). Кроме того, из-за большого отношения длины к диаметру для достижения нужных эффектов необходимо вводить гораздо меньшее количество нанотрубок по сравнению со стандартными добавками – сажей или углеродными волокнами. Новые материалы, вероятно, будут использоваться для изготовления гибких плоских дисплеев, обладающих свойствами тканых материалов, одежды, способной контролировать внутреннюю температуру и автоматически нагреваться и охлаждаться. В автомобильной промышленности композиты на основе нанотрубок уже используются, например, для упрочнения боковых зеркал.

Нанотрубками можно упрочнять не только органические полимеры. Хотя керамические материалы достаточно прочны и устойчивы к химическим и термическим воздействиям, лигирование нанотрубками улучшает их свойства хрупкости. Например, при добавке 5-10 % нанотрубок к алунду (спеченный Al_2O_3) прочность материала на излом возрастает в пять раз, электропроводность – в семь раз, причем теплопроводность становится одноосной.

При создании новых композиционных материалов возникают три проблемы:

- 1 как обеспечить гомогенное распределение нанотрубок в (полимерной) матрице;
- 2 как осуществить контроль направления (ориентации) нанотрубок в матрице;
- 3 как разделить пучки и клубки на отдельные одностенные нанотрубки.

Для эффективного перераспределения нагрузки и увеличения прочности композита необходимо, чтобы взаимодействие между армирующими

волокнами и полимерной матрицей было достаточно сильным. Однако, нанотрубки (аллотропная форма С) практически нерастворимы ни в одном из растворителей. Поэтому для усиления взаимодействия нанотрубок с матрицами используются методы химической модификации их поверхности.

Существуют два способа модификации поверхности нанотрубок – за счет нековалентной (рис. 52) и ковалентной функционализации боковых стенок (рис. 53) или дефектов (рис. 54). Оба способа, а также ультразвуковая обработка позволяют достаточно успешно разделять пучки и клубки на отдельные нанотрубки (процесс известный как расслоение). Как правило, необходимо внедрять в матрицу именно отдельные нанотрубки, а не клубки, поскольку взаимодействия между отдельными нанотрубками в клубках достаточно слабые и при легировании клубками, особенно в малых концентрациях, свойства скорее всего ухудшаются.

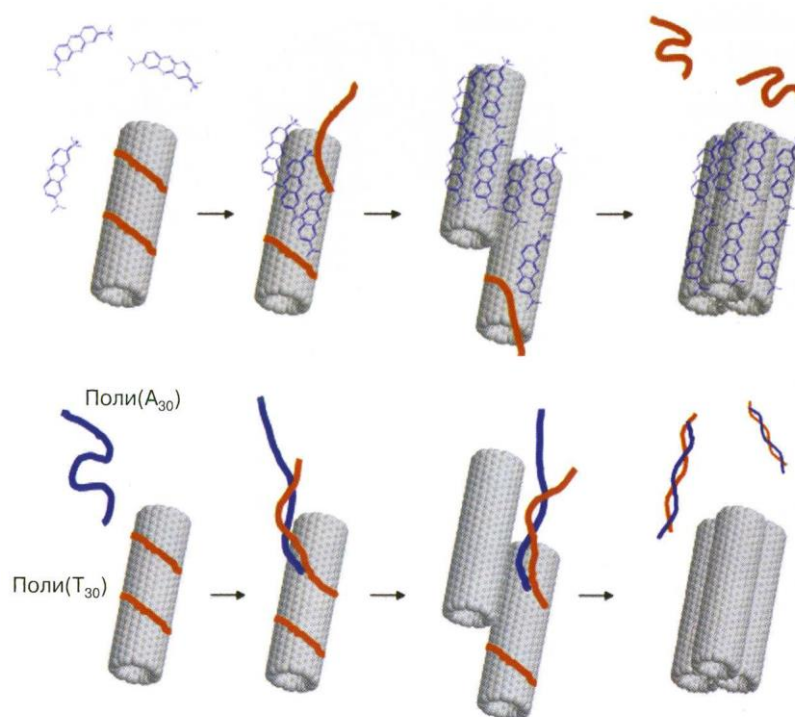


Рис. 52 – Примеры нековалентных взаимодействий между макромолекулярным стабилизатором и углеродными нанотрубками. Показаны: *а* – лиофилизация одностенных нанотрубок с помощью поли(Т30)однониточных ДНК и замещением биомолекулы за счет предпочтительных π-π-взаимодействий нанотрубки и сопряженным красителем (метиленовым голубым), что позволяет провести контролируемое осаждение из раствора; *б* – другой метод растворения-осаждения с использованием комплементарной нити ДНК

Как показано на рис. 52, нековалентное модифицирование представляет собой либо оборачивание нанотрубок молекулами естественных или искусственных полимеров, или присоединение сопряженных молекул за счет взаимодействия π -орбиталей. Последние не влияют на электронные свойства нанотрубок (в отличие от ковалентного модифицирования).

Однако, поскольку при ковалентной функционализации на поверхность нанотрубки помещают специфические химические группы, этот способ представляет больше возможностей для селективного регулирования свойств, а также контроля на молекулярном уровне за расположением и упаковкой нанотрубок при создании устройств.

Движущая сила модификации боковых стенок и «крышек» – напряжение, вызванное большой кривизной поверхности. Отклонение окружения атома углерода от плоского описывается углом пирамидализации φ_p , который равен нулю для sp^2 -гибридных атомов углерода, например, в этилене и $19,5^\circ$ (то есть $109,5-90^\circ$) для sp^3 -гибридного атома в метане (рис. 55). Поскольку для атома углерода в C_{60} $\varphi_p = 11,6^\circ$ геометрия атома ближе к тетраэдрической, чем к плоской треугольной. Как следствие фуллерены легко вступают в реакции присоединения и напряжение снимается.

Поскольку «крышку» нанотрубки можно рассматривать как половину молекулы фуллерена с $\varphi_p \geq 9,7^\circ$ независимо от диаметра нанотрубки, эти участки поверхности легко вступают в реакции электрофильного присоединения. Напротив, угол пирамидализации атомов боковых стенок заметно меньше, около $3-6^\circ$ в зависимости от диаметра и хиральности трубки. Для (5,5)-трубки с конформацией кресла наблюдаются два типа связей углерод-углерод: перпендикулярные и параллельные оси трубки. Они различаются и по степени перекрытия π -орбиталей соседних атомов углерода, что количественно описывается углом рассогласования π -орбиталей ϑ (рис. 55). Хотя для фуллеренов $\vartheta = 0^\circ$, рассогласование соседних π -орбиталей в одностенных нанотрубках может быть значительным – вплоть до $21,4^\circ$ для (5,5)-трубок.

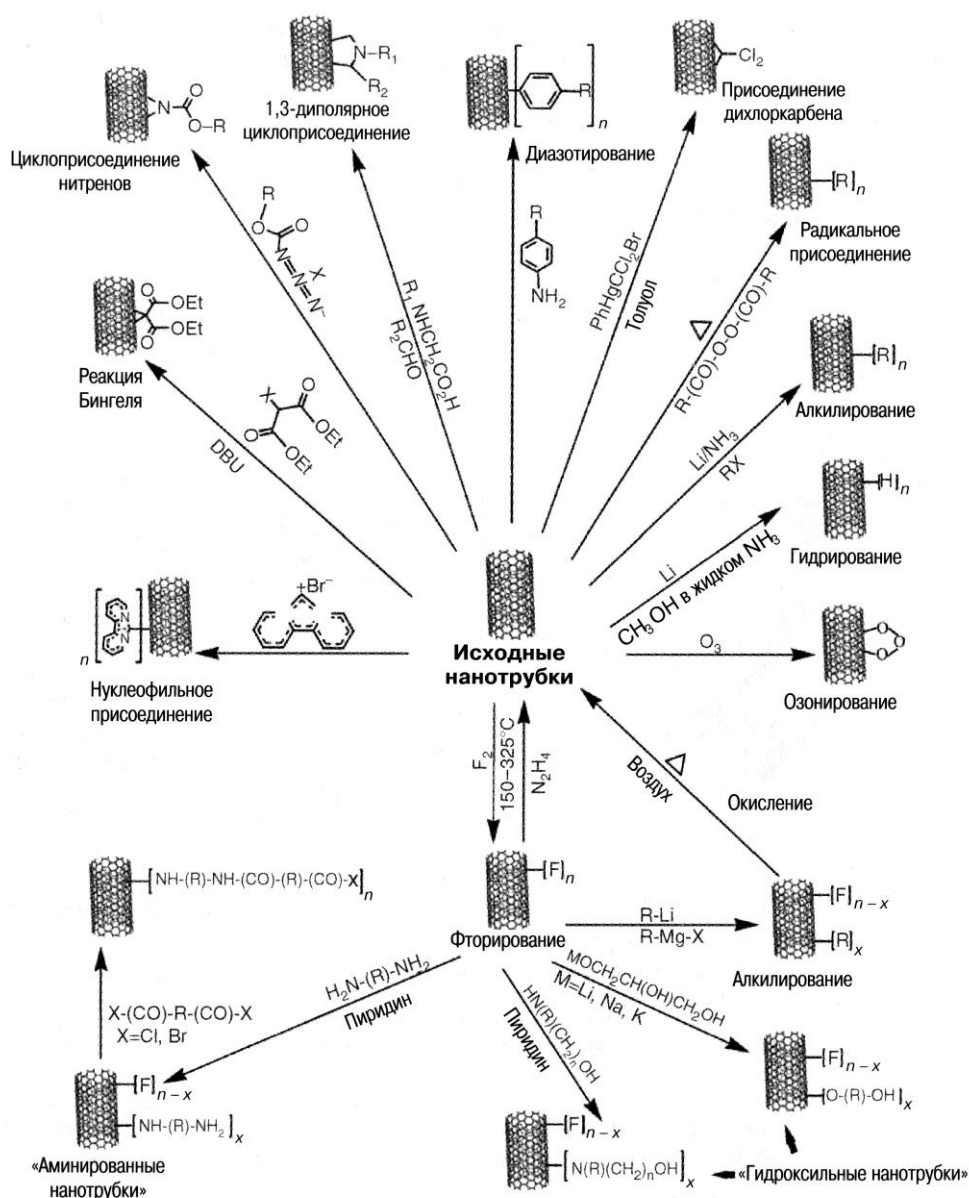


Рис. 53 – Схематическое представление различных способов боковой функционализации одностенных нанотрубок

Как правило, нанотрубки малого диаметра обладают большей реакционной способностью стенок, чем более широкие, из-за достаточно больших углов рассогласования π -орбиталей (что имеет большее значение, чем σ_p). Важно отметить, что кривизна одностенных нанотрубок меньше, чем у фуллеренов, поэтому нанотрубки химически более инертны.

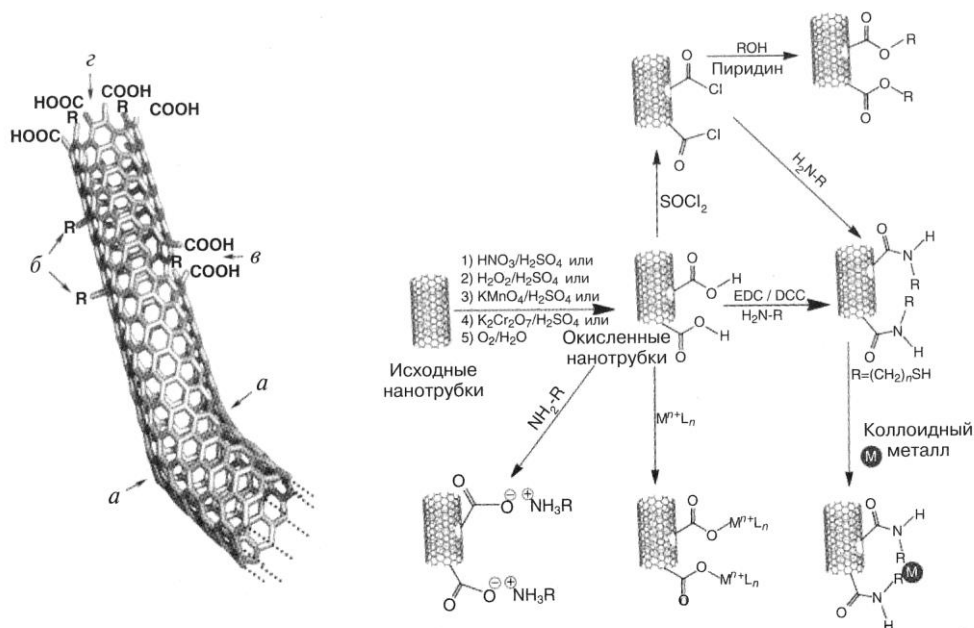


Рис. 54 – Различные дефектные области поверхности одностенной нанотрубки и методы функционализации этих дефектов: *a* – пяти- или семичленные циклы, приводящие к изгибам; *b* – дефекты при sp^3 -гибридных атомах (гидроксильные группы, атомы водорода); *в* – окислительное разрушение поверхности с покрытием отверстий группами – COOH ; *г* – открытый конец трубки с карбоксильными группами (возможно также образование концевых групп $-\text{OH}$, $=\text{O}$, $-\text{NO}_2$ и $-\text{H}$)

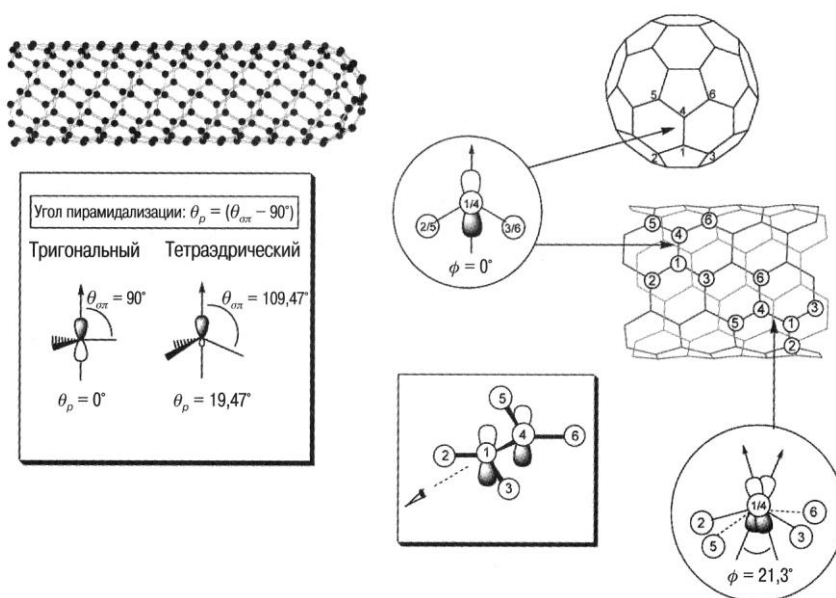


Рис. 55 – Схематическое изображение: *a* – металлической (5,5) одностенной нанотрубки; *b* – углов пирамидализации типичных sp^2 - и sp^3 - гибридных атомов углерода; *в* – рассогласование орбиталей вдоль связи C1-C4 в (5,5)-одностенной нанотрубке и фуллереновой «крышке»

5.2 Рост одномерных наноструктур

Существуют три первичных метода создания нанотрубок: лазерное испарение графитовых мишеней, электродуговой процесс и химическое нанесение из пара. Первые два метода используются и в синтезе фуллеренов, и это неудивительно, поскольку нанотрубки можно рассматривать как их одномерные производные. Для получения одностенных нанотрубок необходимо присутствие металлических катализаторов (Co, Ni, Fe, Y, Mo, некоторых сплавов и т.д.), чтобы предотвратить замыкание отверстия полусферы, которое привело бы к получению фуллеренов. Для роста многостенных трубок присутствие катализатора не является необходимым, но продукты синтеза, помимо целевого, содержат и большое количество фуллеренов и аморфного углерода.

В то время как в дуговых методах обычно получается смесь различных продуктов – одно- и многостенных нанотрубок с разными диаметром и структурой, аморфной сажей и т.д., подход, основанный на двойном пульсирующем лазерном испарении, позволяет получить одностенные трубки с выходом более 70 %. Хотя для получения небольших количеств нанотрубок пригодны оба метода, перейти к промышленному синтезу пока представляется затруднительным. Кроме того, нанотрубки получаются в виде спутанных клубков в смеси с другими формами углерода и остатками металла-катализатора.

По этим причинам в последнее время наиболее широко применяется метод роста из газовой фазы. Он состоит в разложении (обычно термическом) углеводородов на поверхности наночастиц металлических катализаторов. Чаще всего в качестве исходных веществ используются метан и ацетилен, но в последнее время рассматриваются оксид углерода, этилен, метанол и этанол. Как и в других вариантах, CVD-метод получения нанотрубок легко распространяется на промышленные масштабы и может

использоваться для получения килограммовых количеств, необходимых для удовлетворения постоянно расширяющихся сфер применения.

Методом CVD можно выращивать упорядоченные массивы нанотрубок на частицах катализатора, иммобилизованных на поверхности. Эта стратегия была использована для получения массивов как одно- так и многостенных трубок в различных экспериментальных условиях (рис. 56). Процесс роста начинается с закрепленной в нужном месте частицы катализатора, при этом размер растущей трубки связан с диаметром этой частицы. Самоорганизация нанотрубок возникает из-за сильных Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, как между разными трубками, так и между стенками одной трубки (рис. 56а), взаимодействий с подложкой (рис. 56 б), а также под воздействием электрических полей (рис. 56 в). Так можно вырастить наноструктуры вдоль выделенных направлений с определенных точек роста, что очень важно при создании будущих интегральных схем и других электронных устройств.

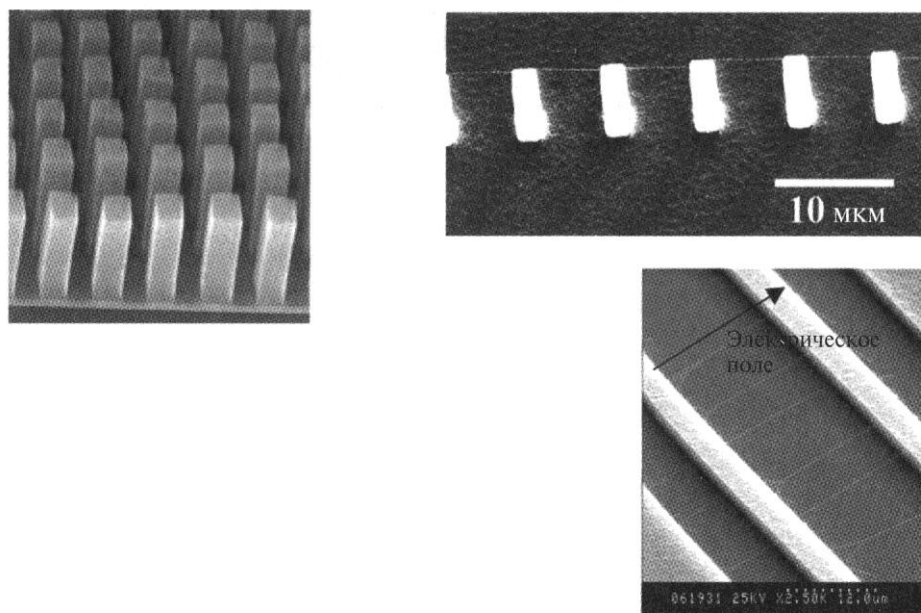


Рис. 56 – Примеры упорядоченного роста углеродных нанотрубок: *а* – пучки многостенных нанотрубок, выращенных на квадратной сетке кластеров железа; *б* – боковой вид «линии электропередач из одностенных нанотрубок на кремниевых опорах» в сканирующем электронном микроскопе; *в* – упорядоченный рост нанотрубок в электрическом поле

Как и упомянутые ранее нити из нанотрубок, упорядоченные массивы (называемые лесами) представляют собой пример самоорганизации (за счет Ван-дер-ваальсовых взаимодействий между трубками).

Леса из нанотрубок выращивают, нанося на поверхность подложки катализатор, а затем – проводя химическое нанесение из газовой фазы (рис. 57). Имеются сообщения об одноэтапном синтезе упорядоченных пучков многостенных трубок и У-образных трубок при использовании металлоценовых катализаторов $M(C_5H_5)_2$ ($M = Fe, Co, Ni$), что исключает необходимость иммобилизации наночастиц катализатора на поверхности. Поскольку исходные вещества выступают как в роли источника углерода, так и катализатора, рост нанотрубок начинается одновременно во многих местах. Последующий рост самопроизвольно протекает в одном направлении за счет взаимодействия между соседними трубками.

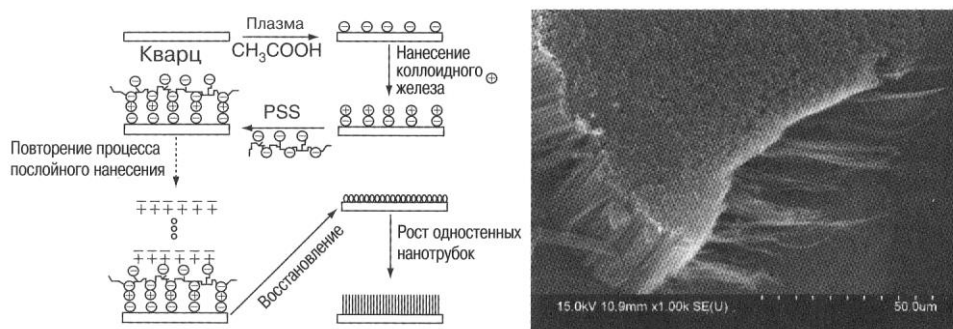


Рис. 57 – Схема метода послойного нанесения кластеров железа и вид сбоку (в сканирующем электронном микроскопе) поверхности с выращенными одностенными нанотрубками

Недостатком метода CVD является недопустимое для многих областей применение многостенных нанотрубок. Поскольку их диаметр определяется размером частиц катализатора, удалось осуществить рост нанотрубок на поверхностно-иммобилизованных частицах $Fe_2O_3@PAMAM$ строго определенного размера; при этом были получены только одностенные нанотрубки с исключительно узким распределением по диаметру. Недавно были разработаны два перспективных промышленных метода CVD

получения одностенных трубок: CoMoCATT (CVD с кипящим слоем) и HiPCOT (конверсия CO при высоком давлении, рис. 58).

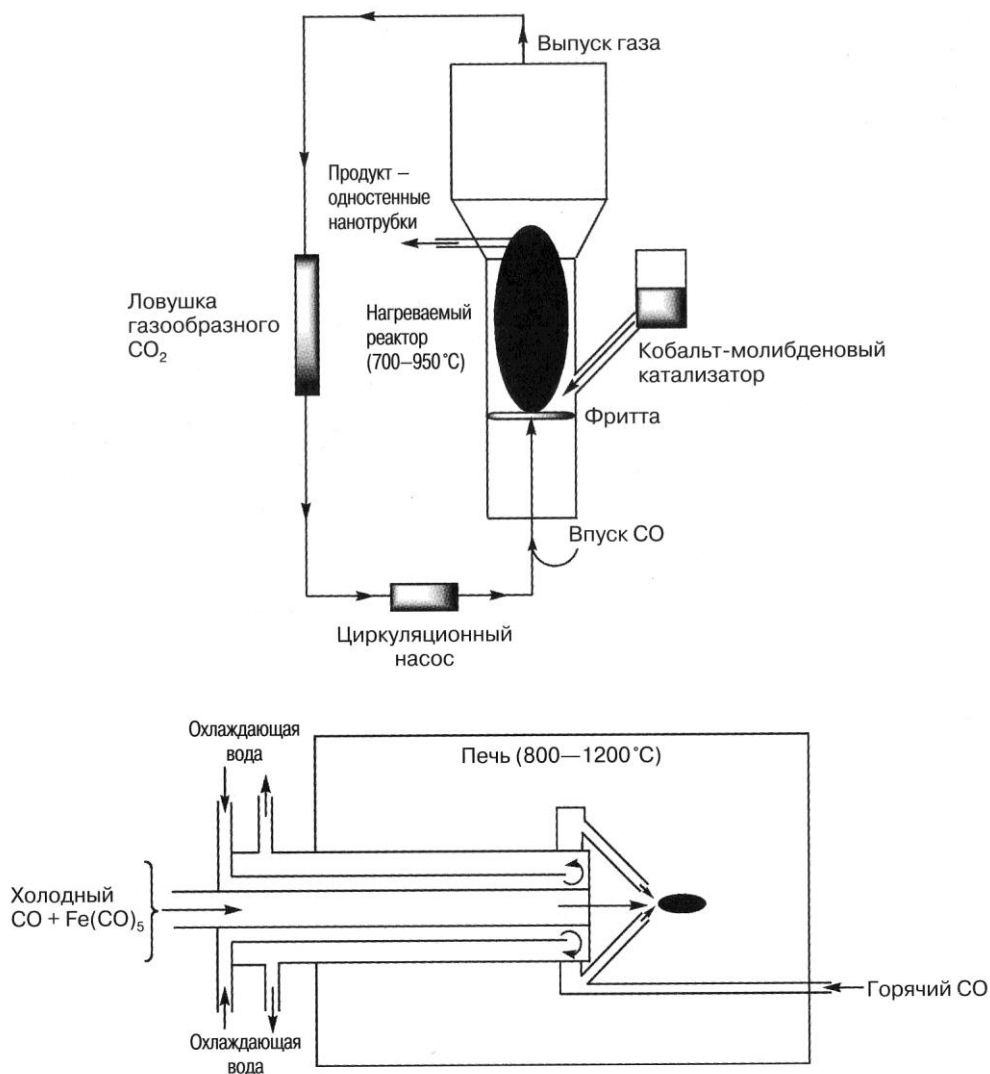


Рис. 58 — Схематическое представление двух методов, используемых для промышленного получения нанотрубок: *а* — CoMoKat с кипящим слоем; источником углерода является CO , катализатором Co/Mo ; *б* — процесс HiPCo с «плавающим катализатором»: используется термическое разложение пентакарбонила железа при давлении 10-100 МПа

5.3 Механизм роста нанотрубок

Наиболее распространенные предположения опираются на механизм пар-жидкость-кристаллы (ПЖК), впервые предложенный для описания роста нитевидных кристаллов (вискеров) полупроводников (рис. 59 [1]). Эта модель предполагает образование жидкого катализатора, который выступает

в роли предпочтительной области сорбции газофазных предшественников (прекурсоров). Последовательный рост нанотрубок или нанопроволок происходит за счет пересыщения капли катализатора и выделения твердой фазы на границе кристалл-жидкость. Однако, количества углерода в пересыщенном нанокластере катализатора совершенно недостаточно для получения столь длинных наноструктур, получаемых в эксперименте. Очевидно, что для осуществления роста нанотрубок должен существовать постоянный приток атомов прекурсора к нанокластеру.

Исходя из фазовой диаграммы бинарной системы прекурсор – катализатор, легко определить диапазон температур проведения роста – от эвтектической температуры и выше, где катализатор остается жидким (рис. 60). Аналогично росту наночастиц золота, с уменьшением их диаметра температура плавления быстро снижается (по сравнению с объемным металлом). Соответственно, для определения условий роста нанопроволок необходимо использовать эвтектические температуры, скорректированные с учетом размера частиц катализатора.

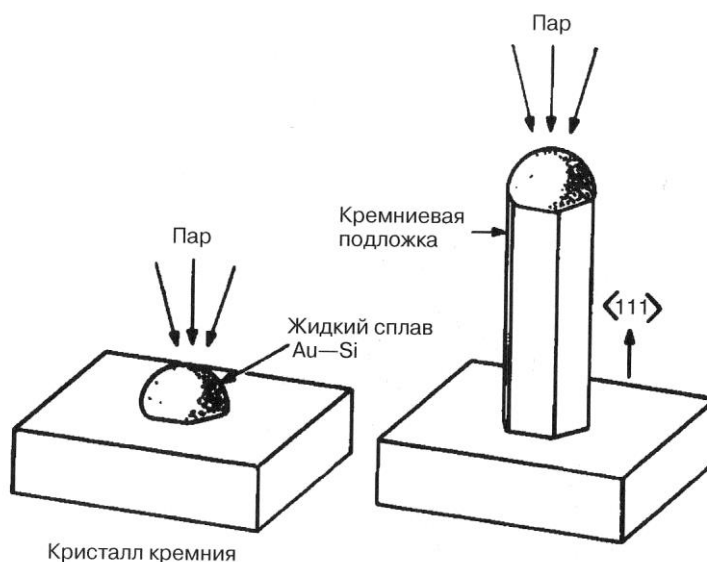


Рис. 59 – Оригинальная схема, использованная для описания метода ПЖК роста полупроводниковых нанопроволок

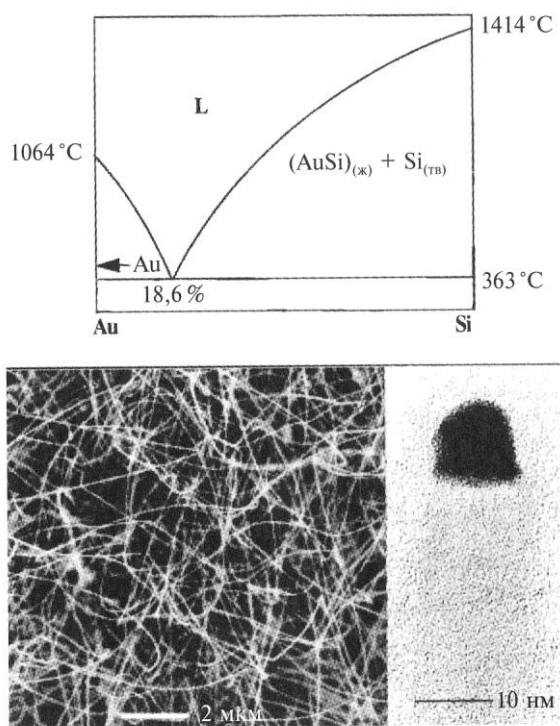


Рис. 60 – Каталитический рост нанопроволок кремния на нанокластерах золота: *а* – фазовая диаграмма системы Au–Si, указана температура плавления и состав эвтектики; *б* – изображение в сканирующем электронном микроскопе; *в* – изображение нанопроволок, выращенных при 450°C, в высокоразрешающем электронном микроскопе. Темная головка нанопроволоки представляет собой нанокластер золота

Хотя механизм ПЖК достаточно хорошо описывает рост нанопроволок, известно довольно много сообщений об успешном росте углеродных нанотрубок при температурах ниже эвтектики, скорректированной с учетом размера частиц катализатора.

Поскольку рост одномерных структур с трудом поддается изучению *in situ*, для установления механизма роста широко используются теоретические расчеты. При росте углеродных нанотрубок на поверхности пересыщенной частицы катализатора образуются островки графена. Когда такой островок закрывает половину поверхности катализатора, он отрывается от нее и образует собственно нанотрубку того же диаметра, что и зерно катализатора. На основании эмпирических данных и результатов расчетов показано, что каталитическая активность в процессах роста нанотрубок снижается в ряду: Ni/Mo > Ni/Cr > Ni/Co > Ni/Pt > Ni/Rh > Ni/Fe > Ni > Fe/Mo > Fe/Cr > Fe/Co > Fe/Pt > Fe/Rh > Fe > Co/Mo > Co > Pt > Cu. В зависимости от того, проходит ли процесс по механизму ПЖК или присоединения к поверхности, ряд

активности можно связать с простотой образования карбидов и диффузии углерода через объем нанокластера, или же, соответственно, с морфологией и составом поверхности катализатора и скорости диффузии атомов углерода по его поверхности. На рис. 61 представлены некоторые детали предполагаемых механизмов, основанных на экспериментальных и теоретических данных. Предположения, основанные на методе ПЖК (рис. 61 верхн. и ср.ч.), содержат следующие основные этапы.

- На первых этапах роста углерод растворяется в расплавленном кластере катализатора. Данные расчетов показывают, что происходит динамический процесс выделения и растворения углерода на поверхности кластера – до тех пор, пока не образуется сильно пересыщенный раствор.

- Углерод выделяется на поверхности пересыщенного раствора с образованием цепочек и циклических структур. Это приводит к понижению концентрации растворенного углерода.

- Углеродные зародыши образуют графеновые островки на поверхности катализатора, которые сливаются в более крупные графитовые фрагменты.

- При низких температурах графитовые островки не могут оторваться от поверхности катализатора, и образуются покрытые графитом нанокластеры металла.

- При относительно высоких температурах (500-1200 °C), когда диаметр островка становится приблизительно равным половине диаметра частицы, графитовый зародыш отрывается от поверхности катализатора и образует верхнюю «крышку» нанотрубки. Последующая графитизация и рост могут протекать двумя путями (рис. 61 средняя часть).

- а) «рост от корня» (рис. 61 в, г): атомы углерода выделяются из расплавленного катализатора и присоединяются к открытому концу растущей трубки;

- б) «рост из складки» (рис. 61 д, ж): атомы углерода выделяются непосредственно на поверхности катализатора и присоединяются к графитовой «крышке».

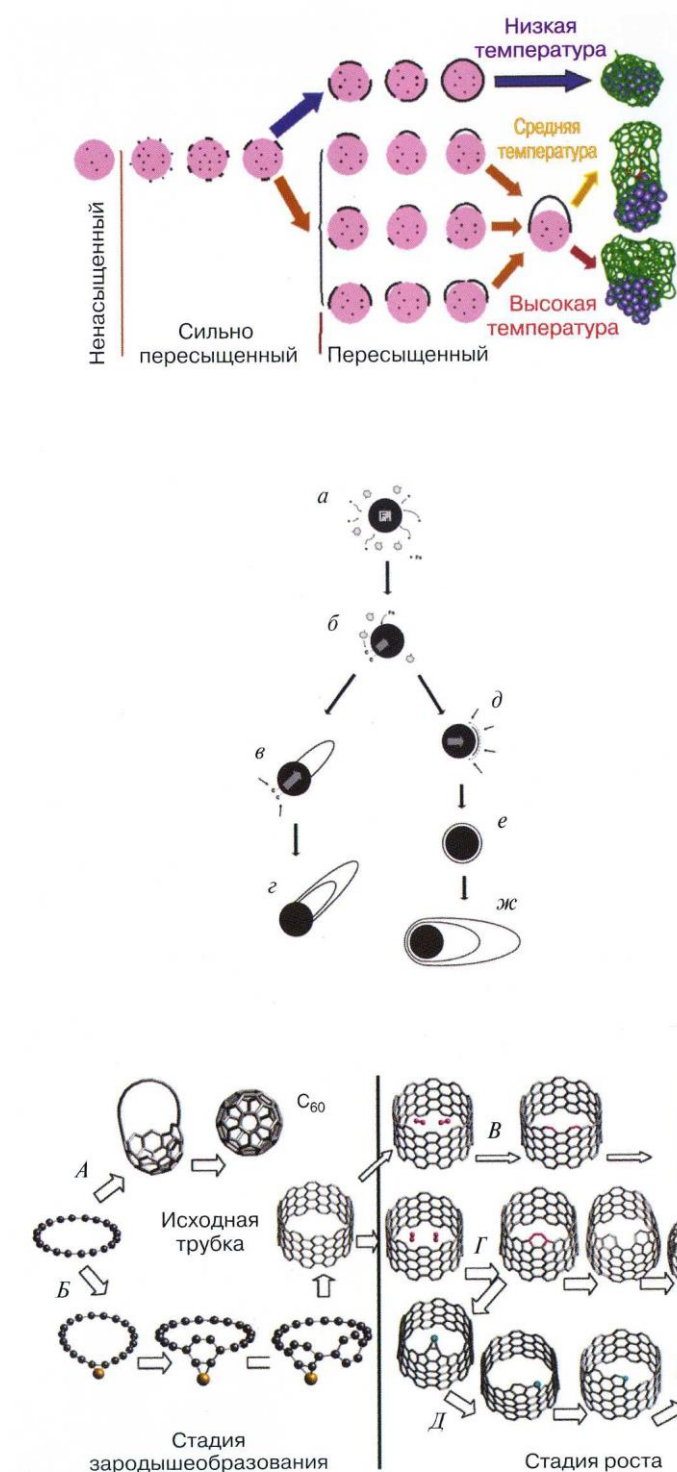


Рис. 61 – Сравнение механизма ПЖК (верхняя и средняя часть) и роста на поверхности

Напротив, рост на поверхности характеризуется пренебрежимо малой растворимостью углерода в объеме катализатора. Поскольку не предполагается, что рост происходит с участием пересыщенного раствора и выделения, любые частицы, хемосорбированные на поверхности, могут оказать очень сильное влияние на рост одностенных нанотрубок. В нижней

части рис. 61 представлен предполагаемый механизм их роста за счет постоянного присоединения фрагментов C_2 к растущему краю нанотрубки. Как указано на схеме, отсутствие активного катализатора приводит к образованию фуллеренов, а не нанотрубок. Предполагается, что рост нанотрубок начинается с поверхностных атомов металла, которые присоединяются к краю полииногового цикла, к которому могут присоединяться новые атомы углерода.

В то время как процесс (B) в нижней части рис. 61 соответствует присоединению фрагмента C_2 к растущему краю, процесс (Г) соответствует образованию дефекта, приводящего к закрытию трубки. В отсутствие металлического катализатора энергетически этот путь более выгоден (на 1,3 эВ), чем путь (B), что и объясняется высоким выходом фуллеренов.

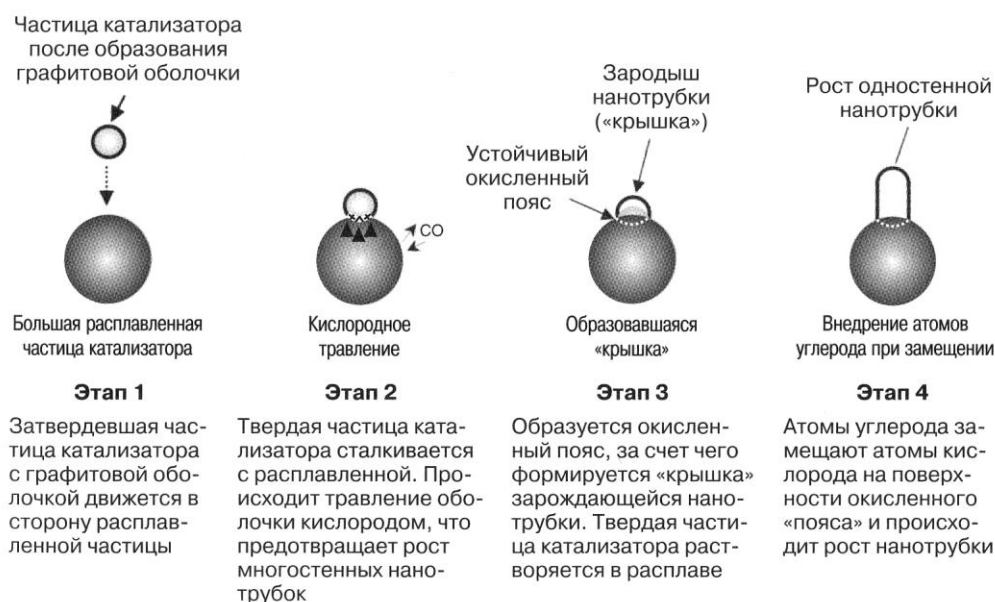
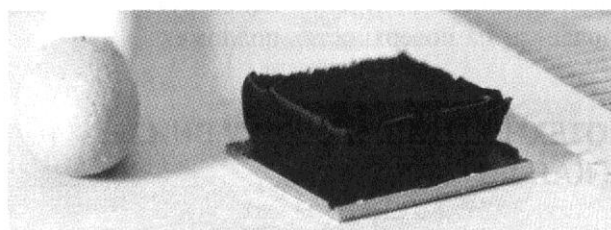


Рис. 62 – Фотография леса нанотрубок с длиной около сантиметра, для сравнения рядом помещена головка спички (а); предполагаемый механизм роста нанотрубок на катализаторах (нанокластерах оксидов металлов) в процессе лазерной абляции, т.е. послойного испарения (б)

Скорее всего, причина состоит в образовании пятичленных циклов, которые образуются при присоединении атомов углерода к растущему концу трубки. Расчеты показали, что катализируемое разрешение дефекта представляет собой самый критический этап всего механизма (процесс *Д* рис. 61). Это, по-видимому, происходит по «механизму самоката (скутера)», когда атомы катализатора мигрируют вдоль открытого конца нанотрубки и способствуют образованию шестичленных циклов, что предотвращает преждевременное закрытие отверстия.

По-видимому, для описания полного механизма роста нанотрубок необходимо введение еще одной переменной. Данные последних исследований показывают, что существенную роль в этом процессе играют металлоксидные катализаторы или кислородсодержащие вещества. Например, в присутствии паров воды лес нанотрубок, выращенный методом CVD, получается более густым, их длина достигает 2,5 мм, а время роста составляет всего 10 мин (рис. 62 *а*). Каталитические свойства водных паров прекрасно демонстрирует весовое соотношение нанотрубки/катализатор, равное 50000 % – в 100 раз больше, чем в процессе HiPCO. Влияние кислородсодержащих веществ, например, паров воды, связывают с уменьшением количества аморфного углерода и контролем степени выделения углерода, что предотвращает рост многостенных трубок. Возможно, их роль и более специфична – например, подавление некоторых механизмов зародышеобразования. В частности, предполагается, что рост многостенных нанотрубок может начинаться с травленных кислородом графеновых листов, покрывающих частицу катализатора – процесс, недавно получивший название «зародообразование на травленных графеновых оболочках» (рис. 62 *б*).

Нанотрубки образуют не только углерод. В последнее время получены нанотрубки многих других неорганических веществ – металлов, оксидов, карбидов, боридов и т.д. Эти материалы используются во многих системах, например, в качестве сенсоров и катализаторов. Из-за отсутствия sp^2 -

гибридных атомов углерода и невозможности сворачивания сеток, сходных с графитовыми, процессы самосборки на частицах катализатора здесь невозможны. Чаще всего эти структуры получают, покрывая углеродную нанотрубку тонким слоем выбранного материала, после чего углеродный шаблон удаляют при отжиге. Как уже было показано для процесса роста нанокластеров, использование шаблонов – очень удобный способ получения наноструктур, а также достижения упорядочения наночастиц на поверхностях подложек.

Вопросы для самопроверки:

1. Краткая характеристика одномерных наноблоков (нанотрубка, нановолокно, нанопроволока, наностержень).
2. Углеродные нанотрубки, классификация, механические и электропроводящие свойства.
3. Перспективные направления использования углеродных нанотрубок (создание плоских дисплеев, полевых транзисторов, армированных полимеров и текстильных волокон).
4. Проблемы, возникающие при создании новых композитных материалов.
5. Способы модификации поверхности нанотрубок.
6. Рост одномерных нанотрубок. Первичные методы выращивания нанотрубок: лазерное испарение графитовых мишеней, электродуговой процесс и химическое нанесение из пара.
7. Предполагаемые механизмы роста нанотрубок (пар–жидкость–кристаллы).
8. Предполагаемые механизмы роста нанотрубок (присоединения к поверхности).
9. Ряд каталитической активности металлов для процесса роста нанотрубок.

Часть II. ВВЕДЕНИЕ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИЮ

1 Основные понятия нанобиотехнологии

Сближение биотехнологии и нанотехнологии началось сравнительно недавно. Тем не менее, этот процесс уже принес замечательные результаты.

Под термином «нанобиотехнология» предлагается понимать совокупность передовых усовершенствованных биотехнологических методов и продуктов. Они включают разнообразные подходы и приемы для создания более чувствительных и точных наносистем, работающих в реальном времени, таких как «лаборатории на чипе» (*lab-on-chip*) и наносенсоры. Речь также идет об использовании наноупорядоченных матриц для управляемого производства лекарств, инженерии и регенерации живых тканей.

Под термином «бионанотехнология» предлагается подразумевать современные нанотехнологии, основанные на использовании биологических строительных блоков, принципов биоспецифичности и биологической активности. Область применения бионанотехнологий не ограничивается только решением задач биологии. Например, в будущих бионанотехнологиях инструменты из олигонуклеотидов ДНК, пептидных нанотрубок и белковых фибрилл могут использоваться для сборки в наноконструкции металлических нанопроводников и других наноэлементов, применяемых в молекулярной электронике и наноэлектрохимии.

На сегодняшний день выделяются основные приоритеты развития нанобиотехнологии и наномедицины: (А. И. Арчаков «Доктрина развития в РФ работ в области нанотехнологии»):

- биологические наночипы для диагностики соматических и инфекционных заболеваний, в том числе для видовой идентификации возбудителей особо опасных инфекций и токсинов;
- наночастицы как лекарственные препараты нового поколения, а также как контейнеры для адресной доставки лекарств в клетки-мишени;

- медицинские нанороботы, способные устранять дефекты в организме больного человека путем управляемых нанохирургических вмешательств;
- молекулярные детекторы для секвенирования генома на основе неорганических нанопор;
- саморазмножающиеся геномы, применимые в области биотехнологии и медицины с целью производства лекарств, проведения фармакологического скрининга и моделирования патологических процессов;
- биосовместимые наноматериалы широкого спектра применения (в том числе для создания искусственных органов, принципиально новых типов перевязочных материалов с антимикробной, противовирусной и противовоспалительной активностью).

1.1 Медицинская диагностика на основе наноустройств

Проведение медицинской диагностики заболеваний путем непосредственного наблюдения за молекулярными системами позволяет снизить ограничения традиционных методик, связанные с низкой чувствительностью и производительностью.

Внедрение нанотехнологических подходов в практику медицинской диагностики позволяет обеспечить следующие практические результаты:

- повышение чувствительности и экспрессности анализа позволяет осуществлять раннюю диагностику заболеваний, что уже в ближайшее время может быть использовано для обнаружения онкологических, эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний, вирусных и бактериальных инфекций;
- повышение производительности позволяет проводить комплексное обследование по набору диагностических критериев, что может быть использовано для индивидуализированного подхода к лечению и профилактике.

Основные подходы различаются по типам регистрирующих устройств, в качестве которых могут использоваться атомно-силовые микроскопы, оптические устройства, в том числе оптико-механические на базе компакт-

дисков к персональным компьютерам, и электрохимические биосенсоры, нанопровода, магнитные наночастицы.

Принцип регистрации основан на изменении физико-химических свойств наноустройств при специфической сорбции молекулярных маркеров патологического процесса.

Особым типом наноустройств являются устройства, основанные на применении полимеразной цепной реакции. Такие устройства (биочипы) позволяют оценить генетический статус обследуемого пациента и/или патогенного микроорганизма и спланировать мероприятия по индивидуализированной профилактике и лечению.

Ожидаемые результаты. С учетом существующего в России задела в период 3—5 лет будут интенсивно развиваться, сертифицироваться и внедряться в практику методики медицинской нанодиагностики онкологических заболеваний, вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекций, методы оценки лекарственной устойчивости бактериальных возбудителей (в том числе туберкулеза), системы фармакологического мониторинга для оценки индивидуальной переносимости лекарств.

1.2 Системы адресной доставки лекарств

Направленный транспорт лекарств в очаг развития патологического процесса позволяет добиться повышения эффективности уже существующей лекарственной терапии. Мировой объем продаж лекарств с модифицированной системой доставки в настоящее время составляет 20% от общего объема рынка фармпрепаратов.

В России разработки систем адресной доставки ведутся по двум направлениям: 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 том числе вакцин). В долгосрочной перспективе существующий в России научный задел позволяет довести до коммерческих прототипов специфические системы доставки на основе антител или аптамеров, способных избирательно связываться с патологически измененными клетками.

1.3 Наночастицы как лекарства

В период 1998–2005 гг. 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.

1.4 Медицинские нанороботы

Медицинские нанороботы являются кибернетическими устройствами нанометрических размеров, изготовленными 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 нанотехнологий позволяет практически 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.

1.5 Молекулярные детекторы на основе нанопор

Данная категория молекулярных детекторов выделена в отдельную группу в связи с ее значимостью для решения задачи прочтения индивидуальных геномов. Регистрация прохождения молекулы через нанопору достигается за счет изменения электрических характеристик между поверхностями пенетрируемой поверхности (более грубый вариант детекции) либо между подведенными к нанопоре наноэлектродами.

При последнем способе регистрации чувствительности детектирования достаточно для того, чтобы различать различные типы нуклеотидов в составе цепочки ДНК.

При этом чтение последовательности нуклеотидов происходит со скоростью в сотни тысяч раз быстрее, чем при использовании стандартных методов секвенирования.

Основным технико-экономическим показателем эффективности разработок в данной области является снижение затрат на чтение индивидуального генома человека с текущего значения 500 млн. евро за 5 месяцев до значения 30 тыс. рублей за день.

В России в настоящее время нет детектирующих устройств подобного типа, отсутствуют также научные публикации в этой области. В ряде учреждений ведутся работы, направленные на компьютерное моделирование процесса проникновения ДНК через нанопору, при этом отсутствуют приборные комплексы, предназначенные для создания нанопор.

1.6 Биосовместимые наноматериалы

Особые свойства наноматериалов могут быть использованы для выращивания искусственных органов и тканей. За рубежом разработана методика восстановления хрящевой ткани, которая имела механические и биохимические свойства, близкие к естественному хрящу. В России научно-практический задел по направлению сделан в области использования наноматериалов для восстановления механических свойств зубной эмали. Ведутся разработки и в области разработки технологии обработки поверхностей методом нанонапыления с целью придания им антибактериальных свойств.

В бионанотехнологии используются главным образом природные молекулы, в основном ДНК, белки и небольшие пептиды. Пока еще мало изучено направление, возникающее на стыке молекулярной биологии, генной инженерии и дисциплин, изучающих строительные блоки, из которых путем самосборки образуются компоненты живых систем. Методы молекулярной биологии и генной инженерии позволяют наделять различными биологическими функциями белки, обладающие свойством самосборки. Полученные в результате компоненты, способные выполнять определенные функции в живых системах, можно встраивать в различные наноструктуры. Предполагается, что в будущем это направление станет одним из центральных. В принципе, такой подход позволит получать не просто упорядоченные наноструктуры, а наноструктуры с различными функциями, из которых можно будет собирать наноконвейеры для обработки отдельных молекул.

Значительный прогресс в области нанобиотехнологии ожидается и от слияния теоретических и методологических основ физики и молекулярной биологии. Множество методов, исходно разработанных для небиологического применения, могут принести огромную пользу в биологических исследованиях. И наоборот, множество рутинных методик,

применяемых в молекулярной биологии, можно значительно усовершенствовать благодаря внедрению в них достижений нанотехнологии. Так, достаточно трудоемкие методы модификации и амплификации ДНК радикально изменятся благодаря использованию микроканальных дозаторов и «лабораторий на чипе». Можно предвидеть, что скоро станет возможной полностью автоматизированная обработка образцов ДНК с использованием наночипов-конвейеров.

Вопросы для самопроверки:

1. Сформулируйте определение «бионанотехнологии».
2. Какие биологические структуры можно отнести к наноструктурам?
3. На каких наноустройствах базируется медицинская диагностика?
4. Какие существуют системы адресной доставки лекарств к мишеням?
5. Виды наночастиц для доставки лекарств.
6. Сформулируйте определение «медицинские нанороботы».
7. Какие известны детекторы на основе нанопор?
8. Сформулируйте определение «биосовместимые наноматериалы».

2 Биосенсоры

2.1 Общие сведения

Химическим сенсором называется устройство, превращающее химическую информацию (концентрацию специфического компонента в образце) в удобный для преобразования сигнал. Химические сенсоры обычно состоят из двух компонентов: из системы химического (молекулярного) распознавания (рецептора) и физико-химического преобразователя (трансдьюсера).

Биосенсоры – это разновидность химических сенсоров, в которых система распознавания имеет биохимическую природу и использует реакции либо индивидуальных биомолекул, либо биологических надмолекулярных структур. По определению биосенсора элемент биологического распознавания должен находиться в прямом пространственном контакте с преобразователем.

Достоинства биосенсоров заключаются в способности преобразовывать различные виды энергии, возможности обнаружения ионных примесей, простых и сложных неорганических и органических молекул, возможности многократного использования. Биосенсоры характеризуются быстроедействием (время отклика составляет от нескольких минут до 1 ч), в то время как специфическая индикация микроорганизмов с использованием иммуноферментного анализа составляет 3–4 ч.

Уникальной особенностью биосенсоров в отличие от химических датчиков является высокая специфичность биоузнающего элемента, а также его способность осуществлять узнавание без дополнительных затрат энергии (повышения температуры, наложения потенциала и т.д.). Подобная специфичность позволяет количественно определять индивидуальное анализируемое вещество либо группу веществ в смеси огромного числа подобных соединений. Например, при помощи фермента глюкозооксидазы можно анализировать содержание глюкозы как в присутствии прочих

моносахаридов, так и при наличии ди-, три- и полисахаридов, содержащих остатки глюкозы, поскольку фермент имеет абсолютную специфичность.

Биосенсоры могут использоваться для мониторинга веществ как биологической, так и небиологической природы.

Биосенсоры, функционирующие без добавления реагента, называют безреагентными.

Биосенсоры, способные быстро и воспроизводимо восстанавливаться, называют многократными. С помощью таких устройств осуществляют прямой мониторинг увеличения или уменьшения концентрации определяемого вещества. Примером непрямого мониторинга веществ является мониторинг соединений, ингибирующих биокаталитическую активность биосенсоров. Однако такие устройства после детекции часто теряют свои функциональные свойства.

Биосенсоры, которые не могут быть воспроизводимо и быстро восстановлены, называются однократными, к их числу относятся биотесты и биоиндикаторы. Потенциальное использование таких устройств, особенно в мониторинге состояния окружающей среды, в большей степени ориентировано на системы предупреждения, не требующие точного определения концентрации анализируемого вещества.

Основная область применения биосенсоров – анализ жидких объектов в медицине, биотехнологии, пищевой и химической промышленности.

Недостатками биосенсоров являются:

- невысокая стабильность;
- трудность получения биоорганических материалов постоянного состава;
- чувствительность к действию высоких и низких температур, бактерицидных загрязнений и др.

Кроме очевидных требований, предъявляемых к сенсорам, таких как простота эксплуатации, дешевизна, высокая точность, долговечность, селективность и скорость анализа, добавляются еще требования

миниатюризации, возможность работать в непрерывном режиме, а в некоторых случаях – возможность внедрения в человеческий организм. При инвазивном использовании зонд должен иметь малые размеры, быть биосовместимым, стерилизуемым и не обладать токсичными или антигенными свойствами.

Биосенсоры рассматриваются и как желательный метод контроля течения и эффективного лечения ряда хронических заболеваний. Облегчение ощущений пациента, улучшение функциональности и уменьшение стоимости приборов – критические требования к таким биосенсорам.

2.2 Принцип действия

Принцип действия биосенсоров основан на взаимодействии биологического компонента с исследуемым материалом и на регистрации этого взаимодействия с помощью физического преобразователя (трансдьюсера) биохимического сигнала в электрический.

На рис. 63 представлена принципиальная схема действия биосенсора, состоящего из пространственно соединенных трансдьюсера и иммобилизованного биоузнающего элемента.

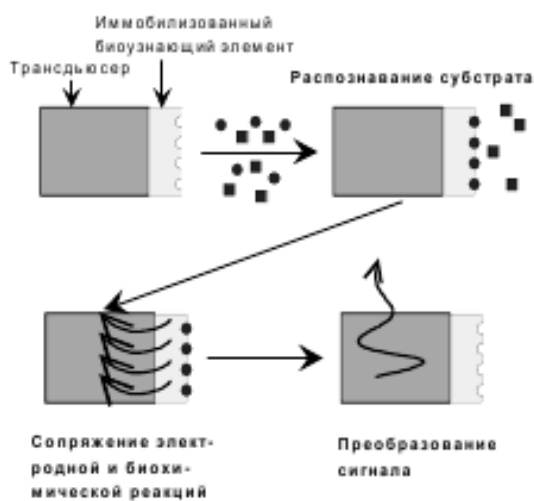


Рис. 63 – Принципиальная схема действия биосенсора

На первом этапе действия биосенсора происходит «узнавание» биоэлементом специфического для него вещества из многокомпонентной смеси. На второй стадии происходит преобразование информации о протекании биохимической реакции в форму электрохимического или прочего (например, оптического) сигнала. Эта стадия является ключевой для осуществления работы биосенсора. Её иногда называют стадией сопряжения биохимической и электродной (либо прочей физико-химической) реакций. На последней стадии электрический сигнал от трансдьюсера преобразовывается в нужную для обработки форму.

Биосенсор состоит из биологически чувствительного элемента (рецептора), физического преобразователя и рабочего раствора. Биологический компонент биосенсора может включать ферменты, ткани, микроорганизмы, антитела, антигены, ДНК, РНК, иммобилизованные на специальном физическом носителе. Биосенсоры, содержащие антитела или антигены, называют иммуносенсорами, имеющие ДНК или олигонуклеотиды, – геносенсорами.

2.3 Классификация по типу используемого трансдьюсера

Биосенсоры могут быть классифицированы по механизму биологического узнавания и по типу используемого трансдьюсера.

По виду преобразователя выделяют четыре основные группы биосенсоров: электрохимические, пьезоэлектрические, калориметрические и оптические.

Для обнаружения микроорганизмов в основном используют электрохимические, пьезоэлектрические и оптические биосенсоры.

**Сравнительные характеристики биосенсоров и тест-систем для
иммуноферментного анализа**

Группа	Чувствительность, м.к./мл	Время анализа, мин	Преимущества	Недостатки
Потенциометрические биосенсоры	$2,5 \cdot 10^4$	30–45	Простота, надежность	Медленный отклик, чувствительность к электрическим шумам
Амперометрические биосенсоры	$1 \cdot 10^5$	55	Низкая стоимость, малые габариты, стабильность отклика	Низкая чувствительность, низкая селективность
Пьезоэлектрические биосенсоры	$1 \cdot 10^5$	5–10	Быстрота, стабильность отклика	Низкая чувствительность, ошибка неспецифического связывания
Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса	$1 \cdot 10^4$	40	Высокая чувствительность, бесконтактность	Оптические помехи, необходимость применения фотоприемников
Волоконно-оптические биосенсоры	$5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$	1-3	Быстрота отклика, малое влияние электрических помех	Необходимость применения фотоприемников
Иммуноферментные тест-системы	$1 \cdot 10^6$	180–240	Специфичность	Длительность анализа, необходимость использования меток, хромогена

2.3.1 Электрохимические биосенсоры

Рассматривая различные способы измерения аналитического сигнала, электрохимические биосенсоры разделяют на амперометрические, потенциометрические, кондуктометрические сенсоры и полевые транзисторы. Последние являются разновидностью потенциометрических сенсоров.

Бесспорное преимущество электрохимических биосенсоров: являясь менее зависимыми от эффектов окружающей среды, чем оптические, они

также позволяют осуществлять перенос информации, преобразованной в электрическую форму, непосредственно на компьютер. Электрохимические биосенсоры характеризуются низкой стоимостью, малыми габаритными размерами, стабильностью отклика.

К недостаткам электрохимических биосенсоров следует отнести чувствительность к колебаниям температуры, pH и излучениям (табл. 7).

Амперометрические биосенсоры

Принцип действия основан на измерении электрического тока, возникающего в результате окисления или восстановления электрохимически активных веществ на поверхности рабочего электрода. В большинстве случаев в ходе эксперимента на единичном рабочем электроде (или на пучке электродов), задаётся постоянный потенциал относительно электрода сравнения. Наблюдаемый ток оказывается пропорционален либо объёмной концентрации электроактивных частиц, либо скорости их расхода или образования в биокаталитическом слое.

В качестве примера можно привести глюкозный биосенсор, обладающий на сегодняшний день наилучшими аналитическими свойствами. Биосенсор создан на основе Берлинской лазури (рис. 64), являющейся в свою очередь наиболее эффективным катализатором восстановления пероксида водорода характеристикам.

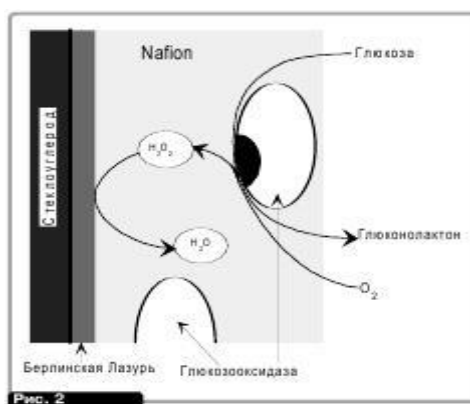


Рис. 64 – Схема глюкозного биосенсора на основе Берлинской лазури

Действие биосенсора основано на следующих химических реакциях. Глюкоза окисляется кислородом воздуха в активном центре фермента. При этом кислород восстанавливается до пероксида водорода. Последний селективно восстанавливается на электроде, модифицированном Берлинской лазурью, продуцируя аналитический сигнал, пропорциональный концентрации глюкозы в анализируемом образце. Отклик биосенсора, включенного в проточно-инжекционную систему, представлен на рис. 65.

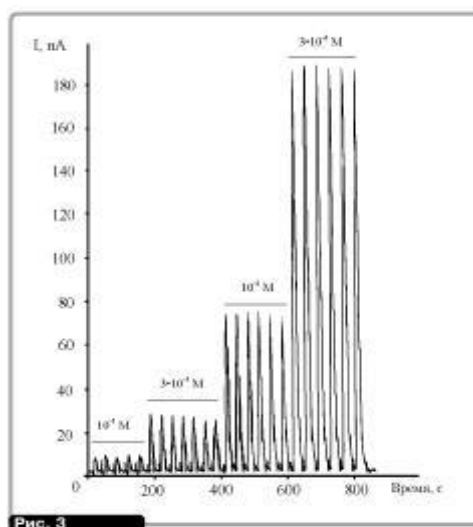


Рис. 65 – Проточно-инжекционный анализ глюкозы на электрохимическом анализаторе с использованием глюкозного биосенсора на основе Берлинской лазури

В настоящее время разрабатываются интеллектуальные сенсорные системы (электронный нос и электронный язык), основанные на принципах, сходных с организацией биологических систем — массивов неспецифичных рецепторов с последующим распознаванием образов с помощью аналогов нейронной сети. Электронный язык – аналитический прибор, состоящий из массива неселективных химических сенсоров, обладающих перекрестной чувствительностью к различным компонентам в растворе, и методов обработки данных - распознавания образов (искусственные нейронные сети, анализ по главным компонентам, нечеткая логика и т.п.) и многомерных калибровок. Важными характеристиками сенсора являются стабильность отклика и перекрестная чувствительность, которая может быть определена как воспроизводимый отклик сенсора к максимально большому числу компонентов раствора. Откалиброванная мультисенсорная система может

быть использована для многокомпонентного количественного анализа растворов, а также распознавания (классификации, идентификации) сложных жидкостей различной природы. Уникальная особенность системы при анализе пищевых продуктов – возможность установить корреляцию между результатами анализа и человеческим восприятием вкуса.

К амперометрическим биосенсорам относят также портативное электронное устройство «электронный нос». Прибор представляет собой тонкую кремниевую пластинку с нанесенными сенсорами для распознавания молекул, с помощью которой можно быстро и точно анализировать газовые смеси и обнаруживать бактерии в воздухе. Принцип его действия похож на функционирование биологических рецепторов запахов. Перспективно применение «электронного носа» для идентификации возбудителей заболеваний, передающихся воздушно-капельным способом. Многие виды бактерий, такие как *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* идентифицируются с помощью «электронного носа». Он позволяет диагностировать туберкулез или язвенную болезнь, вызванную *Helicobacter pylori*, по запаху слюны. Амперометрические биосенсоры используют для детекции *Escherichia coli* в воде, *Salmonella typhimurium*, *Plasmodium falciparum*, выявления обсемененности продуктов бактериями, обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных болезней – сибирской язвы, холеры, бруцеллеза.

Потенциометрические биосенсоры

Потенциометрические измерения состоят в определении разности потенциалов в условиях предельно малого тока либо между рабочим электродом и электродом сравнения, либо между двумя электродами сравнения, разделёнными полупроницаемой мембраной. В качестве трансдьюсера, как правило, выступает ион-селективный электрод (ИСЭ): рН-электроды и полевые транзисторы, которые используют для анализа ионов образующихся в растворе.

Фундаментальным пределом чувствительности подобных устройств является чувствительность транзьюсера. Чувствительность ион-селективных потенциометрических электродов (мембранных электродов, в том числе стеклянных рН электродов, полевых транзисторов и т.д.) согласно уравнению Нернста не может превышать 59 мВ на единицу рН либо на единицу логарифма концентрации иона. Превзойти теоретический предел можно только с использованием альтернативного физического принципа, например, если потенциал индикаторного электрода поддерживается за счет электрохимической реакции, находящейся в равновесии. Согласно уравнению Нернста, чувствительность потенциала к рН среды определяется соотношением протонов и электронов, участвующих в реакции. При соотношении 1:1 изменение потенциала на единицу рН составляет 59 мВ. Если же перенос электронов сопровождается отщеплением большего числа протонов, то изменение потенциала превысит названную величину. Так, при использовании полианилина в качестве рН транзьюсера в широком диапазоне рН (1–9) удалось добиться рекордной чувствительности: 90 мВ/рН. Соответствующий биосенсор также значительно превышал по чувствительности существующие аналоги.

Системы с ионочувствительными полевыми транзисторами по сути являются обычными потенциометрическими системами, только входной транзистор перенесен из электронной схемы высокоомного вольтметра непосредственно в анализируемый раствор. Это позволяет существенно повысить разрешающую способность транзьюсера и тем самым увеличить чувствительность изготовленных на их основе биосенсоров. Биочувствительный слой обычно помещают непосредственно на поверхности ионочувствительной мембраны, являющейся частью затвора полевого транзистора.

Существенным недостатком всех потенциометрических систем, основанных на описанных принципах, является их чувствительность к буферной емкости раствора, что заметно ограничивает их применение.

Наибольшее распространение в диагностике инфекционных болезней получили светоуправляемые потенциометрические биосенсоры LAPS (от англ. *light-addressable potentiometric sensors*). Метод LAPS сочетает в себе фильтрацию исследуемого материала через нитроцеллюлозную мембрану, сэндвич-иммуноанализ и светоуправляемый биосенсор. Наличие бактерий регистрируют по изменению pH на мембране. LAPS-биосенсоры применяют для обнаружения *E. coli* O157:H7 в воде, стафилококкового энтеротоксина, вируса болезни Ньюкасла, возбудителя бруцеллеза *Brucella melitensis*.

В меньшей степени распространены другие виды электрохимических биосенсоров – кондуктометрические и импедансометрические.

2.3.2 Пьезоэлектрические биосенсоры

Пьезоэлектрические биосенсоры чувствительны к изменению массы на поверхности физического носителя (гравиметрические биосенсоры); плотности, вязкости среды, частоты колебаний акустических волн.

Гравиметрические трансдюсеры основаны на принципе резонанса акустической волны, распространяющейся вдоль поверхности кварцевого кристалла (QCM). Резонансная частота по уравнению Соусбери линейно зависит от изменения массы на поверхности кристалла. Однако при разработке биосенсоров приходится сталкиваться с еще одним обстоятельством: резонансная частота также оказывается зависимой от «вискозозластического» коэффициента, который претерпевает существенные изменения в присутствии полимеров и, в том числе, биополимеров. Известны примеры ДНК-сенсоров, демонстрирующих отрицательный отклик (уменьшение массы) в ответ на связывание комплементарной молекулы олигонуклеотида.

В последнее время в пьезоэлектрических биосенсорах все чаще используют пьезоэлектрические кристаллы, которые генерируют и передают акустическую волну с одной стороны кристалла на другую (англ. *bulk acoustic wave sensors* – объемноволновые сенсоры) или по одной грани

кристалла (англ. *surface acoustic wave sensors* – сенсоры поверхностных акустических волн). На основе акустических биосенсоров разработаны иммуносенсоры для обнаружения *Salmonella typhimurium*, вируса герпеса. При этом на поверхности кварцевого резонатора, покрытого золотой пленкой, иммобилизируют специфические антитела. Антитела связывают белки микробных клеток, при этом масса на поверхности увеличивается, а резонансная частота колебаний акустических волн уменьшается на тысячные доли процента, что и фиксирует биосенсор.

В ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» разработан способ детекции биологических макромолекул с помощью пьезоэлектрических биосенсоров. Способ включает иммобилизацию слоев макромолекул на поверхности кварцевого резонатора, помещенного в вакуум, и последовательную регистрацию резонансных частот после нанесения каждого биослоя.

С использованием специфических иммуноглобулинов и антигенов *Francisella tularensis* разработаны пьезоэлектрические биосенсоры для обнаружения возбудителя туляремии в воде, молоке и противотулярийных антител в сыворотке животных.

Пьезоэлектрические биосенсоры отличаются от электрохимических быстрым откликом (5–10 мин), но, в то же время, они обладают низкой чувствительностью и наличием ложноположительных ответов в результате неспецифического связывания с пьезокристаллом.

2.3.3 Оптические биосенсоры

В оптических биосенсорах аналитический сигнал обусловлен не химическим взаимодействием определяемого компонента с чувствительным элементом, а измеряемыми физическими параметрами – интенсивностью поглощения, отражения света, люминесценции объекта и т.д.

Принцип действия оптических биосенсоров основан на регистрации изменений оптических свойств среды:

- оптической плотности (денситометрические биосенсоры);
- цвета (колориметрические биосенсоры);
- мутности (турбидиметрические биосенсоры);
- показателя преломления среды (рефрактометрические биосенсоры) и других свойств в результате присутствия биологического агента.

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

В настоящее время наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла. Последние основаны на принципе поверхностного плазмонного резонанса (англ. *surface plasmon resonance*).

На поверхности нанослоя, который является дном измерительной кюветы, иммобилизуются молекулы, которые комплементарно связывается 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 (см. рис. 66).

К недостаткам трансдьюсера следует отнести его чувствительность к различным параметрам среды, в том числе к локальному изменению температуры, что в ряде случаев драматически сказывается на избирательности системы.

К достоинствам оптических биосенсоров следует отнести высокую чувствительность, малое время отклика (1–3 мин), бесконтактность и малое влияние электрических помех.

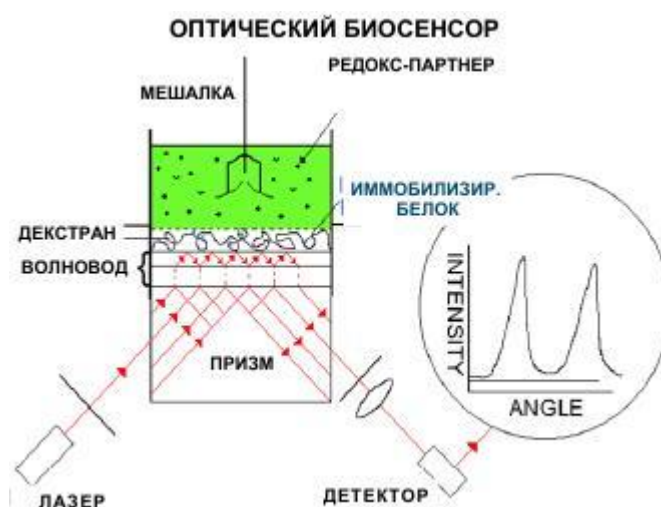


Рис. 66 – Принцип работы оптического биосенсора

Перспективным является использование оптических волокон в качестве био- и иммуносенсоров. Они характеризуются низкой себестоимостью, быстрым откликом, простотой постановки анализа.

Обычно, через волокно подается излучение различных длин волн инфракрасного (ИК) спектра. Учитывая, что многие микроорганизмы обладают специфичными ИК-спектрами, волоконная ИК-спектроскопия может использоваться для выявления изменений свойств биологических объектов. Иммобилизация антител внутри волокна позволяет осуществлять специфическую индикацию. На основе оптоволоконна были разработаны иммуносенсоры для выявления капсульного антигена «фракция 1» чумного микроба и антител к нему, для обнаружения протективного антигена сибиреязвенного микроба. Чувствительность биосенсоров составила 5–50 нг/мл белка, время отклика – 1 мин.

Оптоволоконные биосенсоры могут осуществлять индикацию микроорганизмов без применения специфических молекул – по спектральным характеристикам патогенов, они удобны в обращении, малогабаритны и имеют низкую себестоимость, поэтому они наиболее

перспективны при разработке средств сигнальной индикации патогенных биологических агентов.

Принципиально новым классом оптических биосенсоров являются биосенсоры на основе фотонно-кристаллических волокон с поллой сердцевиной. Принцип действия фотонно-кристаллических волноводов основан на обнаружении и идентификации биологических объектов по спектрам излучения, проходящего через полую сердцевину, заполненную исследуемым материалом, света в диапазоне длин волн от 200 до 1100 нм. Фотонно-кристаллические волноводы имеют каналы для заполнения рабочими растворами, введения пробы и реагентов. Суммарная площадь рабочей поверхности фотонно-кристаллического волокна в сотни и тысячи раз больше, чем у обычного оптического волокна и плазмонно-резонансной кюветы, что ведет к повышению чувствительности метода и скорости протекания реакции межмолекулярного взаимодействия.

В настоящее время фотонно-кристаллические волокна рассматриваются как один из наиболее перспективных элементов волноводно-оптических датчиков физических величин.

К числу основных преимуществ можно отнести защищенность от воздействия от электромагнитных полей, высокую чувствительность и надежность, воспроизводимость и широкий динамический диапазон измерений, возможность спектрального и пространственного мультиплексирования чувствительных элементов, малое время отклика на изменение измеряемой величины (1 мин), малые объемы пробы, малые габариты.

2.4 Способ закрепления биоматериала

Существенным является закрепление (иммобилизация) распознающего элемента – биологического материала – на трансдьюсере. Основные требования, предъявляемые к методам иммобилизации:

- закрепленный биологический материал должен сохранять свою активность в течение как можно более продолжительного времени;
- перенос молекул аналита к распознающему элементу не должен быть затруднен, а если в распознающем элементе осуществляется каталитическая реакция, то должен быть обеспечен отвод продуктов реакции;
- метод иммобилизации должен быть применим в достаточно широких диапазонах температур, значений pH и давлений;
- метод иммобилизации должен обеспечивать хорошую воспроизводимость. Основными методами иммобилизации являются (рис. 67):

- адсорбция,
- включение в полимер, в частности в гель,
- сшивка,
- ковалентное связывание,
- капсулирование или изоляция с помощью мембран.



Рис. 67 – Методы иммобилизации биологического материала

Адсорбция является наиболее простым методом, практически не требующим подготовки компонент сенсора и использования специальных химических реагентов. При физической адсорбции частицы удерживаются на

подложке под действием сил Ван-дер-Ваальса, которые по своей природе делятся на диполь-дипольные, индукционные и дисперсионные взаимодействия, а также под действием водородных и ионных связей. Полученные методом адсорбции элементы обычно характеризуются низкой чувствительностью и существенной зависимостью от температуры и pH.

Включение биологического материала в полимерную матрицу является универсальным методом, применимым для разных типов распознающих элементов. Обычно используются такие полимеры, как полиметилметакрилат, крахмал, нейлон, желатин, коллаген и др. Если матрица состоит из синтетического полимера, его получение проводится в присутствии биологического материала. Обычно добавляется сшиватель, чтобы отдельные полимерные нити объединились в трехмерную сетку. При этом биологически активные молекулы оказываются захваченными внутри полимера. Достоинством этого метода является его универсальность; его недостаток в том, что сетка затрудняет диффузию и мешает проникновению аналита. Кроме того, если включаемые в сетку молекулы не связаны с ней химически, то они могут выходить из нее через поры.

В тех случаях, когда молекулы биологического материала связаны между собой или связаны с опорной сеткой, говорят о методе сшивки. Фактически сшитые распознающие молекулы могут использоваться без подложки, если обладают достаточно хорошими механическими характеристиками. Сшивка обычно используется в сочетании с другими методами. Например, она может стабилизировать элементы, полученные адсорбцией.

Метод ковалентного (химического) связывания является наиболее распространенным в различных приложениях. Он предполагает создание ковалентной связи между биоматериалом и подложкой. Выбор химических реагентов для его реализации зависит от типа связываемых молекул и материала подложки. Обычно метод реализуется в три этапа: очистка и модификация поверхности подложки, т.е. формирование на ней слоя из

необходимых функциональных групп, затем нанесение биоматериала, и, наконец, смывание слабо закрепленных молекул чистыми растворителями. Материалы подложек, используемые в сенсорах: металлы (золото, серебро, платина), стекло, кремний, углерод, полисахариды, нейлон, полимеры и т.д.

Главные достоинства метода ковалентного связывания состоят в том, что, с одной стороны, он обеспечивает надежную связь биоматериала с подложкой и предотвращает его утечку, а с другой позволяет создавать сенсоры с длительным временем жизни.

Один из распространенных методов, используемых при создании сенсоров, состоит в том, что ферменты отделены от остального раствора полупроницаемой мембраной, через которую могут проходить молекулы аналита и продукты каталитической реакции. Практически ферменты находятся в свободном состоянии, но они локализованы в одной части измерительной ячейки. Этот метод также иногда называется микрокапсулированием.

2.5 Аналитические характеристики

2.5.1 Калибровочные характеристики

Для получения количественной информации о содержании анализируемых веществ в образце необходимо знать калибровочные характеристики биосенсора, то есть зависимость аналитического сигнала от концентрации. Поскольку биосенсоры могут использоваться как в составе аналитических систем (FIA, ВЭЖХ), так и независимо от них, то и при описании калибровки необходимо указывать, в каких условиях она была получена.

Кроме собственно градуировочного графика, для сравнения эффективности биосенсоров используются количественные характеристики: чувствительность и предел обнаружения.

Чувствительность определяется, как максимальное значение производной величины отклика по концентрации.

Другой важной характеристикой является нижний предел обнаружения. Следует, однако, отличать реально достижимый нижний предел обнаружения от вычисленного из градуировочного графика, поскольку последний зачастую экстраполируют через несколько порядков по концентрации анализируемого вещества. На нижнем пределе обнаружения отклик аналитической системы должен, по крайней мере, в 3 раза превышать отклик на нулевую концентрацию анализируемого вещества. Кроме того, выше нижнего предела обнаружения отклик должен существенно зависеть от концентрации.

Повысить чувствительность датчика оказывается возможно путем увеличения количества иммобилизованного фермента либо за счет увеличения истинной поверхности индикаторного электрода на микро уровне (увеличения фактора шероховатости). Однако эти ухищрения, как правило, приводят к смещению нижнего предела обнаружения, особенно если он удовлетворяет требованиям, описанным выше, в область более высоких концентраций аналита. Таким образом, объективной характеристикой биосенсора может являться отношение его чувствительности к пределу обнаружения. Для амперометрических датчиков эта величина имеет размерность $[A \cdot M^{-2} \cdot cm^{-2}]$.

2.5.2 Времена стационарных и мгновенных откликов

Время стационарного отклика сенсора при добавлении анализируемого вещества в систему определяется как время, необходимое для достижения 90 % значения стационарного отклика.

Время мгновенного отклика соответствует времени, необходимому для достижения максимальной величины первой производной сигнала $(dR/dt)_{\text{макс}}$ после добавления определяемого вещества.

Обе величины в основном определяются скоростями массопереноса реагентов и продуктов через мембраны биосенсора и активностью систем

биологического распознавания — чем выше активность, тем меньше время отклика.

Важной операционной характеристикой биосенсоров как в стационарном, так и в проточном режиме является пропускная способность системы, определяющаяся числом проанализированных отдельных проб в единицу времени. Кроме времён стационарного или мгновенного откликов, данный параметр включает в себя время, необходимое для выхода сигнала на исходный уровень.

2.5.3 Селективность

Величина селективности биосенсора зависит как от биочувствительного рецептора, так и от трансдьюсера. В основном селективность биосенсора определяют следующими способами:

- по отношению величин откликов на анализируемое вещество и на мешающий компонент, взятых в одинаковых концентрациях;
- по изменению отклика биосенсора (в процентах) при разбавлении вдвое раствора определяемого вещества раствором мешающего компонента известной концентрации, добавляемым в систему.

2.5.4 Воспроизводимость, стабильность и время жизни

Воспроизводимость биосенсора есть оценка разброса или кучности данных в серии наблюдений, или результатов за определенный период времени.

Операционная стабильность сенсоров характеризуется остаточной активностью (% от исходной) биосенсора после нескольких последовательных измерений в течение определенного периода времени.

Время жизни биосенсора рекомендуется определять, как время хранения или работы, во время которого происходит уменьшение чувствительности на 10...50 %.

Вопросы для самопроверки:

1. Понятие биосенсора.
2. Достоинства и основные характеристики биосенсора.
3. Принцип действия биосенсоров.
4. Классификация биосенсоров.
5. Характеристика электрохимических биосенсоров.
6. Характеристика пьезоэлектрических биосенсоров.
7. Характеристика оптических биосенсоров.
8. Методы иммобилизации биологического материала.
9. Аналитические характеристики биосенсоров.

3 Биочипы

3.1 Общие сведения

Одно из направлений развития бионанотехнологий состоит в разработке новых аналитических систем – «микроаналитических систем» (μ -TAS – *micro-Total Analysis System*) и «лабораторий на чипе» (LOC - *Lab-on-a-Chip*). Основой таких систем является миниатюрное устройство – аналитический микрочип.

В общем случае аналитическая система на микрочиповой платформе состоит из:

- Микрочипа.
- Вспомогательных устройств.
- Высокочувствительной системы детектирования.
- Микропроцессора (контроллеры, электроника).
- Программно-математического обеспечения.
- Методик анализа.
- Баз данных.

Существующие микрочипы условно можно разделить на несколько классов:

- матричные (гибридизационные),
- микрофлюидные (к ним же можно отнести и нанофлюидные),
- гибридные микрочипы.

В матричных чипах (биочипах) осуществляется локальная иммобилизация селективно чувствительных веществ (рецепторов) на небольшом участке инертной подложки, что дает возможность проведения качественного, а в некоторых случаях и количественного экспресс-анализа.

Микро/нанофлюидные чипы представляют собой устройства, в которых с помощью современных технологий на небольшой площадке сформированы различные функциональные элементы: смесители,

нагревательные камеры, фильтры, реакционные камеры, сепарационные и разделительные устройства, камеры сбора фракций, датчики, насосы и т.п.

Топология (архитектура) и конструкция микро/нанофлюидных чипов определяется методом и стадиями анализа, которые требуется реализовать на чипе. При анализе компонентов жидкой пробы должны быть реализованы следующие операции: загрузка и дозирование пробы, манипуляции с пробой (очистка, обработка или преконцентрирование пробы), транспортировка пробы в реакционную зону, химические или иные реакции, разделение полученного продукта на компоненты, термическое или иное физическое воздействие на пробу (реагенты), детектирование компонентов, сбор полученных фракций. Движение потоков жидкости может осуществляться под действием центробежных сил (например, в CD-чипе); электрических полей (электрокинетический способ); давления или разряжения; ультразвуковых полей; капиллярных сил и т.д. Наиболее эффективными и широко распространенными способами управления микропотоками вещества являются электрокинетический и гидравлический при этом наиболее технологичным и автоматизируемым считается электрокинетический.

Функциональные элементы микро- и нанофлюидных чипов:

- интерфейсы ввода пробы,
- транспортные каналы,
- устройства дозирования,
- микрокамеры и микросмесители,
- клапаны,
- микронасосы,
- наноструктуры.

В гибридных микрочипах пытаются объединить достоинства матричных чипов (высокая селективность и экспрессность определения) и преимущества микрофлюидных чипов (проведение измерений в непрерывном режиме, расширенные манипуляции с пробой и т.д.).

Матричные биочипы пока распространены наиболее широко, поэтому их рассмотрим подробнее.

3.2 Принцип работы

Основой большинства современных биочипов является матрица из множества полусферических гидрогелевых ячеек (диаметром около 100 мкм), каждая из которых содержит молекулярные зонды, специфичные к одной из множества биологических молекул или их фрагментов (например, к последовательностям ДНК или РНК, белкам) (см.рис. 68). На одном квадратном сантиметре может быть размещено до тысячи ячеек биочипа, предназначенных для разных целей: для выявления мутаций, связанных с предрасположенностью к различным наследственным и онкологическим заболеваниям; для обнаружения бактерий и вирусов; идентификации мутаций микроорганизмов, ведущих к появлению лекарственно-устойчивых форм инфекционных заболеваний.

Различные биомолекулы равномерно распределяются и иммобилизуются химическими связями в объеме геля. Иммобилизация не на двумерной поверхности, а в трехмерном объеме геля дает ряд существенных преимуществ. В десятки и сотни раз увеличивается емкость биочипа на единицу поверхности и соответственно увеличивается чувствительность измерений. Иммобилизованные макромолекулы как бы фиксированы в гомогенной водной среде, составляющей около 95 % объема геля. Это исключает их взаимодействие как друг с другом, так и с твердой поверхностью, где гетерофазные процессы с участием фиксированных на ней биомолекул протекают более сложным образом. Это особенно существенно для белковых чипов, поскольку молекулы белков имеют тенденцию денатурации в интерфазе, образованной между твердой поверхностью и водной средой. Наконец, гелевые элементы на воздухе или под маслом превращаются как бы в изолированные микро- и нанолитровые пробирки, в каждой из которых можно проводить индивидуально различные

специфические взаимодействия, химические и ферментативные реакции. Благодаря этому гелевые биочипы объединяют в себе свойства и микроматриц и микролабораторий.

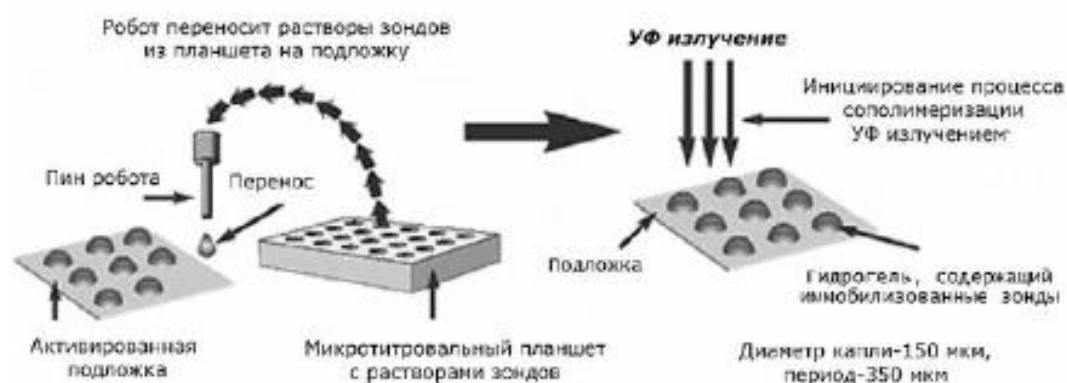


Рис. 68 – Основные стадии изготовления биочипов

Регистрация происходящих на биочипах процессов осуществляется с помощью флуоресцентных, а также в некоторых случаях хемилюминесцентных и масс-спектрометрических методов.

Хемилюминесцентные методы, хотя и уступают по чувствительности люминесцентным, позволяют значительно упростить и удешевить регистрирующую аппаратуру. Кроме того, разработан специальный метод прямого анализа соединений непосредственно в гелевых элементах с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Этот важный в протеомике метод позволяет проводить дополнительную идентификацию взаимодействующих с биочипами соединений по их массе.

Для проведения анализа образец крови пациента или другой исследуемой жидкости проходит предварительную обработку, в ходе которой находящиеся в нем молекулы метятся флуоресцирующим красителем. Затем образец наносится на биочип, помещенный в специальную микрокамеру. Каждый тип молекул образца взаимодействует со специфичными к ним зондами, локализованными в индивидуальных ячейках микрочипа, что может быть зарегистрировано по интенсивности свечения соответствующей ячейки биочипа. По картине свечения множества ячеек

биочипа специальный прибор-анализатор определяет количественно наличие характеристических последовательностей ДНК, РНК или набора белков в исследуемом образце. Были разработаны анализаторы для научных исследований, способные анализировать биочипы содержащие тысячи ячеек, и портативные клинические анализаторы для рутинных медицинских применений, позволяющие анализировать биочипы с одной-двумя сотнями ячеек.

3.3 Классификация

3.3.1 ДНК-микрочипы

ДНК-микрочипы используются для:

- идентификации мутаций в генах, связанных с различными заболеваниями;
- наблюдения за активностью генов;
- диагностики инфекционных заболеваний и определения наиболее эффективного метода антибиотикотерапии;
- идентификации генов, важных для продуктивности сельскохозяйственных культур;
- скрининга микроорганизмов, как патогенных, так и полезных, например, используемых для восстановления зараженных органическими отходами почв.

ДНК-микрочипы необходимы для практического использования информации, полученной в результате секвенирования геномов человека и других живых организмов.

Биочипы представляют собой системы различных распознающих элементов, собранные на малой площади; каждый тип распознающих элементов занимает свой участок (сайт). Применительно к ДНК, это означает, что на одной твердой подложке собрано большое количество различных типов одноцепочечных олигонуклеотидов. В процессе анализа каждый из них связывает комплементарный участок молекул из образца.

Каждый тип олигонуклеотидов занимает сайт диаметром ~100 мкм; детектирующая система считывания обрабатывает сигналы от разных участков и регистрирует присутствие различных последовательностей в исследуемом образце.

Для иммобилизации олигонуклеотидов применяются различные методы, среди которых наиболее популярным является ковалентное связывание на золотой поверхности. При этом используются олигонуклеотиды с привитыми группами –SH, способными непосредственно связываться с золотом. Размещение распознающих элементов на подложке осуществляется тонкими иглами и капиллярами при помощи контактной (*pin printing*) или бесконтактной (*ink-jet printing*) микропечати. Малые порции биоматериалов наносятся на определенные точки подложки.

На рис. 69 показан принцип действия ячейки ДНК или олигонуклеотидного биочипа, основанный на комплементарных взаимодействиях основания аденина (A) с тиминам (T) и гуанина (G) с цитозином (C) в двух нитях ДНК.

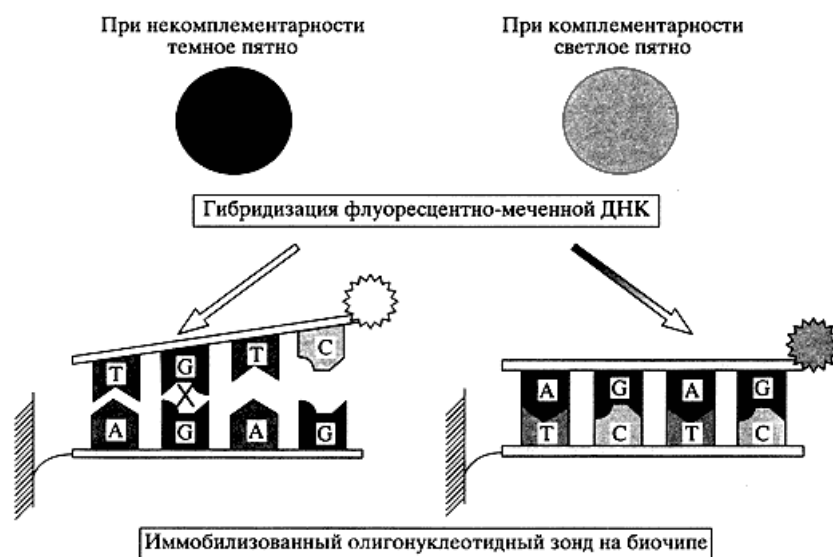


Рис. 69 – Схема образования двойной спирали ДНК на биочипе

Если последовательность оснований в одной нити ДНК (или олигонуклеотида) полностью комплементарна последовательности другой нити, то образуется стабильная совершенная двухнитчатая спираль – дуплекс. Однако присутствие в дуплексе даже одной неправильной пары,

например, G-G предотвращает образование дуплекса. Если иммобилизовать в одном из элементов микрочипа специфическую одноцепочечную ДНК или, положим, 20-ти мерный олигонуклеотид (пробу), то при добавлении к микрочипу меченных флюоресцентными красителями фрагментов ДНК, например, генома человека, будет происходить их высокоспецифичное взаимодействие. Заданный олигонуклеотидный элемент биочипа специфически свяжет только одну комплементарную последовательность из $4^{20} = 1,09 \cdot 10^{12}$ всех возможных последовательностей этой длины в ДНК. В результате флюоресцентное свечение наблюдается только на этом комплементарном элементе биочипа. Таким образом, один элемент биочипа производит одну выборку примерно из триллиона возможных вариантов, в отличие от элемента электронного чипа, где происходит двоичная выборка: *ДА* или *НЕТ*.

Для широкого применения секвенирования ДНК гибридизацией с полными, например, 6-ти мерными или более сложными, микрочипами требуется решение ряда проблем. Важной задачей является надежная дискриминация совершенных и неправильных дуплексов, образующихся на биочипе, что затруднено различиями в стабильности A-T и G-C пар оснований. Измерение кривых плавлений дуплексов и применение алгоритмов, вычисляющих поверхность под кривой плавления для каждого дуплекса, увеличивают надежность анализа.

Другим серьезным препятствием является частое присутствие в ДНК повторяющихся гексануклеотидных и более длинных последовательностей. Эту частоту можно оценить количественно, измеряя и сравнивая интенсивности флуоресценции различных элементов биочипа.

Олигонуклеотидные микрочипы являются эффективным подходом для одновременной идентификации от десятков до тысяч генов и их структурного анализа, для выявления специфичных нуклеотидных последовательностей и нуклеотидных вариаций в их структуре. Однако, когда гены присутствуют в геноме в количестве одной или нескольких

копий, требуется их предварительная амплификация. Наиболее эффективным методом амплификации ДНК является полимеразная цепная реакция, в процессе которой происходит экспоненциальное увеличение количества молекул ДНК от нескольких до миллионов и более копий, достаточных для проведения их гибридизационного анализа.

В более традиционном и простом подходе амплификация ДНК и гибридизация амплифицированной ДНК с биочипом проводятся в две отдельные стадии. Во втором методе амплификация происходит параллельно в растворе в реакционной камере и в гелевых элементах микрочипа, содержащих иммобилизованные и участвующие в амплификации олигонуклеотиды (праймеры). В третьем методе амплификация происходит исключительно в гелевых элементах микрочипа, используемых в этом случае как пробирки объемом от нескольких нанолитров до долей микролитра. Каждая из этих гелевых нанопробирок содержит необходимые для амплификации два и более специфических олигонуклеотида. Метод пока достаточно сложен в исполнении и требует дальнейшей доработки. Однако его реализация позволит анализировать на одном биочипе и в одном эксперименте тысячи полиморфных нуклеотидов в геноме, что позволит использовать его для массового скрининга популяций.

3.3.2 Белковые микрочипы

Переход от ДНК-микрочипов к белковым микрочипам выглядит вполне логичным шагом, однако его осуществление достаточно проблематично. Структура и функции белковых молекул намного сложнее, чем у молекул ДНК. К тому же белки намного менее стабильны. Каждый тип клеток содержит тысячи различных белков, некоторые из которых обладают уникальными, характерными только для определенного типа клеток, функциями. Кроме того, белковый состав клетки меняется в зависимости от состояния здоровья, возраста и влияния окружающей среды.

Белковые микрочипы будут использоваться для:

- обнаружения белковых биомаркеров, характерных для различных заболеваний и даже разных их стадий;
- оценки потенциальной эффективности и токсичности препаратов в доклинических испытаниях;
- измерения различий в синтезе белков различными типами клеток, клетками, находящимися на разных стадиях развития, а также здоровыми и патологически измененными клетками;
- изучения взаимосвязи между структурой и функциями белков;
- оценки различий в экспрессии белков с целью выявления мишеней для новых лекарственных препаратов;
- изучения взаимодействий между белками и другими молекулами.

Белковые биочипы представляют собой фиксированные в определенных областях какого-либо твердого носителя белки (см. рис. 70).

Существует два основных типа белковых биочипов — биочипы прямой и обратной фазы.

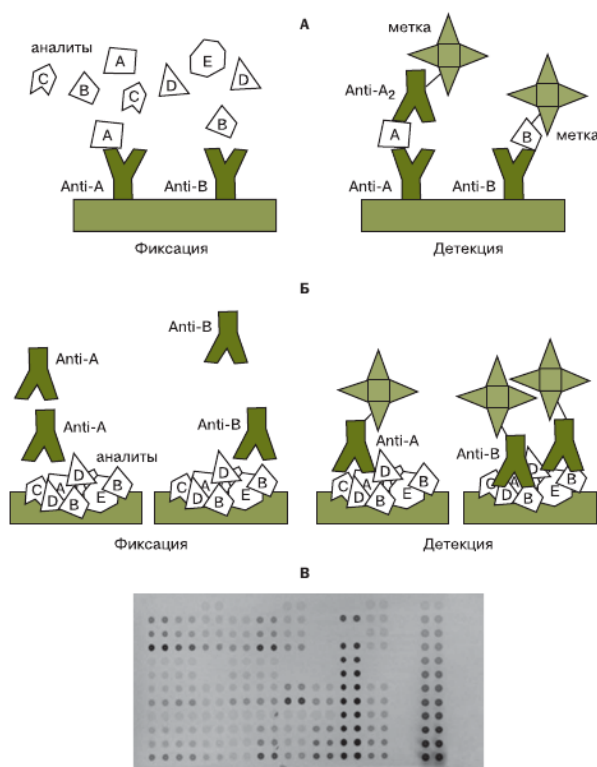


Рис. 70 – Виды белковых биочипов

В биочипах прямой фазы (*forward phase protein array*) на субстрате фиксированы улавливающие молекулы (обычно антитела), и каждая точка биочипа содержит один тип такой «молекулы-ловушки» (рис. 70, *A*). После инкубации биочипа с образцом пациента (например, с клеточным лизатом биопсированной ткани) количество связавшихся искомым анализатором измеряют с помощью меченых молекул (антител или молекул-репортеров). Интенсивность сигнала в каждой точке пропорциональна количеству искомым молекул, фиксированных «молекулами-ловушками». Получающийся точечный «узор» (паттерн) анализируют для установления корреляций с биологической информацией (рис. 70, *B*).

Белковые биочипы прямой фазы широко применяют для обнаружения и количественного анализа белков. Их используют при разработке лекарственных средств, для поиска новых биомаркеров и молекулярного «профилирования» клеточных и биологических материалов.

Другим вариантом белковых биочипов являются биочипы обратной фазой (*reverse phase protein array*). В каждой точке биочипа обратной фазы фиксируют материал от единственного пациента. Таким образом, каждый такой биочип состоит из множества (сотен) образцов от разных пациентов (см.рис. 70, *B*). Наличие искомым молекул в образце пациента определяют с помощью меченых антител одной специфичности, т.е. в этом формате роль «молекул-ловушек» исполняют сами искомые молекулы.

Технология биочипов обратной фазы хорошо подходит для клинической протеомики, т.е. для решения прикладных клинических задач. В настоящее время одно из наиболее важных преимуществ данного метода заключается в возможности получения с его помощью «карты состояния» многочисленных киназозависимых сигнальных путей *in vivo*, а также информации о посттрансляционной модификации белков, такой как их фосфорилирование. Посттрансляционные изменения отражают состояние активности клеточных сигнальных сетей, информация о которой не может быть получена при исследовании ДНК или продуктов транскрипции генов.

Выявление ассоциированных с заболеванием изменений киназозависимых клеточных сетей является ключевой отправной точкой как для создания лекарственных средств, так и для разработки индивидуализированных схем терапии. В отличие от геномного анализа, при анализе протеома извлекается информация о состоянии реально работающих в клетках конкретного пациента белков и сигнальных путей, то есть тех структур, которые являются непосредственной мишенью воздействия лекарственных средств.

Биочипы обратной фазы позволяют контролировать изменения фосфорилирования белков у больных и здоровых лиц, до и после лечения, при эффективной и не эффективной терапии и т.д., что позволяет определить активность белков специфического сигнального пути в режиме реального времени и, следовательно, подобрать лечение в соответствии с «микросхемой» работы клетки каждого пациента.

Белковые биочипы с обратной фазой также применяли для сравнения «портретов» сигнальных путей в клетках первичной опухоли и метастазов у одного и того же пациента. Кардинальные отличия между микроэкологией метастатического очага и первичной опухоли существенно сказываются на активности клеточных сигнальных путей в зависимости от локализации метастазов. В связи с этим определение состояния активности белковых сетей в клетках метастаза может стать одним из инструментов для подбора адекватной терапии, поскольку трудности в лечении и летальные исходы при злокачественных опухолях чаще всего связаны с метастазами. Изучение протеома метастазов позволит назначать пациентам определенную комбинацию различных химиопрепаратов направленного действия, подобранную в соответствии с состоянием сигнальных систем в опухолевых клетках.

3.3.3 Тканевые микрочипы

Тканевые микрочипы, позволяющие проводить анализ тысяч образцов тканей на одном предметном стекле, используются для определения

содержания белков в здоровых и патологически измененных тканях и оценки потенциальных мишеней для лекарственных препаратов. Образцы ткани мозга, размещенные на предметных стеклах, позволяют исследователям измерять изменение электрической активности нервных клеток при различных воздействиях.

3.3.4 Клеточные микрочипы

Клеточные микрочипы позволяют избежать проблемы нестабильности белков в белковых микрочипах и производить более точный анализ взаимодействий белков внутри клетки.

Многие прокариотические и эукариотические клетки сохраняют свою жизнедеятельность и даже могут делиться, будучи фиксированы в гидрогеле. Это открывает ряд интересных возможностей, в том числе для создания клеточных биочипов как матричных биосенсоров для параллельного определения, например, ряда антибиотиков и ксенобиотиков.

Кинетика деления и роста бактерий в геле микрочипа регистрируется окрашиванием клеток флюоресцентной краской. Рост бактерий зависит от резистентности клеток к антибиотику и его присутствия в среде. Подавление роста бактерий в соответствующих элементах биочипа позволяет идентифицировать присутствие этих антибиотиков в среде. После построения калибровочной кривой содержание антибиотиков в среде может быть измерено количественно.

Представляет интерес также создание микрочипов, содержащих животные и растительные клетки для определения широкого диапазона различных веществ в окружающей среде.

3.3.5 Микрочипы на основе малых молекул

Микрочипы на основе малых молекул позволяют фармакологическим компаниям производить одновременный скрининг тысяч потенциальных лекарственных средств.

3.4 Применение биочипов

На сегодняшний день созданы диагностические варианты биочипов, позволяющие выявлять вирусы многих опасных болезней. При диагностике туберкулеза с одновременным выявлением его лекарственно-устойчивых форм, время анализа сокращается с 2-х месяцев до 1 дня. Это позволяет оперативно назначать резервные терапевтические средства тем больным, у которых обнаруживаются формы туберкулеза, устойчивые к обычно применяемым лекарствам (более 10 % случаев). Как показали результаты анализа более 3000 пациентов, надежность метода превышает 90%. Эта методика уже используется в 8-ми региональных медицинских центрах России, а также в нескольких научно-исследовательских институтах, занимающихся проблемами идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

Созданы варианты биочипов, обнаруживающих и типизирующих продукты хромосомных перестроек, приводящих к лейкозу, идентифицирующих вирусы СПИДа, гепатитов *B* и *C*.

Разрабатываются биочипы для обнаружения стафилококкового, холерного, дифтерийного, столбнячного и сибиреязвенного токсинов, а также возбудителей сибирской язвы и чумы, которые могут быть использованы при биотерроризме.

Созданы биочипы для определения видовой принадлежности вирусов оспы и их дискриминации от возбудителей других заболеваний, сходных по первоначальным клиническим проявлениям (герпес, ветряная оспа).

Разработаны биочипы для выявления предрасположенности пациентов к некоторым онкологическим заболеваниям, определения индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам, используемым в противоопухолевой терапии.

Вопросы для самопроверки:

1. Биочипы. Общие сведения.
2. Принципы работы биочипа.
3. Классификация биочипов.
4. ДНК-микрочипы.
5. Белковые микрочипы.
6. Тканевые и клеточные микрочипы.
7. Применение биочипов в нанобиотехнологии.

4 Липосомальные биопрепараты

В середине 60-х годов английский ученый Алек Бэнгхем, выясняя роль фосфолипидов в свертывании крови, изучал структуру коллоидных дисперсий, образующихся при набухании фосфолипидов в избытке воды. На электронных микрофотографиях он увидел слоистые частицы, удивительно похожие на мембранные структуры клетки. Следующее исследование показало, что неорганические ионы, присутствующие в растворе в момент набухания фосфолипидов, включаются внутрь этих частиц и удерживаются там длительное время, обмениваясь с ионами наружного раствора с очень малой скоростью. Так впервые было установлено, что фосфолипиды, являющиеся основными компонентами клеточных мембран, способны самопроизвольно образовывать в воде замкнутые мембранные оболочки. Эти оболочки захватывают в себя часть окружающего водного раствора, а образующая их фосфолипидная мембрана обладает свойствами полупроницаемого барьера, легко пропускающего воду, но препятствующего диффузии растворенных в ней веществ.

Это открытие имело огромное значение для дальнейшего развития всей мембранной биологии. Липидные частицы, описанные А. Бэнгхемом и его сотрудниками, оказались максимально упрощенной моделью клеточных мембран. Очень скоро эти частицы, получившие название липосомы (от греч. *липос* – жир и *сома* – тельце или частица), стали излюбленным объектом исследования многих ученых, занимавшихся изучением самых разных свойств биологических мембран.

Сегодня мы являемся свидетелями необычайно активного интереса к этим структурам со стороны как фундаментальной, так и прикладной науки.

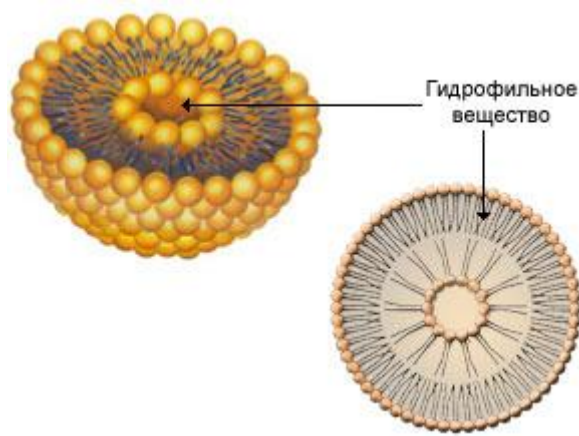


Рис. 71 - Липосома, поперечный разрез

Более того, липосомы — это и высокоприбыльный коммерческий продукт, встречающийся на прилавках магазинов, в аптеках, косметических салонах и рекламируемый на экранах телевизоров. Однако, несмотря на постоянно растущее внимание к липосомам со стороны специалистов разных направлений, рядовой потребитель пока еще плохо представляет себе, что такое липосомы. Поэтому важно познакомиться с этими интересными объектами, вошедшими в практику научных исследований и нашу повседневную жизнь в результате захватывающих достижений биологии во второй половине XX в., и показать перспективы, которые открываются в будущем за счет разработки прогрессивных липосомных и везикулярных технологий.

4.1 Строение липосом

Первые липосомы были получены из фосфолипидов. Основная роль фосфолипидов в клетке — быть структурными компонентами мембран. По своему химическому строению они относятся к группе так называемых амфифильных соединений, молекулы которых состоят из двух частей, радикальным образом различающихся по своему отношению к водному окружению (см.рис. 71). Такое «раздвоение личности» придает фосфолипидным молекулам замечательное свойство самопроизвольно образовывать в воде мембраны, которые представляют собой двойной слой

липидных молекул, обычно называемый просто липидным бислоем. Стремление максимально ограничить контакт неполярных цепей липида с водой приводит к тому, что бислой при его достаточной протяженности замыкается сам на себя, образуя полые оболочечные структуры, получившие название везикулы (от англ. *vesicle* - маленький пузырек).

Часто слова «липосомы» и «липидные везикулы» используют как синонимы. Однако исторически липосомами впервые были названы частицы, образующиеся при механическом диспергировании взвеси набухших фосфолипидов в воде. Эти частицы являются многослойными, и потому их иногда называют мультиламеллярными везикулами (МЛВ). Они состоят из нескольких десятков, а то и сотен липидных бислоев, разделенных водными промежутками, и имеют довольно крупные размеры (до 50 мкм). На другом полюсе обширного липосомного семейства находятся самые маленькие везикулы (около 20 нм), образованные одним липидным бислоем и называемые малыми моноламеллярными везикулами (ММВ). Между этими двумя крайностями лежит целое поле разнообразных липосомных структур, различающихся размерами, формой, числом липидных бислоев и внутренним устройством. Внешне липосомы не всегда выглядят как глобулярные частицы. Иногда они принимают уплощенную дискообразную форму (так называемые дискомы) или имеют вид очень длинных и тонких трубок, которые называют тубулярными липосомами.

4.2 Свойства липосом и везикул

Свойства липосом и их поведение определяются прежде всего наличием у них замкнутой мембранной оболочки. Несмотря на молекулярную толщину (около 4 нм), липидный бислой отличается исключительной механической прочностью и гибкостью. В жидкокристаллическом состоянии бислоя его компоненты обладают высокой молекулярной подвижностью, так что в целом мембрана ведет себя как

достаточно жидкая, текучая фаза. Благодаря этому липосомы сохраняют целостность при различных повреждающих воздействиях, а их мембрана обладает способностью к самозалечиванию возникающих в ней структурных дефектов. Вместе с тем гибкость бислоя и его текучесть придают липосомам высокую пластичность. Так, липосомы меняют размеры и форму в ответ на изменение осмотической концентрации внешнего водного раствора. При сильном осмотическом стрессе целостность бислоя может нарушиться, и липосомы могут раздробиться на частицы меньшего размера.

Для практического применения липосом и везикул исключительно важна их способность включать в себя и удерживать вещества различной природы. Это может быть сделано разными способами. Круг веществ, включаемых в липосомы, необычайно широк - от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот. Хотя липосомы достаточно прочны и стабильны в широком диапазоне условий, их можно легко разрушить до мицеллярного состояния с помощью поверхностно-активных веществ, относящихся к разряду детергентов (то есть моющих средств). Этот процесс, называемый солюбилизацией, является обратимым, и липосомы вновь формируются, если детергент удалить из мицеллярного раствора. Самосборку мембран путем удаления солюбилизирующего детергента обычно применяют для встраивания интегральных мембранных белков в липидный бислой, называя этот процесс реконструкцией, а получаемые при этом белоксодержащие липосомы - протеолипосомами.

4.3 Способы получения липосом

Для получения липосом известны различные способы. Так, например, они могут быть получены способом дегидратации/регидратации, в соответствии с которым липид растворяют в органическом растворителе, таком как хлороформ, дихлорметан или спирт, такой как метанол или этанол.

Затем раствор высушивают с использованием, например, роторного испарителя, после чего на стенке испарительной колбы образуется пленка липида. Добавление к сухой пленке воды или водного раствора, такого как буфер, приводит к образованию многослойных липосом. Образованием именно этого продукта завершается первая стадия образования везикул с использованием различных методик. Последующая обработка может приводить к дегидратации/регидратации везикул, или ДРВ (DRV) (Альтернативно, при последующей обработке ультразвуком липидной суспензии получают однослойные липосомы

Другие известные в технике способы включают детергентную обработку, выпаривание с обращением фаз и введение, а также лиофилизацию и методы замораживания - оттаивания.

В зависимости от применяемого для образования липосом способа получают липосомы разного размера и с различающимися характеристиками. Липосомы могут использоваться для инкапсулирования материалов, таких как биологически активные продукты, в частности фармацевтические средства, включая вакцины, а также нефармацевтические средства, такие как продукты, воздействующие на кожу, в частности препараты для искусственного загара и другие средства макияжа. Методики инкапсулирования варьируют в зависимости от природы инкапсулируемого реагента, размера и свойств образованных липосом.

Размер липосом важен с точки зрения их применения. В некоторых случаях нужны крупные липосомы, в тех случаях, например, когда инкапсулируются частицы, включающие микроорганизмы, такие как бактерии, для получения, например, вакцин.

Однако во многих случаях предпочтительны мелкие липосомы. Это связано с тем, что мелкие липосомы не так быстро удаляются ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС), и в меньшей степени, чем крупные

липосомы (с размерами свыше 200 нм). Захват везикул в РЭС возрастает с увеличением их размера. Кроме того, крупные липосомы при их внутримышечной инъекции не способны эффективно достичь регионарных лимфатических узлов и доставить в них вакцины и другие средства.

Липосомные препараты, содержащие различные лекарственные средства, могут быть оптимизированы с точки зрения содержания лекарственного ингредиента, стабильности, картины биологического распределения и уровня поступления в клетку путем изменения физико-химических параметров липосом, таких как температура фазового перехода, размер липосом, характер распределения препарата по размеру, величина поверхностного заряда, гидратация поверхности соединениями, несущими гидрофильные группы, и характер распределения по размеру частиц.

Размер липосом представляет собой параметр, который определяет фракцию, захватываемую РЭС. Мелкие липосомы могут быть получены при использовании гомогенизаторов под высоким давлением, но при этом используют большие количества липидов, для того чтобы добиться приемлемой величины коэффициента отношения включенного лекарственного средства к липидной массе. При использовании другого подхода в псевдооживленном слое многослойных дегидратированных-регидратированных везикул (ДРВ) в присутствии неинкапсулированного лекарственного средства получают везикулы с размером менее 200 нм, сохраняющие количество первоначально включенных растворенных веществ.

Показан стабилизирующий эффект на везикулы, возникающий при добавлении сахара после получения липосом, в том случае, например, когда липосомы, содержащие лекарственное средство, лиофильно высушивают для хранения и затем подвергают повторной гидратации.

Авторы настоящего изобретения нашли усовершенствованный способ получения липосом, и в частности мелких липосом, который позволяет сократить количество стадий процесса и получать при этом стабильные липосомы с высокоэффективной инкапсулирующей способностью.

Предлагается способ получения липосомного препарата, содержащего реагент, который включает следующие стадии:

- 1) образование пустых липосом;
- 2) смешивание липосом, полученных на стадии (1), с раствором сахара и указанного реагента и
- 3) высушивание смеси, полученной на стадии (2).

При повторной гидратации высушенного материала, полученного на стадии (3), образуются липосомы, содержащие включенный в них реагент. При получении таким способом липосом увеличение их размера относительно липосом, образуемых на стадии (1), происходит в значительно меньшей степени, чем в случае липосомных препаратов, которые не содержат сахара. И в этом случае указанные выше процессы экструзии, обработки в псевдооживленном слое или гомогенизации могут быть исключены.

Установлено, что в ходе сушки с использованием соответствующих концентраций сахаров, до определенной степени снижается уровень слияния и агрегации липосом при образовании аморфной стеклоподобной массы, а также взаимодействие сахаров с основной группой фосфолипидов. В ранних исследованиях дегидратированные/регидратированные везикулы (ДРВ) получали без использования сахаров в качестве стабилизаторов, при этом процедура основывалась на индукции слияния/агрегации образующихся мелких однослойных везикул при контролируемой регидратации. В этой связи, можно было предположить, что общая стабилизация мелких

однослойных везикул за счет добавления соответствующих количеств сахаров будет сопровождаться при восстановлении исходных МОВ (SUV) очень низкой величиной включения.

Однако оказалось, что это не так. Хотя, как и в случае всех липосом, степень включения реагента зависит в некоторой мере от характеризующего систему коэффициента отношения липид:реагент, тем не менее ожидается, что уровень инкапсулирования реагента в липосомы, достигаемый при использовании способа по настоящему изобретению, будет вполне приемлемым.

Кроме того, применение липосом в качестве системы доставки лекарств налагает определенные требования к их физической и химической стабильности. Липосомы в виде водной дисперсии подвергаются гидролизу и физическим изменениям в процессе хранения, включая подтекание инкапсулированных лекарственных средств, а также изменение размеров в результате агрегации или слияния. Однако ожидается, что физическая и химическая стабильность липосом, получаемых по способу настоящего изобретения, будет хорошей.

Таким образом, настоящий способ дает возможность получать мелкие липосомы с высокой загрузкой, которые, как отмечалось выше, будут особенно полезны при создании фармацевтических композиций. Кроме того, заявленный способ может использоваться для приготовления инкапсулированных материалов разных типов.

Однако способ согласно настоящему изобретению будет особенно полезен при изготовлении липосом для применения в фармацевтической области. В этом случае используемые в рамках данного способа реагенты будут включать биологически активный материал, такой как фармацевтический ингредиент или лекарственное средство. Для этой цели получаемые на стадии (1) липосомы должны представлять собой мелкие

однослойные везикулы со средним размером, например, в диапазоне от 25 нм до 90 нм, предпочтительно в диапазоне от 50 нм до 90 нм и наиболее предпочтительно от 70 нм до 90 нм. В конечном итоге, получаемые в рамках этого способа липосомы будут иметь все еще небольшой размер, в среднем менее 500 нм и обычно от 100 до 200 нм.

Имеющиеся на стадии (1) липосомы представляют собой пустые липосомы, получаемые посредством любого традиционного способа, например, с помощью описанного выше классического способа. При этом любые образованные липосомы, в случае если их средний размер слишком велик для целевого использования, могут быть уменьшены с помощью известных в технике способов, например, ультразвука, гомогенизации, экструзии или техники псевдооживленного слоя.

Для получения липосом используют известные в технике липиды. Они включают, например, лецитины, такие как, например, фосфатидилхолин (ФХ), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ), или заряженные липиды, в частности анионные липиды, такие как фосфатидиновая кислота, или катионные липиды, такие как стеариламин, необязательно в присутствии холестерина. Предпочтительным липидом является ДСФХ. Выбор липида зависит, в определенной мере, от природы активного средства и от цели использования липосом.

Приемлемые для использования на стадии (2) растворы сахаров включают водные растворы моносахаридов, таких как глюкоза и фруктоза, дисахаридов, таких как лактоза или сахароза, а также полисахаридов. Особенно предпочтительным для использования в способе настоящего изобретения сахаром является дисахарид, такой как сахароза или лактоза, или моносахарид, такой как глюкоза. В особенности, в качестве сахара предпочтительна сахароза.

В предпочтительном варианте на стадии (2) используют такое количество сахара, чтобы отношение массы сахара к массе липида составляло от 1:1 до 6:1 (масс./масс.) и более предпочтительно - в диапазоне от 1:1 до 5:1 (масс./масс.). Было обнаружено, что чем большее количество сахара используют, тем меньше увеличение размера липосом, получаемых после регидратации, в сравнении с имевшимися на стадии (1). Однако при этом уровень включения реагента может быть ниже. Таким образом, правильный выбор используемых в данном способе коэффициентов указанных соотношений будет зависеть от их целевого использования, при этом необходимо определять нужный баланс между степенью включения реагента при данном содержании липида и размером липосомы. Разница между этими параметрами находит отражение в определенной вариабельности воздействия конкретного реагента на образование липосом, что будет пояснено ниже. В приемлемом варианте количество имеющегося сахара менее 10 % (масс./объем) от всей композиции.

Кроме того, было показано, что увеличение объема используемого в рамках данного способа сахарного раствора при снижении его концентрации может способствовать повышению уровня включения. Приемлемые концентрации растворов сахаров находятся в диапазоне от 20 до 200 мМ, предпочтительно от 30 до 150 мМ.

Далее, было также обнаружено, что если последующую регидратацию проводить при повышенных температурах, например, от 30 до 80 °С, в частности от 40 до 65 °С, и в особенности примерно при 60 °С, то уровень включения может быть повышен. Показана эффективность такой процедуры в случае липосом, включающих ФХ и холестерин (ХОЛ), которые обычно образуются при комнатной температуре. Однако при использовании в рамках такого способа повышенных температур может наблюдаться некоторое увеличение размера липосом в сравнении с их исходными значениями, что

нужно принимать во внимание при выборе условий, практикуемых для получения липосом в каждом конкретном случае.

К числу других факторов, которые, как было показано, также влияют на уровень включения, относятся индивидуальная природа реагента, такого как инкапсулируемое лекарственное средство, и, в частности, растворимость и количество такого реагента. При этом в некоторых случаях растворимость реагента может лимитировать то его количество, которое может быть растворено на стадии (2) и далее включено в липосому. К числу других факторов, влияющих на количество включаемых реагентов, относятся взаимодействия реагента с липидами липосомы, а также проницаемость липосомы для реагента.

В случае наличия в растворе, используемом на стадии (2) реакции, высоких концентраций реагента процент его включения может быть снижен. В этой связи, по экономическим причинам может быть выгодно снижать количество применяемого реагента.

Условия, выбираемые для целей получения липосом желательных размеров и нагрузки, включают коэффициент отношения массы сахара к массе липида, природу липида, концентрацию используемого раствора сахара, количество включенного в раствор реагента и температуру регидратации, которые могут быть определены для каждого конкретного реагента с помощью обычных процедур.

Указанная выше стадия (3) может проводиться с использованием традиционных способов, например, с помощью лиофильной сушки, распылительной сушки, флэш-кристаллизации, высушивания в воздушном потоке (например, в псевдооживленном слое), вакуумной сушки, сушки в печи или посредством любого другого известного в технике способа. И хотя механические свойства продуктов, получаемых описанными способами, могут различаться, при том, что продукт распылительной сушки будет

представлять собой дискретный и зачастую текучий порошок, тогда как лиофильная сушка дает твердую лепешку, свойства липосом при регидратации с точки зрения их стабильности и способности к нагрузке реагентом будут в целом сходными.

Распылительная сушка может оказаться предпочтительной для ряда приложений, включая приготовление фармацевтических композиций, поскольку она позволяет получать продукт с приемлемыми для дальнейшей обработки механическими свойствами.

Продукт, получаемый при лиофильной сушке, включает блочную пористую массу, обладающую относительно слабыми механическими характеристиками. С помощью размалывания этой массы ей могут быть приданы лучшие механические свойства, однако имеется риск возникновения повреждений на такой дополнительной стадии.

Распылительная сушка может дать продукт с хорошими механическими характеристиками, который может быть доставлен ингаляцией или введен парентерально после разбавления водой.

Последующая стадия регидратации может быть осуществлена в ходе процесса производства или альтернативно композиция может поставляться в сухом виде и дальше подвергаться регидратации уже в сайте предполагаемого введения, например, в больнице или в фармацевтическом отделении, когда инкапсулированное лекарственное средство должно быть доставлено пациентам.

Образуемые липосомы отличаются хорошей стабильностью, что определяет длительный срок годности продукта. Это свойство важно, например, для косметических продуктов, гигиенических принадлежностей и фармацевтических средств.

Как отмечалось выше, указанный способ особенно хорошо подходит для получения относительно мелких липосом с высокой степенью нагрузки реагентом. Это особенно желательно для применения в фармацевтической области, в частности для доставки материалов, таких как полимерные или белковые лекарственные средства, ДНК-содержащие вакцины, векторы для генной терапии или химические лекарственные средства. Приемлемые химические средства включают антибиотики, такие как окситетрациклины, *b*-лактамные антибиотики, такие как пенициллины, в частности пенициллин G, ампициллин или амоксициллин, или цефалоспорины, а также противораковые средства, гормоны, иммунотерапевтические препараты, противовирусные средства, противовоспалительные соединения и др.

На основе получаемых с помощью вышеописанного способа липосомных продуктов могут быть приготовлены фармацевтические композиции, например, при объединении их с фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями. Такие композиции могут быть пригодны для целей перорального, парентерального, и, в частности, внутривенного, или местного введения, например, на поверхность кожи или слизистой. Особенно полезной в рамках настоящего изобретения является композиция, пригодная для введения с помощью аэрозольного распылителя или ингалятора. Было обнаружено, что для этой цели приемлемы нейтральные липосомы липидной природы с высоким фазовым переходом, такие как липосомы, образуемые из смесей ДСФХ и холестерина. При осуществлении процесса в соответствии со способом настоящего изобретения, проведение экструзии перед сушкой может стать необязательной процедурой.

4.4 Применение липосом

В фундаментальных научных исследованиях

Первое применение липосом в научных исследованиях было связано с моделированием клеточных мембран. В то время гипотеза липидного бислоя как основного структурного элемента биологических мембран овладела умами исследователей и необходимы были четкие экспериментальные доказательства справедливости основных положений этой гипотезы. Липосомы, как никакая другая модель, идеально подходили для решения этой задачи. С помощью липосом были установлены основные закономерности транспорта веществ через мембрану, показана важная роль фазовых переходов в функционировании мембран, определены молекулярные параметры липидного бислоя и его динамические характеристики, изучены процессы слияния мембран, в реконструированных системах были охарактеризованы индивидуальные мембранные белки и целые белковые ансамбли.

В последнее время на липосомы и везикулы обратили внимание представители других фундаментальных наук. Математиков интересуют проблемы топологии двумерных поверхностей в трехмерном пространстве в связи с упругими свойствами липидного бислоя. Физиков липосомы привлекают как фрактальные системы со специфическим поведением при агрегации и богатством морфологических превращений. Для химиков бислойные везикулы интересны как микрореакторы, позволяющие проводить химические реакции в ориентированных средах с возможностью пространственного разделения реагентов и продуктов реакции посредством мембран. Специалистам в области материаловедения липосомы представляются прекрасной основой для создания новых композитных материалов с высокой биосовместимостью. Этот перечень можно

продолжить, но и так ясно, что липосомы и везикулы в качестве объекта исследования обещают в будущем много интересных открытий.

В фармакологии и медицине

В настоящее время это, пожалуй, наиболее активно развивающееся направление практического использования липосом. Способность липосом включать в себя самые разные вещества практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, свойств и размера молекул дает поистине уникальные возможности для решения некоторых медицинских проблем. Так, многие лекарственные препараты имеют низкий терапевтический индекс. Это означает, что концентрация, в которой они оказывают лечебное действие, мало отличается от концентрации, при которой препарат становится токсичным. В других случаях лекарственный препарат при введении в организм может быстро терять активность под действием инактивирующих агентов. Включение таких препаратов в липосомы может значительно повысить их терапевтическую эффективность, поскольку, с одной стороны, препарат, находящийся в липосоме, защищен ее мембраной от действия неблагоприятных факторов, а с другой – та же мембрана не позволяет токсичному препарату превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма. Липосома в данном случае выполняет роль хранилища, из которого препарат высвобождается постепенно, в нужных дозах и в течение требуемого промежутка времени.

С точки зрения биологической совместимости липосомы идеальны как переносчики лекарственных препаратов. Они делаются из природных липидов и поэтому нетоксичны, не вызывают нежелательных иммунных реакций и биodeградируемы, т.е. должны разрушаться под действием обычных ферментов, присутствующих в организме. Однако ситуация с терапевтическим применением липосом не так проста, как хотелось бы. Оказалось, что липосомы недостаточно стабильны в крови и быстро выводятся из кровотока макрофагами, которые находятся в печени, селезенке

и костном мозгу. По этой же причине липосомные носители обычно не удается направить именно в те органы и ткани, где происходит патологический процесс.

Следует, однако, сказать, что привлекательность идеи липосомной терапии была настолько велика, что перечисленные осложнения стимулировали многочисленные и интенсивные исследования, в результате которых для многих проблем были найдены оригинальные, а порой и остроумные решения.

Так, естественная нацеленность макрофагов на липосомы может быть использована для их активации, что очень полезно для борьбы с вирусными, бактериальными и грибковыми инфекциями. Тот факт, что липосомы не задерживаются такими органами, как сердце, почки, мозг, а также клетками нервной системы, позволяет за счет использования липосомных лекарственных форм значительно снизить кардиотоксичность, нефротоксичность и нейротоксичность ценных препаратов, применяемых для противораковой терапии. Кроме того, прикрепление к поверхности липосом молекул, специфичных по отношению к клеткам-мишеням (например, иммуноглобулинов), в некоторых случаях оказывается эффективным для направленной доставки противораковых, противоинфекционных и противовоспалительных препаратов. Проблема доставки лекарства в нужное место может быть также решена путем местного применения липосомных препаратов, как это было сделано в случае противоартритных препаратов, а также препаратов для лечения дыхательного синдрома новорожденных и астмы.

Все эти приемы были предложены для обычных липосом, время пребывания которых в кровотоке невелико (от нескольких минут до нескольких часов). И поэтому они не решали общей проблемы преодоления

естественных барьеров для липосом в организме, основным из которых является печень.

Решение проблемы оказалось довольно неожиданным и достаточно простым. Выяснилось, что клетки, вылавливающие липосомы из крови, можно обмануть, сделав поверхность липосом сильно гидрофильной за счет ковалентно связанного синтетического полимера полиэтиленгликоля (рис. 4). В результате время жизни липосом в кровотоке превысило вдвое суток. Но, что более важно, такие липосомы постепенно накапливались в тех местах, где кровеносные сосуды имели дефекты, то есть были повреждены, обладали повышенной проницаемостью или вообще были плохо развиты, что обычно характерно для опухолей и окружающих их тканей, а также при инфекционных и воспалительных процессах. Необычные свойства полиэтиленгликольсодержащих липосом и их высокая терапевтическая эффективность настолько поразили исследователей, что эти липосомы получили образное название «липосомы-невидимки» (*stealth liposomes*) аналогично известному самолету-невидимке «стелс», который не удается обнаружить с помощью радарных устройств.

Применение липосом в медицине не ограничивается традиционной химиотерапией. Липосомы более перспективны в сочетании с новым поколением лекарств, созданных благодаря успехам белковой и генетической инженерии. Как известно, генетическая инженерия основана на введении фрагментов ДНК в клетки, с тем чтобы заставить их продуцировать нужные белки или полипептиды. Использование для этой цели липосом, содержащих лечебные гены, может оказаться полезным для терапии наследственных заболеваний, которые обусловлены дефектами генов, кодирующих жизненно важные белки. С помощью липосом в организм могут быть также введены различные белки, в частности ферменты, с целью энзимотерапии и цитокины для коррекции иммунного статуса организма. Весьма серьезные работы

ведутся по созданию гемоглобинсодержащих липосом (гемосом) с целью получения искусственных заменителей крови.

Успехи в разработке и применении липосомных препаратов медицинского назначения велики. В настоящее время они являются предметом пристального внимания со стороны многих фармацевтических компаний, которые инвестируют значительные средства в эту область. И по-видимому, недалеко то время, когда в клиниках и на аптечных прилавках будут широко представлены разнообразные липосомные препараты, предназначенные для лечения болезней, которые сегодня кажутся неизлечимыми.

В косметике

В 1987 г. две известные косметические компании создали новый продукт, явившийся плодом усилий их исследовательских лабораторий. Это были липосомный гель «Каптюр» фирмы «Кристиан Диор» и крем для кожи под названием «Ниосомы» фирмы «Л'Ореаль». В последующие годы в продаже появилось несколько сот аналогичных продуктов. Почти каждая уважающая себя косметическая фирма считала своим долгом предложить покупателю изделия, изготовленные на основе липосом. И сегодня это, пожалуй, самая продвинутая в коммерческом отношении область их практического применения.

В основе липосомного косметического бума лежат два обстоятельства. Во-первых, медицинские требования к препаратам для кожного применения являются значительно менее жесткими, чем в случае препаратов, применяемых парентерально, т.е. вводимых в организм с помощью инъекций. И поэтому путь таких препаратов от исследовательской лаборатории до потребителя занимает значительно меньшее время и обходится производителю намного дешевле. Во-вторых, для косметических целей пригодны самые простые липосомы, производство которых не требует

сложного технологического оборудования и дорогостоящих исходных материалов.

В ассортименте липосомной косметики имеются кремы для повседневного ухода за кожей, кремы, предотвращающие ее старение, средства для ухода за кожей после бритья, кондиционеры для волос, духи с длительно сохраняющимся запахом, губная помада, солнцезащитные кремы, средства для загара, грим, интимная и декоративная косметика. Основу всех этих препаратов составляет водная дисперсия липосом, как правило многослойных, которые благодаря способности удерживать воду являются прекрасным увлажняющим агентом. Для усиления полезных эффектов в рецептуру вводят добавки различных биологически активных веществ, таких, как витамины, антибиотики, белковые экстракты, фруктовые кислоты. Нередко продукция выпускается по принципу «сделай сам», когда покупателю предлагается липосомная основа, в которую он по своему желанию может ввести любые добавки.

Что касается механизмов благотворного влияния липосомных косметических препаратов, то здесь нет единого мнения. Некоторые утверждают, что в липосомной форме биологически активные вещества легче проходят через кожу, тогда как другие считают, что это не так и что липосомы хороши как инертный, не раздражающий кожу материал, который готовится на водной основе и не содержит в своем составе спиртов, детергентов, масел и других солюбилизаторов не природного происхождения.

В пищевой индустрии

Липиды в виде жиров являются одним из основных компонентов почти любого продукта питания. Способность липосом солюбилизовать (делать растворимыми) вещества в воде, защищать их от неблагоприятных факторов среды и высвободить эти вещества в нужное время и предсказуемым образом может быть использована в технологических процессах пищевой

промышленности. Так, в сыроделии использование ферментов в липосомной форме позволило сократить время созревания сыра (для чего иногда требуется около года) на 30-50%. Кроме того, благодаря более высокой дисперсности липосомных препаратов значительно улучшились вкусовые качества сыра и его консистенция.

Хлебобулочные и кондитерские изделия, содержащие липосомы, которые, как известно, хорошо удерживают воду, не черствеют и длительное время сохраняют товарный вид. Добавление липосом в дрожжевое тесто защищает клетки дрожжей от гибели при замораживании, благодаря чему появилась возможность поставлять изделия из этого теста в виде полуфабриката в замороженном виде. Включение в липосомы вкусовых и ароматизирующих добавок также улучшает потребительские свойства кондитерских изделий. Благодаря крупномасштабности пищевой индустрии и её ориентации на массового потребителя перспективы развития липосомных технологий в этом направлении весьма велики.

Другие применения липосом

Применении липосом в генотерапии. Перенос генетического материала с помощью липосом был осуществлен не только в клетки млекопитающих, но и в протопласты растений, а также в клетки прокариот. В некоторых случаях эффективность трансформации клеток при использовании липосом была существенно выше, чем с помощью других методов, что очень важно с точки зрения возможностей их биотехнологического применения. В настоящее время некоторые фирмы выпускают специальные липосомные реагенты для трансфекции, то есть введения ДНК, РНК и других макромолекул в клетки разного типа.

Из других применений липосом заслуживает упоминания их использование для диагностических и аналитических целей. В липосомы можно включать радиоактивные, рентгеноконтрастные, парамагнитные

вещества, а также вещества, отражающие ультразвук, с тем чтобы улучшить качество изображений, получаемых такими методами диагностики, как компьютерная томография, рентгенография, сцинтиграфия и ультразвуковое зондирование.

И наконец, некоторые экологические проблемы могут быть решены с помощью липосом. Так, эффективность использования микроорганизмов для биологического разложения органических отходов и промышленных загрязнений зависит от обеспечения микроорганизмов веществами, необходимыми для их роста и размножения. В этом случае липосомы могут быть использованы для доставки клеткам недостающих питательных элементов, минеральных добавок и ростовых веществ. Кроме того, при нефтяных загрязнениях добавление липосом значительно облегчает удаление нефти с поверхности воды и из почвы.

Липосомы являются эффективным средством удаления из жидких сред токсичных и радиоактивных металлов. Использование липосом в производстве красок и лакокрасочных материалов позволяет отказаться от применения экологически вредных органических растворителей.

Вопросы для самопроверки:

1. Современные липосомальные препараты.
2. Строение липосомы.
3. Свойства липосом и везикул.
4. Сырье для получения липосом.
5. Модификация липосомальных структур.
6. Способы получения липосом.
7. Применение липосом.

5. Нанотехнология в доставке лекарственных средств

Применение нанотехнологий способно существенно повысить эффективность доставки наноразмерных частиц лекарственных средств, биоактивных препаратов, вакцин и т.д. По данным журнала «Nature Materials», к 2006 г. в мире уже было разработано порядка 130 лекарственных средств и средств доставки, основанных на принципах нанотехнологий. Наряду с фармакологическими изделиями в медицину поступает широкий ассортимент других наноразмерных средств, материалов и устройств. В их числе, например, сверхминиатюрные имплантаты, которые могут эффективно обнаруживать самые ранние стадии болезни и автоматически устранять условия для ее развития. Некоторые виды терапии, основанной на использовании наноматериалов, уже получили разрешение на клиническое применение.

Поэтому можно сказать, что медицинские нанотехнологии представляют сегодня пока скорее футуристической, но, вместе с тем, реалистичной областью ближайшего будущего. Можно ожидать, что они позволят улучшить здоровье человека и продлить его жизнь. Основные усилия сейчас сконцентрированы на болезнях, считающихся неизлечимыми. К ним можно отнести такие заболевания, как рак, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, хорея Хантингтона).

5.1 Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ

В зависимости от агрегатного состояния и морфологических особенностей наночастицы делят на: нанокристаллы, нанокапсулы, наносферы и полимерные мицеллы.

До недавнего времени внутривенно вводили только истинные растворы. Присутствие частиц эмульсии или суспензий может привести к закупорке капилляров – эмболии. Легко прикинуть, какими размерами должны обладать частицы дисперсий, чтобы избежать эмболии. Диаметр эритроцитов, которые свободно проходят через любые сосуды, – 7 мкм. С учетом их деформируемости, с запасом считается, что безопасными могут быть дисперсии с размером частиц менее 1 мкм, то есть нано-диапазона.

Один из менее сложных путей совершенствования лекарственных препаратов состоит в получении их нанокристаллов, существенно отличающихся от аморфных порошков, доминирующих в настоящее время. Размер этих нанокристаллов больше, чем неорганических кристаллов, и составляет 200-500 нм. Нанокристаллы применяют внутрь в виде водных суспензий.

Данный метод обладает рядом преимуществ перед традиционными методами приема лекарств. Лекарственные препараты в виде нанокристаллов лучше всасываются в пищеварительном тракте, то есть их биодоступность значительно выше. Кроме того, в такой форме лекарства более устойчивы к биодegradации в организме, а также более стабильны при хранении, что увеличивает срок их годности.

Очень перспективным представляется использование в виде нанокристаллов рентгеноконтрастных веществ. Например, при коронарографии изображение сосудов сердца держится не более нескольких десятков секунд. Затем, вследствие выхода вещества из сосудистого русла, картина быстро теряет контрастность. Введение же нанокристаллических рентгеноконтрастных веществ позволяет наблюдать сосудистую систему в течение нескольких десятков минут.

Рассмотрим липосомы как контейнеры для доставки лекарственных средств, так как пока только липосомальные препараты дошли до

клинических испытаний и некоторые из них лицензированы. Мембрана липосом состоит из природных фосфолипидов, что определяет их многие привлекательные качества. Они нетоксичны, биодергадируемы, при определенных условиях могут поглощаться клетками, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к внутриклеточной доставке их содержимого (см. рис. 72).

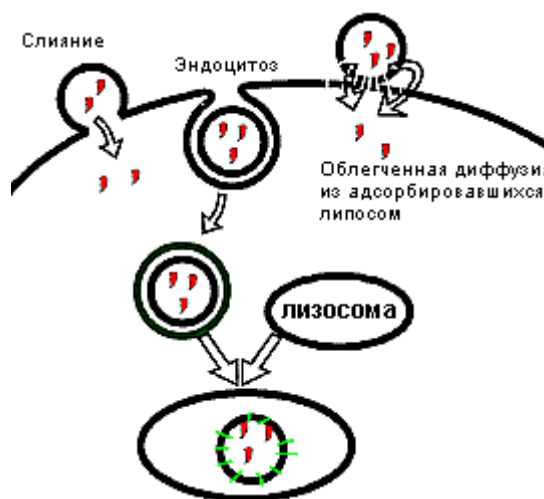


Рис. 72 – Способы проникновения содержимого липосом в клетку

Кроме того, вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных биодеструкции в биологических жидкостях.

Еще одно важное преимущество наночастиц как лекарственной формы — постепенное высвобождение лекарственного вещества, инкорпорированного в них, что увеличивает время его действия. Очень важное свойство липосом (как и других наночастиц) стало основой для конструирования эффективных антираковых препаратов. Речь идет о соотношении размеров наночастиц и диаметра пор капилляров.

Так как размер наночастиц больше диаметра пор капилляров, их объем распределения ограничивается компартаментом введения. Например, при внутривенном введении они не выходят за пределы кровотока, т.е. должны

плохо проникать в органы и ткани. Следовательно, резко понижается токсическое действие субстанции, ассоциированной с наночастицами. С другой стороны, это свойство может служить основой для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в солидные опухоли и очаги воспаления, так как капилляры, снабжающие эти области кровью, как правило, сильно перфорированы (см.рис. 73). Следовательно, наночастицы будут накапливаться в опухоли. Это явление получило название пассивное нацеливание. Таким образом, существует две причины, вследствие которых липосомальные препараты антиканцерогенных субстанций очень эффективны: уменьшение токсичности и пассивное нацеливание.



Следствия:

- Уменьшение токсичности
- Уменьшение объема распределения и, след.
- Увеличения концентрации в кровотоке
- Пассивное нацеливание в «горячие» области

Рис. 73 – Липосомы проникают через поры капилляров только в «горячих точках»

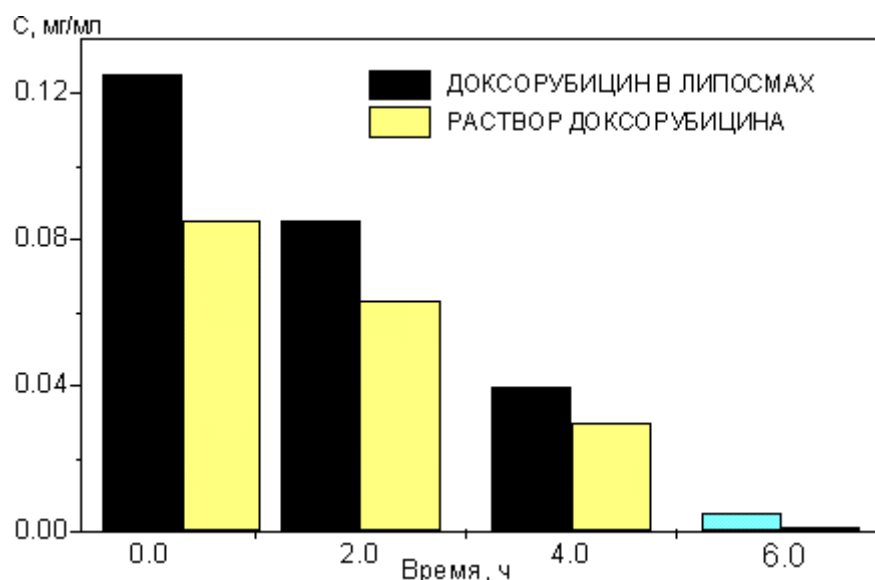


Рис. 74 – Изменение концентрации доксорубидина в крови при введении его в липосомах и в виде раствора

Было подтверждено, что липосомальные препараты обладают более пролонгированным действием, они менее токсичны, чем растворы, так как в меньшей степени накапливаются в сердце, тогда как в крови их концентрация выше. На рис. 74 приведены данные о концентрации доксорубидина в крови после введения раствора и нагруженных липосом. Хорошо видно значительное превышение концентрации доксорубидина при введении его в липосомальной форме. Уменьшение же токсичности в случае использования липосомального препарата позволяет повысить дозу без заметных токсических эффектов. Все это дает качественно новые результаты при лечении липосомальными препаратами. В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке появилось несколько липосомальных противораковых препаратов, таких как антрациклины дауномицин и доксорубидин, а также винкристин, аннамицин и третиноин, многие препараты находятся на последних стадиях клинических испытаний, в том числе и Липодокс.

Но липосомы как и другие наночастицы довольно быстро захватываются ретикулоэндотелиальной системой (РЭС). Это происходит вследствие взаимодействия липосом с белками плазмы – опсонидами (в

основном, компонентами комплемента). Опсоины «метят» Лс, делают их мишенями для клеток РЭС. Понятно, что увеличение времени их циркуляции еще больше повысит эффективность липосомальных препаратов. С этой целью несколько лет тому назад было предложено их поверхность модифицировать полимерами с гибкой гидрофильной цепью, например полиэтиленгликолем (ПЭГ). Для этого используются специальные модифицированные липиды, например, фосфатидилэтаноламин (ФЭ), конъюгированный с ПЭГ.

Очень эффективны липосомы для препаратов, мишенью которых являются клетки РЭС, так как именно эти клетки интенсивно поглощают наночастицы. Такая ситуация складывается при внутриклеточной микробной инфекции и при вакцинации. Доставка амфотерицина В непосредственно в зараженные клетки приводит к прекрасным результатам при системных грибковых инфекциях, висцеральном лейшманиозе.

В случае использования липосомальных вакцин иммунный ответ усиливается в следствие того, что антигены, ассоциированные с липосомами, попадают непосредственно в антигенпредставляющие клетки. Липосомы представляют возможность просто конструировать поливалентные вакцины: например, против нескольких штаммов гриппа (сингапурский, Пекинский и Йамагата), гепатита А и В, дифтерии, столбняка.

Важной областью применения липосом становится генная терапия. Липосомы как средство доставки генетического материала выступают и как защита от нуклеаз, и в качестве компактизирующего средства (положительно заряженные липосомы), и как инициатор эндоцитоза. Известно, что важнейшим этапом процессинга вирусом является слияние ее мембраны с мембраной эндосомы, происходящее под действием гемагглютинина. При этом содержимое липосомы попадает в цитозоль, то есть избегает лизосомальных ферментов. Именно этот путь считается предпочтительным

для липосом, нагруженных генетическим материалом. Липосомы рассматриваются как наиболее перспективные носители. Некоторые композиции оказываются сравнимыми по эффективности трансфекции с аденовирусными векторами.

Во многих случаях, и для генной терапии не в последнюю очередь, важна адресная доставка в нужный тип клеток. В качестве «молекулярного адреса» наиболее часто выбирают иммуноглобулины, имеющие соответствующие мишени на целевых клетках.

Липосомы могут быть весьма полезны для солюбилизации веществ, плохо растворимых как в воде, так и в масле, например, таксола, бетулиновой кислоты.

Основной недостаток липосом как лекарственной формы – относительная небольшая стабильность при хранении. Этого недостатка лишены полимерные наночастицы, имеющие практически те же области возможного применения. Но в отличие от липосом полимерные наночастицы состоят из менее безопасного материала, чем фосфолипиды. Этим в основном задерживается их продвижение в качестве лекарственной формы.

В последние пять лет появилось более десятка лекарственных липосомальных препаратов, не меньшее количество находится на различных стадиях клинических испытаний. Это свидетельствует о том, что липосомальные исследования перешли на качественно другой уровень - уровень конструирования реальных препаратов.

5.2 Магнитные наночастицы

5.2.1 Магнитные наночастицы разрушают раковые клетки

Многофункциональные наночастицы под воздействием магнитного поля могут проникать в раковые клетки, проделывая дыры в их мембранах.

Известно, что одной из основных проблем онкологии является создание эффективных маркеров, способных распознать раковые клетки среди здоровых с тем, чтобы впоследствии разрушать их, не причиняя вреда остальным. В настоящее время именно в этом качестве предлагается использовать сложные магнитные наночастицы, которые теперь могут рассматриваться как один из наноразмерных приборов для биомедицины.

Разрушительная для раковых клеток работа выполняется под действием магнитного поля. Ядро наночастиц состоит из оксидов железа. Исследователями было обнаружено, что под влиянием магнитного поля частицы, находящиеся внутри раковых клеток, способны разрывать мембраны клеток, проделывая в них дыры.

Частицы «наноклиники» состоят из нескольких элементов. Кроме магнитного ядра, которое позволяет проводить неинвазивные манипуляции, частицы содержат также красители, поглощающие инфракрасный и излучающие желтый свет, покрытие из кремния, и обособленные пептидные группы, имитирующие гормоны. Краситель позволяет «видеть» частицы с помощью лазерного микроскопа, а наличие гормонов обеспечивает селективность процесса распознавания раковых и здоровых клеток.

Ядро из оксидов железа изготавливается в первую очередь и имеет средний диаметр около 18 нм. Молекулы красителя — в нем происходит процесс испускания одного желтого фотона при поглощении двух ИК-фотонов — абсорбируются на поверхности ядра. Кремниевое покрытие, добавляемое с использованием специальной технологии, увеличивает диаметр частицы еще на 7 нм. Окончательные размеры частиц составляют около 32 нм.

Исследователи проверяли действие многофункциональных наночастиц на двух линиях раковых клеток: клетках эпителиальной карциномы, клетках почечного рака зеленой африканской мартышки. Они воздействовали на

раковые клетки с внедренными в них наночастицами магнитным полем в 7 Тесла, достижимым в диагностических системах, основанных на явлении магнитного резонанса. В результате было обнаружено разрушение раковых клеток на 30-85 %. То же самое поле в отсутствие наночастиц не вызывало никакого эффекта. Исследователи пока не знают, как в точности магнитные частицы совершают свою разрушительную работу. Однако, они наблюдали, что раковые клетки, подвергшиеся описанному лечению, имеют разрывы в мембранах, в то время как здоровые клетки – нет.

По-видимому, выравнивание наночастиц в магнитном поле приводит к истиранию и повреждению мембран.

Недавно в печати появилось сообщение о завершении важной исследовательской работы, посвященной новому методу диагностики рака. Новая техника, которая применяет магнитные частицы, обнаруживает метастазы в лимфатических узлах даже в том случае, когда они не могут быть определены другими используемыми для этих целей методами. К достоинству предлагаемой процедуры относится то, что она не требует операции.

Для врачей также, как и для пациентов, определение расположения метастаз зачастую становится весьма обременительной процедурой. Часто единственным способом увидеть, где именно лимфатические узлы поражены раковыми клетками, является операционное вмешательство. В некоторых случаях, таких как рак желудка, такая операция может длиться несколько часов, и даже после нее хирурги не вполне уверены в том, что места расположения всех метастаз найдены правильно.

Дополнительные волнения при операционной диагностике метастатического поражения здоровой ткани вызывает тот факт, что кажущиеся чистые (здоровые) лимфатические узлы на самом деле могут

быть поражены метастатическими клетками, т.е. визуальное определение локализации опухоли весьма неточно.

Крошечные магнитные частицы, являющиеся главным звеном описываемой техники, удивительно просты по составу. Если вы возьмете магнит со своего холодильника, размельчите его до состояния порошка и покроете каждую частицу сахарной оболочкой, – это и будет необходимый магнитный порошок. Тем не менее, эти простые наноагенты работают весьма эффективно. Их целями становятся не клетки опухоли, а клетки здоровой ткани, в частности, макрофаги, – класс иммунных клеток, которые перемещаются через здоровые лимфатические узлы. Будучи захвачены макрофагами, магнитные частицы изменяют магнитные свойства клетки, вызывая, в частности, уменьшение сигнала, и «затуманивание» лимфатического узла при наблюдении с помощью техники магнитно-резонансной томографии. В местах расположения метастаз опухолевые клетки заполняют лимфатические каналы, существенно уменьшая поток макрофагов, и, тем самым, число частиц, замазывающих картинку.

Перед исследованиями пациентам ставилась внутривенная капельница, содержащая магнитные частицы в соляном растворе. Процедура МРТ, в ходе которой обследовались лимфатические узлы, проводилась спустя 24-36 ч, 75 % метастатически пораженных узлов, определенных в ходе описываемой процедуры, не могли быть определены никакими другими методами в силу малой площади поражения.

Целевая лекарственная терапия в последнее время получает все большее распространение благодаря магнитным курьерам - магнитным частицам, прикрепленным к биомолекулам, частицам лекарства, или диагностического агента. Магнитные курьеры обеспечивают два уникальных преимущества для биологических систем. Используемые в качестве меток других молекул, они могут быть детектированы с помощью

высокочувствительной магниторезистивной системы-сенсора, работающего, например, на эффекте гигантского магнитосопротивления. С другой стороны, молекулами, прикрепленными к магнитным курьерам, легко можно манипулировать с помощью внешнего магнитного поля. Это касается как процесса доведения, скажем, лекарства, до определенного органа человека, так и удержания его в этом органе.

В последние десятилетия были созданы противоопухолевые препараты, способные в ряде случаев сохранить жизнь пациентам, ранее считавшимся неизлечимыми. Подавляющее большинство этих лекарств относится к группе так называемых цитотоксических агентов, то есть веществ, убивающих активно делящиеся клетки. Эти соединения, подавляя развитие злокачественного новообразования, губительно действуют и на здоровые клетки и ткани.

В первую очередь страдают активно делящиеся стволовые клетки костного мозга - их гибель приводит к нарушению естественных процессов обновления клеток. Поэтому даже процедура трансплантации клеток костного мозга оказывается бесполезной.

Спасительной для пациента стала бы очистка костного мозга, взятого у пациента, от вредоносных клеток.

В настоящее время наиболее перспективным методом решения этой задачи оказалось разделение клеток с помощью специфичной иммуносорбции на магнитоуправляемые сорбенты. Другими словами, сепарация клеток костного мозга осуществляется в магнитном поле. Что же из себя представляют магнитоуправляемые сорбенты?

Это не что иное, как соединенные вместе ферромагнитные частицы (металлические шарики диаметром не более 5 мкм, покрытые полистиролом) и антитела – искусственные образования, которые притягивают либо

здоровые, либо пораженные клетки. В первом случае это положительная, во втором - отрицательная иммуносорбция. А в результате каждая из клеток, относящаяся к той или иной группе, окажется как бы в ловушке (любая из них притягивает по три-четыре антитела). И если обработанный таким образом костный мозг поместить в магнитное поле, произойдет разделение (сепарация) составляющих его клеток на "плохие" и "хорошие". Последние отделяют от первых и помещают в отдельные емкости, предварительно освобождая от магнитоуправляемых сорбентов, где и хранят до момента трансплантации.

5.2.2 Магнитные наночастицы управляют стволовыми клетками

Ученые из UCL показали, что магнитные наночастицы могут быть использованы для направления трансплантированных стволовых клеток к месту повреждения сосудов и ткани сердца. Это позволит достичь большей эффективности клеточной терапии.

Учеными разработана технология, при помощи которой в эндотелиальные клетки-предшественники, необходимые для восстановления кровеносных сосудов, были внедрены микроскопические содержащие железо частицы. При помощи направленного магнитного воздействия на эти частицы удалось добиться движения клеток к месту повреждения артерий.

В экспериментах на животных, направляя клетки при помощи магнитов, ученые смогли добиться в 5 раз большей концентрации стволовых клеток в месте поражения, чем в контроле, когда были трансплантированы клетки без магнитных частиц. В опытах *in vitro* к нужному месту при помощи магнитов удалось направлять в шесть раз больше клеток.

До сих пор мечение клеток магнитными наночастицами использовали в клеточной терапии только для того, чтобы проследить за судьбой

трансплантированных клеток и отчасти их потомства. Но метод, позволяющий при помощи магнитных частиц направлять клетки к месту повреждения, предложен впервые. В настоящее время для использования в клинической практике FDA одобрено только первое применение метода, для слежения за клетками при помощи МРТ.

Ученые надеются, что, поскольку материал, из которого изготовлены магнитные частицы, уже одобрен FDA для медицинского использования, предложенный ими метод будет допущен к клиническим испытаниям в ближайшие 3-5 лет. В случае успеха этих испытаний регулярные инъекции «магнитных» стволовых клеток можно будет применять для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, технологию можно адаптировать для лечения заболеваний других органов. Этот метод не органичивается клетками — при помощи магнитных частиц можно будет, например, направлять специальные антитела или вирусы к раковым опухолям.

5.2.3 Магнитные наночастицы фильтруют кровь

Ученые из Грегори Тех (Georgia Tech) и Института Рака Яичников получили дальнейшее развитие потенциально новых лекарств от рака, которые используют магнитные наночастицы для удаления раковых клеток из организма.

«Мы в первую очередь заинтересованы в разработке эффективных методов для сокращения распространения раковых клеток яичника на другие органы», сказал Джон Макдональд, профессор биологии Технологического института Джорджии и главный научный сотрудник в Институте рака яичников.

Идея пришла группе исследователей из работы Кена Скэрберри, студента. Скэрберри первоначально задумывал идею как средство извлечения вирусов и вирусно инфицированных клеток. По совету своего советника, он стал смотреть, как эта система сможет работать с раковыми клетками.

Свой первый документ по этому вопросу он опубликовал в журнале Американского химического общества в июле 2008 г. В этой работе он и Макдональд показали, что, внедрив в раковые клетки мышей зеленые флуоресцентные маркеры и красные магнитные наночастицы, можно получить способность манипулировать магнитным полем и сдвигать раковые клетки. Сейчас Макдональд и Скэрберри показали, что магнитная техника работает и с человеческими раковыми клетками.

«Зачастую, летальные случаи от рака относятся не к первоначальной опухоли, а к созданию далеких опухолей раковых клеток, которые отслаиваются от первичной опухоли» – сказал Скэрберри. «Оборотные опухолевые клетки могут внедриться в отдаленные местах и привести к возникновению вторичных опухолей. Наша методика предназначена для фильтрации брюшной жидкости или крови, что способствует удалению этих свободно плавающих раковых клеток, что должно способствовать увеличению продолжительности жизни путем предотвращения дальнейшего развития рака».

В тестах, они показали, что их техника работает на людях так же эффективно, как и на мышах. Следующим шагом будет проверка того, насколько хорошо техника может увеличить срок жизни животных. Если все пойдет хорошо, следующим шагом будет внедрение ее в медицину.

5.2.4 Магнитные наночастицы улучшают проникновение лекарств в легкие

Вдыхаемые лекарства скоро могут начать направляться в легкие с использованием магнитного поля. Такая технология была разработана учеными Германии из Университета Людвиг-Максимилиана (Ludwig-Maximilians University) в Мюнхене. Исследователи провели компьютерное моделирование и эксперименты на мышах, где показали, что лекарства, смешанные с магнитными наночастицами, в 8 раз лучше достигают легких, чем лекарства, ингалируемые обычным методом.

При многих легочных заболеваниях, таких, например, как астма или рак легких, необходимо вдыхание лекарств, чтобы они могли достичь больных тканей. Для этого пациенты должны открывать рот и вдыхать лекарство, распыляемое ингалятором. Дальше лекарство попадает в дыхательное горло. Однако эффективность такой методики низка: лишь 4% лекарства проходит через горло. Все это вынуждает врачей повышать дозы, что может, в свою очередь, вызвать нежелательные побочные эффекты.

Более лучший путь, по мнению Карстена Рудольфа (Carsten Rudolph), руководителя исследования, заключается в смешивании лекарств с магнитными наночастицами в микрокаплях жидкости. В дальнейшем такие микрокапли могут быть направлены прямо на больные участки с помощью магнитного поля. Данная идея не является новой, но группа Рудольфа показала первой ее работоспособность на живом организме – в данном случае, мыши.

Исследователи начали с создания компьютерной модели дыхательных путей мыши, состоящих из дыхательного горла, разветвляющегося на два бронха. При расчетах был учтен уровень потока воздуха в дыхательных путях. Предполагая, что используются наночастицы из оксида железа диаметром 50 нм, ученые предсказали, что в такой ситуации и при

использовании магнитного зонда возможно захватывать до 16 % микрокапель лекарства.

Далее группа Рудольфа проверила сделанные расчеты. Для этого у мыши была вскрыта грудная клетка, и рядом с одним из легких был помещен специально сделанный магнитный зонд с высоким градиентом потока магнитного поля. Оказалось, что когда микрокапли впрыскиваются в дыхательные пути мыши, в легкое с зондом попадает в 8 раз больше лекарства, чем в другое легкое. Другой эксперимент на мыши с неповрежденной грудной клеткой показал, что это соотношение уменьшилось и составило 2,5.

Исследователи отмечают, что выполнение той же задачи на людях не является столь простым. Это связано с тем, что человеческие легкие намного больше по размерам и сложнее по структуре, так что в них труднее управлять движением микрокапель. Кроме того, нужно использовать более сильное магнитное поле.

5.3 Нанокomпозиты как системы доставки лекарственных средств

Современные возможности создания нанодисперсных носителей медикаментозных средств достаточно обширны. В их качестве могут выступать как простейшие продукты «сверхмикронизации» натуральных, или близких к ним, материалов, так и полученные путем химического синтеза. Особое место среди них занимают полимеры. Среди них есть множество биологически совместимых, а также, что не менее важно, подвергающихся последующей биodeградации с образованием нетоксичных для организма соединений.

Особый интерес исследователей вызывает поиск носителей, обеспечивающих адресную, целевую доставку нужного лекарственного средства. Такой метод получил название «таргетная терапия», исходя из английского термина «*target*», т.е. мишень. Причем такой мишенью могут

быть не только патологически измененные клетки, вирусы и т.д., но и отдельные органеллы клеток. Чуть подробнее рассмотрим адресную доставку лекарств.

Адресная доставка лекарств – метод введения фармацевтических препаратов для достижения терапевтического эффекта у людей и животных. Чтобы лекарство было эффективным, важно, чтобы его молекулы попали к нужным клеткам: антидепрессанты попали в мозг, противовоспалительные средства – в места воспалений, антираковые препараты – в опухоль и т.д. Направленный транспорт лекарств в очаг развития патологического процесса позволяет добиться повышения эффективности уже существующей лекарственной терапии. Такая адресная доставка обеспечивает более эффективное действие лекарства и сохраняет окружающие ткани. Для нее служат нанокапсулы (стелс-липосомы) или векторы для генной терапии (вирусные и невирусные). У наночастиц-лекарей несколько последовательных задач. Им надо найти в организме клетки-мишени, пройти через все барьеры, доставить к ним субстанцию для лечения или диагностики, затем проникнуть внутрь клетки и выгрузить содержимое. После выполнения своей задачи судьба наночастиц – распасться на части и покинуть организм. Для того чтобы обеспечить выполнение всех этих этапов действий, им надо обладать некоторыми вполне определенными свойствами: иметь рецепторы для направленного движения к цели, обладать способностью проходить через клеточные мембраны, высвобождать содержимое точно в нужное время и в нужном месте, быть нетоксичными. Мишени, на которые направлены наночастицы, это, к примеру, раковые клетки, клетки, зараженные вирусом, атеросклеротические бляшки и поврежденные органы. Барьеры, которые встают на пути наночастиц, многообразны: стенки желудочно-кишечного тракта, стенки капилляров, гемато-энцефалический барьер (между кровью и клетками мозга), мембрана клетки и мембраны клеточных органелл. Выгрузка содержимого в нужном

месте – очень важный этап. Если лекарство не освободится в мишени, оно не сработает. Если оно выйдет наружу по пути к цели, будет еще хуже: оно сработает не там, где надо, и в результате пострадают прочие ткани. Чтобы обеспечить правильное высвобождение субстанции, его надо контролировать, а для контроля служат либо факторы внешней среды: температура, pH, специфические ферменты, либо время. Мировой объем продаж лекарств с модифицированной системой доставки в настоящее время составляет 20 % от общего объема рынка фармпрепаратов. В России разработки систем адресной доставки ведутся по двум направлениям: пассивный направленный транспорт (облегченное преодоление 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 том числе и вакцин).

Определенную степень избирательности доставки может обеспечить сам факт принадлежности того или иного лекарственного вещества, а также его наноносителя к группе водо- или жирорастворимых материалов. Понятно, что гидрофильные соединения не могут непосредственно присоединяться к липофильным структурам (например, фосфолипидным мембранам). Гидрофобные лекарственные средства не так просто превратить в наноразмерную эмульсию, так как велика опасность неконтролируемого образования крупных частиц, угрожающих эмболией. Подобных трудностей в фармацевтике нанопрепаратов весьма много.

Еще одним общим вопросом в области создания таргетных соединений является возможность применения технологий многокомпонентного комплексования. В этом случае носитель обратимо фиксирует на себе сразу несколько специализированных ингредиентов, одни из которых

обеспечивают собственно фармацевтический эффект, а другие – «целенаведение», а возможно, и последующую плановую деструкцию НК.

Для трудно растворимых лекарственных средств лимитирующей стадией процесса поглощения обычно является растворение. Поэтому много внимания уделяется разработке способов повышения скорости растворения и растворимости медикаментозных препаратов. Одним из способов повышения скорости растворения лекарств является получение твердых дисперсных систем. Они представляют собой композиты «лекарственное средство – носитель». В качестве носителей могут выступать вещества (эксипиенты), используемые в качестве вспомогательных при получении лекарств в фармации. Чаще всего используют водорастворимые полимеры, но также и нерастворимые органические и неорганические вещества, такие как микрокристаллическая целлюлоза, хитозан, тальк и т.д.

Перспективным методом, позволяющим повысить скорость растворения и растворимость труднорастворимых лекарственных средств, является их совместная механическая активация (МА) с различными эксипиентами. В результате механической обработки смесей молекулярных кристаллов при определенных условиях может происходить уменьшение размеров частиц до 100 нм и меньше, или образование на поверхности частиц большого диаметра разупорядоченного слоя, или распределение лекарства по носителю с образованием пленки его на поверхности толщиной менее 100 нм. Таким образом, в результате механической активации получается нанокристаллический материал – нанокомпозит, который характеризуется особыми свойствами, отличными от физических свойств смеси компонентов.

Вопросы для самопроверки:

1. Магнитные наночастицы и их роль в лечении заболеваний.
2. Нанокомпозиты как средства доставки лекарств.
3. Фуллерены. Способы получения и их роль в бионанотехнологии.
4. Молекулярная диагностика заболеваний.

Библиографический список

1. Фахльман Б. Химия новых материалов и нанотехнологии. Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2011 – 464 с.
2. Газит Э. Нанобиология: необъятные перспективы развития. – М: Научный мир, 2011. – 152 с.
3. Наноструктуры в биомедицине / под ред. К.Е. Гонсалвес, К.Р. Хальберштадт, К.Т. Лоренсин, Л.С. Наир. М.: Бином, Лаборатория знаний, 2019. – 529 с.
4. Р. Рамбиди Н.Г., Березкин А.В. Физические и химические основы нанотехнологий. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. – 455 с.
5. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 134 с.
6. Ратнер М., Ратнер Д. Нанотехнология: простое объяснение очередной гениальной идеи. М.-СПб.-Киев: Издательский Дом «Вильямс», 2004. – 240 с.
7. Черненко Г.Т. Нанотехнологии: настоящее и будущее. СПб.: «БКК», 2012. – 80 с.
8. Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов / под ред. С.В. Калюжного. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 528 с.
9. Климов В.В. Наноплазмоника. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 481 с.
10. Сергеев Г.Б. Нанохимия: учебное пособие. - 3-е изд.- М.: КДУ, 2009. – 336 с.
11. Попова Л.М. Введение в нанотехнологию: Учебное пособие. РИО СПбГТУ РП. СПб: 2013. – 96 с.
12. Белая книга. Исследования в области наночастиц, наноструктур и нанокомпозитов в Российской Федерации. М. 2006. – 348 с.
13. Рыжонков Д.И. Наноматериалы [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Д.И. Рыжонков, В.В. Лёвина, Э.Л. Дзидзигури – М.:

БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 366 с.
<http://www.iprbookshop.ru/4593>. – ЭБС «IPRbooks».

14. Гусев А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ А.И.Гусев – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. – 416 с. <http://www.iprbookshop.ru/12979>. – ЭБС «IPRbooks».
15. Барыбин, А.А. Физико-химия наночастиц, наноматериалов и наноструктур [Электронный ресурс]: Учеб. пособие / А.А. Барыбин, В.А. Бахтина, В.И. Томилин, Н.П. Томилина. – Красноярск: СФУ, 2011. – 236 с. <http://www.knigafund.ru/books/181129>.

Оглавление

Предисловие.....	3
Часть I. ВВЕДЕНИЕ В НАНОТЕХНОЛОГИЮ.....	4
1 Общие представления о нанообъектах и нанотехнологиях.....	5
1.1 Свободная манипуляция атомами и молекулами.....	6
1.2 История возникновения нанотехнологии.....	8
1.3 Примеры практического применения нанотехнологий.....	10
1.4 Естественные границы развития современной микроэлектроники.....	11
1.5 Создание объектов по принципу «сверху-вниз» и «снизу-вверх».....	12
1.6 Суть «туннельного эффекта».....	14
Вопросы для самопроверки.....	15
2 Электронные микроскопы.....	16
2.1 Принципы работы просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ).....	18
2.2 Сканирующие электронные микроскопы.....	19
2.3 Сканирующие зондовые микроскопы.....	22
2.4 Принцип работы сканирующего туннельного микроскопа.....	24
2.5 Работа атомно-силового микроскопа.....	25
2.6 Принцип работы сканирующего оптического микроскопа ближнего поля (СОМБП).....	27
Вопросы для самопроверки.....	29
3 Инструменты для создания наноструктур.....	30
3.1 Наноскопическая литография.....	30
3.2 Перьевая нанолитография.....	31
3.3 Электронно-лучевая литография.....	32

3.4 Молекулярный синтез.....	33
3.5 Самосборка.....	34
3.6 Наноскопическое выращивание кристаллов.....	36
3.7 Полимеризация.....	37
3.8 Нанокирпичики и строительные блоки.....	38
Вопросы для самопроверки.....	41
4 Нульмерные наноматериалы.....	42
4.1 Первые сложные нульмерные структуры: фуллерены.....	45
4.2 Растворный синтез нульмерных наноструктур.....	54
4.3 Самосборка нульмерных наноструктур в упорядоченные массивы.....	65
Вопросы для самопроверки.....	69
5 Одномерные наноструктуры.....	71
5.1 Углеродные нанотрубки.....	72
5.2 Рост одномерных наноструктур.....	85
5.3 Механизм роста нанотрубок.....	88
Вопросы для самопроверки.....	95
Часть II. ВВЕДЕНИЕ В НАНОБИОТЕХНОЛОГИЮ.....	96
1 Основные понятия нанобиотехнологии.....	96
1.1 Медицинская диагностика на основе наноустройств.....	97
1.2 Системная адресная доставка лекарств.....	98
1.3 Наночастицы как лекарства.....	99
1.4 Медицинские нанороботы.....	99
1.5 Молекулярные детекторы на основе нанопор.....	100
1.6 Биосовместимые наноматериалы.....	101
Вопросы для самопроверки.....	102
2 Биосенсоры.....	103
2.1 Общие сведения.....	103
2.2 Принцип действия.....	105
2.3 Классификация по типу используемого трансдьютера.....	106
2.3.1 Электрохимические биосенсоры.....	107
2.3.2 Пьезоэлектрические биосенсоры.....	112
2.3.3 Оптические биосенсоры.....	113
2.4 Способ закрепления биоматериала.....	116
2.5 Аналитические характеристики.....	119
2.5.1 Калибровочные характеристики.....	119
2.5.2 Времена стационарных и мгновенных откликов.....	120
2.5.3 Селективность.....	121
2.5.4 Воспроизводимость, стабильность и время жизни.....	121
Вопросы для самопроверки.....	122
3 Биочипы.....	123
3.1 Общие сведения.....	123
3.2 Принципы работы.....	125
3.3 Классификация.....	127
3.3.1 ДНК-микрочипы.....	127

3.3.2 Белковые микрочипы.....	130
3.3.3 Тканевые микрочипы.....	133
3.3.4 Клеточные микрочипы.....	134
3.3.5 Микрочипы на основе малых молекул.....	134
3.4 Применение биочипов.....	135
Вопросы для самопроверки.....	136
4 Липосомальные биопрепараты.....	137
4.1 Строение липосом.....	138
4.2 Свойства липосом и везикул.....	139
4.3 Способы получения липосом.....	140
4.4 Применение липосом.....	150
Вопросы для самопроверки.....	157
5 Нанотехнологии в доставке лекарственных средств.....	158
5.1 Липосомы и другие наночастицы как средства доставки лекарственных веществ.....	158
5.2 Магнитные наночастицы.....	164
5.2.1 Магнитные наночастицы разрушают раковые клетки.....	164
5.2.2 Магнитные наночастицы управляют стволовыми клетками.....	169
5.2.3 Магнитные наночастицы фильтруют кровь.....	170
5.2.4 Магнитные наночастицы улучшают проникновение лекарств в легкие.....	172
5.3 Нанокompозиты как системы доставки лекарственных средств.....	173
Вопросы для самопроверки.....	176
Библиографический список.....	177