

Принципы создания наноконструкций с использованием молекул нуклеиновых кислот в качестве строительных блоков

Ю.М.Евдокимов, В.В.Сычев

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук
119991 Москва, ул. Вавилова, 32, факс (499) 135–1405*

Рассмотрены две известные стратегии создания наноконструкций на основе жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот: «энтропийная» конденсация нуклеиновых кислот и «энтальпийная» конденсация комплексов нуклеиновая кислота – поликатион. Приведены примеры создания наноконструкций на основе молекул ДНК и комплексов ДНК с хитозаном. Описаны уникальные свойства наноконструкций, определяющие области их практического применения.

Библиография — 60 ссылок.

Оглавление

I. Введение	194
II. Стратегии создания наноконструкций на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот	195
III. Заключение	205

I. Введение

В фокусе нового быстро развивающегося научного направления, которое зародилось на стыке физики, химии, электронной и компьютерной техники и известно под названием «нанотехнология»,^{1,2} оказались так называемые наноразмерные объекты, величина которых составляет от долей нанометра до сотен нанометров. Интерес к ним обусловлен тем, что на рубеже XX и XXI веков было установлено, что отдельные атомы (или единичные молекулы) можно использовать в качестве «строительных блоков» для направленного создания пространственных структур методом «атом за атомом». К наноразмерным объектам относятся одно-, двух- и трехмерные образования (индивидуальные наночастицы, нанопленки, стержни и трубки), наноструктурированные и нанопористые материалы и наноустройства. Верхний предел указанного выше интервала размеров структур достаточно условен, а нижний определяется размерами молекул и атомов.

Несмотря на многообразие нанообъектов, существует, по-видимому, ряд особенностей, общих для всех таких материалов. Прежде всего, это так называемый размерный эффект.^{3,4} Действительно, атом на поверхности отличается от атома того же элемента «внутри» обычного материала.

Ю.М.Евдокимов. Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией конденсированного состояния нуклеиновых кислот ИМБ РАН. Телефон: (499)135–9720, e-mail: yevdokim@imbr.ru
Область научных интересов: химия природных и физиологически активных соединений, лиотропные жидкие кристаллы биополимеров, биосенсоры, нанобиотехнология.

В.В.Сычев. Младший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (499)135–9927, e-mail: vvs.sci.bio@mail.ru
Область научных интересов: нанобиотехнология.

Дата поступления 15 июня 2007 г.

Если в частице большое число атомов находится на поверхности, то их среднее координационное число будет более низким. Следствием менее прочного связывания атомов на поверхности является более низкая температура плавления поверхностных слоев. Плавление, будучи по своей природе кооперативным процессом, становится не очень точно определенным понятием для небольшого числа атомов в ансамбле (кластере), и при понижении числа атомов в кластере фазовый переход (плавление) становится «размытым».⁴ (Это связано, по-видимому, с тем, что кластеры ведут себя как маленькие молекулы, а не как массивный материал. В этом случае можно говорить, скорее, не о фазах, а о разных структурных изомерах, которые существуют в определенном интервале температур.) Более того, свойства атома в составе небольшого кластера, расположенного на поверхности, зависят от типа подложки или от того, содержит ли кластер «примесь» в виде одного или нескольких атомов других элементов. При выяснении связи между свойствами и размерами кластеров нужно иметь в виду, что важен не только средний размер кластеров, но и вид распределения кластеров по размерам.³ В результате изменение свойств по мере уменьшения размера частиц носит немонокотонный характер и на соответствующих зависимостях появляются специфические точки.

Кроме того, в случае наноматериалов проявляются некоторые дополнительные особенности,³ а именно:

- размерные эффекты могут иметь квантовую природу,
- имеется много факторов, маскирующих наличие размерного эффекта (в отличие от обычных материалов),
- каталитические свойства атомов переходных металлов на поверхности, в том числе селективность, сильно зависят от размера кластеров.

Можно сказать, что в структурах, состоящих из ограниченного числа «строительных блоков», проявляются и доминируют принципиально новые физические явления, такие как квантовые эффекты, масштабирование свойств в зависимости от размеров самих структур, преобладающее влияние

поверхностных свойств, отсутствие дефектов в объеме. Кроме того, наличие свободных валентностей у атомов поверхностного слоя обуславливает значительную «энергонасыщенность» и, соответственно, высокую реакционную способность создаваемых структур. Все сказанное выше означает, что у структур появляются уникальные, зачастую непредсказуемые, механические, электрические, магнитные, оптические, химические и другие свойства. Таким образом, наноструктурный материал — это «больше, чем размер», поскольку важен не сам размер, а появление у созданного материала уникальных свойств, являющихся функцией размера частиц наноматериала.

Наконец, крайне важна проблема стабильности наноматериалов, поскольку часто тепловые, химические и радиационные поля приводят к полной или частичной потере уникальных свойств наноматериалов.^{3,4}

Таким образом, очевидно, что изучение свойств наноструктурных объектов должно быть предметом междисциплинарных исследований.

В соответствии со сказанным выше можно определить нанотехнологию как междисциплинарную науку, изучающую вопросы создания и использования «структурированных» материалов, устройств и систем, свойства которых обусловлены геометрическими размерами или специфическими физико-химическими особенностями наноструктур.⁵

Одним из сравнительно новых направлений нанотехнологии является наномедицина (точнее, нужно говорить «нанотехнология для решения задач медицины»). Идея, что нанотехнология поможет сделать лечение многих заболеваний более направленным, весьма привлекательна. Действительно, можно изменить распределение лекарств в организме пациента таким образом, чтобы они достигали только места своего действия. Эта задача может быть решена в случае применения наноструктурных носителей, называемых также «наночастицами (наносистемами) для адресной доставки лекарств» и создаваемых с учетом биохимических особенностей организма данного пациента. Поскольку уникальная особенность наночастиц состоит в их крайне развитой (по сравнению с традиционными материалами) поверхности, наносистемы для доставки лекарств позволяют преодолеть плохую растворимость и плохие абсорбционные свойства (всасываемость) лекарств новейших поколений. При этом сами наночастицы используются не только для лечения тех или иных патологий, но и для диагностики заболеваний. В связи с этим большое значение приобретает создание новых наноматериалов, имеющих лучшие характеристики для терапевтического и диагностического применения.

Следует отметить, что вопрос о биологической роли наноматериалов остается пока открытым, и их биологические свойства должны быть тщательно изучены. Полученные результаты могут оказаться очень важными для понимания природы токсичности наноматериалов и выявления потенциальной опасности, связанной с нанотехнологией. Первые дискуссии на эту тему на уровне экспертов разных стран были проведены в США⁶ в декабре 2005 г. и в Институте кристаллографии РАН (Москва) в октябре 2006 г. Участники дискуссий обратили внимание на то, что специфические свойства наночастиц любого происхождения (их развитая поверхность, высокая химическая реакционная способность и высокая каталитическая активность, легкое перемещение в потоке воздуха или жидкости, зачастую отсутствие метаболизма и т.д.) могут при их попадании в окружающую среду либо в организм животного или человека привести к последствиям, которые заранее невозможно прогнозировать. Тем самым начато обсуждение правил работы с наноматериалами и правил их контролируемого применения в различных областях медицины, техники и науки.⁷

Материалы ряда семинаров и симпозиумов, проведенных недавно (см., например, материалы международной конференции *NanoTech 2005*, May 8–12, Anaheim, California, USA или материалы *NATO Workshop «Nanomaterials for application in medicine in biology»*, 2006, October 4–6, Bonn, Germany), показывают, что число исследований в областях нанотехнологии, в которых используются биологические макромолекулы, стремительно растет. Нанотехнология на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот (дц-НК) привлекает особое внимание исследователей в силу специфических свойств, характерных только для этих молекул.⁸ В предлагаемом обзоре кратко рассмотрены разные стратегии такого наконструирования, проведено сравнение их особенностей и очерчены возможные области применения создаваемых наноконструкций.

II. Стратегии создания наноконструкций на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот

В настоящее время предложены две принципиально разные стратегии наконструирования, которые основаны на использовании разных физико-химических свойств молекул дц-НК; при этом независимо от применяемой стратегии структура получаемых наноматериалов может быть контролируема с молекулярной точностью.^{9–11}

1. Стратегия «шаг за шагом»

В основе технологии наконструирования, предложенной в 1982 г. Зиманом,⁹ лежит создание пространственных структур путем последовательной модификации исходной молекулы ДНК, что приводит сначала к плоской нанорешетке, а затем к структурам типа куба.

Первый шаг — это получение при помощи биохимических методов или путем прямого химического синтеза молекул НК, имеющих одноцепочечные комплементарные концевые фрагменты (называемые «липкими» концами (**A** на рис. 1,а)). Взаимодействие между «липкими» концами разных фрагментов НК приводит к формированию единой структуры, имеющей два разрыва в сахарофосфатных цепях (**B** на рис. 1,а). При помощи фермента лигазы эти разрывы «зашивают», что приводит к формированию полноценной структуры дц-НК (**C**). Второй шаг — создание точки ветвления (крестообразной структуры **D**) за счет использования фрагментов НК со специфической последовательностью азотистых оснований или введения единичных разрывов в одну из цепей НК. Сами крестообразные структуры могут состоять из трех или четырех разных «ветвей», т.е. могут иметь разную пространственную форму. У крестообразной молекулы дц-НК при помощи ферментов создают «липкие» концы. Гибридизация и последующее сшивание «липких» концов соседних молекул НК приводит к формированию первой наноструктуры — плоской нанорешетки из молекул дц-НК (**E** на рис. 1,б).

Такие структуры из молекул ДНК в точках «ветвления» достаточно подвижны, поэтому образующаяся плоская нанорешетка не является очень жесткой. Для формирования более жесткой структуры был использован ряд подходов, которые можно назвать «дополнительными» к подходу Зимана. В частности, способ, предложенный Нимейером,¹² основан на использовании биобiotинилированной молекулы ДНК и белка стрептавидина, связывающего биотин. Этот прием позволяет создавать нанорешетки, имеющие форму замкнутых колец. Бергстром использовал¹³ для наноконструирования синтетические молекулы, представляющие собой производные 1,1-бис(4-(2-гидроксиэтил)фенил)этиленфенилэтана, в которых обе гидроксильные группы ковалентно связаны с одноцепочечными самокомплементар-

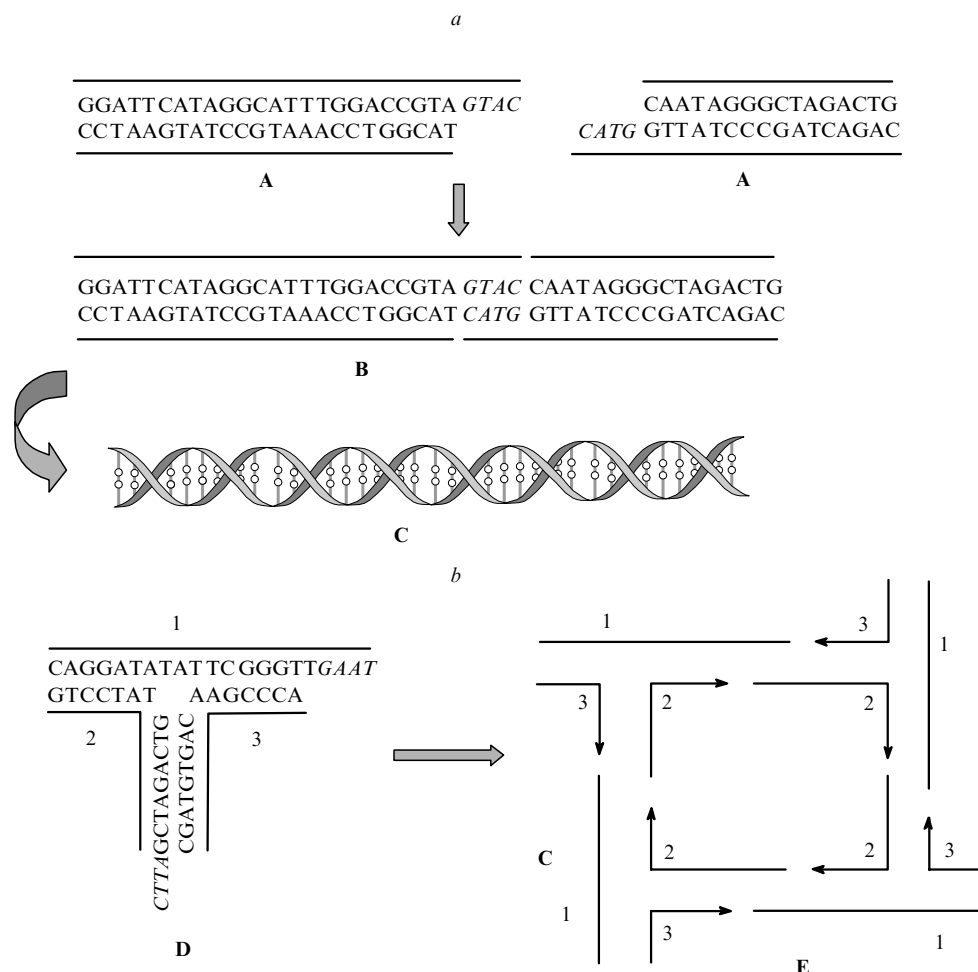


Рис. 1. Схема формирования плоской нанорешетки из двухцепочечных молекул ДНК.

a — получение двухцепочечной ДНК с заданной последовательностью; *b* — создание плоской наноструктуры (см. текст).

ными олигонуклеотидами. Комплементарная гибридизация олигонуклеотидных фрагментов приводила к возникновению циклических структур, включающих от двух до семи «строительных блоков». Жесткость этих конструкций (они названы многолучевыми звездами) обеспечивается чередованием углеводородных фрагментов, имеющих фиксированную пространственную структуру, и двухцепочечных олигонуклеотидов.

Используя молекулы ДНК с заданной последовательностью нуклеотидов и соответствующей крестообразной формы, Зиман получил наноконструкцию, имеющую форму куба, ребрами жесткости которой служили молекулы дц-ДНК (рис. 2). Различные аспекты стратегии «шаг за шагом» и разные наноструктуры (в виде октаэдра, додекаэдра и т.д.) рассмотрены в работе ¹⁰.

Необходимо подчеркнуть, что использование описанной выше методики сопряжено со значительными материальными затратами. Действительно, нужно получить молекулы НК с известными последовательностями азотистых оснований, использовать целый набор ферментов (рестриктаз и лигаз) для расщепления и последующего сшивания фрагментов НК между требуемыми парами оснований, выделить продукт из реакционной смеси, проводя анализ его свойств при помощи современных методов (таких как атомная силовая микроскопия) на всех стадиях синтеза. Это означает, что технология является трудоемкой, она требует контроля «качества» каждой из стадий процесса.

Напомним, что важнейшая задача наноконструирования состоит в создании трехмерных наноконструкций (НАК) с контролируемыми свойствами. Молекулы НК, входящие в наноконструкцию, сохраняют свои физические и химические характеристики и параметры, типичные для вторичной структуры В-формы. Это дает возможность вводить в состав НАК разные молекулы («гости»), что должно придавать новые полезные свойства создаваемым объектам (см. рис. 2).

Для создания пространственных НАК со встроенными молекулами «гостей» Миркин,¹⁴ Летсингер с соавт.,¹⁵ а также Аливисатос с соавт.¹⁶ практически одновременно (в 1996 г.) использовали прием, основанный на применении в качестве «строительных блоков» синтетических одноцепочечных фрагментов НК, «пришитых» к наночастицам коллоидного золота. Добавление к такой системе «чужеродной» НК, последовательность азотистых оснований которой комплементарна исходной НК, приводит в результате гибридизации к жесткой структуре дц-НК. При этом наночастицы золота располагаются на строго фиксированном расстоянии, которое можно контролировать с шагом 0.34 нм (расстояние между парами оснований). Если же использовать наночастицы золота, к которым «пришито» более одного одноцепочечного фрагмента НК, можно создавать 3D-наноструктуры, состоящие из чередующихся на регулярном расстоянии атомов золота и молекул дц-НК.

В работах ^{17–20} описано формирование наноконструкций, включающей углеродные нанотрубки (УНТ) и моле-

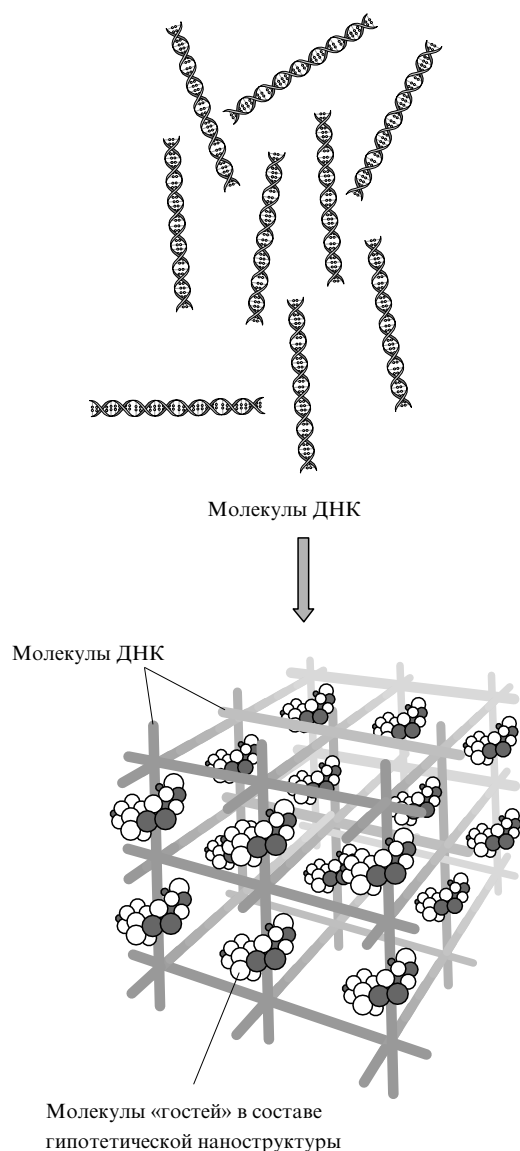


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая основную идею стратегии «шаг за шагом»: из молекул дц-ДНК путем их последовательной модификации необходимо создать трехмерную наноконструкцию, способную удерживать молекулы «гостей».

кулы пептидно-нуклеиновой кислоты (ПНК) — синтетического соединения, в котором (в отличие от природных молекул НК) сахарофосфатный остов заменен пептидной цепочкой. В структуре ПНК сохранены азотистые основания и расстояние между ними остается таким же, как и в природных НК. Пептидно-нуклеиновые кислоты имеют ряд преимуществ перед обычными НК: они более устойчивы в обычно используемых растворителях, защищены от разрушения под действием некоторых гидролитических ферментов и, наконец, имеют незаряженный пептидный остов, увеличивающий стабильность гибридных комплексов ПНК–НК. Молекула ПНК «пришивается» к химически модифицированной УНТ, что приводит к образованию комплекса УНТ–ПНК. Затем этот комплекс подвергается гибридизации с комплементарным одноцепочечным фрагментом молекулы НК, ковалентно прикрепленным к поверхности твердого носителя. В результате образуется жесткая двухцепочечная конструкция (ПНК–НК), содержащая в своем составе УНТ, определенным образом расположенные

в пространстве. Это означает, что, используя молекулы НК, специфическим образом расположенные на поверхности электронного модуля, можно ориентировать УНТ в заданных направлениях.

Кроме того, использование плоских решеток из молекул ДНК в качестве «масок» с последующим встраиванием в эти решетки токопроводящих веществ, таких как арсенид галлия или фосфит индия, открывает, по мнению Ди Мауро и Холленберга,²¹ возможность для создания элементов (чипов) для микроэлектроники с точностью, значительно превышающей точность известных стандартных технологий их изготовления.

В весьма обстоятельном обзоре²² рассмотрены разные аспекты создания и возможного практического применения конструкций, состоящих из наночастиц металлов и молекул олигонуклеотидов (нуклеиновых кислот).

Молекулы «гостей» в составе наноконструкций могут быть мишенями для других биологически активных соединений (БАС), т.е. на основе наноконструкций можно создавать биодатчики для определения веществ, распознающих молекулы «гостей».

При помощи трехмерной наноструктуры, представленной на рис. 2, можно объяснить основы разных стратегий «накопления» молекул химических, в том числе биологически активных, соединений (молекул «гостей») в структуре НК. Согласно первому подходу, молекулы «гостей» в структуре НК могут размещаться внутри самих молекул НК. Действительно, линейная молекула дц-ДНК способна «удерживать» в своей структуре интеркаляторы (т.е. планарные молекулы, встраивающиеся между парами азотистых оснований) или соединения, заполняющие одну из бороздок на поверхности макромолекулы (полипептиды, белки и т.д.). Равновесная концентрация любого из удерживаемых таким образом соединений зависит от особенностей вторичной структуры дц-ДНК (расстояния между парами оснований, их наклона, плотности заряда фосфатных групп и т.д.) и подчиняется известным законам адсорбции. Предельное число молекул «гостей» может быть равно, например, одной молекуле на 5 пар оснований, и эта величина, при прочих равных условиях, зависит только от структуры молекулы «гостя».

Очевидно, что в принципе возможны два пути накопления молекул «гостей» в составе НК на основе ДНК. Так, можно связать молекулы «гостей» с исходной молекулой ДНК и из комплекса ДНК–«гость» сформировать необходимую 3D-НК по технологии «шаг за шагом». Понятно, что в результате нескольких биохимических и физико-химических стадий формирования НК, реализуемых в разных условиях, концентрация молекул «гостей», скорее всего, будет невысокой. Согласно второму пути, пользуясь технологией «шаг за шагом», можно сформировать из исходных молекул дц-ДНК требуемую 3D-НК, а затем связать молекулы «гостей» с дц-ДНК, образующими ребра жесткости этой конструкции. Поскольку физико-химические характеристики молекул ДНК в составе НК остаются практически неизменными, число молекул «гостей», удерживаемых молекулами дц-ДНК в составе НК, не может существенно отличаться от числа молекул «гостей», удерживаемых исходной молекулой дц-ДНК. Таким образом, возможность достижения сверхвысокой концентрации молекул «гостей» при использовании стратегии «шаг за шагом» представляется маловероятной.

Однако возможен и другой подход к рассматриваемой проблеме «аккумуляции» молекул «гостей» в составе НК на основе молекул дц-ДНК. Между молекулами ДНК, упорядоченными в структуре НК, имеется «свободное пространство» (см. рис. 2), и *a priori* не существует никаких ограничений для размещения в нем молекул «гостей». Поскольку расстояние между соседними молекулами дц-ДНК в

упорядоченных структурах этих макромолекул можно регулировать в пределах 2.5–5.0 нм, можно попытаться достичь высокой концентрации «гостей» в свободном пространстве между молекулами ДНК. Таким образом, существует возможность для принципиально иного способа иммобилизации (аккумуляции) молекул различных химических соединений в составе 3D-наноструктур.

2. Стратегия «все сразу»

Как было сказано выше, существуют способы упорядочения соседних молекул НК, позволяющие эффективно использовать пространство между ними для размещения молекул «гостей». Расстояние между соседними молекулами дц-ДНК в упорядоченных структурах составляет несколько нанометров. Можно попытаться достичь высокой концентрации «гостей» в свободном пространстве между молекулами ДНК путем включения этих частиц в состав «сшивок» между соседними молекулами ДНК. Такие сшивки, учитывая расстояние между молекулами ДНК, можно назвать наномостиками. В рассматриваемом подходе к накоплению молекул «гостей» в составе НК концентрация «гостей» определяется геометрическими параметрами свободного пространства, числом молекул «гостей» в составе наномостиков и, по-видимому, прямо не связана с особенностями вторичной структуры молекул дц-ДНК. Очевидно, что для реализации этого подхода к накоплению молекул «гостей» необходимо пространственно упорядочить соседние молекулы дц-ДНК и соединить их мостиками. Это означает, что принципиально возможен совсем другой способ накопления молекул разных химических соединений в составе 3D-НК.

Однако при этом нужно ответить на ряд вопросов:

— каким образом упорядочить соседние молекулы дц-ДНК;

— как соединить соседние молекулы ДНК наномостиками, содержащими молекулы «гостей»;

— какими свойствами будет обладать созданная НК.

В основе технологии создания НК, разработанной в Институте молекулярной биологии РАН,^{23,24} лежит представление о возможности упорядочения молекул НК (или их комплексов), приводящего к образованию разных пространственных структур. Предложенная стратегия наноконструирования основана на использовании не единичных молекул НК, а структур, самопроизвольно возникающих при фазовом исключении этих молекул из водно-солевых растворов.²⁵

Как известно, при концентрировании водно-солевых растворов, содержащих жесткие спиральные молекулы дц-НК низкой молекулярной массы ($\sim 1 \cdot 10^6$ Да), происходит спонтанное упорядочение этих молекул, приводящее к образованию жидкокристаллических фаз разного типа (от холестерической до ромбической).^{26,27} Следует отметить, что стремление к холестерической упаковке — специфическое свойство именно молекул дц-НК (ДНК или РНК),²⁸ обладающих геометрической и оптической анизотропией.

Описаны также способы формирования и физико-химические свойства жидкокристаллических дисперсий (ЖКД) дц-НК в результате конденсации этих молекул в водно-солевых растворах.²⁵

а. Методы получения жидкокристаллических дисперсий нуклеиновых кислот

Существуют два принципиально разных способа получения таких дисперсий (рис. 3), которые и определяют создание наноконструкций разного типа.²⁹

Первый способ конденсации — это так называемая «энтропийная» конденсация, т.е. процесс, в котором движущей силой является изменение энтропии системы.³⁰ Такая

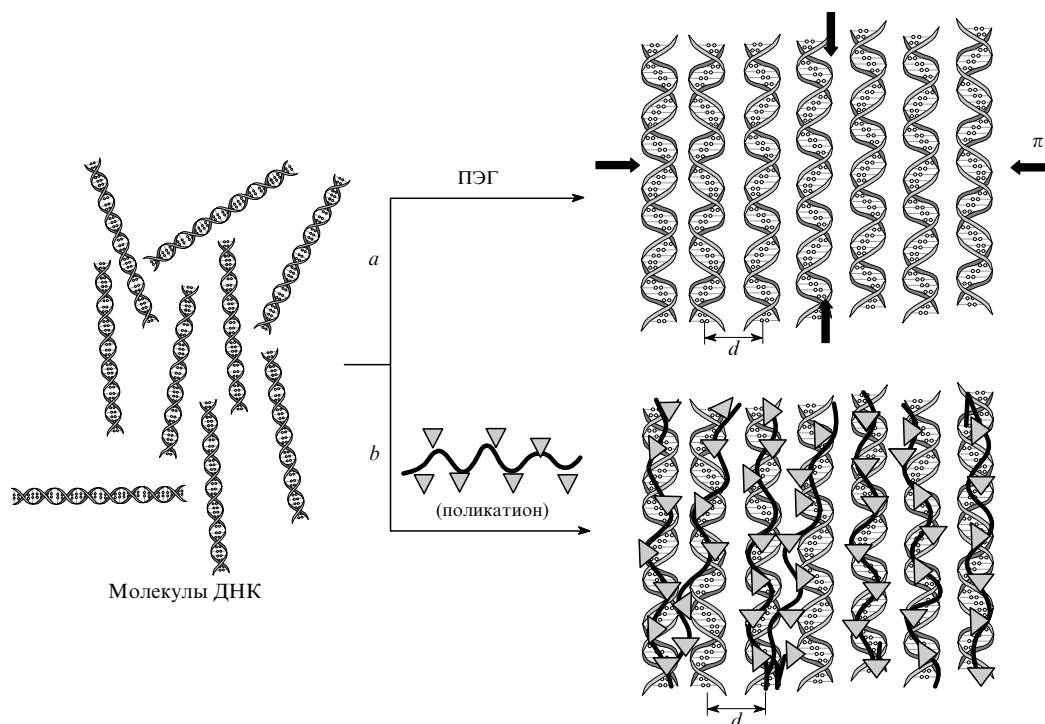


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая два возможных способа самопроизвольного упорядочения молекул дц-ДНК в структуре частиц жидкокристаллической дисперсии (показаны слои, перпендикулярные оси частицы).

а — «энтропийная» конденсация, вызванная добавлением полиэтиленгликоля; стрелки на рисунке обозначают осмотическое давление раствора (π), без которого частицы дисперсии не могут существовать; б — «энтальпийная» конденсация, вызванная взаимодействием молекул ДНК с поликатионами.

конденсация реализуется при фазовом исключении молекул НК из водно-солевых растворов при добавлении к ним некоторых полимеров, в частности полиэтиленгликоля (ПЭГ), и известна также как ψ (ψ)-конденсация (ψ — Polymer-Salt-Induced). При определенных «критических» условиях жесткие молекулы дц-НК низкой молекулярной массы упорядочиваются и образуют ЖКД. (Нарушение «критических» условий, в частности снижение концентрации ПЭГ ниже «критической», приводит к распаду частиц ЖКД и к переходу молекул ДНК в изотропное состояние. Следует подчеркнуть, что «жидкостный» характер упаковки молекул НК в частицах ЖКД не позволяет, например, иммобилизовать их на поверхности мембранного фильтра.) Размер частицы ЖКД, оцениваемый теоретически, близок к 500 нм; в состав частицы входит около 10^4 молекул НК. Как было показано ранее,²⁵ частицы ЖКД, образующиеся при фазовом исключении линейных низкомолекулярных дц-НК, обладают несколькими особенностями, которые можно использовать при создании наноконструкций.

Во-первых, полимер не входит в состав частиц дисперсии (см. рис. 3); для частиц ЖКД дц-НК характерны сохранение реакционной способности структурных элементов (азотистых оснований и др.) НК, а также высокая (в пределах от 160 до 400 мг·мл⁻¹) локальная концентрация НК и упорядоченное расположение соседних молекул НК в частицах ЖКД.

Во-вторых, расстояние (d) между соседними молекулами НК в частицах ЖКД можно регулировать в пределах 2.5–5.0 нм посредством изменения осмотического давления раствора. «Свободное» пространство между соседними молекулами ДНК доступно для молекул многих соединений. Значительное расстояние между молекулами ДНК и «жидкостный» характер упаковки этих молекул обеспечивают условия для быстрой диффузии молекул «гостей» как между молекулами ДНК в одном слое, так и между молекулами ДНК в соседних слоях в структуре частиц ЖКД. Кроме того, из-за невозможности «взять в руки» частицы ЖКД все оценки их параметров основаны на результатах косвенных экспериментальных методов и различных теоретических приближений.

В-третьих, как уже говорилось, молекулы НК в силу присущей им геометрической и оптической анизотропии образуют холестерические ЖКД (ХЖКД). Можно сказать, что такой холестерик является «окрашенным», поскольку он поглощает УФ-излучение (благодаря присутствию хромофоров — азотистых оснований). Разработанная специально для частиц дисперсий «окрашенных» холестериков (и многократно проверенная экспериментально) теория³¹ предсказывает появление в спектре кругового дихроизма (КД) в УФ-области аномальной полосы, которая в зависимости от параметров вторичной структуры молекул НК может иметь разный знак. Теория не накладывает ограничений на число молекул окрашенных соединений (хромофоров), которые можно вводить в структуру НК. Следовательно, можно ожидать появления аномальных полос в спектрах КД в областях поглощения любых окрашенных соединений, не только встраивающихся (интеркалирующих) между парами оснований молекул НК, но и анизотропно располагающихся в пространстве между соседними молекулами НК, которые образуют частицы ХЖКД. Это означает, что аномальные полосы в спектре КД представляют собой аналитический критерий, позволяющий следить за малейшими нарушениями структуры исходных молекул НК и структуры образующихся частиц ЖКД.

Наконец, на поверхности соседних молекул НК в частицах ХЖКД присутствуют реакционноспособные группы (места), либо такие группы могут быть химически встроены в молекулы НК без нарушения их способности к образованию частиц ХЖКД. Этими местами являются, в частности,

азотистые основания, формирующие комплексы с ионами металлов; ими могут быть молекулы лигандов, дополнительно вводимых в систему, или активные группы поликатионов, связанных с молекулой НК.

Таким образом, сохранение реакционной способности структурных элементов НК (азотистых оснований и др.), высокая концентрация НК и упорядоченное расположение ее молекул в частицах дисперсии, не ограничивающее диффузию молекул «гостей», могут обеспечить высокую скорость проникновения этих соединений внутрь частиц и высокую скорость их взаимодействия с молекулами НК. Сказанное означает, что, в принципе, существует теоретическая возможность для «сшивания» соседних молекул НК в частицах ХЖКД. Кроме того, аномальная оптическая активность исходной НК и ЖК-дисперсии позволит следить за тончайшими изменениями не только вторичной структуры молекул НК, но и пространственной структуры частиц ХЖКД. Поскольку молекулы НК в частицах ХЖКД расположены на расстоянии 2.5–5.0 нм, «сшивку» можно назвать «наномостиком», а возникающую при этом конструкцию, содержащую большое число таких мостиков, — наноконструкцией на основе молекул дц-НК. Данный подход к созданию пространственных структур НК можно назвать наноконструированием, причем его идеология принципиально отличается от рассмотренной выше стратегии «шаг за шагом».

Второй способ формирования частиц ХЖКД из жестких линейных молекул НК низкой молекулярной массы — их фазовое исключение из водно-солевых растворов в результате «корреляционного взаимодействия» (притяжения за счет дисперсионных сил)^{32, 33} между сегментами НК, отрицательные заряды фосфатных групп которых нейтрализованы противоионами (см. рис. 3). Поскольку движущей силой процесса является изменение энтальпии системы, этот способ фазового исключения называют «энтальпийной» конденсацией. Для реализации данного подхода нужны поликатионы, нейтрализующие большую часть (80–90%) отрицательных зарядов фосфатных групп НК. По мере уменьшения плотности поверхностного заряда молекул дц-НК дисперсионные силы сначала уравнивают, а затем начинают превышать электростатическое отталкивание соседних молекул; в этом случае происходит спонтанное «исключение» образующихся частиц комплекса НК–поликатион из раствора. Очевидно, что эффективность взаимодействия поликатиона с молекулой НК зависит как от величины положительного заряда поликатиона, так и от характера распределения зарядов вдоль его молекулы.

Наиболее важные особенности дисперсий комплексов НК–поликатион иллюстрирует рис. 3. Во-первых, фазовое исключение комплексов происходит при достижении «критической» концентрации поликатиона в растворе, которая сопоставима с концентрацией исходных молекул НК. При этом большую роль играет молекулярная масса поликатиона: чем она выше, тем эффективнее поликатион связывается с молекулой НК и тем ниже «критическая» концентрация поликатиона, необходимая для конденсации НК. Во-вторых, поликатионы всегда входят в состав образующихся частиц дисперсии.^{34–36} В-третьих, молекулы поликатионов, имеющие фиксированную пространственную конформацию, обеспечивают одно фиксированное расстояние (d) между соседними комплексами НК–поликатион в образующихся частицах; как правило, это расстояние близко к 2.5 нм.³⁷ В-четвертых, в некоторых случаях в зависимости от структуры поликатионов из комплексов НК–поликатион удается сформировать ЖКД, для частиц которой характерно не только большее (но по-прежнему фиксированное!) расстояние между молекулами комплексов НК–поликатион, но и интенсивная полоса в спектре КД,³⁷ т.е. удается сформировать ХЖКД. И, наконец, при образовании частиц ЖКД

комплексов НК–поликатион реакционная способность молекул НК может заметно снижаться (из-за стерических факторов, связанных с расположением поликатионов на поверхности молекулы НК), однако появляются другие реакционноспособные центры в составе молекул поликатиона. Эти центры также диффузионно доступны. Высокая локальная концентрация поликатионов в составе частиц ХЖКД НК, наличие химически активных групп в составе поликатиона и упорядоченное расположение поликатионов могут обеспечить условия для «сшивания» соседних комплексов НК–поликатион в частицах ХЖКД мостиками и создания наноконструкции.

Сопоставляя два пути спонтанного упорядочения молекул НК или их комплексов, можно заключить, что, по крайней мере теоретически, существует принципиальная возможность использования молекул НК, фиксированных в пространственной структуре частиц ЖКД, в качестве «строительных блоков» с регулируемыми свойствами, т.е. можно создать НК с заранее заданными свойствами.

Следовательно, в обоих рассмотренных выше случаях фундаментальная проблема сводится к фиксации молекул «гостей» и построению из них мостиков между соседними

молекулами НК (или комплексами поликатион–НК), чтобы придать устойчивость конструкции в целом.

6. Наноконструирование на основе холестерической жидкокристаллической дисперсии ДНК

При создании наноконструкции первым способом фазового исключения молекул НК (см. рис. 3) требуется соединить соседние молекулы ДНК в структуре частиц ХЖКД мостиками таким образом, чтобы не нарушался характер пространственного упорядочения молекул дц-ДНК в этих частицах. Очевидно, для этого необходимо, чтобы на поверхности молекул НК существовали места, которые могут служить «началом» и «окончанием» указанных мостиков. Такими местами, в принципе, могут быть ионы металла, связанные с парами оснований, или молекулы дополнительно вводимого в систему лиганда. Очевидно, что соединение двух соседних молекул ДНК возможно только в том случае, если они определенным образом ориентированы относительно друг друга (т.е. пространственная ориентация молекул должна быть согласованна). Это означает, что образование наномостиков — тонко сбалансированный про-

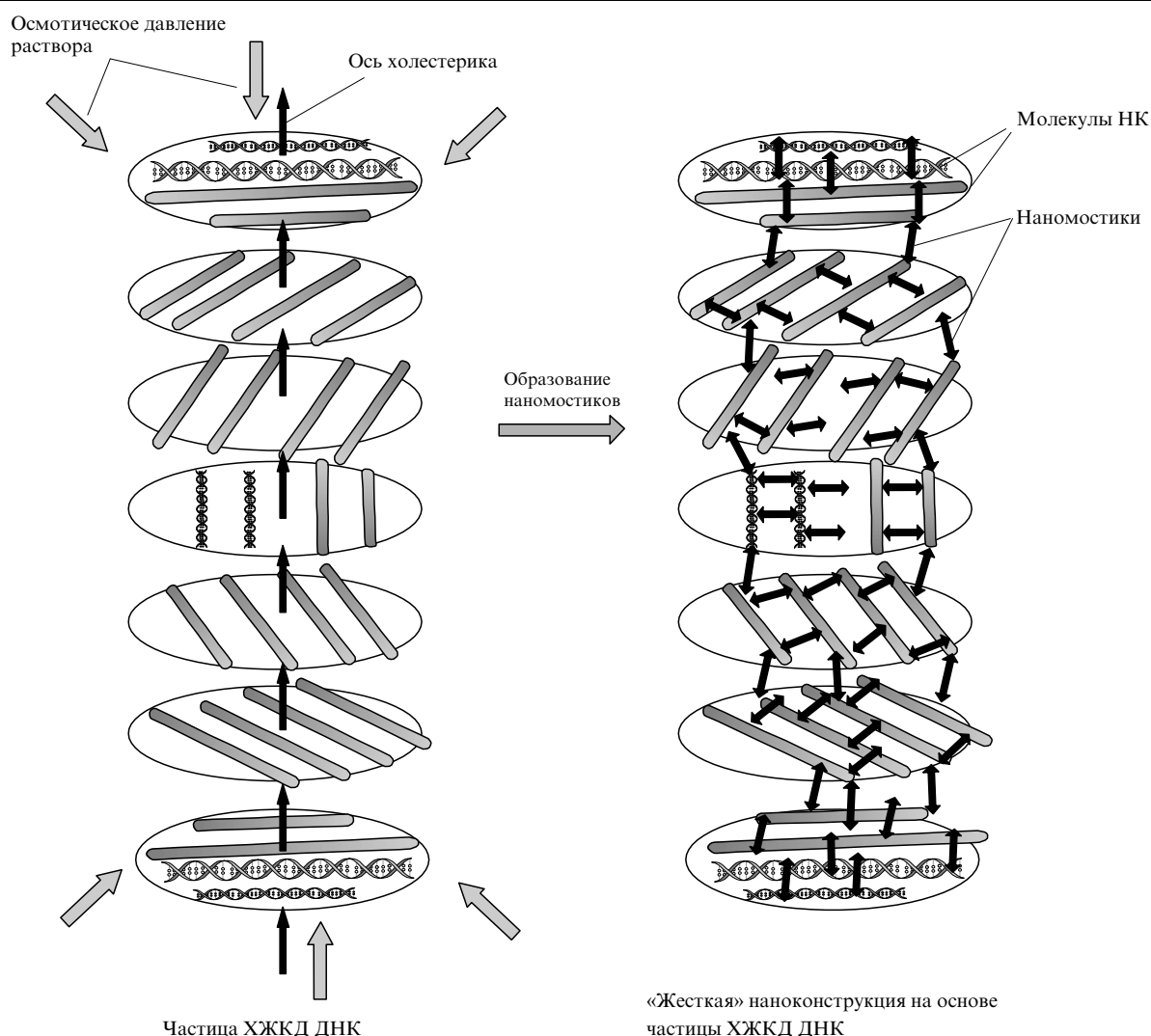


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая основную идею стратегии «все сразу»: частицы ХЖКД, в которых молекулы дц-НК упорядочены, существуют только при определенном осмотическом давлении раствора, необходимо «сшить» молекулы НК мостиками без нарушения пространственной структуры частицы ХЖКД.

цесс, который может реализоваться только при соблюдении целого ряда условий.

Наномостики должны соединить молекулы ДНК, расположенные как в одном слое, так и в соседних слоях холестерической структуры частиц ХЖКД, что приведет к потере части диффузионных степеней свободы молекул ДНК. В результате может произойти драматическое изменение свойств частиц ХЖКД (рис. 4). В частности, «жидкостный» характер упаковки соседних молекул ДНК и диффузионная подвижность должны исчезнуть, а сама структура может приобрести некоторые черты «твердого» материала (прежде всего, стабильность). Наконец, если процесс «сшивания» соседних молекул ДНК удастся реализовать таким образом, чтобы не нарушалась пространственная структура частиц ХЖКД, то аномальная оптическая активность позволит контролировать изменение вторичной структуры исходных молекул ДНК и появление компонентов, образующих мостики.

Детальный анализ свойств соединений, которые могут быть использованы в качестве составных элементов наномостиков, привел к выбору антибиотиков антрациклинового ряда.¹¹ Эти соединения способны образовывать плоские, достаточно жесткие хелатные комплексы с ионами металлов, причем особенно прочные хелатные комплексы дают ионы Cu^{II} . В определенных условиях в состав таких комплексов может входить до 10 повторяющихся субъединиц, т.е. антрациклины могут образовывать с ионами Cu^{II} протяженные плоские структуры (полимерные хелатные комплексы³⁸). Молекулы антибиотиков этой группы, в частности дауномицин (ДАУ), могут внедряться между парами оснований НК и синтетических полинуклеотидов, только если они имеют В-форму. При интеркаляции реакционноспособные группы молекулы ДАУ (группы $\text{C}=\text{O}$ и OH) недоступны для химических реакций. Однако ДАУ и его аналоги могут, как известно, образовывать с нуклеиновыми кислотами В- или А-формы так называемые «внешние» комплексы. При образовании «внешнего» комплекса реакционноспособные группы ДАУ остаются доступными для химических реакций, в частности для хелатообразования. Как показано в работах^{39,40}, важным условием образования протяженных хелатных комплексов является наличие «активных» атомов кислорода в положениях 5, 6, 11 и 12 агликаона антрациклина.

Технология получения наноконструкции на основе дц-ДНК детально описана в работах^{39,41}. Из молекул дц-ДНК формировали ХЖКД, к ней добавляли дауномицин и затем раствор CuCl_2 . В результате такой обработки в спектре КД происходит резкое увеличение амплитуды полосы с $\lambda \approx 500$ нм, соответствующей хромофору комплекса $[\text{ДАУ}-\text{Cu}^{II}]$ (рис. 5). При использованных условиях (молекулярная масса ДНК $\sim 8 \cdot 10^5$ Да, концентрация ДНК ~ 5 мкг $\cdot$ мл⁻¹) максимальная амплитуда указанной полосы может достигать ~ 2500 единиц ΔA (1 единица ΔA равна 10^{-6} оптических единиц). Столь значительное увеличение амплитуды полосы при $\lambda \approx 500$ нм свидетельствует о том, что хромофор комплекса $[\text{ДАУ}-\text{Cu}^{II}]$ оказывается анизотропно фиксированным относительно оси молекул ДНК в составе частиц ХЖКД.³¹

Хотя существуют две разные модели фиксации комплексов $[\text{ДАУ}-\text{Cu}^{II}]$ вблизи поверхности молекул ДНК, экспериментальные данные^{39,41} позволили сделать однозначный выбор в пользу модели хелатного комплекса, играющего роль мостика между соседними молекулами ДНК. В частности, одно из доказательств основано на том, что нарушение условий формирования частиц ХЖКД, например разбавление водно-полимерного раствора до концентрации ПЭГ ниже «критической», сопровождается распадом этих частиц, переходом молекул ДНК в изотропное состояние и полным исчезновением в спектре КД аномальной полосы, расположенной в области поглощения хромофоров ДНК.

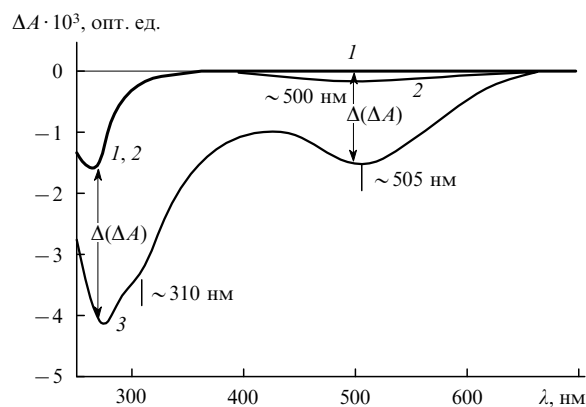


Рис. 5. Спектры КД исходной ХЖКД ДНК (1) и этой же дисперсии после обработки дауномицином (2) и CuCl_2 (3). Концентрация ДНК ~ 5.5 мкг $\cdot$ мл⁻¹; фосфатный буфер, pH 6.7. Здесь и на рис. 7, 8 $\Delta A = A_L - A_R$, A_L и A_R — оптическая плотность для левого и правого циркулярно поляризованного излучения соответственно. $\Delta(\Delta A)$ — увеличение интенсивности полос в результате образования наноконструкции.

Однако ничего подобного не происходит, если разбавить водно-полимерный раствор, в котором частицы ХЖКД были обработаны дауномицином и раствором хлорида меди. Аномальные полосы в спектре КД, соответствующие и хромофорам ДНК, и хромофорам ДАУ, сохраняются во всех случаях, их амплитуда лишь уменьшается пропорционально степени разбавления. Известны и другие способы доказательства образования мостиков между соседними молекулами ДНК, фиксированными в структуре частиц ХЖКД.⁴²

Эффективность образования наномостиков зависит от концентрации и молекул ДАУ, и ионов меди.⁴¹ Обе зависимости имеют S-образный характер с высокой степенью соответствия. Близкое соответствие зависимостей, отражающих усиление полос, расположенных в разных областях спектра КД, позволяет предполагать, что образование мостиков инициирует своего рода «фазовый переход» между разными структурами холестериков; в частности, холестерик, возникающий при «сшивании» молекул ДНК мостиками, возможно, сильнее закручен, чем исходный.

Экспериментальные данные, полученные при помощи разных физических методов, включая низкотемпературную магнитометрию,⁴³ а также результаты проведенных недавно теоретических расчетов⁴⁴ показали, что в состав мостика $[\cdots - \text{Cu}^{II} - \text{ДАУ} - \text{Cu}^{II} - \cdots]$ входит шесть ионов двухвалентной меди (рис. 6). Наномостики представляют собой плоские хелатные комплексы, которые «сшивают» пространственно упорядоченные молекулы ДНК, расположенные как в одном слое, так и в соседних слоях.

Таким образом, в результате образования мостиков между соседними молекулами ДНК свойства исходного холестерика⁴³ изменяются и возникает наноконструкция (см. рис. 4).⁴⁵

Можно перечислить некоторые свойства созданной конструкции (наноматериала). Во-первых, в отличие от исходных «жидких» частиц ХЖКД ДНК устойчивость наноконструкции не зависит от осмотического давления раствора, а определяется числом наномостиков. Во-вторых, для такой конструкции ДНК характерно увеличение аномальной оптической активности, проявляющееся в увеличении амплитуды полос, расположенных в спектре КД в областях поглощения ДНК и антибиотика. В-третьих, наноконструкция характеризуется двумя тепловыми структурными переходами. Один

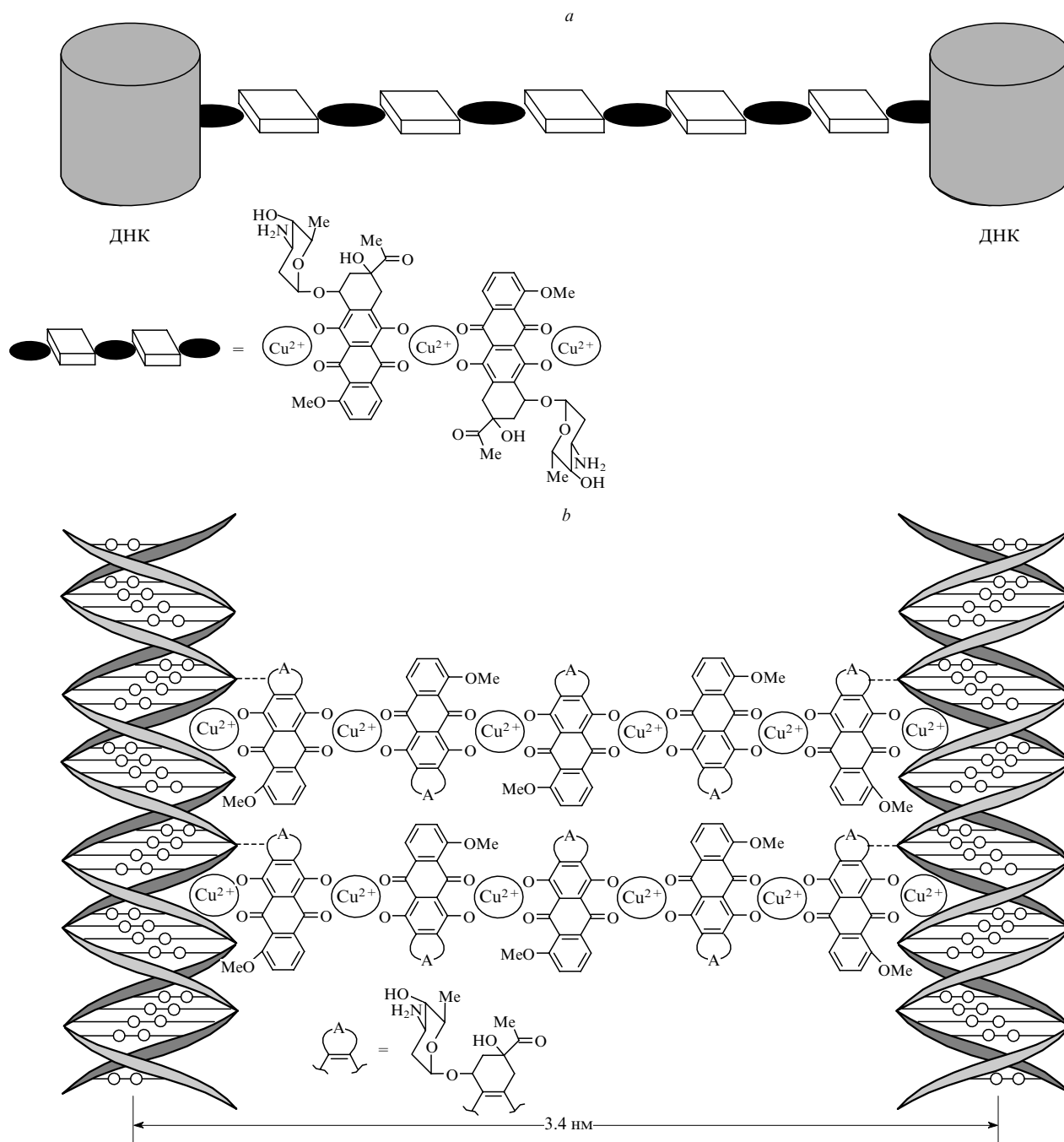


Рис. 6. Схематическое изображение наномостиков между двумя соседними молекулами ДНК.

a — вид наномостика сверху, вдоль оси молекулы ДНК; *b* — более детальная структура наномостиков между молекулами ДНК (для наглядности мостики повернуты на 90° по отношению к их реальному положению). Следует отметить, что одна молекула ДНК повернута на 180° вокруг вертикальной оси по сравнению с другой молекулой ДНК.

из них можно назвать «КД-плавлением» наномостиков: с повышением температуры мостики между молекулами ДНК разрушаются, при этом в спектрах КД исчезает характерная для наноконструкции аномальная полоса ДАУ. Другой переход — это «КД-плавление» самого холестерика ДНК; разрушение холестерической структуры также проявляется в спектрах КД. Величина «температуры плавления» наномостиков растет по мере увеличения их концентрации (рис. 7), оставаясь при этом ниже величины «температуры плавления» исходного холестерика дц-ДНК.⁴⁶ Наконец, для

наноконструкции характерна высокая локальная концентрация не только молекул ДНК, но и высокая концентрация противоопухолевого антибиотика дауномицина.

Стабильность наноконструкции в отсутствие осмотического давления раствора, определяемая только числом наномостиков, позволила зафиксировать созданные частицы на поверхности мембранного фильтра, что, в свою очередь, открыло возможность для визуализации частиц при помощи атомного силового микроскопа. (Еще раз подчеркнем, что исходные частицы ХЖКД ДНК просто не существуют в

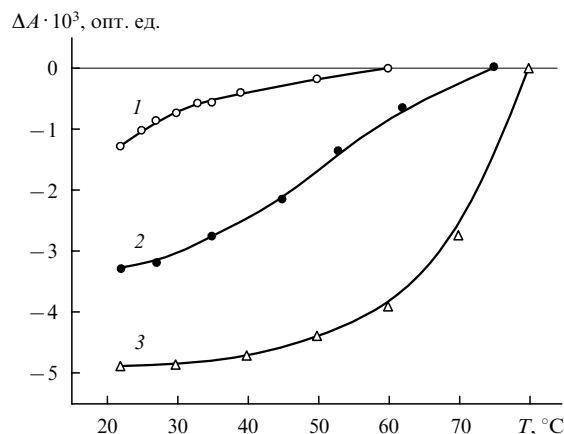


Рис. 7. Влияние температуры на амплитуду полосы ($\lambda = 310$ нм) в спектрах КД жидкокристаллических дисперсий ДНК, содержащих наномостики, при разных концентрациях дауномицина ($c_{\text{ДАУ}}$) и CuCl_2 (c_{Cu}) (в моль $\cdot$ л $^{-1}$).

Концентрация полиэтиленгликоля ~ 170 мг $\cdot$ мл $^{-1}$; 0.3 М NaCl ; $2 \cdot 10^{-3}$ М фосфатный буфер, pH 6.7.

1 — $c_{\text{ДАУ}} = 1.5 \cdot 10^{-5}$, $c_{\text{Cu}} = 5 \cdot 10^{-6}$; 2 — $c_{\text{ДАУ}} = 2.73 \cdot 10^{-5}$, $c_{\text{Cu}} = 8.99 \cdot 10^{-6}$; 3 — $c_{\text{ДАУ}} = 6.4 \cdot 10^{-5}$, $c_{\text{Cu}} = 2.0 \cdot 10^{-5}$.

отсутствие осмотического давления раствора.) Частицы наноконструкции по форме близки к вытянутым цилиндрам. Оценка размера 400 частиц показывает, что он изменяется в пределах от 0.4 до 0.8 мкм, а средняя величина составляет ~ 0.5 мкм. Это означает, что размер полученных жестких частиц наноконструкции совпадает с размером исходных «жидких» частиц ХЖКД из молекул дц-ДНК, который они имеют в растворах с фиксированным осмотическим давлением (этот размер был оценен ранее при помощи теоретических расчетов).

Таким образом, удалось не только создать жесткую наноконструкцию на основе частиц ХЖКД ДНК, но и получить данные, характеризующие макроскопические параметры этого материала. Следовательно, гипотетическая трехмерная структура, предложенная для жесткой наноконструкции (см. рис. 4), существует в действительности.

Можно предполагать, что существуют и другие условия, при которых дц-ДНК, образующие первоначально «жидкий» холестерик, могут, потеряв свою растворимость, превратиться в «твердый» холестерик. Свойства материала нового типа можно регулировать, причем аномальная оптическая активность выступает как критерий, отражающий состояние пространственной структуры наноконструкции. Это открывает возможность практического применения наноконструкций ДНК в качестве чувствительного элемента (биодатчика) сенсорных устройств для обнаружения химических, в том числе биологически активных, соединений, нарушающих структурную целостность элементов наномостиков^{47, 48} и, следовательно, аномальную оптическую активность.

Таким образом, использование частиц ХЖКД ДНК позволяет создать материал, обладающий уникальными свойствами. Если говорить о научном значении наноконструкции, то можно сказать, что на основе частиц ХЖКД ДНК получена неизвестная ранее структура, которая вызывает большой интерес теоретиков.

Следует отметить, что созданный материал в разных работах называют по-разному (наноконструкция, наноматериал, жидкокристаллический эластомер, твердый холестерик и т.д.), и вопрос о его названии остается предметом дискуссий.

в. Наноконструирование на основе холестерической жидкокристаллической дисперсии комплексов ДНК – поликатион

В случае использования второго варианта фазового исключения ДНК (см. рис. 3) при создании наноконструкции необходимо соединить мостиками соседние молекулы поликатиона, жестко фиксированные на поверхности молекул ДНК, причем так, чтобы характер пространственного упорядочения комплексов ДНК – поликатион в частицах ХЖКД не нарушался. Высокая локальная концентрация молекул поликатиона в составе частиц ХЖКД НК, наличие в поликатионе реакционноспособных групп и упорядоченное расположение молекул поликатиона могут обеспечить условия для «сшивания» соседних комплексов ДНК – поликатион в частицах ЖКД. Решение этой задачи связано, прежде всего, с поиском поликатиона, который обеспечивает не только нейтрализацию отрицательных зарядов фосфатных групп ДНК, но и появление в системе новых реакционноспособных групп.

С этой точки зрения привлекает внимание биодegradуемый, биосовместимый полиаминосахарид хитозан (поли(1 $\rightarrow$ 4)-2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкопираноза), получаемый дезацетилированием природного хитина.^{49, 50} В силу особенностей пространственной структуры молекул хитозана (Хи) его положительно заряженные аминогруппы могут взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК по типу «через одну». При этом хитозан не только нейтрализует отрицательные заряды фосфатных групп ДНК, но и создает специфическое распределение положительно заряженных аминогрупп вблизи поверхности ДНК.⁵¹

Анализ спектров поглощения, наблюдаемых при титровании водно-солевого раствора ДНК раствором хитозана, показал, что при достижении «критической» концентрации последнего в спектре появляется поглощение в той области ($\lambda > 320$ нм), где ни ДНК, ни сам хитозан не поглощают (так называемая «кажущаяся» оптическая плотность), и увеличивается поглощение при $\lambda \approx 260$ нм. Такие изменения спектра поглощения обусловлены формированием дисперсной фазы комплексов ДНК – Хи, на частицах которой происходит рассеяние УФ-излучения.⁵¹

Сопоставление спектров КД исходной В-формы ДНК и спектров дисперсий комплексов ДНК – Хи показало, что при достижении «критической» концентрации хитозана в спектре КД в области поглощения ДНК появляется аномальная положительная полоса ($\lambda \approx 270$ нм). Такая полоса, согласно теории,⁵¹ отражает холестерическую упаковку молекул комплексов ДНК – Хи в частицах дисперсии. Однако в отличие от «классических» холестериков ДНК, которые имеют, как правило, аномальные отрицательные полосы в спектрах КД и, следовательно, левую закрутку пространственной холестерической структуры, для холестериков ДНК – Хи характерна положительная полоса в спектре КД и, следовательно, правая закрутка пространственной структуры.

На кривых рассеяния рентгеновских лучей на фазе, которая сформирована из частиц ХЖКД комплекса ДНК – Хи, имеющих аномальную оптическую активность положительного знака, присутствует один брэгговский рефлекс ($d_{\text{Брэгг}} \approx 2.6$ нм).⁵² Отсутствие малоугловых рефлексов высших порядков на рентгенограммах свидетельствует об отсутствии регулярного трехмерного порядка в расположении молекул комплексов ДНК – Хи. Величина брэгговского рефлекса, характеризующая расстояние между соседними комплексами ДНК – Хи в образованной фазе, существенно меньше, чем величина $d_{\text{Брэгг}}$, характерная для частиц ХЖКД ДНК, и соответствует переходной области между холестерической и гексагональной жидкокристаллическими фазами. Малое изменение брэгговского рефлекса при увеличении

температуры показывает, что упаковка комплексов ДНК–Хи не является столь «жидкой», как в холестерической фазе исходной ДНК.

Поскольку соседние свободные аминогруппы и гидроксильные группы в молекулах хитозана с высокой эффективностью образуют плоские хелатные комплексы с ионами меди,^{53–56} для «сшивания» соседних комплексов ДНК–Хи, фиксированных в структуре частиц ХЖКД, был использован тот же подход, что и в случае ХЖКД ДНК. Из молекул дц-ДНК путем их взаимодействия с хитозаном формировали ХЖКД, добавляли к ней раствор ДАУ (или CuCl_2) и затем обрабатывали раствором CuCl_2 (или ДАУ).

Было обнаружено, что после добавления к ХЖКД комплекса ДНК–Хи, имеющей положительный знак полосы в спектре КД, раствора CuCl_2 и последующей обработки ДАУ в спектре возникает интенсивная положительная полоса при $\lambda \approx 500$ нм, соответствующая оптическим свойствам хромофора комплекса $[\text{ДАУ} - \text{Cu}^{\text{II}}]$.

Аналогичное увеличение амплитуды полосы наблюдается также в том случае, если использовать ХЖКД, сформированную из молекул хитозана, которые имеют другое содержание аминогрупп; при этом ХЖКД комплекса ДНК–Хи характеризуется отрицательной полосой в спектре КД. Рост амплитуды полосы в области поглощения хромофора $[\text{ДАУ} - \text{Cu}^{\text{II}}]$ свидетельствует о том, что этот хромофор становится пространственно фиксированным по отношению к молекулам хитозана в любых ХЖКД, сформированных из разных комплексов ДНК–Хи.

Важное отличие ХЖКД комплексов ДНК–Хи от ХЖКД ДНК состоит в том, что порядок добавления растворов ДАУ и CuCl_2 не влияет на увеличение аномальной оптической активности. Эффективность нарастания аномальной полосы в спектре КД ЖК-дисперсии комплексов ДНК–Хи зависит, как и в случае дисперсии ДНК, от концентрации молекул ДАУ и ионов меди. Однако отсутствие «критической» концентрации для ионов меди означает, что в отличие от случая ДНК в молекулах хитозана в составе комплекса ДНК–Хи всегда имеются группы, стерически доступные для хелатообразования с ионами меди. Такими группами являются аминогруппы и гидроксильные группы сахарных остатков хитозана, хелатные комплексы которых с ионами меди характеризуются высокой константой связывания ($\sim (1-4) \cdot 10^{14}$).^{57, 58}

Следует отметить качественное совпадение данных, полученных для комплексов ДНК–Хи, с результатами, отражающими формирование мостиков в случае ДНК. На основании этого можно утверждать, что увеличение амплитуды полосы при $\lambda \approx 500$ нм в спектрах КД ХЖКД разных комплексов ДНК–Хи обусловлено возникновением наномостиков типа $[\dots - \text{Cu}^{\text{II}} - \text{ДАУ} - \text{Cu}^{\text{II}} - \dots]$ между соседними молекулами хитозана, связанными в комплексы с молекулами ДНК в составе частиц ХЖКД.

Как и в случае ДНК, мостики могут возникать между соседними молекулами хитозана в одном слое и в соседних слоях, т.е. усиление полосы при $\lambda \approx 500$ нм отражает возникновение пространственной конструкции. Это означает, что формирование мостиков $[\dots - \text{Cu}^{\text{II}} - \text{ДАУ} - \text{Cu}^{\text{II}} - \dots]$ (и, следовательно, наноконструкций на основе НК) имеет во всех случаях одно и то же оптическое «проявление». Однако максимальные амплитуды полос, наблюдаемые при создании наноконструкций на основе комплексов ДНК–Хи, приблизительно в три раза меньше по сравнению с амплитудой полосы, характерной для наноконструкции, сформированной из ХЖКД дц-ДНК. Такое различие может быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, оно может просто отражать меньшее число наномостиков. Во-вторых, наномостики могут быть короче, поскольку расстояние между комплексами ДНК–Хи меньше, чем расстояние между моле-

кулами ДНК. Наконец, причина может быть в том, что угол наклона (относительно макромолекулы) мостиков между молекулами хитозана в составе комплексов ДНК–Хи в ХЖКД отличается от угла наклона в случае мостиков между молекулами ДНК, что может быть связано с конформацией молекул хитозана, расположенных на соседних молекулах ДНК. Точная причина различий должна быть установлена в процессе дальнейших исследований.

Тот факт, что в случае ХЖКД комплексов ДНК–Хи размер наномостиков может быть небольшим и что ионы меди могут образовывать очень прочные хелатные комплексы с соседними аминогруппой и гидроксильной группой сахарных остатков хитозана,^{59, 60} позволяет предположить, что свойства таких наноконструкций могут заметно отличаться от свойств наноконструкций, формируемых на основе ДНК. В частности, из рис. 8 видно, что амплитуды аномальных полос ($\lambda = 505$ нм) в спектрах КД дисперсий наноконструкций на основе разных комплексов ДНК–Хи практически не изменяются при увеличении температуры. Это означает, что пространственная структура ХЖКД комплексов ДНК–Хи остается неизменной в указанном интервале температур. В целом термическая стабильность наноконструкций на основе комплексов ДНК–Хи заметно превышает стабильность не только дисперсий исходных комплексов ДНК–Хи (кривые 1, 2), но и наноконструкций на основе ДНК (см. рис. 7).

Конформация молекул хитозана крайне важна для наноконструирования, о чем свидетельствует зависимость амплитуды полосы $\lambda = 505$ нм в спектре КД ХЖКД комплексов ДНК–Хи от содержания аминогрупп в используемом хитозане.²⁹ Из этой зависимости следует, что имеется минимальное (предельно малое) расстояние между аминогруппами (~ 13 Å, что приблизительно соответствует их расстоянию «через одну»), на котором могут находиться соседние наномостики из комплексов $[\text{ДАУ} - \text{Cu}^{\text{II}}]$. При этом малая величина аномальной оптической активности, несмотря на

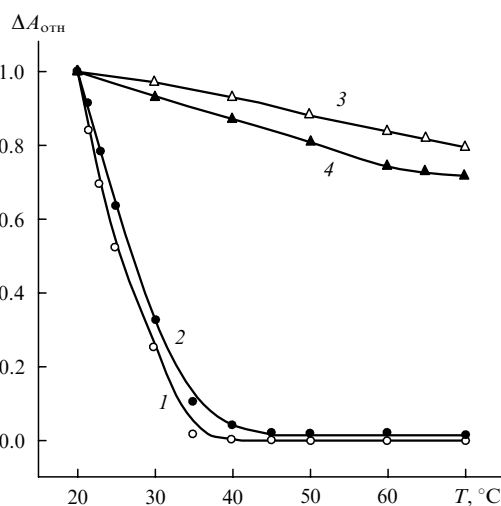


Рис. 8. Влияние температуры на амплитуду полосы ($\lambda = 270$ нм) в спектрах КД жидкокристаллических дисперсий комплексов ДНК–Хи с разными хитозанами (1, 2) и полосы ($\lambda = 505$ нм) в спектрах КД наноконструкций на основе этих дисперсий (3, 4). $\Delta A_{\text{отн}} = \Delta A / \Delta A_0$, где ΔA_0 относится к начальной температуре.

Содержание свободных аминогрупп в хитозане 65% (1, 3) и 55% (2, 4). Концентрации ДНК ~ 15.5 мкг·мл⁻¹, хитозана 28.7 мкг·мл⁻¹; молекулярная масса хитозана 5 кДа; $c_{\text{ДАУ}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹, $c_{\text{Cu}} = 1.5 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹; 0.05 М NaCl, 0.02 М фосфатный буфер, pH 6.7.

высокую концентрацию активных групп в сахарных остатках хитозана, т.е. несмотря на высокую концентрацию потенциальных мест образования мостиков, показывает, что пространственная ориентация возникающих мостиков не является оптимальной. Лишь по мере увеличения расстояния между аминогруппами хитозана пространственная структура этой молекулы обеспечивает ориентацию активных групп, способствующую формированию оптимальных наномостиков в создаваемой конструкции.

Таким образом, сопоставление изложенных в этом разделе данных с результатами наноконструирования на основе ДНК позволяет утверждать, что между соседними молекулами хитозана в составе комплексов ДНК–Хи, фиксированных в пространственной структуре частиц ХЖКД, можно сформировать мостики, т.е. можно создать наноконструкцию нового типа.

Очевидно, что для построения конкретной пространственной модели наномостиков между соседними молекулами комплексов ДНК–Хи, а следовательно, для построения пространственной модели наноконструкции в целом, требуются дополнительные теоретические и экспериментальные исследования.

Факт существования жестких наноконструкций на основе частиц ХЖКД молекул ДНК или комплексов ДНК с поликатионами, сохраняющих аномальные оптические свойства, открывает путь для создания и других материалов подобного типа. В частности, возможно использование других поликатионов, фиксированных на поверхности молекул дц-ДНК. Не исключено, что такими же «твердыми» холестериками являются ДНК-содержащие бактериофаги или хромосомы животных и растений.

III. Заключение

Представленный в обзоре материал показывает, что молекулы дц-НК — это важный полифункциональный объект нанотехнологии. Направленное и регулируемое изменение свойств этих молекул обеспечивает широкие возможности для создания наноструктур, которые могут найти практическое применение в различных областях науки и техники.

Наноконструкции, концентрация ДНК в которых превышает $200 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, могут быть использованы в медицине и биотехнологии в качестве «носителей» генетического материала или различных биологически активных соединений, в том числе лекарственных веществ.

Наноконструкции на основе частиц ХЖКД дц-ДНК (или РНК) могут служить чувствительными элементами (биодатчиками) оптических биосенсоров, позволяющих определять наличие биологически активных соединений, в частности генотоксикантов, в физиологических жидкостях. Такие датчики находят применение в медицине, биотехнологии, экологических исследованиях.

Наноконструкции с управляемыми физико-химическими свойствами, включенные в состав полимерных пленок (гидрогелей), могут найти применение в современных оптических и электронных устройствах (в частности, в качестве оптических фильтров).

Обзор подготовлен при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (за счет средств РФФИ-офи, проект № 06-04-08073).

Литература

1. М.К.Роко, Р.С.Уильямс, П.Аливисатос. *Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований*. Мир, Москва, 2002
2. Ю.Альтман. *Военные нанотехнологии*. Техносфера, Москва, 2006
3. R.A.Andrievski. In *Proceedings of the 1st Iran-Russia Joint Seminar and Workshop on Nanotechnology*. Tehran, Iran, 2005. P. 1
4. E.Roduner. *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 583 (2006)
5. Ю.М.Евдокимов. *Российские нанотехнологии*, **1**, 244 (2006)
6. In *Reports of the OECD Workshop on the Safety of Manufactured Nanomaterials*. Washington, DC, 2005. P. 149
7. C.O.Robichaud, D.Tanzil, U.Weilenmann, M.Wiesner. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 8985 (2005)
8. Ю.М.Евдокимов, М.А.Захаров, С.Г.Скуридин. *Вестн. РАН*, **76**, 112 (2006)
9. N.C.Seeman. *J. Theor. Biol.*, **99**, 237 (1982)
10. N.C.Seeman. *Sci. Am.*, **290** (6), 64 (2004)
11. Yu.M.Yevdokimov, S.G.Skuridin, Yu.D.Nechipurenko, M.A.Zakharov, V.I.Salyanov, A.A.Kurnosov, V.D.Kuznetsov, V.N.Nikiforov. *Int. J. Biol. Macromol.*, **36**, 103 (2005)
12. C.M.Niemeyer, M.Adler, S.Gao, L.Chi. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **39**, 3056 (2000)
13. J.Shin, D.E.Bergstrom. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **36**, 111 (1997)
14. C.A.Mirkin, R.C.Mucic, L.J.Storhoff. *Nature (London)*, **382**, 607 (1996)
15. R.L.Letsinger, R.Elghanian, G.Viswanadham, C.A.Mirkin. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 289 (2000)
16. A.P.Alivisatos, K.P.Johnsson, X.Peng, T.E.Wilson, C.J.Loweth, M.Bruchez, P.Schultz. *Nature (London)*, **382**, 609 (1996)
17. K.A.Williams, P.T.M.Veenhuizen, B.G.de la Torre, R.Eritja, C.Dekker. *Nature (London)*, **420**, 761 (2002)
18. A.Star, E.Tu, J.Niemann, J.C.P.Gabriel, C.S.Joinerr, C.Valcke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 921 (2006)
19. J.Hahm, C.Lieber. *Nano Lett.*, **4**, 51 (2004)
20. X.Tang, S.Bansaruntip, N.Nakayama, E.Yenilmez, Y.Chang, Q.Wang. *Nano Lett.*, **6**, 1632 (2006)
21. E.Di Mauro, C.P.Hollenberg. *Adv. Mater.*, **5**, 384 (1993)
22. E.Katz, I.Willner. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 6042 (2004)
23. Ю.М.Евдокимов, В.И.Салынов, С.Г.Скуридин. *Докл. АН*, **338**, 827 (1994)
24. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov, E.Gedig, F.Spener. *FEBS Lett.*, **392**, 269 (1996)
25. Ю.М.Евдокимов. *Изв. АН СССР. Сер. физ.*, **55**, 1804 (1991)
26. F.Livolant, A.Leforestier. *Prog. Polym. Sci.*, **21**, 1115 (1996)
27. Ю.М.Евдокимов. *Вестн. РАН*, **73**, 712 (2003)
28. Ю.М.Евдокимов. *Жидкие крист. практ. применение*, **3**, 10 (2003)
29. Ю.М.Евдокимов, М.А.Захаров, В.И.Салынов. *Кристаллография*, **51**, 1212 (2006)
30. L.Onsager. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 627 (1949)
31. V.A.Belyakov, V.P.Orlov, S.V.Semenov, S.G.Skuridin, Yu.M.Yevdokimov. *Liq. Cryst.*, **20**, 777 (1996)
32. I.Rouzina, V.A.Bloomfield. *J. Phys. Chem.*, **100**, 9977 (1996)
33. E.Allahyarov, G.Gompper, H.Lowen. *J. Phys.: Condens. Matter*, **17**, 1827 (2005)
34. J.Pelta, D.Durand, J.Doucet, F.Livolant. *Biophys. J.*, **71**, 48 (1996)
35. M.Saminathan, A.Thomas, A.Shirahata, L.H.Sigal, T.Thomas, T.J.Thomas. *Biochemistry*, **38**, 3821 (1999)
36. V.A.Kabanov, V.G.Sergeyev, O.A.Pyshkina, A.A.Zinchenko, A.B.Zezin, J.G.H.Joonsten, J.Brackman, K.Yoshikawa. *Macromolecules*, **33**, 6587 (2000)
37. С.Г.Скуридин, А.Т.Дембо, В.С.Ефимов, Ю.М.Евдокимов. *Докл. АН*, **365**, 400 (1999)

38. Ю.М.Евдокимов, В.И.Сальянов, Ю.Д.Нечипуренко, С.Г.Скуридин, М.А.Захаров, Ф.Спенер, М.Палумбо. *Мол. биол.*, **37**, 340 (2003)
39. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov, F.Spener, P.Manlio. *Int. J. Biol. Macromol.*, **19**, 247 (1996)
40. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov, L.V.Buligin, A.T.Dembo, E.Gedig, F.Spener, M.Palumbo. *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **15**, 97 (1997)
41. М.А.Захаров, Л.Г.Соколовская, Ю.Д.Нечипуренко, Г.Б.Лорткипанидзе, Ю.М.Евдокимов. *Биофизика*, **50**, 824 (2005)
42. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov, S.V.Semenov. *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 889 (1996)
43. В.Н.Никифоров, В.Д.Кузнецов, Ю.Д.Нечипуренко, Ю.М.Евдокимов. *Письма в ЖЭТФ*, **81**, 327 (2005)
44. Ю.Д.Нечипуренко, В.Ф.Рябоконь, С.В.Семенов, Ю.М.Евдокимов. *Биофизика*, **48**, 635 (2003)
45. Ю.М.Евдокимов, В.В.Сычев. *Технол. живых систем*, **4**, 10 (2007)
46. М.А.Захаров, Ю.Д.Нечипуренко, Г.Б.Лорткипанидзе, Ю.М.Евдокимов. *Биофизика*, **50**, 1036 (2005)
47. С.Г.Скуридин, Ю.М.Евдокимов. *Биофизика*, **49**, 468 (2004)
48. С.Г.Скуридин, В.А.Дубинская, М.А.Лагутина, О.Н.Компанец, В.Г.Голубев, Л.Б.Ребров, В.А.Быков, Ю.М.Евдокимов. *Технол. живых систем*, **3**, 3 (2006)
49. H.Hayatsu, T.Kobo, Y.Tanaka, K.Negishi. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1363 (1992)
50. S.Danielsen, K.Varum, B.T.Stokke. In *The 5th International Conference of European Chitin Society*. Trondheim, Norway, 2002. D6
51. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov. *Liq. Cryst.*, **30**, 1057 (2003)
52. Ю.М.Евдокимов, В.И.Сальянов, С.Г.Скуридин, А.Т.Дембо. *Мол. биол.*, **36**, 706 (2002)
53. N.C.Braier, R.A.Jishi. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **499**, 51 (2000)
54. S.Lee, F.Mi, Y.Shen, S.Shyu. *Polymer*, **42**, 1879 (2001)
55. K.Inoue, Y.Baba, K.Yoshizuka. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2915 (1993)
56. I.S.Lima, C.A.Airoidi. *Thermochim. Acta*, **421**, 125 (2004)
57. A.Domard. *Int. J. Biol. Macromol.*, **9**, 98 (1987)
58. O.A.C.Monteiro, C.Arnoldi. *J. Colloid Interface Sci.*, **212**, 212 (1999)
59. S.Schlick. *Macromolecules*, **19**, 192 (1986)
60. M.Rhazi, J.Derbrieres, E.Talaimate, M.Rinaudo, P.Vottero, A.Alagui. *Polymer*, **43**, 1267 (2002)

PRINCIPLES OF THE DESIGN OF NANOSTRUCTURES WITH NUCLEIC ACID MOLECULES AS BUILDING BLOCKS

Yu.M. Yevdokimov, V.V.Sychev

*V.A.Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences
32, Ul. Vavilova, 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(499)135 – 1405*

The review considers two known strategies of the design of nanostructures based on liquid-crystalline dispersions of two-stranded nucleic acids: 'entropy' condensation of nucleic acid and 'enthalpy' condensation of nucleic acid — polycation complexes. Examples of the design of nanostructures based on DNA and DNA – chitosan complexes are given. The unique properties of the nanostructures dictating the scope of their practical application are described.

Bibliography — 60 references.

Received 15th June 2007