



IOSUD USAMVB Timișoara

Scoala doctoral : Medicină Veterinară

Mijloace nano-terapeutice în medicină - Introducere

Suport de curs electronic pentru studenții la doctorat

Disciplina: Farmacologie veterinară



Îndrumător științific: Prof. Romeo Teodor Cristina, PhD., DVM

2013

Cuprins

1. Mijloace nano-terapeutice în medicin	
1.1. Nanotehnologia în biologie	6
1.1.1. Nanomedicina	7
1.2. Nano-materialele utilizate în biomedicin	9
1.2.1. Materialele magnetice	11
1.3. Aplicații principale ale nanotehnologiei în biomedicin	22
1.3.1. Terapia în cancer	22
1.3.2. Aplicații asupra ADN-ului	27
1.3.3. Separarea magnetic	30
1.4. Manipularea celulelor i biomoleculelor	33
1.4.1. Terapia prin înlocuire cromozomial	33
1.4.2. Detectarea de proteine	33
1.5. Nanofiltre cu barier (eng. <i>gated nanosieves</i>)	34
1.5.1. Imunoizolarea unor celule față de organism	35
1.6. Nano-farmaceutice bazate pe fulerene	36
1.7. Acțiunea asupra trombilor vasculari	37
1.7.1. Sonolysis – microbule cu gaz pentru aplicații terapeutice.	37
1.8. Ingineria țesuturilor	38
1.8.1. Aplicațiile nanotehnologiei în ingineria țesuturilor	38
1.8.2. „Cre terea” de noi organe	39
1.9. Determin rile biologice	40
1.9.1. Coduri optice multicolore pentru determin ri biologice	40
1.9.2. Nanotehnologia în m surarea oxigenului dizolvat	41
1.9.3. Nanoparticule ca biomarkeri	41
1.9.4. Detectorii de virus	42
1.10. Roboții biologici	42
1.10.1. Nanoroboții medicali de mâine	43
1.11. Viitorul nano-biotehnologiei	45
Bibliografie	47

Nota:

La redactarea acestui material i-a adus aportul i doctoranda **Andreia Chiril** , anul I PhD. - **SDMVT**

1. Mijloace nano-terapeutice în medicin

Preambul

Nanobiotehnologia este un câmp nou de cercetare, constituind interfața dintre științele vieții și nanotehnologie. În acest domeniu unde dimensiunile cu care se lucrează sunt cuprinse între: 1 nm și 100 nm (1).

Acest domeniu propune exploatarea calității biomoleculilor și a proceselor pe care le implică pentru dezvoltarea unor materiale sau dispozitive cu activitate certă în medicină. Medicamentele substanțe care, în general determină modificări favorabile în organism dar pot de asemenea fi nocive datorită mai ales a:

- efectelor nedorite,
- reziduurilor,
- fenomenelor de rezistență.

De exemplu, peste 70% dintre bacteriile care determină infecții intra-spitalice sunt rezistente la cel puțin un antibiotic!

Cel mai cunoscut exemplu este cel al tulpinilor meticilino-rezistente (figura 1)⁽¹⁾.



Figura 1. Tulpini Methicillin-Rezistente de *Staphylococcus aureus* (MRSA) evidențiate prin Scanning Electron Micrograph (SEM) Sursa: http://img.timeinc.net/time/daily/2007/0706/a_lantibiotics_0618.jpg

Un alt mecanism de supraviețuire bacterian este: Ply Sly mechanism, în care bacteriile pot evita și mai apoi elimina antibioticul, pompându-l extracelular (figura 2).

Deci microorganismele care pot genera rezistență, posedă forme de „inteligență”, iar cele noi tipuri de substanțe active trebuie să „identifice” acele celule care le fac „încă mai inteligente”! Acesta a fost începutul acestei științe ⁽¹⁾.

Medical Technology



How Bacteria Fight Back

Antibiotics kill bacteria by blocking necessary enzymes (see 1, above). But bacteria play sly mechanisms for evading attack. They spew out enzymes to slice apart the antibiotic (2). They close off the cell wall to prevent penetration (3). They pump out the antibiotic before it can kill (4) or change the targeted enzyme to disable the drug (5). And they easily pass on the best tools to still other bugs.

Figura 2. mecanismul PlySly bacterian

Sursa: http://s3.amazonaws.com/readers/healthmad/2007/07/22/43701_0.jpg

În acest context nanotehnologia terapeutică caută să ofere caracteristici specifice care pot reduce morbiditatea și mortalitatea la om și animale:

- o terapie invazivă minimală,
- funcții cu densitate înaltă,
- concentrarea în volume foarte mici.

FDA- definește un sistem de eliberare al farmaconilor ca fiind: „... un produs destinat diagnosticului, tratamentului, prevenirii, sau diminuirii unei boli sau a condițiilor ei de apariție, sau care interferează o funcție sau structura organismului și care nu-și atinge efectul său primar ca urmare a unei interacțiuni chimice și care nu este metabolizat“... (FDA) ⁽¹⁾.

Aplicațiile inițiale, de pionierat ale nanobiotehnologiei au dat posibilitatea reformulării unor condiționări, considerate până atunci a fi toxice în formule sigure și mult mai eficiente ⁽¹⁾.

Astfel nano-formulele din prima generație au inclus:

- nanoparticulele de tip albumin-bound
- chelații (gadolinium)
- particulele oxido-feroase

nanoparticulele din argint
restorativele (în stomatologie) și
lipozomii (ca primii reprezentanți ai celei de a doua generații)

Dintre numeroasele studii "on the topic", fluidele magnetice sunt considerate a fi printre primele aplicații verificate ale nano științelor.

Un bun exemplu este folosirea cu succes al fluidelor magnetice în SIDA ⁽¹⁾.

Totu și aceste prime încercări au demonstrat în timp numeroase neajunsuri, dintre care cele mai importante au fost:

biodisponibilizarea nesatisfăcătoare,
efectul limitat,
potențiala citotoxicitate,
tratamentele de lungă durată și frecvente.

Nanodispozitivele (sin. nanocarriers) au depășit aceste limitări.

Acestea sunt capabile să :

maximizeze activitatea terapeutică ,
minimizeze efectele toxice secundare,
țintească celule specifice și nu țesuturile,
permită o mică suprafață.

Numeroase grupuri funcționale pot fi plasate pe nanodispozitive pentru:

creșterea / scăderea solubilității,
penetrația mai ușoară a membranelor celulare,
creșterea imuno-compatibilității,
favorizarea asimilării celulare,
stabilirea cu certitudine a destinației finale a farmaconului.

Astfel, a doua generație de nano-dispozitive a devenit mult mai sofisticată datorită studiilor la nivel molecular acest fapt permițând nano-dispozitivelor să :

1. țintească ,
2. identifice,
3. elibereze precis substanța activă,
4. monitorizeze eficacitatea terapeutică în timp real ⁽¹⁾.

1.1. Nanotehnologia în biologie

Cele mai promițătoare tehnologii ale secolului 21 sunt **biotehnologia** și **nanotehnologia**. Aceasta din urmă este știința structurilor nanometrice se ocupă cu crearea, investigarea și utilizarea sistemelor care sunt de 1000 de ori mai mici decât componentele utilizate în prezent în domeniul microelectronicii ⁽³⁾.

Convergența acestor două tehnologii rezultă în dezvoltarea nanobiotehnologiei, această combinație interdisciplinară poate crea multe echipamente inovatoare ⁽³⁾.

Nano-biotehnologia reprezintă unirea biotehnologiei și a nanotehnologiei.

Această disciplină hibridă, înseamnă de asemenea, producerea de dispozitive de dimensiuni atomice prin imitarea sau încorporarea sistemelor biologice la nivel molecular, sau construirea de instrumente minuscule pentru a studia sau modifica proprietățile structurale atom cu atom.

Nanobiotehnologia poate avea o combinație de microtehnologie clasică cu o abordare a biologiei moleculare.

Biotehnologia utilizează cunoștințele și tehnica din biologie pentru a manipula procese moleculare, genetice și celulare, ca să dezvolte produse și servicii; este utilizat în diverse domenii, de la medicină la agricultură ⁽²⁾.

Nanotehnologia este un nou domeniu al științei care implică lucrul cu materiale (substanțe) sau dispozitive la nivel nanometric. Un nanometru este o miliardime dintr-un metru; este aproximativ 1/80.000 din diametrul firului de păr, sau de 10 ori diametrul unui atom de hidrogen.

Nanotehnologia manipulează proprietățile chimice și fizice ale unei substanțe la nivel molecular. Ea schimbă modul de gândire, estompează granițele dintre fizică, chimie și biologie, eliminarea acestei granițe ridică multe provocări și noi direcții pentru organizarea educației și cercetării ⁽³⁾.

Richard Feynman, în discursul din 1959, intitulat *"There is plenty of room at the bottom"* scoate în evidență următorul concept:

"Dacă mințile voastre înguste, pentru confort, divid acest univers în bucăți, fizică, biologie, geologie, astronomie, psihologie ș.a.m.d.. Amintiți-vă că natura nu ține asta!"
^(2,3)

1.1.1. Nanomedicina

Primele origini ale noțiunii de nano-medicin provin din ideea vizionar a lui Feynman a unor nanoroboți și a unor mecanisme asemănătoare care ar putea fi proiectate, construite, și introduse în organism pentru a efectua reparații celulare la nivel molecular ^(2, 3). Odat cu cristalizarea priorit țiilor medicinei secolului XX i mai ales XXI, i namomedicina a luat avânt (Tabelul 1)

Tabelul 1.

Priorit țiile medicinei de azi (Sinteză Cristina, 2009)⁽¹⁾

Umană	Veterinară
Diabet ◀	▶ Procesul infectios
Cancer ◀	▶ Zoonozele
Atacul de cord ◀	▶ Disfuncția hormonală
Disfuncția hormonală ◀	▶ Diabetul la câine
Modularea SNC ◀	▶ Celulele Stem (os)
Celulele Stem ◀	▶ Supresia imună
Supresia imună ◀	▶ Monitoring
Alergie ◀	
Deficiențele ochiului ◀	
Angioplastia ◀	
Monitoring ◀	

În general miniaturizarea instrumentelor medicale va asigura abord ri mai precise, mai controlabile, mai multilaterale, mai sigure, mai rapide pentru creșterea calității vieții.

Aceste idei au fost studiate i de c tre Drexler in anii 1980-1990, i în scrierile tehnice ale lui Freitas în 1990-2000, dar primul om de știință care a exprimat posibilit țiile a fost fizicianul Richard P. Feynman (laureat al premiului Nobel) ^{(cit. De Freitas R. A., 2004)(2,3)}.

Aplicațiile biomedicale ale nanotehnologiei sunt rezultate directe a astfel de convergențe; totuși provocările, cu care se confruntă cercetătorii și inginerii care lucreaz în domeniul nanotehnologiei sunt, enorme i extraordinar de complexe.

Interesul crescut al nanotehnologiei în aplicații medicale a dus la apariția unei noi discipline cunoscute ca nanomedicin .

Pe larg, nanomedicina cuprinde procesul de diagnosticare, tratare și prevenire a bolilor și traumatismelor, eliminarea durerii, pstrarea și înt rirea s n t ții utilizând „unelte” moleculare și cunoștințe moleculare ale organismului. Deci nanomedicina este de fapt aplicarea nanotehnologiei în medicin ^(2, 10).

Utilitatea nanotehnologiei în științele biomedicale impune crearea de materiale și dispozitive proiectate s interacționeze cu corpul la nivel subcelular, cu înalt grad de specificitate. Utilizarea nanotehnologiei în științele biomedicale prezintă multe oportunit ți revoluționare în lupta împotriva cancerului, tulburărilor cardiace și neurovegetative, infecțiilor și altor boli.

Se așteaptă ca tehnologia să creeze inovații și să aibă rol vital în varii aplicații biomedicale, nu doar în transportul de substanțe medicamentoase și în terapia genică, dar și în imagistica moleculară, biomarkeri și biosenzori ⁽¹¹⁾.

Nanotehnologia ar avea un rol mare în domeniul ceret rilor din terapia medicamentoasă cu specificitate de țintă și în metodele de diagnostic timpuriu a patologiilor.

Simpozionul intitulat "Nanoscience and Technology: Shaping Biomedical Research" din 2000 s-a adresat nanoștiinței și nanotehnologiei din domeniile de cercetare din biomedicin :

- Sinteza și utilizarea nanostructurilor
- Aplicarea nanotehnologiei în terapie
- Nanostructuri biomimetice și biologice
- Interfețe biologice electronice
- Dispozitive pentru detectarea precoce a bolilor
- Instrumente pentru studierea unei singure molecule
- Nanotehnologia și ingineria țesuturilor ⁽³⁾

Nanomedicina variază de la aplicații medicale ale nanomaterialelor, la biosenzori nanoelectronici, și ca posibile aplicații viitoare ale nanotehnologiei moleculare. Probleme curente ale nanomedicinii implic înțelegerea problemelor legate de toxicitatea și impactul asupra mediului a materialelor nanometrice ⁽¹²⁾.

1.2. Nano-materialele utilizate în biomedicin

Nanoparticulele sunt comparabile, ca dimensiune, cu proteinele.

Organismele vii sunt alcătuite din celule care au în general dimensiunea de $10\ \mu\text{m}$, componentele celulare sunt, ca dimensiune, din domeniul sub-micronic, iar proteinele sunt și mai mici, având, în general, în jur de $5\ \text{nm}$ ⁽⁶⁾.

În figura 3 este redat gradul de mărime comparativ al nano-moleculor.

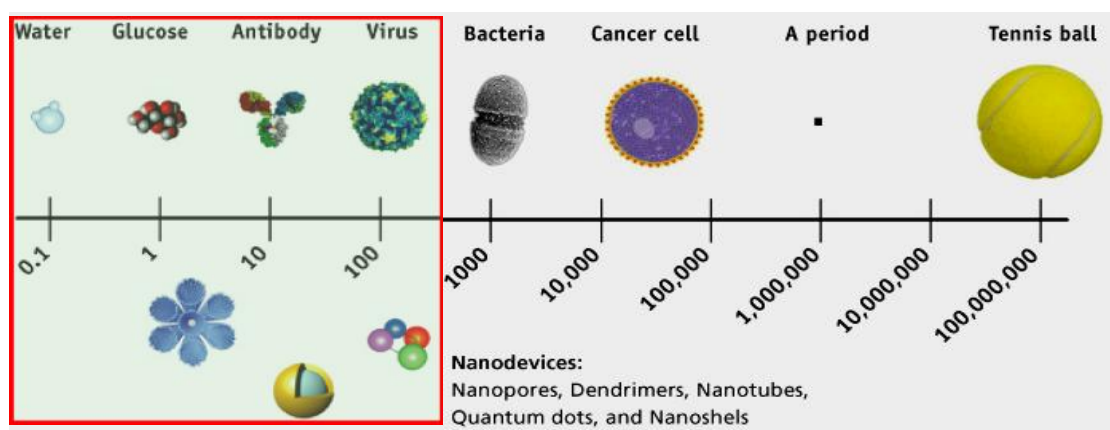


Figura 3. Gradul de mărime comparativ al nano-moleculor
Sursa: www.fda.gov/consumer/updates/nanotech072507.html

Se cunosc deja numeroase materiale cu abilități în eliberarea medicamentelor. Dintre acestea, primele substanțe cunoscute au fost polimerii care inițial aveau utilizări non-biologice, dar care au fost selectate și în medicină datorită numeroaselor proprietăți dezirabile, de exemplu:

Tipul polimerului	Caracteristica principală
Poliuretanii	- elasticitate
Polisiloxanii	- abilități de izolare
Polimetil-metacrilatii	- rezistență și transparentă
Polivinil alcoolii	- hidrofilie și rezistență
Polietilenele	- duritate și lipsa gonflării
Polivinil-pirolidonele	- suspensia

(1)

Materialele biocompatibile care prezintă răspuns la câmpul magnetic extern și-au găsit multe aplicații interesante în arii variate ale bioștiințelor și biotehnologiei, incluzând diferite discipline medicale ^(10, 11).

Pentru a interacționa cu o țintă biologică, este necesară atașarea unui strat biologic sau molecular care acționează ca o interfață bioanorganică; exemple de strat bio: anticorpi, biopolimeri (colagenul, diferite monostraturi de molecule care fac nanoparticula biocompatibilă).

Tehnicile de detectare optică sunt foarte răspândite în biologie, astfel că nanoparticulele ar trebui să aibă în plus un strat fluorescent sau unul care își schimbă proprietățile optice. Un material de succes folosit pentru nano-formulări trebuie să fie:

- inert chimic,
- liber de impurități filtrabile,
- cu îmbinare minimă,
- ușor procesabil,
- cu structură adecvată.

Factorii care pot influența biodegradarea polimerilor pot fi:

a. Specifici

- structura chimică,
- compoziția chimică,
- prezența grupărilor ionice,
- prezența formațiunilor (sau lanțurilor defecte),
- greutatea moleculară sau distribuția greutății moleculare,
- morfologia (amorfă / semicristalină, microstructura etc.),
- prezența compușilor cu greutate moleculară mică.

b. Tehnologici

- condițiile de prelucrare
- procesele termice
- procesele de sterilizare
- stocaj
- formă

c. Medicali

- locul implantării
- compușii absorbiți și adsorbiți (apa, lipidele, ionii etc.),
- factori fizico-chimici (schimbul ionic, energia ionică, pH-ul)
- factori fizici (schimbări de formă și mărime, variații ale coeficienților de difuziune, stress-ul mecanic etc.),
- hidrolizele (enzime vs. apă).

(1)

Comparația nanoparticulelor cu proteinele, d o idee a utilizării acestor „sonde” foarte mici care ne permit spionarea funcționării celulare, fără a produce prea multe interferențe. Înțelegerea proceselor biologice la nivel nanometric, este o forță motrică puternic în spatele dezvoltării nanotehnologiei ⁽⁶⁾.

Pentru aplicații biologice, cele mai utilizate proprietăți sunt efectele optice și magnetice, pe lângă cele fizice. Nanoparticulele formează de obicei centrul (mijlocul) nanobiomaterialelor. Pot fi utilizate ca suprafețe pentru asamblare moleculară, și pot fi formați din material anorganic sau polimeric.

Se mai găsesc sub forma unor nano-vezicule înconjurată de o membrană sau un strat. Forma este de obicei sferică, dar poate fi și cilindrică, plată (discoidală), sau alte forme. Dimensiunea și distribuția dimensiunii poate fi importantă, de exemplu atunci când este necesară traversarea unei membrane celulare.

Un control strict al dimensiunilor medii ale particulelor și o distribuție limitată a dimensiunilor a permis crearea unor sonde fluorescente care emit lumină, într-o gamă largă de lungimi de undă. Acest lucru permite crearea unor biomarkeri cu multe culori bine definite ⁽⁴⁾.

Mijlocul însuși poate avea mai multe straturi și poate fi multifuncțional, de exemplu combinând straturi magnetice și luminescente, se pot detecta și manipula particulele.

Particula centrală este adesea protejată de mai multe monostraturi de materiale inerte, de exemplu siliciu, sau molecule organice care sunt adsorbite sau chemisorbite la suprafața particulei. Peste se mai adaugă un strat adițional de molecule de legare pentru a fi funcțional. Aceste molecule de legare sunt liniare și au grupări reactive la ambele capete, unul pentru a se atașa de particulă iar celălalt pentru atașarea diverselor grupuri biocompatibile (anticorpi, fluorofori în funcție de aplicație) ⁽⁶⁾.

1.2.1. Materialele magnetice

Familia largă a materialelor controlabile prin câmp magnetic, include atât nano-, cât și microparticule, structuri (nanotuburi, nanofire), pelicule subțiri. Pot servi ca exemple:

- ferrofluidele (fluidele magnetice),
- fluidele magnetoreologice,
- polimerii magnetici,

- materiale anorganice magnetice,
- structurile biologice modificate magnetic,
- particule magnetice cu biomolecule legate^(5,7).

În multe cazuri materialele composite sensibile magnetic, constau din particule magnetice mici (cel mai adesea formate din magnetit , maghemit sau diverși feriti), de la scar nanometric la cea micrometric , dispersați în polimeri, biopolimeri sau matrice anorganic ; ca metod alternativ particulele magnetice pot fi adsorbite pe suprafața extern a unei particule diamagnetice (nu conține electroni desperecheați și deci nu este atras de câmpul magnetic)^(4, 5, 7).

În majoritatea cazurilor s-au dezvoltat nano-/ microparticule sintetice sensibile magnetic, dar s-au produs cu succes i particule magnetice biologice (magnetozomi produși de o bacterie magnetotactică) care au fost utilizați cu succes în bioaplicații^(4,5,10).

Sinteza nanoparticulelor magnetice

Multe proceduri chimice s-au utilizat pentru a sintetiza nano-/microparticule magnetice pentru bioaplicații, de exemplu:

- co-precipitarea clasic ,
- reacțiile în medii constrânse (microemulsiile),
- sintezele sol-gel,
- reacțiile sono-chimice,
- microunde,
- reacții hidrotermale,
- hidroliz i
- termoliza precursorilor^(4,5,8).

Cea mai simpl și eficientă cale chimică de a obține particule magnetice este tehnica coprecipit rii. Oxizii de fier, sub forma magnetitei (Fe₃O₄) sau maghemitei (- Fe₂O₃), sunt preparați prin „îmbătrânirea” mixturilor stoichiometrice de săruri feroase și ferice în mediu apos alcalin. (*stoichiometria = ramur a chimiei care studiaz raporturile cantitative dintre elemente, în combinații sau în reacții*)⁽⁴⁾



Magnetita (Fe_3O_4) nu este foarte stabil i este sensibil la oxidare ceea ce duce la formarea maghemitei ($-\text{Fe}_2\text{O}_3$). Principalul avantaj al procesului de coprecipitare este c se pot sintetiza o cantitate mare de nanoparticule; totuși controlul distribuției dimensiunilor particulelor este limitat ^(4, 5).

Ad ugarea de anioni organici chelatanți (carboxilați, ioni de -hidroxicarboxilați, acid citric, a.gluconic sau oleic) sau agenți de suprafață complexanți (dextran, carboxidextran, amidon, polivinilalcool), în timpul form rii magnetitei, poate ajuta controlul dimensiunii nanoparticulelor ⁽⁴⁾.

Potrivit raportului molar dintre ionii organici și sărurile de fier, chelația acestor ioni organici pe suprafața ionilor de oxid de fier, poate preveni nucleația și duce la formarea nanoparticulelor mai mari, sau inhib cre terea nucleilor de cristal i duce la formarea nanoparticulelor mici.

Metoda de coprecipitare clasic genereaz o distribuție largă a dimensiunilor. Sinteza unor nanoparticule de oxid de fier cu dimensiuni uniforme se poate face în nanoreactori sintetici și biologici, ca structuri micelare în solvenți non-polari, cu ti de proteine de apoferitin , dendrimere, ciclodextrine i lipozomi ^(4, 9, 10).

Sinteza hidrotermal a nanoparticulelor de magnetit este efectuat în medii apoase în reactoare sau autoclave, unde presiunea poate fi mai mare de 2,000 psi (cca 13,8 Mpa), iar temperatura mai mare de 200°C.

În acest proces, condițiile de reacție, cum ar fi solventul, temperatura i timpul de obicei au efect asupra produsului. Dimensiunea, particulelor din pudrele de magnetit , a crescut odat cu prelungirea timpului de reacție și o cantitate mai mare de ap a rezultat în urma reacției de precipitare a particulelor mari de magnetit ⁽⁴⁾.

Procesul sol-gel este o cale umed adecvat pentru sinteza oxizilor metalici nanostructurați. Acest proces se bazează pe hidroxilarea și condensarea precursorilor moleculari în soluții rezultând o soluție de particule nanometrice mai departe condensarea și polimerizarea anorganică duce la o rețea tridimensională de oxizi metalici de gel umed.

Pentru c aceste reacții se efectuează la temperatura camerei, sunt necesare viitoare tratamente termice pentru a dobândi forma final cristalin .

Principalii parametri care afectează cinetica, reacția de creștere, hidroliza, reacțiile de condensare și prin urmare, structura și proprietățile gelului sunt: solventul, temperatura, natura și concentrația sărurilor precursore folosite, pH-ul și agitația ^(4,8).

Procesul polioli este o abordare chimică versatilă pentru sinteza nanoparticulelor și microparticulelor cu forme bine determinate și dimensiuni controlate.

Polioli selectați (polietilen glicol) folosiți ca solvenți prezintă constante dielectrice mari și pot dizolva compuși anorganici. Datorită punctului de fierbere relativ înalt, oferă o gamă largă de temperaturi de operare pentru prepararea compusilor anorganici.

Polioli pot servi ca agenți reducători și de asemenea ca stabilizatori pentru controlul creșterii particulelor și prevenirea agregării interparticulare.

Nanoparticulele de magnetit neagregate (7 nm diametru) au fost sintetizate în timpul reacției trietilenglicolului cu Fe, la o temperatură ridicată ^(4, 8).

Recent a fost dezvoltat o nouă metodă de sinteză a nanoparticulelor de magnetit – sinteza prin injectare în flux (**FIS = flux injection syntesis**).

Tehnica constă în amestecarea continuă sau segmentară a reagenților în regim de flux laminar într-un reactor capilar. Prezintă următoarele avantaje: reproductibilitate mare și cauza curgerii în bloc și condițiilor laminare, omogenitate mare și oportunitate pentru un control extern precis al procesului ⁽⁴⁾.

Nanoparticulele de magnetit obținute au dimensiuni cuprinse între 2-7 nm.

Pirolizele (pyrolysis) cu spray și laser sunt reprezentanți tipici ai tehnologiei cu aerosoli, sunt procese chimice continue care permit rata mare de producție a nanoparticulelor.

Prin piroliza cu spray, o soluție de săruri ferice și un agent reducător în solvent organic este spray-ată într-o serie de reactori, unde soluția de aerosoli condensează și solventul se evaporă. Reziduul uscat rezultat este format din particule ale căror dimensiuni depinde de mărimea inițială a picăturilor originale ⁽⁴⁾.

Particulele de magnetit cu dimensiuni între 5-60nm cu diferite forme au fost obținute utilizând diferiți precursori de săruri de fier în soluții alcoolice.

S-au studiat o gamă largă de reacții chimice accelerate prin iradiere cu microunde a reactanților. Recent s-a dezvoltat o metodă cu microunde, simplă, rapidă și eficientă

pentru prepararea nanoparticulelor de magnetit relativ uniforme ($80\pm 5\text{nm}$) direct din surse de Fe^{2+} , formarea acestora necesită de la câteva secunde la câteva minute.

De asemenea utilizând această procedură se pot obține nanoparticule de magnetit „umplute” cu nanoparticule de argint.

Pulberi de nanoparticule de magnetit se mai pot sintetiza pe cale mecano-chimică. Măcinarea cu ajutorul morii cu bile a cloridului feros și fierului cu hidroxid de sodiu a dus la o amestecătură de magnetit și clorură de sodiu.

Pentru a evita aglomerarea excesul de NaCl este adăugat precursorului înainte de moară. Pentru obținerea particulelor de diferite dimensiuni, pulberile măcinate au fost reîncălzite la temperaturi de la 100°C la 800°C timp de o oră (4, 5, 12).

Stabilizarea particulelor magnetice

Pentru a obține materiale sensibile magnetic biocompatibile de obicei este necesar să se stabilizeze nanoparticulele de oxid de fier prin modificarea suprafeței lor sau prin încorporarea în matrici biocompatibile corespunzătoare (4, 5).

Nanoparticulele magnetice modificate ar trebui să fie stabile contra agregării în mediul biologic și în câmpul magnetic.

Mai mulți compuși cu grupări funcționale de carboxil, fosfat și sulfat sunt cunoscute că se leagă de particulele de magnetit și le stabilizează.

Acidul citric poate fi utilizat cu succes pentru stabilizarea fluidelor magnetice pe bază de apă prin coordonarea prin una sau două grupări reziduale de carboxil; acesta lasă cel puțin o grupare de acid carboxilic să fie expusă solventului, care ar trebui să fie responsabil pentru a face suprafața cu încărcarea negativă și hidrofilică. Alte fluide pot fi stabilizate prin interacțiuni ionice, utilizând de exemplu acid percloric sau hidroxid de tetrametilamoniu.

În majoritatea cazurilor biopolimeri biocompatibili sunt utilizați pentru stabilizarea și modificarea particulelor magnetice.

Materialele polimerice naturale sau sintetice utilizate pentru stabilizarea particulelor ar trebui să aibă proprietățile: să fie biocompatibile, biodegradabile, netoxice, netrombogene, non-imunogene și ieftine (4, 5).

Nanoparticulele ideale, compozite polimer biocompatibile sensibile magnetic trebuie să aibe următoarele proprietăți:

- diametrul particulelor sub 100 nm,
- stabilitate în sânge,
- să nu activeze neutrofilele,
- să nu agregheze trombocitele,
- să evite sistemul reticuloendotelial,
- comportament neinflamator,
- timp de circulație prelungit,
- posibilă imobilizare a compușilor biologici corespunzător (anticorpi) și
- producție ieftină.

Dextranul este un polimer de polizaharid compus exclusiv din unități de D-glucopirone cu diverse lungimi de lanț și ramificații; a fost utilizat ca înveliș de polimer mai ales pentru biocompatibilitatea excelentă ^(4,5).

Formarea magnetitei în prezența dextranului 40.000 a fost raportată pentru prima dată în 1982.

Această procedură s-a utilizat pentru prepararea agentului de contrast pentru MRI Ferumoxtran-10; acest material are un diametru hidrodinamic de dimensiuni mici, 15-30 nm și prezintă rezistență în sânge, ceea ce permite acestor particule foarte mici să acceseze macrofagele localizate adânc în țesuturile patologice.

Alți biopolimeri care servesc ca înveliș sunt formați din dextran carboximetilat, carboxidextran, amidon, arabinogalactan sau glicozaminogalactan, iar ca polimeri sintetici biocompatibili avem polietilen glicolul (PEG) și polivinil alcoolul (PVA).

Nanoparticulele magnetice adesea formează o parte magnetică dintr-un compozit de microparticule sensibile magnetic format din diferiți polimeri sintetici, biopolimeri, materiale anorganice, celule microbiale sau materiale vegetale.

Microparticulele superparamagnetice monodisperse compuse dintr-o matrice de polistiren cu nanoparticule de maghemit (cca. 8 nm diametru), cunoscute ca Dynabeads (Invitrogen), au fost utilizate la un număr mare de bioaplicații, mai ales în biologia moleculară, biologia celulară, microbiologie și izolarea proteinelor ^(4,5).

Progrese recente

Particulele sensibile magnetic au deja multe aplicații stabilite sau potențiale în variate domenii din bioștiințe, biotehnologie și tehnologiile mediului înconjurător ^(4,5).

Aplicațiile referitoare la biomedicină sunt bazate în special pe utilizarea unor proprietăți selectate, cum ar fi separarea magnetică, țintirea magnetică, producerea de contrast, creșterea contrastului MRI.

Proprietățile magnetice ale asemenea materiale au permis utilizarea lor în numeroase domenii:

- nano-/microparticulele pot fi separate din probele complexe utilizând un câmp magnetic extern (un separator magnetic, magnet permanent sau un electromagnet). Această proprietate este importantă pentru că majoritatea materialelor biologice au proprietăți diamagnetice care permit separarea selectivă eficientă a materialelor magnetice.
- particulele magnetice pot fi conduse și menținute la un loc anume utilizând un câmp magnetic extern.
- supuse unui câmp magnetic alternativ cu frecvență înaltă, particulele magnetice, sunt capabile să genereze contrast. Acest fenomen este utilizat în special în timpul hipertermiei pe bază de fluide magnetice în tratamentul cancerului (de exemplu).
- nanoparticulele de oxid de fier magnetic generează un contrast T_2 negativ în timpul RMN-ului, au rol de agent de contrast
- pot fi utilizate pentru modificarea diamagnetică a materialelor biologice (materiale derivate din celule sau plante), polimeri organici și materiale organice, pentru etichetarea magnetică a compușilor biologici activi (anticorpi, enzime, aptameri) ^(4,5).

Diagnoza medicală și transportul adecvat și eficient al medicației sunt domeniile medicale unde particulele nanometrice și-au găsit aplicația practică.

Sunt multe alte propuneri interesante pentru utilizarea instrumentelor nanomecanice în domeniul cercetărilor medicale și practice clinice ⁽³⁾.

Nanodispozitivele din științele medicale ar putea înlocui celule, care funcționează defectiv sau necorespunzător, de exemplu respirocitele propuse de Freitas ⁽²⁾.

Aceste eritrocite artificiale teoretic sunt capabile să furnizeze (asigure) oxigen mai eficient decât un eritrocit natural.

Ar putea înlocui celulele roșii defecte din circulația sanguină. Aplicațiile respirocitelor ar putea include înlocuitori de transfuzii de sânge, tratamentul parțial al anemiei, probleme neonatale/prenatale și tulburări pulmonare ⁽³⁾.

Nanodispozitivele ar putea administra medicamente direct în corpul pacientului. Asemenea nanostructuri ar putea transporta medicamente în locuri bine determinate, realizând un tratament mai precis.

Mecanisme similare cu „arme” specifice ar putea fi utilizate pentru îndepărtarea obstacolelor din sistemul circulator sau în identificarea și distrugerea celulelor tumorale.

Nanoroboții care funcționează în corp, ar putea monitoriza nivelul diferiților compuși și înregistra informația într-o memorie internă. Pot fi utilizați rapid în examinarea unui anumit țesut, prin controlarea caracteristicilor biochimice, biomecanice și histometrice ale acestuia ^(2,3).

Biotehnologia își extinde sfera și eficacitatea privind opțiunile tratamentelor disponibile din nanomateriale. Nanotehnologia moleculară va dezvolta eficacitatea, confortul și viteza viitoarelor tratamente medicale și în același timp le va scădea semnificativ riscul, costul și invazivitatea ⁽³⁾.

Biotehnologia permite fabricarea personalizată, biofarmaceutică și biotehnologică a medicamentelor pentru a învinge problemele asociate cum ar fi solubilitatea slabă, stabilitate chimică slabă după administrare in vivo și in vitro (perioada de înjumătățire scurtă), biodisponibilitate slabă și potențiale efecte secundare ⁽³⁾.

Nanoparticulele transportoare au fost dezvoltate ca o soluție pentru a depăși problemele de transport – nanocristale de substanțe medicamentoase, nanoparticule solide de lipide (SLN), transportoare lipidice nanostructurate (NLC), nanoparticule din conjugate medicament-lipid (LDC) ⁽³⁾.

Transportorii (cărui), după cum a raportat Muller și col. (cit. de Herbert Ernest și Shetty Rahul), sunt adecvați pentru a rezolva problemele de livrare a medicamentelor cu solubilitate diferită ⁽³⁾.

Quantum Dot (punctul cuantic) cu nanoparticule de o culoare specifică, poate oferi o verificare ieftină și ușoară, a unei probe de sânge, pentru prezența în același timp a diferitelor virusuri. În ceea ce privește cercetarea, capacitatea de a eticheta mai multe biomoleculi, atât în exteriorul cât și în interiorul celulei, ar putea permite cercetătorilor să vadă schimbările celulare complexe și evenimente asociate cu boala, furnizând indicii valoroase pentru dezvoltarea viitoarelor produse farmaceutice și terapeutice ⁽³⁾.

Prima nanosistă artificială cu porți voltaice a fost fabricată de **Charles R. Martin** și col. la **Colorado State University** în 1995 ^(2, 3).

Membrana lui Martin conține o matrice din nanotubi cilindrici de aur cu diametrul de 1,6 nm. Când tubii sunt încărcăți pozitiv, sunt excluși ionii pozitivi și pot trece cei negativi, iar când membrana primește voltaj negativ, pot trece doar cei pozitivi.

Pentru a obține un nanodispozitiv similar, dar cu specificitate moleculară semnificativă, ar putea combina porțile voltaice cu dimensiunile și forma porilor pentru a obține control asupra ionilor transportați ^(2, 5).

Domeniul multidisciplinar al aplicațiilor nanotehnologice pentru descoperirea de noi molecule și manipularea celor disponibile în mod natural, ar putea fi orbitoare în potențialul său de îmbunătățiri în îngrijirea sănătății. Pe viitor, ne putem imagina o lume în care nanodispozitivele medicale sunt implantate în mod curent sau chiar injectate în circulația sanguină pentru a monitoriza sănătatea și a participa automat în repararea sistemelor care au deviat de la funcționarea normală.

Avansarea continuă în domeniul nanobiotehnologiei biomedicale este stabilirea și colaborarea grupurilor de cercetare din domeniile complementare.

Asemenea colaborări trebuie menținute nu doar la nivelul domeniilor de specialitate ci și la nivel internațional. Ar trebui menționat faptul că nanotehnologia însăși nu este o disciplină unică în curs de dezvoltare ci mai degrabă un punct de întâlnire a științelor tradiționale cum ar fi chimia, fizica, biologia pentru a aduce împreună cunoștințe colective și expertiza necesară dezvoltării acestei noi tehnologii.

În **tabelul 2** se regăsesc câteva domenii de aplicare ale nanotehnologiei ⁽³⁾.

Abilitatea de a structura materiale și dispozitive la nivel molecular aduce beneficii imediate și va revoluționa cercetarea și practica medicală. S-au început experimente teoretice și practice asupra biocompatibilității nanomaterialelor și nanodispozitivelor ⁽²⁾.

Tabelul 3 oferă o privire de ansamblu asupra acestui domeniu cu expansiune rapidă⁽²⁾.

Tabelul 2

Aplicabilitatea nanotehnologiei (după : Ernest H, Shetty R., 2005)⁽³⁾

Nanomateriale brute	Simulare și diagnostic celular	Cercetare biologică
Învelișul nanoparticulelor	Chip-uri celulare	Nanobiologie
Materiale nanocristaline	Simulatoare celulare	Nanoștiința în științele vieții
Materiale nanostructurate	Manipulare ADN, secvențializare, diagnostic	Transportul medicamentelor
Peptide ciclice	Testări genetice	Descoperirea de medicamente
Dendrimere	Micro-matrice ADN	Biofarmaceutice
Agenti detoxifianți	Secvențiere ADN ultra-rapid	Încapsularea de medicamente
Fulerene	Manipulare și control ADN	Medicamente "inteligente"
Transportori de medicamente		
Nanoparticule pt. Scanare MRI	Instrumente și diagnosticare	Medicină moleculară
Nano-coduri de bare	Sisteme de detectare bacteriană	Terapie genetică
Nano-emulsii	Bio-chip-uri	Farmacogenomice
Nano-fibre	Imagistic biomolecular	
Nano-particule	Biosenzori și biodetectare	Enzime artificiale și controlul lor
Nanoshell	Aplicații de diagnostic și apărare	Manipularea și controlul enzimelor
Nano-tubi de carbon	Roboți de endoscopie și microscopie	
Nano-tubi noncarbon	Senzori bazați pe fulerene	Nanoterapeutice
"puncte cuantice" (quantum dots)	Imagistic	Nanoparticule antibacteriene și antivirale
	Laborator pe un chip	Farmaceutice bazate pe fulerene
	Monitorizare	Terapie fotodinamică
Locuri artificiale de fixare		
Anticorpi artificiali	Nanosenzori	Radiofarmaceutice
Enzime artificiale		
Receptori artificiali	Micro-matricea proteinelor	Biologie sintetică și nano-dispozitive primitive
Polimeri imprimați molecular	Scanare microscopică prin sondare	Tecto-dendrimere
		Nanoplatforme dinamice "nanozomi"
Controlul suprafețelor	Dispozitive intracelulare	Celule și lipozomi artificiali
Adezivi de suprafață artificiali	Analize (teste) intracelulare	Micelii polimerice
	Biocomputere intracelulare	
	Senzori/reporteri intracelulari	Biotehnologie și biorobotic
Suprafețe biocompatibile	Implante în celule	Terapie virală biologică
Suprimarea biofilmului	BioMEMS (micro-electromechanical systems)	Hibridi bazați pe viruși
Suprafețe prelucrate	Materiale și instrumente implantabile	Celule stem și clonarea
Suprafețe model	BioMEMS, chip-uri, și electrozi implantați	Ingineria țesuturilor
	Protetic bazat pe MEMS /nanomateriale	Organe artificiale
Înveliș filmat	Ajutoare senzoriale (retin artificial)	Nanobiotehnologia
	Micromatrice	
	Senzori bazați pe micro-structuri	Biorobotic și bioboți
Nanopori		Nanorobotic
Imunoizolare	Microfluide	
Site și canale moleculare	Micro-ace	Nanoroboți și dispozitive ADN
Membrane nanofiltrante	MEMS medical	Nanoroboți bazați pe diamante
Nanopori		
Separare	Instrumente chirurgicale MEMS	Dispozitive de reparare a celulei

Tabelul 3

Lista aplicabilitatea nanotehnologiei în științele biomedicale (după Freitas Jr., 2004)⁽²⁾

Nano-aplicații
Biodetectarea patogenilor
Detectarea proteinelor
Cercetarea structurii ADN-ului
Ingineria țesuturilor
Distrușgerea prin c ldușr a tumorilor (hipertermia)
Studii fagocinetice
Intensificarea contrastului MRI
Separarea i purificarea biomoleculelor i celulelor
Markeri biologici fluorescenți
Transportul de medicamente i gene
Celule artificiale
Construcția de proteine pentru transportul eficient de electroni, sau cu propriet ți mecanice
Biosenzori
Nanobiomotori
Biomineralizare
Nanorobotic
Nanocomputere

1.3. Aplicații principale ale nanotehnologiei în biomedicin

1.3.1. Terapia în cancer

Dimensiunile mici ale nanoparticulelor îi înzestreză cu proprietăți care pot fi foarte folositoare în oncologie, mai ales în imagistică.

Punctele quantice (nanoparticule cu proprietăți de confinare cuantică, ca de exemplu emisia luminoasă ajustabilă după dimensiune), utilizate în legătură cu MRI-ul, pot produce imagini excepționale ale localizării tumorale.

Aceste nanoparticule sunt mult mai luminoase decât coloranții organici și necesită doar o sursă luminoasă pentru excitare. Acest lucru înseamnă că particulele cuantice fluorescente pot produce o imagine de contrast mai bună.

O altă proprietate a acestora este suprafața mare raportată la volum, care permite atașarea multor grupări funcționale la nanoparticule, care apoi caută și se conectează la anumite celule tumorale.

Dimensiunea mică a nanoparticulelor (10 la 100nm) le permite acumularea preferențială la localizarea tumorală (pentru că tumorile nu au un sistem limfatic efectiv) ⁽¹²⁾.

Terapia anticancerosă fotodinamică se bazează pe distrucția celulelor canceroase cu ajutorul oxigenului atomic generat de laser, care este citotoxic.

Celula cancerosă preia o cantitate mai mare, față de celulele sănătoase, din colorantul special care se folosește pentru obținerea oxigenului atomic, deci doar celulele canceroase vor fi distruse (figura 4).

Din nefericire moleculele de colorant rătăcesc în piele și ochi și produc reacții de sensibilizare la expunerea solară, timp de aproape 6 săptămâni.

Pentru evitarea acestui efect secundar, varianta hidrofobică a acestui colorant este închisă într-o nanoparticulă poroasă.

Colorantul rămâne în nanoparticulă, nu se împrăștiă în tot organismul, dar nici nu își pierde capacitatea de a produce oxigen atomic, care va fi eliberat prin pori de 1 nm ⁽⁶⁾.

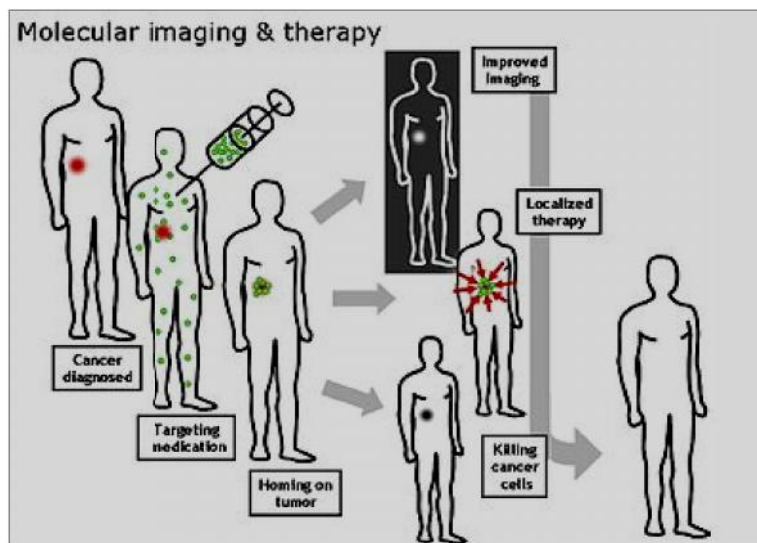


Figura 4. Utilizarea nanoparticulelor în terapia și diagnosticul imagistic al cancerului ⁽¹²⁾

Halas și West de la Rice University din Houston, au dezvoltat un sistem de transportare a substanțelor medicamentoase numit **nanoshell – nanosfere** din metal dielectric (siliciu acoperit cu aur).

Aceste nanosfere încorporate în polimeri hidrogel care conțin substanțe medicamentoase anti-tumorale, sunt injectate în organism și se acumulează lângă celulele tumorale (figura 5).

Când sunt încălzite cu un laser infraroșu, nanosferele (puțin mai mari decât virusul poliomielitei) absorb selectiv o frecvență specifică de infraroșii, topesc polimerul și eliberează substanța activă într-un loc specific ^(1,2).

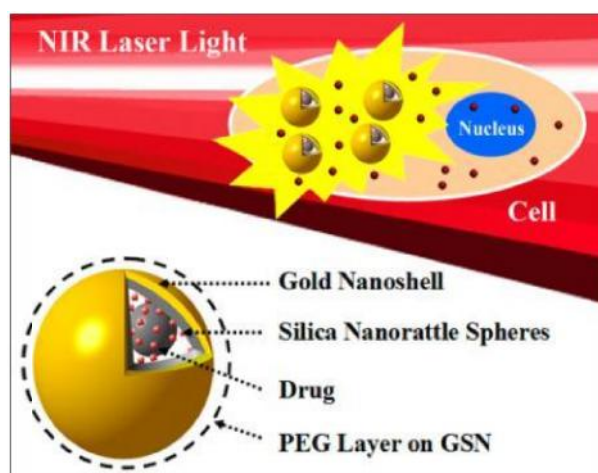


Figura 5. Nanosfere de aur

(Sursa: http://english.cas.cn/Ne/CASE/201101/t20110121_64693.shtml)

Dendrimerele sunt molecule sintetice de forma stelat cu diametrul de 5-20 nanometri, formate din structuri ramificate (figura 6).

Baker și Tomalia (cit. de Freitas R.A., 2004.,) sintetizează nanodispozitive multicomponente numite tectodendimere. Au în mijloc un dendrimer de care se atașează alte tipuri de module dendrimerice, fiecare tip fiind proiectat pentru a îndeplini funcții necesare pentru a forma un nanodispozitiv terapeutic inteligent.

Un număr mare de combinații se pot realiza pentru a fabrica (produce) nanodispozitivul dintr-o „bibliotecă” de componente dendrimerice, care îndeplinesc următoarele funcții: recunoașterea celulelor bolnave, diagnosticul bolilor, transportul de substanțe medicamentoase, determinarea locației și determinarea rezultatului terapiei.

De exemplu, odată ce dendrimerele raportoare de apoptoză, intensificatoare de contrast și eliberatoarele de chemoterapeutice sunt atașate la dendrimerul central, există posibilitatea de a produce cantități mari din acest tectodendrimer.

Acest schelet poate fi modificat pentru a fi utilizat împotriva unui tip anumit de cancer prin substituirea dendrimerele pentru recunoașterea tumorală, creând un nanodispozitiv „personalizat” pentru a distruge doar un anumit tip de cancer, evitând celulele sănătoase.

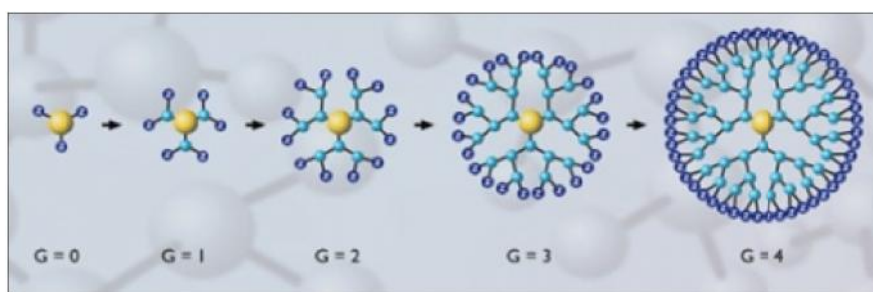


Figura 6. Exemple de dendrimere de la generația 0 la 4

(Sursa: <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>)

La nanodispozitive sintetizate utilizând generația 5 de dendrimere din poliamidoamidă cu centrul din etilendiamină, cu acid folic, fluoresceină și metotrexat atașat covalent la suprafață, aceștia țintesc celula tumorală, ajută în imagistică și au capacitatea de a livra intracelular substanța medicamentoasă (livrarea țintită a îmbunătățește răspunsul citotoxic al celulelor la metotrexat de 100 de ori față de cel liber).

Câteva tipuri de celule canceroase au fost asociate cu cel puțin o proteină unică pe care dendrimerele de localizare ar putea să le folosească pentru identificarea celulelor canceroase, și datorită progresiei genomice este foarte probabil să se identifice proteine unice pentru fiecare tip de tumoră.

Același tip de recunoaștere a proteinelor de suprafață ar putea fi utilizat împotriva celulelor infectate cu virusuri sau paraziți^(1,2).

Hipertermia produsă de fluide magnetice, bazată pe faptul că particulele magnetice biocompatibile produc căldură prin diverse tipuri de pierdere energetică în timpul aplicării unui câmp magnetic AC.

Este o metodă promițătoare în terapia cancerului, datorită faptului că țesuturile se încălzesc la 42-46°C, ceea ce reduce, în general, viabilitatea celulelor canceroase și crește sensibilitatea la chemoterapie și radiații.

Spre deosebire de chemoterapie și radiații, hipertermia are mai puține efecte secundare.

Pentru tratamentul prin hipertermie au fost utilizate diferite tipuri de nanoparticule biocompatibile magnetice, cum ar fi fluidele magnetice stabilizate cu dextran, alte tipuri de fluide magnetice biocompatibile, nanoparticule modificate cu aminosilan, magnetolipozomi cationici sau magnetolipozomi cu afinitate⁽⁴⁾.

Agenți de contrast

Particulele superparamagnetice sunt utilizate ca agenți de contrast în rezonanța magnetică (MRI) (figura 7).

Agenții de contrast particulați includ particule:

- **foarte mici** (UPSIO = *ultrasmall super-paramagnetic iron oxides*) cu diametrul între 10 și 40nm;
- **particule mici** (SPSIO = *small super-paramagnetic iron oxides*) diametrul între 60-150 nm;
- **particule mari (sau orale)** cu diametrul între 300nm-3,5μm.

Agenții de contrast pe bază de oxizi de fier care se găsesc în comerț sunt stabilizați de obicei cu dextran, carboximetil dextran, carboxidextran sau copolimer de stiren divinil benzen⁽⁵⁾.

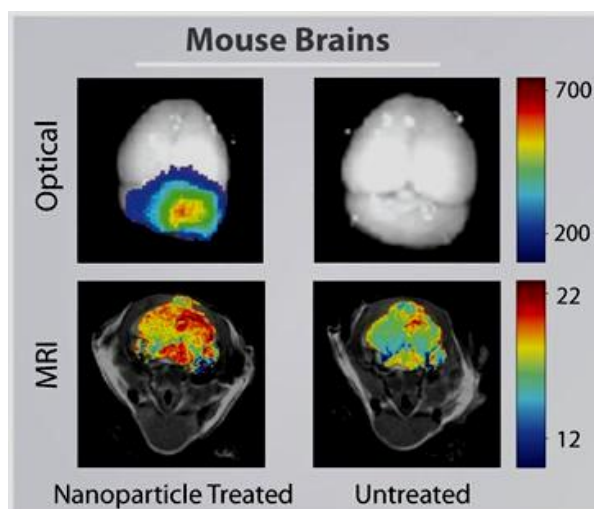


Figura 7. Creierul la oarece utilizând ca agenți de contrast, nanoparticule (stânga) și tehnici convenționale (dreapta)

(Sursa: <http://www.futurity.org/health-medicine/nano-painting-lights-up-brain-tumors/>)

Noile abordări din imagistică utilizează reporteri bioluminiscenti și fluorescenți codificați genetic (etichete de identificare iluminată sau luminescentă) oferind o perspectivă revelatoare asupra organismului viu, cum nu s-a mai observat înainte. Informațiile oferite de acești reporteri pot fi utilizate pentru a spori cunoștințele în biologie și dezvoltarea abordărilor terapeutice pentru boli care includ cancerul, infecția, bolile neurovegetative și cardiovasculare.

Exemple de sisteme:

SPECT/CT – sistem hibrid, capturează / captează atât informațiile funcționale în procesele celulare și moleculare (creștere și activitate) cât și detaliile anatomice (dimensiune și formă) a unei structuri moleculare dorite, mai rapid, eficient și mai clar decât dispozitivele imagistice standard. Imaginile obținute prin aceste sisteme pot ajuta la identificarea rapidă a tumorilor, studiarea unui tratament adecvat, livrarea unei terapii țintite pentru a distruge celulele dorite și urmărirea pentru evaluarea eficacității tratamentului.

- **agenți de contrast** pentru ultrasunete au fost fabricați din „microbule” care împrăstie lumina și permit clinicianului să vadă care parte a mușchiului cardiac funcționează slab.

- **NeuroSpec** este un agent de radiodiagnosticare care etichetează celulele albe din sânge și precursorii mieloizi fără necesitatea îndepărtării și re-injecției sângelui în pacienți.

Noul produs este, de exemplu, pentru pacienții cu semne neclare de apendicități care au vârsta de peste 5 ani.

Facilitează de asemenea vizualizarea imaginilor generate prin camera gamma, permițând medicilor să determine ușor și rapid sediul infecției ⁽³⁾.

Caracteristicile nanoparticulelor din fluidele magnetice (opacitate și absorbția razelor X) permit utilizarea lor în examenele radiologice. Puterea de contrast a nanoparticulelor, în cazul razelor X, este mai mare comparativ cu alte substanțe, ceea ce rezultă creșterea puterii de contrast cu până la 50% ^(9,10).

1.3.2. Aplicații asupra ADN-ului

Secvențierea ADN ultrarapid

Branton și col. de la Harvard University, folosesc un câmp electric pentru a conduce o varietate de polimeri ADN și ARN prin nanoporul central al unei α -hemolizine care avea ca suport un strat bilipidic asemănător cu membrana celulară.

Branton a arătat că nanoporul poate să facă diferența între segmentele de pirimidină și purină de-a lungul unei molecule de ARN, iar în 2000 a demonstrat discriminarea dintre diverse lanțuri de ADN cu aceeași lungime dar cu o compoziție diferită. Cercetările curente sunt direcționate spre fabricarea unor pori cu dimensiuni și geometrie specifică de o mare precizie, care ar putea recunoaște fragmentul de ADN dublu catenar, dar și pe cel monocatenar, care trece prin pori; și investigarea beneficiilor adugării unor conductori electrici la nanopori pentru a îmbunătăți rezultatele. Acești nanopori ar putea permite citirea a 1000 de baze/secundă / por ^(2,10).

Biomolecule radio-controlate

Jacobson a atașat antene minuscule pentru radiofrecvență pe nanocristale de aur, cu mărimea de 1,4 nm și sub 100 de atomi, care apoi au fost atașate ADN-ului.

Când se emite o radiofrecvență de aproximativ 1 GHz către antene, curenții turbionari alternativi induși în nanocristale produc încălzire inductiv foarte bine localizată, în 2 secunde producând separarea ADN-ului dublu catenar în două catene

separate într-un proiec de dehibridizare reversibil, care las moleculele vecine neatinsse. Aplicarea pe termen lung ar prevedea ata area antenelor pe sisteme vii i controlul expresivit ții genelor printr-o comutare electric de la distanță.

Nanocristalele de aur pot fi ata ate deasemenea la proteine, deschizând astfel posibilitatea control rii electronice a unor procese biologice mai complexe cum ar fi plierea proteinelor i activitatea enzimatic ⁽²⁾.

Tehnologia nano-ADN

Descoperirea PCR-ului (*polymerase chain reaction*) – reacție polimerazică în lanț - a deschis drumul spre o nou er de cercet ri biologice.

Impactul se simte nu doar în aria biologiei moleculare, dar i în alte domenii tiințifice asociate. Au fost dezvoltate noi clase de conjugate semisintetice ADN-protein , rețele oligomerice formate din streptavidină și ADN dublu catenar, care se pot transforma în nanocercuri supramoleculare bine definite.

Conjugatele ADN-streptavidin pot fi utilizate ca blocuri modulare de construcție pentru producția unor noi reagenți imunologici pentru analiza ultrasensibilă a urmelor de proteine i a altor antigeni, prin mijloacele metodologiei imuno-PCR.

Imuno-PCR-ul este o combinație a specificității unui test imuno bazat pe anticorpi cu puterea exponențială de amplificare a PCR-ului, prin urmare rezult o cre tere de 1000 de ori a gradului de sensibilitate comparativ cu metoda ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*).

Conjugatele ADN-streptavidin , auto-asamblate, au fost utilizate i în nanotehnologie, conjugatele sunt utilizate ca sisteme model pentru rețelele de nanoparticule cu comutare ion dependent ; ca blocuri de construcție programate, pentru construcția rațional a biomoleculor cu arhitectur complex , care pot fi utilizate ca abloane pentru dezvoltarea nanometric a dispozitivelor anorganice.

Conjugatele covalente de ADN monocatenar i streptavidin sunt utilizate ca adaptori biomoleculari pentru imobilizarea macromoleculor biotinite la substrat solid prin hibridizarea acidului nucleic. Aceast imobilizare, ADN-dirijat , permite funcționarea selectivă și reversibilă a substratelor solide cu metalele și nanoparticulele semiconductoare, ori *viceversa*; permite funcționalizarea ADN-dirijat a nanoparticulelor de aur cu proteinele, cum ar fi imunoglobulinele i enzimele. Fabricarea nano-

structurilor biometalice funcționale din nanoparticule de aur și anticorpi sunt utilizate ca instrumente de diagnostic în bioanalitic ⁽³⁾.

Nanobiotehnologia în analiza cu randament crescut a polimorfismului nucleotidelor unice.

Urmărind publicații ale variațiilor hărții secvențelor genomice, care conține peste 2 milioane de polimorfisme nucleice unice (SNPs), următoarea provocare ar fi dezvoltarea unei noi tehnologii care să utilizeze această informație într-o manieră cost efectivă.

Metodele de genotipare trebuie îmbunătățite pentru a crește randamentul (productivitatea), pentru a permite cercetărilor farmaceutice, biotehnologice și academice să descopere legăturile dintre unele variante genomice și boală, cu potențial consecvent pentru dezvoltarea de noi diagnostice și terapii.

Noile abordări ale extracției și amplificării ADN-ului au scurtat mult timpul necesar acestor procedee la câteva secunde.

Dispozitive microfluidice permit detectarea polimorfismului prin separarea rapidă a fragmentelor utilizând electroforeza capilară și cromatografie lichidă, împreună cu amestecarea și transportul reagenților și biomoleculilor în sisteme integrate.

Obiectivele de bază în dezvoltarea sistemului de extracție și purificare care vor fi compatibile cu genotiparea SNP cu randament crescut:

- Eliberarea ADN-ului din celule în soluție fără accidentarea enzimatică sau mecanică a acestuia
- Îndepărtarea debriurilor celulare (proteine) care ar putea împiedica amplificarea sau hibridizarea ADN-ului
- Prepararea de probe de ADN economice și cu randament ridicat cu protocoale simplificate, care reduc numărul procedurilor implicate
- Evitarea chimicalelor periculoase pe cât posibil pentru a minimiza costurile cu manipularea și neutralizarea lor
- Consecvență atât în calitate cât și în cantitate a randamentului ADN-ului dintre probe astfel încât cuantificarea să nu fie necesară iar amplificarea și/sau hibridizarea ulterioară să fie de un grad înalt de reproductibilitate.

Pentru a putea stabili asociații semnificative între gene și boli ar trebui determinat un genotip de ordinul 10^7 pe zi⁽³⁾.

1.3.3. Separarea magnetică

Separarea magnetică este o metodă foarte simplă, rapidă, eficientă și delicată pentru izolarea rapidă a moleculelor dorite, organelor celulare și celulelor din amestecuri biologice complexe și probe crude brute cum ar fi sângele, măduva osoasă, omogenatele tisulare, urina, fecale sau alte materiale biologice (figura 8).

Separarea magnetică în eprubete este tehnologia de preferință când e nevoie de o producție ridicată de compuși puri și biologic activi și structuri biologice la scară mică.

Separarea magnetică a fost folosită în principal pentru separarea imunomagnetică (IMS) a celulelor eucariote (ex. celule canceroase, celule stem, sau limfocite T).

Progresul acestei proceduri a fost activat de către dezvoltarea anticorpilor monoclonali și caracterizarea îmbunătățită a antigenilor specifici celulari.

Este posibilă separarea multor tipuri de celule specifice din populații celulare mixte din sânge, măduva osoasă și alte surse fără pierderi celulare sau deteriorări.

Sunt disponibile mai multe dispozitive comerciale care permit separarea celulelor dorite dintr-un volum mare de sânge sau suspensii celulare.

- **Sistemul CliniMACS** (Miltenyi Biotec, Germania) este bazat pe MACS Technology care utilizează MACSMicroBeads (particule superparamagnetice de nanodimensiuni, aproximativ 50 nm diametru, compuse dintr-o matrice de fier dextran cuplat cu anticorpi specifici) o unitate de separare magnetică.

CliniMacs permite separarea automată a celulelor la scară clinică într-un mediu închis și steril.

Componentele cheie ale CliniMacs Plus Instrument sunt microcomputerul integrat, unitatea de separare magnetică, pompa peristaltică și diferitele supape.

- **Sistemul Isolex 300** este un separator magnetic de celule CD34 pozitive, ex vivo, din sânge periferic mobilizat, utilizând anticorpi monoclonali anti CD 34 și microsferă superparamagnetice. Dispozitivul constă dintr-un instrument pentru separarea Dynabeads din suspensia de celule mononucleare din sângele periferic mobilizat.

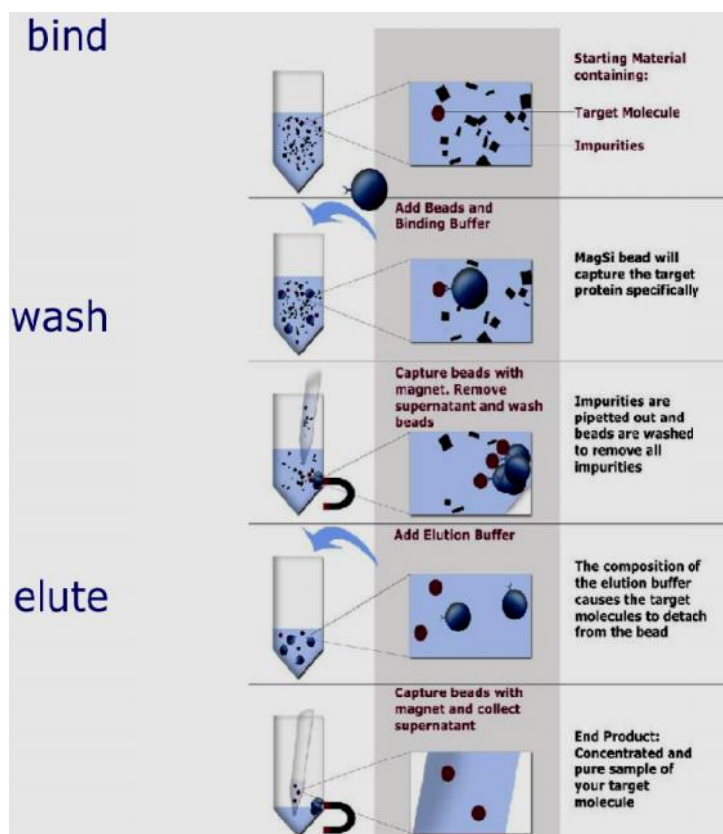


Figura 8. Separare magnetic (<http://www.nordicdiagnostica.com/magnetic-beads/2284>)

Separarea imunomagnetic (IMS), a bacterilor patogene importante (*Salmonella*, *Legionella* și *E.coli verotoxigen*) și a unor paraziți tip protozoare (*Cryptosporidium*, *Giardia*), a fost utilizat cu succes în microbiologia alimentară, medicală și chiar în apa. Ca etichetă se folosesc atât particulele magnetice nanometrice cât și cele micrometrice ca anticorpi specifici imobilizați.

IMS permite scurtarea timpului de detecție, un caracter important din punct de vedere medical. Ca o alternativă la IMS s-au utilizat pentru scopuri similare particule magnetice cu lectine imobilizate.

Particule magnetice cu anexin A₅ (V) imobilizate au fost utilizate pentru separarea simplă și eficientă a celulelor apoptotice din culturi celulare normale.

Această procedură este bazată pe faptul că anexina V este o proteină Ca²⁺ dependentă care leagă fosfolipidele, cu afinitate mare pentru fosfatidilserin (PS), care este redistribuit din interiorul membranei plasmatică spre exterior în cazul celulelor apoptotice sau moarte.

Odat ce se g sește pe suprafața celulară, PS este accesibilă pentru legarea la anexina V i cu oricare dintre conjugății ei ^(1,4,10).

Magnetofecția

Localizarea magnetic a acizilor nucleici legați la particule magnetice în celulele receptoare este baza „magnetofecției” care este o metod simpl i foarte eficient de transfecție (figura 9).

Nanoparticulele magnetice de oxid de fier sunt de obicei învelite cu molecule cationice specifice care se pot asocia cu vectori de gen (ADN, ARN antisens, ODN-oligo-deoxinucleotida, virusuri). Apoi celulele magnetice sunt concentrate pe celulele target prin influența unui câmp magnetic extern generat de magneți.

Asimilarea celular a materialului genetic este realizat prin endocitoz i pinocitoz , dou procese biologice naturale. Prin urmare arhitectura i structura membranelor r mân intacte, față de alte metode de tranfecție fizice, care deteriorează membrana celular .

Acizii nucleici sunt eliberați în citoplasmă prin diferite mecanisme în funcție de formularea folosit . Cuplarea nanoparticulelor magnetice cu vectorii de gene de orice fel rezult într-o cre tere dramatic a asimilării acestor vectori i prin urmare rezult o înalt eficiență de tranfecție. Celulele transfectate pot fi separate de cele netransfectate utilizând tehnici de separare magnetic adecvate ⁽⁴⁾.

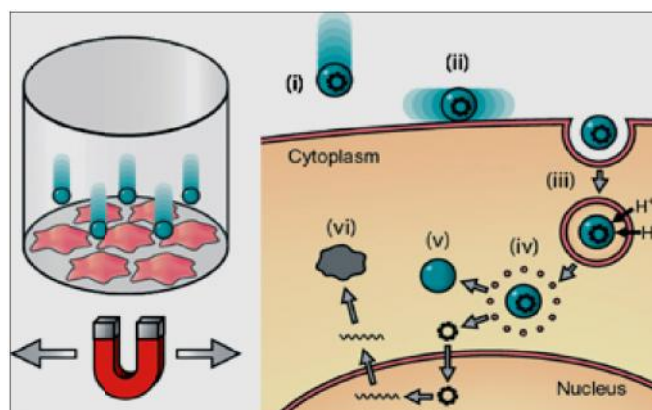


Figura 9. Magnetofecția

Nanoparticulele cu ADN i ARN antisens sunt incubate împreun cu celulele, un câmp magnetic este a ezat sub suprafața plăcii în care se află culturile celulare ceea ce apropie nanoparticulele de celule (i) i le atrage dintr-o parte în alta a celulei (ii) favorizând mecanic endocitoza (iii). Odat ce complexul particul /ADN a fost endocitat se produce ruperea endozomului (iv) i eliberarea ADN-ului (v), care apoi transcrie proteina țintit (vi)

Sursa: <http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/rt/prINTERfriendly/5167/5775>

1.4. Manipularea celulelor i biomoleculelor

Nanoparticulele magnetizate i-au g sit multe aplicații, incluzând separarea și cercetarea celular . Majoritatea particulelor magnetice sunt sferoidale, ceea ce a limitat în oarecare m sur posibilit țile de a le face multifuncționale.

Ar putea fi fabricate nanoparticule cilindrice prin electro-depoziția metalelor într-un model nanoporos de oxid de aluminiu (III).

În funcție de model, raza cilindrului ar putea fi de la 5-500 nm cu lungimea până la 60 μm, diferiți liganizi pot fi atașați la diferite segmente; exemplu porfirine atașate cu linkeri de tiol sau carboxil au fost atașați simultan de segmente de aur, respectiv nichel.

Este posibil crearea de nanofire cu p rți fluorescente izolate spațial.

S-a ar tat c exist posibilitatea ca un nanofir s se autoasambleze într-o suspensie, prin control magnetic extern, acest lucru ar putea permite o asamblare celular controlat , de diferite forme ⁽⁶⁾.

1.4.1. Terapia prin înlocuire cromozomial

Nanoroboții ar putea intervenii la nivel celular, efectuând citochirurgie in vivo.

Cea mai probabil localizare a unei funcții patologice într-o celul este nucleul, mai specific cromozomul. Într-o pricedur citochirurgical , înlocuirea cromozomial , un nanorobot, controlot din exterior, ar putea extrage cromozomii, specifici unei anumite boli, i s ii înlocuiasc cu alți cromozomi produși după tiparul original al individului, specifici celulei „operate”, dar f r gena defect . Astfel genele defecte mo tenite pot fi înlocuite, astfel putându-se trata bolile genetice ⁽²⁾.

1.4.2. Detectarea de proteine

Proteinele sunt importante în limbajul, structura și funcționarea celulară, și înțelegerea modului de funcționare a acestora este extrem de importantă pentru progresele viitoare.

Nanoparticulele de aur sunt larg utilizate în imunohistochimie, pentru identificarea interacțiunilor protein -protein . Totuși capacitățile acestei tehnici sunt limitate.

Spectroscopia difuz Raman este o tehnică bine pusă la punct pentru detectarea și identificarea moleculelor individuale de colorant.

Prin combinarea celor două metode pe o singură nanoparticulă se pot îmbunătăți drastic capacitățile de multiplexare în examinarea proteinelor.

Prof. Mirkin a proiectat o „sondă” multifuncțională care este construită în jurul unei nanoparticule de 13 nm. Nanoparticula este învelită în oligonucleotide hidrofiliice care conțin colorant Raman la un capăt și sunt terminate cu un element de recunoaștere (biotina). Acest moleculă este catalitic activ și va fi învelită în soluție de argint și hidrochinonă.

Soluția de argint și hidrochinonă reacționează cu substratul, și se produce legarea sondei la molecule și o placare cu argint aproape de colorantul Raman, care permite detectarea la un microscop Raman standard.

În afară de faptul că această sondă este capabilă să recunoască molecule mici, ea poate fi modificată să conțină anticorpi la suprafața pentru recunoașterea proteinelor.

Sonda nu prezintă reactivitate încrucișată în determinarea proteinelor și a moleculelor de dimensiuni mici ⁽⁶⁾.

1.5. Nanofiltre cu barieră (eng. *gated nanosieves*)

Debitul substanțelor prin nanopori poate fi controlat și extern. Prima sită nano cu porți voltaj dependente a fost fabricată de Nishizawa și col. în anul 1995 la Colorado State University, avea o matrice de nanotubi din aur cu diametrul intern de 1,6 nm.

Când nanotubii sunt încărcăți pozitiv, se permite doar transportul ionilor negativi, cei pozitivi fiind excluși; cu un voltaj negativ vor fi transportați doar ionii pozitivi.

Nanodispozitive similare combină acum porțile voltaj dependente cu dimensiunea porilor, forma și tipul de încărcare pentru a obține un control precis al ionilor transportați cu semnificativă specificitate moleculară (figura 10).

Eforturile recente ale lui Martin și Kohli au fost direcționate spre imobilizarea unor molecule biochimice, agenți de recunoaștere, cum ar fi enzime, anticorpi, alte proteine și ADN, în unul din nanotuburile pentru fabricarea unor nanosenzori biologic activi, pentru separarea substanțelor active sau pentru biocataliza selectivă ⁽²⁾.

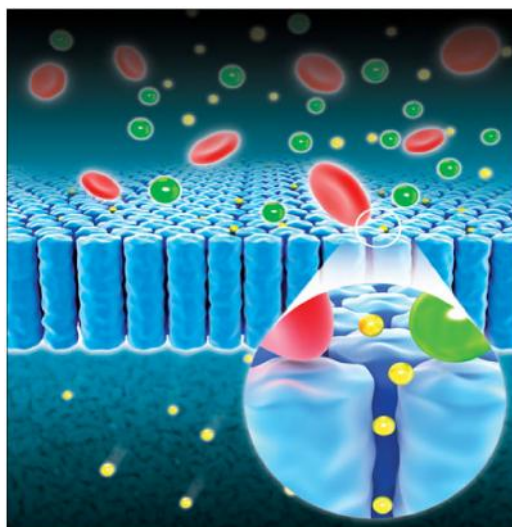


Figura 10. Nanofiltru (<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=26485.php>)

1.5.1. Imunoizolarea unor celule față de organism

Unul din cele mai simple nanomateriale este reprezentat de o suprafață cu găuri, nanopori. În 1997 Desai și col. au creat ceea ce s-ar putea considera unul din primele dispozitive terapeutice nanomedicale, utilizând microprelucrarea în "vrac", pentru a fabrica "camere" minuscule în interiorul unor casete din silicon cristalin, în care se pot adăuga celule. Camerele interferează (comunică) cu mediul biologic înconjurător printr-o membrană filtrantă din silicon policristalin, cu nanopori simetrici de aproximativ 20nm.

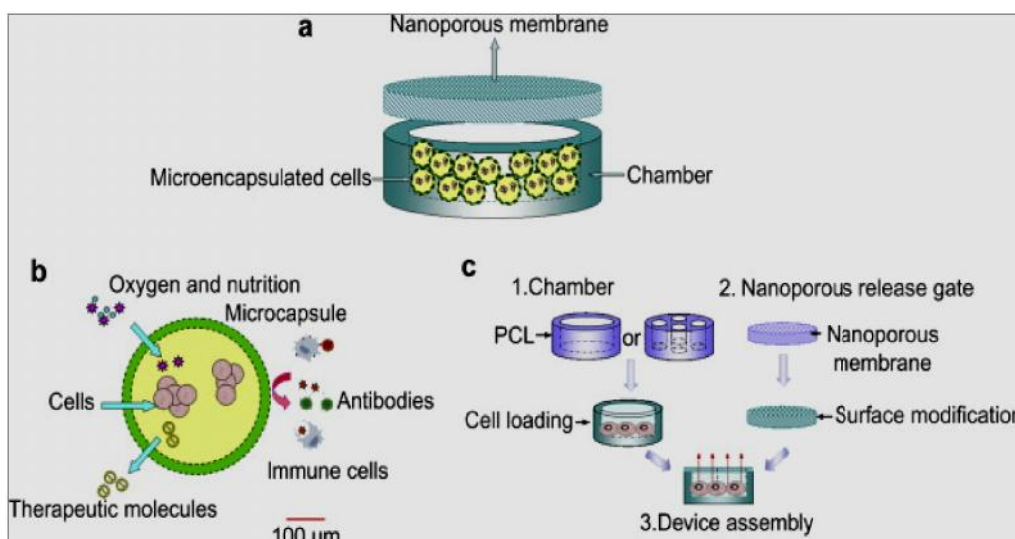


Figura 11. Diagrama unor membrane biodegradabile nanoporoase; a-dispozitiv integrat; b- microcapsule; c- capsule PCL cu porți nanoporoase (Sursa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208005115>)

Acești pori sunt destul de mari pentru a permite trecerea moleculelor mici ca oxigenul, glucoza și insulina, dar sunt destul de mici pentru a împiedica pasarea moleculelor mai mari din sistemul imunitar ca imunoglobulinele și particule virale.

În spatele acestei bariere artificiale, celulele pancreatice, de obolă, încapsulate și imunoizolate primesc nutrienți și rămân sănătoase timp de mai multe săptămâni, secretând insulină prin pori, în timp ce rămân ascunse față de sistemul imunitar, care în mod normal le-ar ataca și ar respinge celulele străine.

Microcapsule cu celule insulare pancreatice de porc ar putea fi implantate subcutan la pacienții bolnavi de diabet, restaurând temporal feedback-ul glucozei în organism, în timp ce se evită folosirea unor imunosupresoare puternice, care ar putea duce la riscuri crescute de infecții. Furnizarea unor celule încapsulate organismului ar putea fi de valoare în tratarea altor boli cu insuficiență hormonală sau enzimală.

Pe viitor se va lua în considerare folosirea unor neuroni încapsulați care ar putea fi implantați în creier și apoi stimulați electric pentru eliberare de neurotransmițători, și folosirea acestora în tratamentul bolii Alzheimer sau Parkinson.

Desai a activat în studierea imunoizolării, transportului de medicamente și senzori pe bază de celule ⁽²⁾.

1.6. Nano-farmaceutice bazate pe fulerene

Derivate solubile ale fulerenelor cum ar fi C_{60} (un aranjament din 60 atomi de carbon pe moleculă de forma unei mingi de fotbal) prezintă mari promisiuni ca agenți farmaceutici.

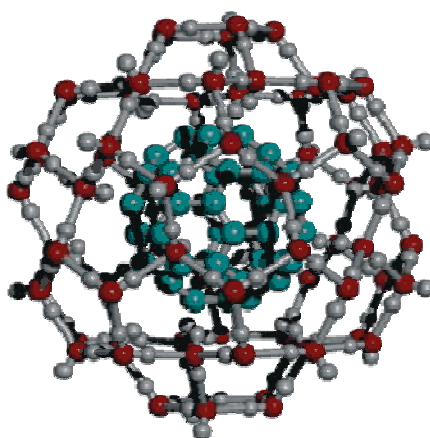


Figura 12. Fuleren $C_{60}(H_2O)_{80}$ (<http://www.lsbu.ac.uk/water/buckmin.html>)

Acești compuși, care sunt deja tema unor studii clinice, au o biocompatibilitate bună și toxicitate relativ scăzută chiar și la doze relativ mari.

Fulerenele pot fi utilizate ca și compuși antivirali (mai ales împotriva HIV), agenți antibacterieni (*E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*), agenți terapeutici fotodinamici antitumorali și anticancer, ca agenți antioxidanți și antiapoptotici în terapia sclerozei laterale amiotrofice și bolii Parkinson ^(1, 2).

1.7. Acțiunea asupra trombilor vasculari

1.7.1. Sonolysis – microbule cu gaz pentru aplicații terapeutice.

Pentru dizolvarea trombilor vasculari, microbulele sunt administrate intravenos sau injectate local într-o structură vasculară specifică, cum ar fi o grefă vasculară. Ultrasunetul va fi aplicat extern (sau printr-un cateter intern) deasupra zonei cu coagulul pentru a asigura acțiune țintită localizată.

Microbulele perfuzează coagulul, și acționează ca dispozitive micromecanice; prin ultrasunete se sparg bulele din câmpul de acțiune, ceea ce duce la dezintegrarea coagulului.

Nanochirurgia "sonolysis" (sonolizare) reprezintă o terapie nanoinvazivă localizată pentru tratamentul trombozei vasculare (figura 13).

Comparat cu terapiile alternative pentru tromboză, sonoliza are meritul de a fi mai puțin invazivă decât trombectomia mecanică și mai rapidă decât terapia medicamentoasă convențională, cu mai puțin risc de sângerare ⁽³⁾.

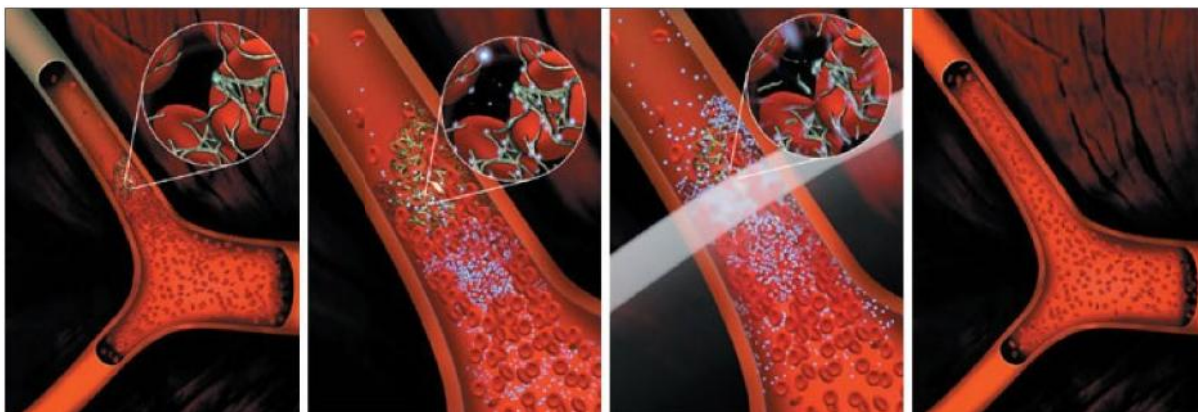


Figura 13. Tehnica Sonolysis

(<http://rehabilitacionymedicinafisica.files.wordpress.com/2009/02/sonolysis2.jpg>)

1.8. Ingineria țesuturilor

Suprafața osoasă nu este netedă, ea prezintă denivelări (rugoziți) care pot ajunge până la 100 nm dimensiune. Dacă suprafața implantului osos artificial ar fi netedă, organismul l-ar respinge, ar exista posibilitatea ca implantul să fie acoperit de un strat de țesut fibros, lucru care reduce contactul dintre implant și os, care duce la slăbirea implantului și produce inflamație. A fost demonstrat că prin crearea unor rugozități de dimensiuni nanometrice, pe protezele de șold, genunchi, se poate reduce rata respingerii și se stimulează producția de osteoblaste.

Osteoblastele sunt celule responsabile de creșterea matricei osoase. Efectul a fost demonstrat cu materiale polimerice, ceramice dar mai recent și pe metal.

Mai mult de 90% dintr-o suspensie de celule osoase au aderat la nanostructurile de pe suprafața metalică. În final aceste constatări vor ajunge la proiectarea unor proteze mai durabile (rezistente), și reduc ansele ca implantul să se slăbească.

S-a arătat că utilizând abordarea biomimetică, creșterea încreșterea a unui film nanostructurat de apatit din lichidele corporale stimulate, a rezultat formarea unui strat nanoporos puternic aderent.

Startul a fost construit din 60 nm de cristale, și posedă o structură nanoporoasă stabilă și bioactivitate ^(6,10).

1.8.1. Aplicațiile nanotehnologiei în ingineria țesuturilor

Prin ingineria țesuturilor se referă la dezvoltare de noi țesuturi in vitro, care mai apoi vor fi plasați chirurgical în corp, sau stimularea refacerii in situ utilizând implante bioartificiale din celule vii, introduse aproape de locul afectat ⁽³⁾.

Un aspect crucial în transplantul celular este urmărirea și monitorizarea grefelor celulare în beneficiarul transplantului.

Pentru a verifica celulele in vivo au fost utilizate nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier pentru etichetare celulară, permițând vizualizarea ulterioară in vivo pe MRI. MRI-ul este o metodă neinvazivă care se poate utiliza nu doar pentru a se confirma că celulele s-au grefat, dar poate monitoriza și timpul scurs în migrația celulară și supraviețuirea acestora în țesutul dorit.

Aceste informații ajută la optimizarea procesului de transplant în ceea ce privește numărul de celule necesare, metoda, sau locul administrării celulelor și fereastra terapeutică eficientă în ceea ce privește timpul scurs din momentul lezării și eficacitatea transplantului ⁽⁴⁾.

Se folosește materie (material) de la același individ, pacient (autolog), sau de la alți indivizi (alogenici), sau chiar de la alte specii de mamifere (xenogenice).

S-a luat în vedere, prin implicarea microelectronicii sau nanotehnologiei, crearea de țesuturi sau organe bioartificiale care pot lua locul unui organ care este bolnav terminal (ochi, ureche, inimă sau articulație).

Dispozitivele protetice implantabile și nanoschelele pentru dezvoltarea (creșterea) noilor organe sunt noile scopuri (ținte) ale cercetătorilor în nanotehnologie.

Un avans rezonabil s-a făcut în nanoingineria hidroxiapatitei pentru înlocuirea osoasă. Pe viitor, ne putem imagina o lume unde nanodispozitivele sunt implantate în mod curent sau chiar injectate în circulația sanguină pentru a monitoriza starea de sănătate și a participa automat la repararea sistemelor care au deviat de la normal.

Acești nanoroboți ar putea fi personalizați prin adaptarea lor la genotipul și fenotipul pacientului pentru a optimiza intervenția în stadiile inițiale ale bolii exprimate ^(3, 9).

1.8.2. „Creșterea” de noi organe

Construirea de celule la scară nanometrică poate fi realizabilă prin replicarea lor programată. Semnalele sunt transmise, înainte și înapoi cu instrucțiunile, pentru dimensiunea și forma dorită, la locul construcției.

Când instrucțiunile complete sunt terminate, organele pot fi ”crescute” conform condițiilor specificate. Pentru a fi compatibile cu statutul imunologic al individului aceste organe ar putea avea codat ADN-ul necesar.

Acest lucru ar putea spori (ușura) integrarea structurilor artificiale cu țesuturile vii, împrumutând interfața adecvată sistemelor biologice, având avantajul absenței reacției imune, față de organele donor care se utilizează.

În anii următori asta ar putea reprezenta un salt major în managementul tulburărilor prin insuficiență de organ ⁽³⁾.

1.9. Determinările biologice

1.9.1. Coduri optice multicolore pentru determinări biologice

Creșterea numărului de cercetări în genomică și proteomică generează un număr crescut de secvențe de date și necesită dezvoltarea unei înalte tehnologii de screening.

Multe tehnologii de determinare ajung la saturație când numărul elementelor ajunge la câteva milioane.

O abordare tridimensională, bazată pe „coduri de bare optice” din particule de polimeri în soluție; este limitat doar prin numărul redus de „tag”-uri (etichete) unice pe care le poate produce și detecta.

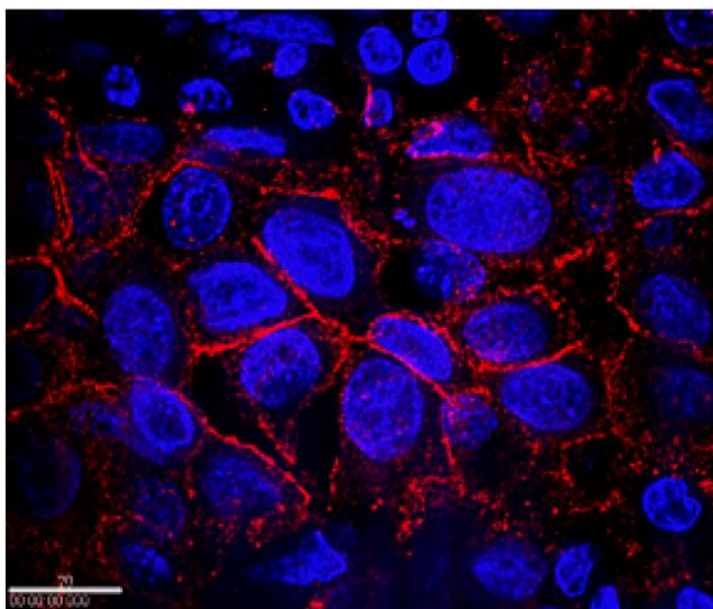


Figura 14. Celule cancer mamar cu membrana celulară roșie datorită reacției punctelor cuantice, și nuclei colorați în albastru (<http://www.nist.gov/mml/bmd/her2-021908.cfm>)

Punctele cuantice (quantum dots) singulare au fost utilizate cu succes ca un înlocuitor al coloranților organici în diverse aplicații de bio-tagging.

Această idee a fost dusă mai departe prin combinarea a diferite puncte cuantice de diverse dimensiuni, care au diferite culori fluorescente, combinându-le în microsferă polimerice. Selecția nanoparticulelor utilizate în acest experiment are 6 culori diferite de intensități, și este de ajuns pentru a codifica 1 milion de combinații ⁽⁶⁾.

1.9.2. Nanotehnologia în măsurarea oxigenului dizolvat

Oxigenul este unul din metaboliții majori în sistemul aerobic, iar măsurarea oxigenului dizolvat este de importanță majoră în aplicații din medicină, industrie și mediu. Interesele recente în metode de măsurare a concentrației oxigenului dizolvat s-au așezat mai ales asupra senzorilor optici, datorită avantajelor pe care le au față de electrozii ampermetrici convenționali ⁽³⁾.

Nanosenzorii optici PEBBLE (eng. probes encapsulated by biologically localized embedding) – sonde încapsulate prin încorporare biologic localizată – au fost proiectați pentru oxigenul dizolvat utilizând silicați modificați organic (ormosil) ca matrice pentru nanoparticule.

Nanoparticulele de ormosil sunt formate dintr-o particulă centrală cu feniltrimetoxisilam ca precursor urmat de formarea stratului de înveliș cu metiltrimetoxisilam ca precursor.

Structura foarte permeabilă și natura hidrofobică a nanoparticulelor de ormosil, precum și dimensiunea lor mică, rezultă un răspuns de fluorescență la oxigenul dizolvat și un răspuns liniar în toată seria de la concentrația 0% până la cea de 100 % oxigen ⁽³⁾.

1.9.3. Nanoparticule ca biomarkeri

Nanoparticulele pot fi utilizate atât pentru detecția cantitativă cât și calitativă a celulelor tumorale in vitro. Sporesc procesul de detectare prin concentrarea și protejarea markerilor împotriva degradării, în scopul de a face analiza mai sensibilă.

De exemplu nanosferele de polistiren fluorescent învelite în streptavidină, **Fluorospheres- fluorescența verde** și **TransFluorospheres - fluorescența roșie**, au fost utilizate pentru detectarea receptorului factorului de creștere epidermală (EGFR) pe celule A431 (celule de carcinom epidermoid uman) prin metoda citometriei de flux cu o singură culoare. Rezultatele au arătat că nanosferele fluorescente asigură o sensibilitate de 25 ori mai mare decât conjugatele streptavidin-fluorescein.

În studierea biomarkerilor este dezvoltată una care detectează timpuriu, cu succes și mai bine bolile curabile.

Agenții de contrast pot fi încărcăți în nanoparticule pentru diagnosticul tumorilor. Caracteristicile fizico-chimice ale nanoparticulei (dimensiunea, polarizarea suprafeței,

învelișul suprafeței, stabilitatea) permit redirecționarea și concentrarea markerilor la locul de interes. Particule coloidale etichetate pot fi utilizate ca agenți de radiodiagnostic. Pe de altă parte, niște sisteme coloidale ne-etichetate sunt deja utilizate sau testate ca agenți de contrast în metode de diagnostic CT și RMN.

Pe viitor, nanoparticulele cu afinități specifice de legare ar putea fi resuspendate în fluide corporale recoltate, sau poate chiar injectate direct în circulația sanguină.

Nanoparticulele împreună cu moleculele legate, ar putea fi capturate direct prin filtre și studiate prin spectrometrie cu rezoluție înaltă ^(3, 9).

1.9.4. Detectorii de virus

Grupul lui Lieber a reușit detectarea electrică directă, cu selectivitate ridicată, a particulelor virale. Au utilizat tranzistori cu câmp pentru a măsura modificările minore de conductanță caracteristice legării și desfacerii pe matricea de nanofire modificată cu anticorpi virali. Matricile detectează virusuri atât din fluide corporale cât și din alte fluide.

Grupul a testat matrici cu receptori specifici pentru Virusul Influenzei tip A, paramixovirusuri și adenovirusuri, și au constatat că detectorii pot diferenția între aceste 3 virusuri, datorită faptului că s-au utilizat receptori specifici pentru fiecare în parte, și pentru că fiecare virus se leagă pentru o anumită perioadă de timp la receptor; astfel ansele unui rezultat fals pozitiv sunt minime ⁽²⁾.

1.10. Roboții biologici

„Bioroboții” bacterieni pot fi construiți de exemplu din aprox 300 de gene bine puse la lucru (aproximativ 150000 baze) ceea ce constituie genomul minim pentru un microtub funcțional. Utilizați în medicină, acești microtubi, ar putea fi proiectați să producă selectiv vitamine, hormoni, enzime și citochine în organismul deficitar, sau să absoarbă și să metabolizeze selectiv în produși finali, inofensivi, substanțe dăunătoare, otrăvuri, toxine sau detritusuri intracelulare nedigerabile.

Egea Biosences este proprietara unei tehnologii de scrierea a genelor și programarea proteinelor (GeneWriter and Protein Programming) cu o bază de date de peste 1 milion de proteine programate, produce peste 200 de gene sintetice și proteine, și a reușit sinteza celei mai mari gene sintetizate chimic (peste 16000 de baze).

Cercetătorii de la Institute of Biological Energy Alternatives, îndepărtează materialul genetic din microorganisme (*Mycoplasma genitalium*), sintetizează un lanț de material genetic asemănător cu cel natural și speră ca lanțul artificial să conțină un număr minim de gene de *M. Genitalium* pentru a susține viața.

Cromozomul artificial va fi introdus în celula "golit" care va fi apoi testat pentru abilitatea de a supraviețui și a se reproduce. Pentru a asigura siguranța, celula va fi incapabilă să producă infecții, și va fi limitat și conceput în așa fel încât să moară dacă ajunge în mediu ⁽²⁾.

1.10.1. Nanoroboții medicali de mână

Pe termen mai lung, poate în 10-20 de ani, sistemul de mașini moleculare și nanoroboți ar putea fi folosiți de medici în lupta contra bolilor, în sănătate și îmbătrânire.

Materialele de construcție organice (proteinele) sunt foarte bune la autoasamblare, dar cele mai performante dispozitive moleculare pot fi construite din materiale „diamantoide”, cea mai puternică substanță, dar proiectul nanoroboților din aceste materiale rămâne controversat ^(2, 3).

Respirocitele

Un exemplu al unui nanorobot este celula roșie (eritrocitul) artificial mecanic sau „respirocitul”, un dispozitiv sferic de 1 μm dimensiune, cu sistem de pompare activ prin glucoză serică endogenă, capabil să transporte de 236 de ori mai mult O₂ decât eritrocitul natural. Nanorobotul este format din 18 miliarde de atomi aranjați cu precizie și „umpluți” cu până la 3 miliarde molecule de O₂ și CO₂.

Mai târziu gazele se eliberează din dispozitiv prin pompe moleculare.

Respirocitele imită acțiunea eritrocitului, senzorii de concentrație a gazelor aflate la exteriorul fiecărui dispozitiv reacționează, astfel nanorobotul știe când trebuie să se încarce cu O₂ și când să descarce CO₂ în plămâni (figura 15).

Un nano computer și numeroși senzori chimici și de presiune ajută dispozitivul să funcționeze corespunzător și să poată fi ajustat din exterior. Injectarea a 5 ml, doză terapeutică, de respirocite 50% în soluție salină, adică 5 trilioane de nanoroboți, în circulația sanguină, ar dubla capacitatea de transport a oxigenului (studii efectuate la un volum de aproximativ 5,4 l sânge).

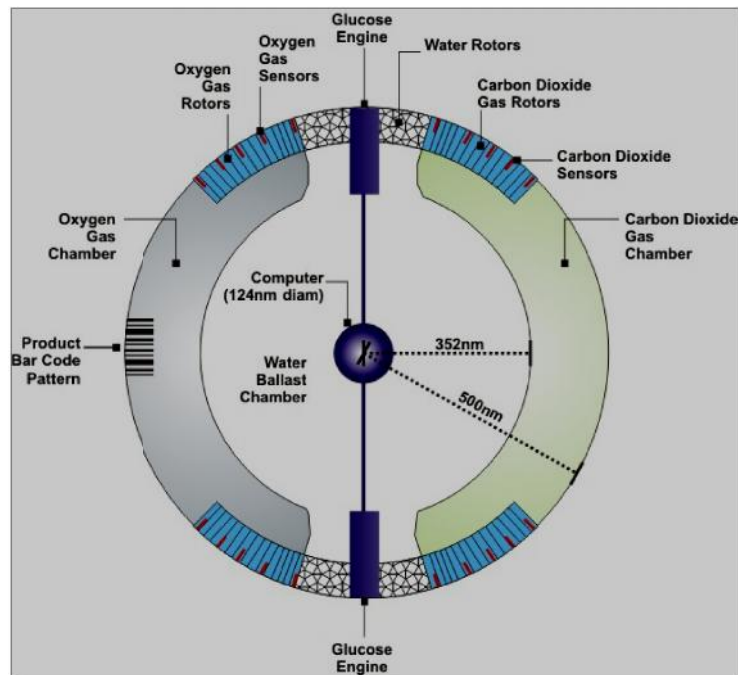


Figura 15. Schema prototipului unui respirocit (<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3034>)

Aplicații ale respirocitelor: substituenți în transfuzii, tratament în anemie, disfuncții pulmonare, perinatale și neonatale, terapie și diagnostic în cancer, prevenirea asfexiei, respirație artificială (2, 3).

Microbivorii

O celulă albă (leucocit) mecanică de dimensiuni microscopice, care are ca funcție distrugerea patogenilor din circulația sanguină, utilizând digestia și eliminarea.

Prototipul are formă sferoidală turtită, cu axul mare cu diametrul de $3,4\ \mu\text{m}$, și axul mic cu diametrul de $2,0\ \mu\text{m}$.

Microorganismul țintit se va lega la suprafața dispozitivului datorită locașurilor speciale de legare specifice de specie, după care nițele cârlige telescopice stabilesc ancorarea acestuia și introducerea lui în interiorul dispozitivului. Inițial patogenul va fi prins într-o cameră de $2\ \mu\text{m}^3$, apoi va fi transferat într-o altă cameră cu dimensiuni similare unde va fi supus digestiei enzimaticе, cu ajutorul a 40 de enzime sintetice.

În urma digestiei enzimaticе vor rezulta produse ca aminoacizi, mononucleotide, glicerol, acizi grași liberi și zaharuri simple. Aceste molecule inofensive, sunt eliminate în torrentul sanguin, tot procesul având durată de 30 de secunde.

Acești nanoroboți pot fi de 80 de ori mai activi ca agenți fagocitanți decât macrofagele, și ar avea o durată de viață mult mai lungă.

O doz de câțiva ml de microbivori ar elimina în totalitate o infecție septicemică în câteva minute la câteva ore, după care microbivorii ar fi eliminați complet, din corp ⁽²⁾.

1.11. Viitorul nano-biotehnologiei

Majoritatea companiilor se axează pe dezvoltarea de aplicații farmaceutice, cum ar fi transportul de substanțe medicamentoase.

Mai multe companii exploatează efectele dimensiunii cuantice a nanocristalelor semiconductoare pentru etichetarea biomoleculilor, sau utilizarea nanoparticulelor de aur bio-conjugate pentru etichetarea diferitelor componente celulare.

Alte companii aplică materiale nano-ceramice în ingineria țesuturilor și ortopedie.

Argintul coloidal este larg utilizat ca formulare antimicrobial, reactivitatea mare a oxidului de titan, poate fi utilizat ca atare sau după ce a fost iluminat cu raze UV ca bactericid (tabelul și figurile 16 și 17).

Tabelul 4

Exemple de nanomateriale comercializate pentru aplicații bio-medicale (după Salata O.V., 2004) ⁽⁶⁾.

Transportul de substanțe medicamentoase	Nanoparticule polimerice pentru transportul medicației antitumorale care poate traversa bariera hemato encefalic Reducerea dimensiunii particulelor la 50-100 nm Nanoparticule micelare pentru încapsularea substanțelor medicamentoase, proteinelor, ADN-ului
Filtrare prin membrană	Materiale ceramice nanoporoase pentru filtrarea endotoxinilor, separarea ADN-ului și a proteinelor.
Past de dinți	Nanoparticulele de hidroxiapatit pot să îmbunătățească suprafața dintelui
Dezinfectante de suprafață	Nanoemulsii
Biomarkeri luminescenți	Puncte cuantice semiconductoare cu grupări amino sau carboxil la suprafață, emit între 350-2500 nm (lungime de undă)
Detectarea și separarea pe tipuri de celule	Miez magnetic înconjurat de un strat polimeric cu anticorpi pentru capturarea celulelor.
Filtre AiroCide	Oxitul de titan distruge patogenii din aer.
Nanoparticule de aur pentru bioanaliză	Nanoparticule de aur bio-conjugate pentru TEM sau microscopie fluorescentă.
Biomarkeri din aur	Coduri de bare de ADN atașate la nanosinde pentru identificare, PCR-ul este utilizat pentru amplificarea semnalului
Barriere solare	Nanoparticule transparente pentru absorbția razelor UV, și transformarea în căldură
Bandaje Acticoat	Argintul în formă de nanocristale foarte activ asupra patogenilor
Ingineria țesuturilor	Implante ortopedice și dentale, exploatarea proprietăților materialelor a siliconului nanoporos



Figura16. Bandaje Acticoat (<http://www.woundsource.com/product/acticoat-7>)

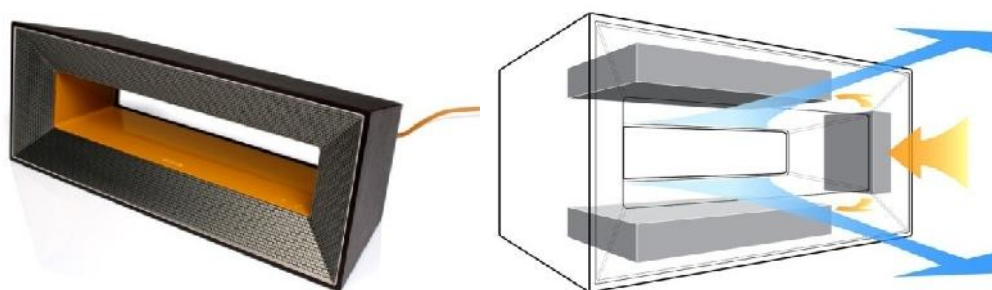


Figura 17. Filtrul de aer Airocid
(Sursa: <https://www.airocid.com/how-it-works>)

În forma actual , majoritatea nanoparticulelor comerciale, cu aplicații în medicin , duc c tre transportul de substanțe medicamentoase.

În bioștiință, nanoparticulele înlocuiesc coloranții organici în aplicații care necesit fotostabilitate ridicat și deasemenea capacități mari de multiplexare.

Sunt evoluții în direcționarea și controlarea nanoparticulelor, cum ar fi conducerea nanoparticulelor magnetice c tre tumori, apoi ori elibereaz substanța medicamentoas ori doar produce hipertermie localizat , distrugând țesuturile din jur.

Tendința majoră în dezvoltările viitoare a nanomaterialelor este să le facă multifuncționale și controlabile la semnale exterioare sau de mediul local, astfel transformându-le în nanodispozitive ⁽⁶⁾.

Bibliografie

1. **Cristina Romeo T.** – Nout ți în nanomedicină, <http://www.veterinarypharmacon.com/docs/585-NANOMEDICINA.pdf>, 2009
2. **Freitas Robert A. Jr.** – What is nanomedicine. 1(1) 2-9, 2004
3. **Herbert Ernest., Rahul Shetty** – Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergences of Nanotechnology with Biology, 2005
4. **Safaric Ivo, Hiska Katerina, Safarikova Mirka** – Magnetic Nanoparticles for Biomedicine, in: Intracelular delivery: Fundamentals and Applications, Fundamental Biomedical Technologies, Ed. Prokop.Springer Bv, 2011, 363-372
5. **Safaric Ivo, Safarikova Mirka** - Magnetic nanobiocomposites and their possible applications, NanoCon 20. - 22. 10. 2009, Rožnov pod Radhošt m, eská Republika
6. **Salata O.V.** – Applications of nanoparticles in biology and medicine, Journal of Nanobiotechnology, 2 (3), 2004
7. **Sayed Z.M.,Telang S. D., Ramchand C.N.** - Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine, *BioMagnetic Research and Technology* 2003, :<http://www.biomagres.com/content/1/1/2>
8. **Silva A., Silva-Freitas E. et all.** - Magnetic particles in biotechnology:from drug targeting to tissue engineering, *Advances in Applied Biotechnology*, Ed. InTech, 2012, 237-258
9. **incai Mariana,Vulpe Alexandara Iuliana** – Observații asupra efectului protector al unor nanocompuși magnetici asupra pielii în condiții de expunere prelungit la UVR, *Lucrare de diplom* , 2003
10. **incai Mariana, Lupescu Ramona Camelia** – Efectul UV protector al unor compuși cu nanoparticule, *Lucrare de diplom* , 2007
11. ***Nanofluidics – Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanofluidics>, 2013
12. ***Nanomedicine – Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanomedicine>, 2013
13. *** <http://rehabilitacionymedicinafisica.files.wordpress.com/2009/02/sonolysis2.jpg>
14. *** <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3034>
15. *** <http://www.futurity.org/health-medicine/nano-painting-lights-up-brain-tumors/>
16. *** <http://www.lsbu.ac.uk/water/buckmin.html>
17. *** <http://www.nist.gov/mml/bmd/her2-021908.cfm>
18. *** <http://www.nordicdiagnostica.com/magnetic-beads/2284>
19. *** <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961208005115>
20. *** <http://www.woundsource.com/product/acticoat-7>
21. ****http://img.timeinc.net/time/daily/2007/0706/a_lantibiotics_0618.jpg
22. ***http://english.cas.cn/Ne/CASE/201101/t20110121_64693.shtml
23. ***http://s3.amazonaws.com/readers/healthmad/2007/07/22/43701_0.jpg
24. ***<http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>
25. ***<http://www.fda.gov/consumer/updates/nanotech072507.html>
26. ***<http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/rt/printerFriendly/5167/5775>
27. ***<http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=26485.php>
28. ***<https://www.airocide.com/how-it-works>