

Использование инструментов ТРИЗ в биомедицинских исследованиях

Владимир Петров,
Др. Евгений Бердичевский

Use of TRIZ tools in biomedical research

Vladimir Petrov
Dr. Yevgeny Berdichevsky

Введение

- Впервые использование принципов и механизмов работы и форм животных в технике предложил Леонардо да Винчи.
- В 1950-х годах американский биофизик Отто Шмитт (Otto Schmitt) разработал концепцию «биомиметики»
- Термин «бионика» был придуман Джеком Э. Стилом (Jack E. Steele)
- Г. Альтшуллер предложил использовать принципы и механизмы работы животных, особенно древних, для развития технических систем.
- В середине 1976 года В. Петров провел исследования по возможности переноса законов биологии для создания системы законов развития техники.
- Цель данной работы показать более широкое применение инструментов ТРИЗ в биомедицинских исследованиях.

Introduction

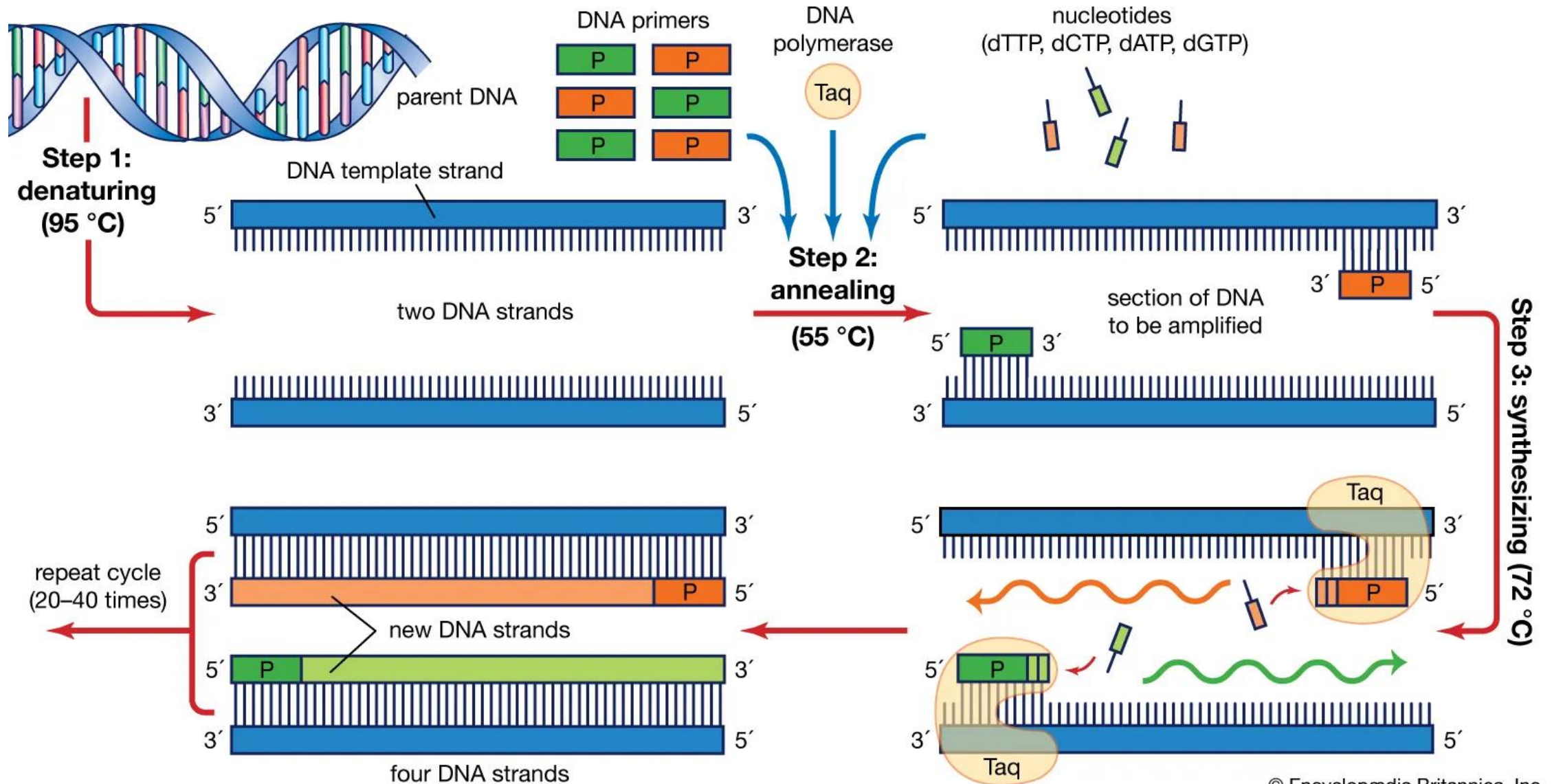
- For the first time, the use of the principles and mechanisms of work and forms of animals in technology was proposed by Leonardo da Vinci.
- In the 1950s, the American biophysicist Otto Schmitt developed the concept of "biomimetics"
- The term "bionics" was coined by Jack E. Steele
- G. Altshuller proposed using the principles and mechanisms of the work of animals, especially ancient ones, for the development of technical systems.
- In the middle of 1976, V. Petrov conducted a research on the possibility of transferring the laws of biology to create a system of laws for the development of technics.
- The purpose of this work is to show an application of TRIZ tools in biomedical research.

История развития ПЦР

- Для проведения различных анализов ДНК и для диагностики заболеваний берут пробу. Однако бывают случаи, когда невозможно второй раз взять пробу и это единственная проба.
- Как быть?
- Ответ очевиден — нужно дублировать (амплифицировать) ДНК — это осуществляется с помощью репликации ДНК
- Впервые это сделал Норвежский биохимик Хьелль Клеппе в 1971 году. Для этого он воспользовался ферментом ДНК-полимеразой, который впервые в 1956 году выделил американский ученый Артур Корнберг из бактерий *Escherichia coli*.
- В 1983 году американским биохимиком Кэри Муллисом была изобретена ПЦР и 28.07.1987 был получен патент США 4,683,195.

The development of PCR

- A sample is taken for various DNA tests and for the diagnosis of diseases. However, there are cases when it is not possible to take a sample at the second time and this is the only sample.
- How to solve the problem of the DNA amount shortage?
- The answer is obvious - you need to duplicate (amplify) DNA – this is accomplished using DNA replication
- This was performed at first by the Norwegian biochemist Kjell Kleppe in 1971. To achieve this, he used the enzyme DNA polymerase, which was originally isolated in 1956 by the American scientist Arthur Kornberg from *Escherichia coli* bacteria.
- In 1983, American biochemist Kary Mullis invented PCR and received US Patent 4,683,195 on July 28, 1987.





ProFlex™ PCR System

История развития ПЦР

- Для проведения ПЦР анализа, перед каждым новым синтетическим циклом в смесь надо было добавлять новую порцию фермента ДНК – полимеразы, потому что он быстро выходил из строя из-за высоких температур, используемых в ПЦР.
- Возникла новая задача.
- Как сделать, чтобы фермент ДНК – полимеразы дольше служил?
- В таких случаях в ТРИЗ применяют функционально-ориентированный поиск (ФОП), который представляет собой трансфер технологий.
- Значит нужно найти область, где эта функция выполняется в тяжелых условиях и массово. Это означает, что нужно найти фермент ДНК – полимеразы, где бы он работал при высоких температурах.

The development of PCR

- For the PCR procedure, before each new synthetic cycle, a new portion of the DNA polymerase enzyme had to be added to the mixture, because it quickly failed due to the high temperatures used in PCR.
- A new problem has arisen.
- How to make the DNA polymerase enzyme to persist longer?
- In such cases, TRIZ uses function-oriented search (FOS), which is a technology transfer.
- So you need to find an area where this function is massively completed in challenging conditions. This means that you need to find the DNA polymerase enzyme, where it would work at high temperatures without loss of its biochemical activity.

История развития ПЦР

- В 1985 году Кэри Мюллис в корпорации Cetus начал использовать для ПЦР термостабильную Taq-полимеразу (выделенную из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus*), что значительно упростило работу. Taq-полимеразу выделили в 1976 году ученые из США, Эллис Чиен, Дэвид Эдгар и Джон Трела. Этот фермент сохранял активность даже при температурах выше 75 °С.
- В 1991 году ученые во главе с Эриком Матуром из биотехнологической компании Stratagene, (Калифорния), обнаружили ДНК-полимеразу Pfu (*Pyrococcus furiosus*), которая демонстрирует значительно более высокую точность репликации, чем ДНК-полимераза Taq. В 1996 году они получили патенты на экзонуклеазо-дефицитные Pfu и на полную Pfu (U.S. Patent 5,489,523, U.S. Patent 5,545,552).

The development of PCR

- In 1985, Kary Mullis at Cetus Corporation began using thermostable Taq polymerase (isolated from the extreme thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*) for PCR, which greatly simplified the work. Taq polymerase was firstly isolated in 1976 by US scientists Ellis Chien, David Edgar and John Trela. This enzyme remained active even at temperatures above 75°C.
- In 1991, scientists led by Eric Mathur of Stratagene, California, a biotechnology company, discovered Pfu (*Pyrococcus furiosus*) DNA polymerase, which exhibits significantly higher replication fidelity than Taq DNA polymerase. In 1996, they received patents for exonuclease-deficient Pfu and for complete Pfu (U.S. Patent 5,489,523, U.S. Patent 5,545,552).

История развития ПЦР

- **Достоинства Taq-полимеразы** — это высокая скорость её работы (процессивность).
- **Недостаток** этой полимеразы заключается в довольно высокой вероятности внесения ошибочного нуклеотида, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5'-экзонуклеазная активность).
- **Достоинства Pfu-полимеразы** — это гораздо более точное копирование молекул ДНК, что значительно уменьшает число мутаций в реплицируемой ДНК.
- **Недостаток** — низкая скорость её работы (процессивность).

History of PCR development

- **The advantage of the Taq polymerase** is its high speed of work (processivity).
- **The disadvantage** of this polymerase is the rather high probability of introducing an erroneous nucleotide, since this enzyme lacks error correction mechanisms (3' → 5'-exonuclease activity).
- **The advantage of Pfu polymerase** is a much more accurate copying of DNA molecules, which significantly reduces the number of mutations in replicated DNA.
- **The disadvantage** is the low speed of its work (low processivity).

История развития ПЦР

- **Противоречие требований 1 (ПТ - 1)** у **Taq-полимеразы** – *высокая скорость их работы (процессивность)*, но *высокая вероятность внесения ошибочного нуклеотида*.
- **ПТ – 2** у **Pfu-полимеразы** – *низкая вероятность внесения ошибочного нуклеотида*, но *низкая скорость их работы (процессивность)*.
- **Идеальный конечный результат (ИКР)**. Высокая скорость работы и высокая точное копирование молекул ДНК.
- **Противоречия свойства (ПС)**. Почему у **Taq-полимеразы** вероятность внесения ошибочного нуклеотида, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5'-экзонуклеазная активность).
- **Решение – гибридизация**. Использование их вместе. Остаются только достоинства и компенсируются недостатки.

History of PCR development

- **The contradiction of requirements 1 (CR - 1)** for **Taq polymerase** is the *high speed of their work (processivity)*, but the *high probability of introducing an erroneous nucleotide*.
- **CR - 2** in **Pfu polymerase** – *low probability of introducing an erroneous nucleotide*, but *low speed of their work (processivity)*.
- **Ideal final result (IFR)**. **High** speed of work and **high** exact copying of DNA molecules.
- **Property Contradictions (PC)**. Why is **Taq polymerase** likely to introduce an erroneous nucleotide, since this enzyme lacks error correction mechanisms (3'→5'-exonuclease activity).
- **The solution is hybridization**. Using them together. Only advantages remain and disadvantages are compensated.

Аппарат ПЦР

- Аппарат ПЦР должен циклично выдавать следующие температуры-95, 55, 72 градусов Цельсия.
- Первые аппараты для ПЦР работали на основе подогрева с помощью термонагревательного элемента, а охлаждение осуществляется с помощью вентилятора и потока воздуха. ПЦР, особенно для длинных фрагментов ДНК, длился 4-6 часов.
- **Как сократить время нагревания и охлаждения?**
- В качестве решения задачи предложено использовать эффект Пельтье или термоэлектрический эффект (Peltier effect). В аппарате ПЦР поставили элемент Пельтье, который быстро нагревал и охлаждал препарат. Это позволило значительно сократить процесс, и ПЦР стал длиться 0.5-1.5 часа, что тоже сделало революцию, особенно в молекулярной диагностике, в частности, при определении наличия вируса короны.

PCR apparatus

- The PCR apparatus should cycle through the following temperatures - 95, 55, 72 degrees Celsius.
- The first PCR machines operated on the basis of heating with a thermal heating element, and cooling was carried out using a fan and air flow. PCR, especially for long DNA fragments, lasted 4-6 hours.
- **How to shorten the heating and cooling time?**
- As a solution to the problem, it is proposed to use the Peltier effect or the thermoelectric effect (Peltier effect). A Peltier element was installed in the PCR apparatus, which quickly heated and cooled the preparation. This made it possible to significantly shorten the process, and PCR lasted 0.5-1.5 hours, which also made a revolution, especially in molecular diagnostics, *e.g.* in determining the presence of corona virus.

Качество и концентрация ДНК и РНК

- Для проверки концентрации и качества ДНК и РНК использовали спектрофотометрию. Для этого нужно было использовать специальные кварцевые кюветы, которые пропускали и не преломляли ультрафиолет (230-320 nm). Каждая из которых стоила \$100. Это было очень дорого. Кроме того, чтобы заполнить кювету требовалось много дефицитного биоматериала. Как решить эту задачу?
- **Противоречие требований (ПТ).** Проверка концентрации и качества ДНК и РНК требует наличия дорогой кюветы и наличия большого количества биоматериала, что не всегда возможно при его дефиците. Т.е. противоречие между необходимостью *производить проверку и дороговизной кюветы, и количеством биоматериала.*
- **Идеальный конечный результат (ИКР).** Проверка производится, кювета дешевая и малые затраты биоматериала.
- **Противоречия свойства (ПС).** Чтобы произвести проверку нужно использовать большую, дорогую кювету и много биоматериала, а чтобы снизить расходы на проверку и снизить расход биоматериала, нужно иметь малую кювету и малое количество биоматериала.
- Разрешим ПС в **структуре**.
- **Решение.** Стали использовать кварцевые капилляры, которые стоили \$1.

Quality and concentration of DNA and RNA

- Spectrophotometry was used to check the concentration and quality of DNA and RNA. To do this, it was necessary to use special quartz cuvettes that let through and did not refract ultraviolet (230-320 nm). Each of which cost \$100. It was very expensive. In addition, a lot of scarce biomaterial was required to fill the cuvette. How to solve this problem?
- **Conflict of requirements (CT).** Checking the concentration and quality of DNA and RNA requires an expensive cuvette and a large amount of biomaterial, which is not always possible when there is a shortage of it. Those. the contradiction between the need *to check* and the *high cost of the cuvette*, and the *amount of biomaterial*.
- **Ideal final result (IFR).** The check is carried out, the cuvette is cheap and the biomaterial costs are low.
- **Property Contradictions (PC).** To test, you need to use a large, expensive cuvette and a lot of biomaterial, and to reduce the cost of testing and reduce the consumption of biomaterial, you need to have a small cuvette and a small amount of biomaterial.
- Resolving PC in the **structure**.
- **Solution.** They began using quartz capillaries, which cost \$1.

Качество и концентрация ДНК и РНК

- **Возникла новая задача.**
- Потребовалось много проверок и соответственно много кварцевых капилляров. Кроме того, на каждую проверку требовалось минимум 5 микролитров материала, что далеко не всегда было доступно.
- **Идеальный конечный результат (ИКР).** Не использовать кювету и капилляр. Биоматериал не тратится.
- **Решение.** Стали использовать технологию удерживания образца, который использует только поверхностное натяжение, чтобы удерживать образец на месте. Это устраняет необходимость в громоздких и дорогих кюветах. Образец объемом 1 мкл пипеткой наносят на конец оптоволоконного кабеля (принимающее волокно). Второй оптоволоконный кабель (волокно – источник) затем приводится в контакт с жидким образцом, в результате чего жидкость перекрывает зазор между оптоволоконными концами. Импульсная ксеноновая импульсная лампа служит источником света и спектрометр, использующий линейную ПЗС-матрицу (linear CCD array), используется для анализа света после прохождения через образец.

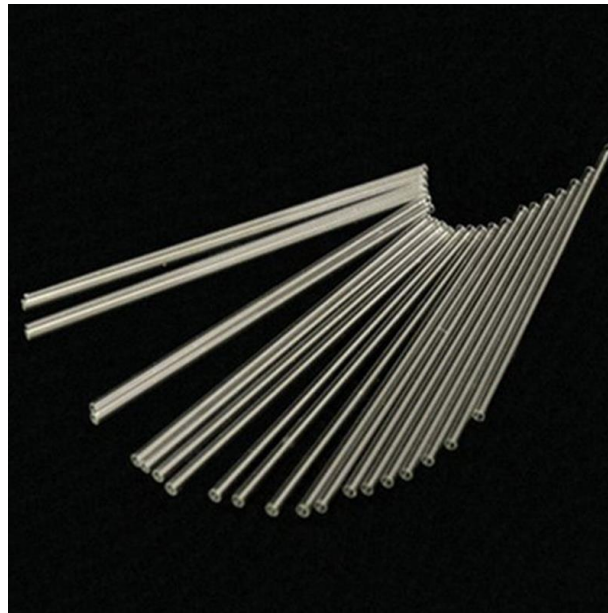
Quality and concentration of DNA and RNA

- **A new problem has arisen.**
- It took a lot of checks and, accordingly, a lot of quartz capillaries. In addition, each test required a minimum of 5 microliters of material, which sometimes was far from available.
- **Ideal final result (IFR).** Do not use cuvette or capillary. Biomaterial almost is not wasted.
- **Solution.** They began to use the technology of holding the sample, which uses only surface tension to hold the sample in place. This eliminates the need for bulky and expensive cuvettes. A 1 μ l sample is pipetted onto the end of the fiber optic cable (receiving fiber). The second fiber optic cable (source fiber) is then brought into contact with the liquid sample, causing the liquid to bridge the gap between the fiber ends. A flash xenon lamp serves as the light source and a spectrometer using a linear CCD array is used to analyze the light after passing through the sample.

Quartz Cuvette

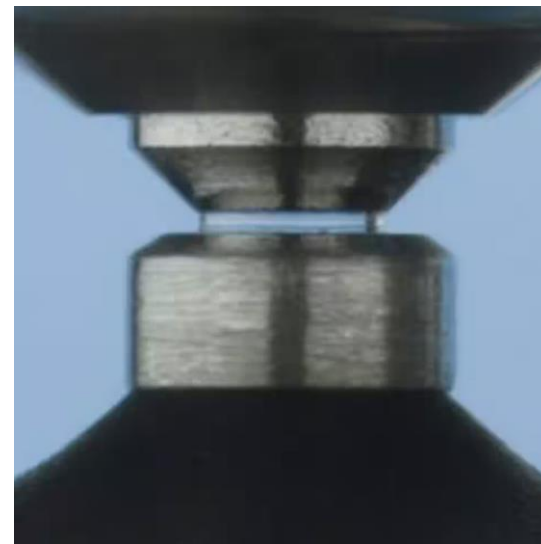
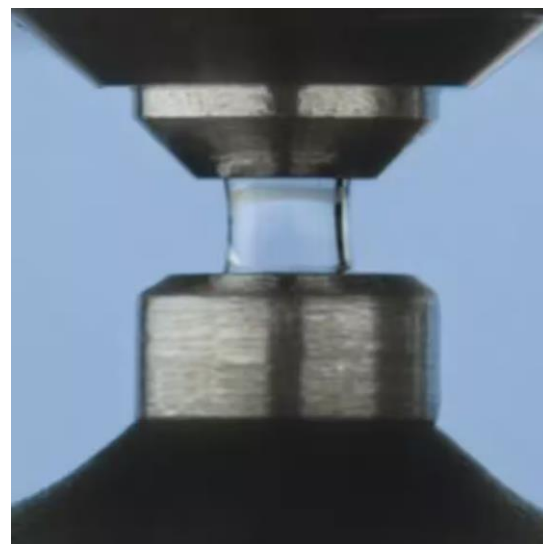
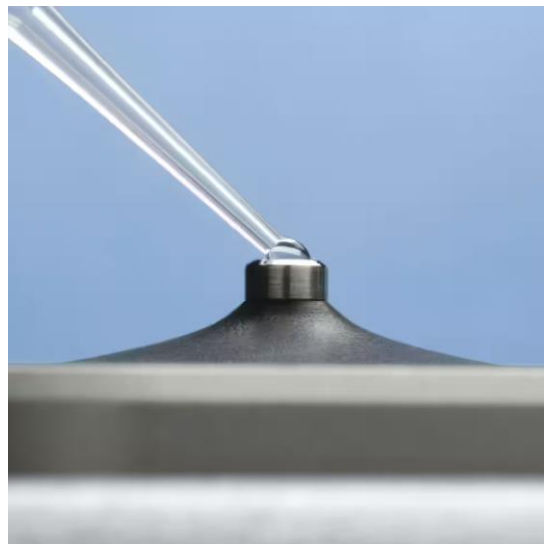
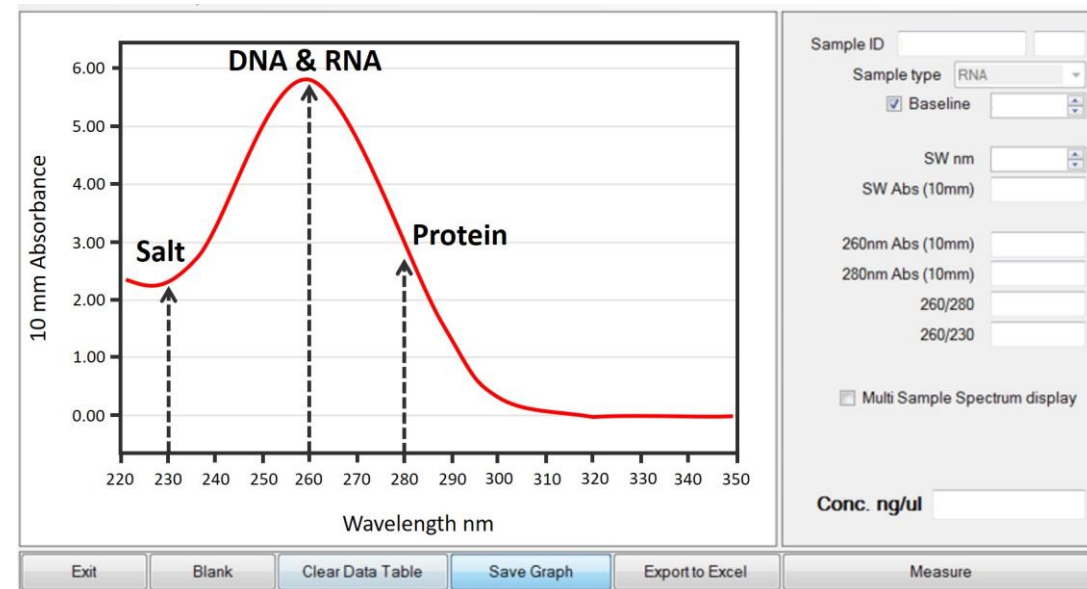


Quartz glass capillary tube



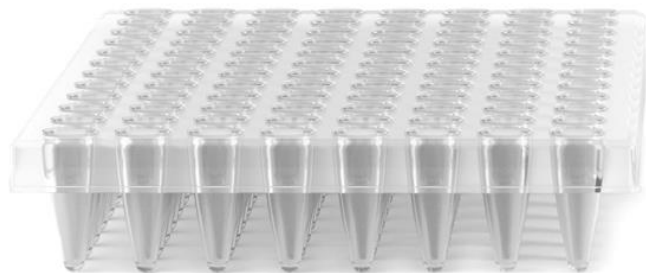
NanoDrop





Синтез ДНК на основе кремния

- Twist Bioscience разработала запатентованный процесс производства синтетической ДНК на основе полупроводников с **высокопроизводительной кремниевой платформой**, которая позволяет миниатюризировать химию, необходимую для синтеза ДНК.
- Эта миниатюризация позволяет нам уменьшить объемы реакции в 1 000 000 раз при одновременном увеличении пропускной способности в 1 000 раз, что позволяет синтезировать 9 600 генов на одном кремниевом чипе в полном масштабе. Традиционные методы синтеза производят один ген в том же физическом пространстве с использованием 96-луночной пластины.



ТРАДИЦИОННЫЕ
МЕТОДЫ
96 Олиго = 1 Ген

TRADITIONAL
METHODS
96 Oligos = 1 Gene

Silicon-powered DNA synthesis

- Twist Bioscience developed a proprietary semiconductor-based synthetic DNA manufacturing process featuring a high-throughput silicon platform that allows to miniaturize the chemistry necessary for DNA synthesis.
- This miniaturization allowed to reduce the reaction volumes by a factor of 1,000,000 while increasing throughput by a factor of 1,000, enabling the synthesis of 9,600 genes on a single silicon chip at full scale. Traditional synthesis methods produce a single gene in the same physical space using a 96-well plate.



КРЕМНИЕВАЯ ПЛАТФОРМА
> 1 миллион олиго = 9 600
генов

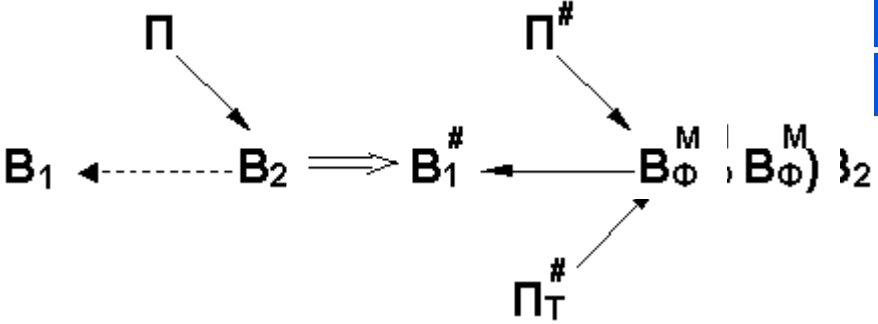
SILICON PLATFORM
> 1 Million Oligos = 9,600
Genes

NADPH oxidase

- есть фермент NADPH Oxidase. Его основная функция это делать свободные радикалы которые убивают вирусы и бактерии и грибки, которых проглотили клетки крови или лёгких под названием фагоциты. Считается, что свободные радикалы и оксиданты повреждают ДНК, вызывая **рак и старение**. Поэтому очень важна сбалансированная регуляция этого процесса. Фабрика производства радикалов состоит из двух белков gp91^{phox} и p22^{phox} и сидят в ней мембране. Чтобы их активировать они должны соединиться с белком p67^{phox}, который соединяется с разными доменами в белках p40^{phox}, p47^{phox} and Rac1. Последний- Rac1, "активирует активатор" p67^{phox}, и ведёт его к мембране. Чтобы Rac1 не включал систему, его сдерживает белок Rho -GDI и лично активирует белок GEF. Что я сделал- я убрал белки RHO-GDI, и GEF используя всегда-активированный- мутант Rac1, и построил гибридный белок содержащий Rac1 и только небольшие части (меньше половины) белков p67 и p47, ответственные за активацию оксидазы и производства из кислорода свободных радикалов. То есть я полностью убрал 4 белка из системы, а два других уменьшил до минимума. Этот химерный и гибридный белок мы назвали Тримера (так как состоит из трех частей) и он был достаточен для производства радикалов. Это стало хорошим и удобным инструментом в изучении оксидазы так как недостаток её активности ведёт к тяжёлому заболеванию - CGD, где человек все время болеет инфекционными болезнями. Некоторые лаборатории стали пробовать сделать структуру оксидазы в комплексе с нашей Тримерой, чтобы найти механизмы его работы для поиска лекарств. Но! оказалось, что свободные радикалы нужны не только чтобы убивать микробов, но и чтобы регулировать кровяное давление, слух, равновесие и так далее. И теперь мою Тримеру используют в поисках ингибиторов оксидазы, которые потом можно будет использовать в качестве лекарств.

NADPH oxidase

There is an enzyme NADPH Oxidase. Its main function is to make free radicals that kill viruses and bacteria and fungi that have been ingested by blood or lung cells called phagocytes. Free radicals and oxidants are believed to damage DNA, causing **cancer and aging**. Therefore, a balanced regulation of this process is very important. The radical production factory consists of two proteins gp91^{phox} and p22^{phox} and sit in their membrane. To activate them, they must bind to the p67^{phox} protein, which binds to different domains in the p40^{phox}, p47^{phox} and Rac1 proteins. The last one, Rac1, "activates the activator" p67^{phox} and leads it to the membrane. To prevent Rac1 from turning on the system, it is restrained by the Rho-GDI protein and personally activated by the GEF protein. What I did was I removed the RHO-GDI and GEF proteins by using an always-activated Rac1 mutant, and built a fusion protein containing Rac1 and only small parts (less than half) of the p67 and p47 proteins responsible for oxidase activation and production of free radicals from oxygen. That is, I completely removed 4 proteins from the system, and reduced the other two to a minimum. We called this chimeric and hybrid protein Trimer (because it consists of three parts) and it was sufficient for the production of radicals. It has become a good and convenient tool in the study of oxidase, since the lack of its activity leads to a serious disease - CGD, where a person is constantly sick with infectious diseases. Some laboratories began to try to make the structure of oxidase in combination with our Trimer in order to find the mechanisms of its work for drug discovery. But! it turned out that free radicals are needed not only to kill germs, but also to regulate blood pressure, hearing, balance, and so on. And now Trimer is being used in the search for oxidase inhibitors, which can then be used as drugs.



ть” фермент

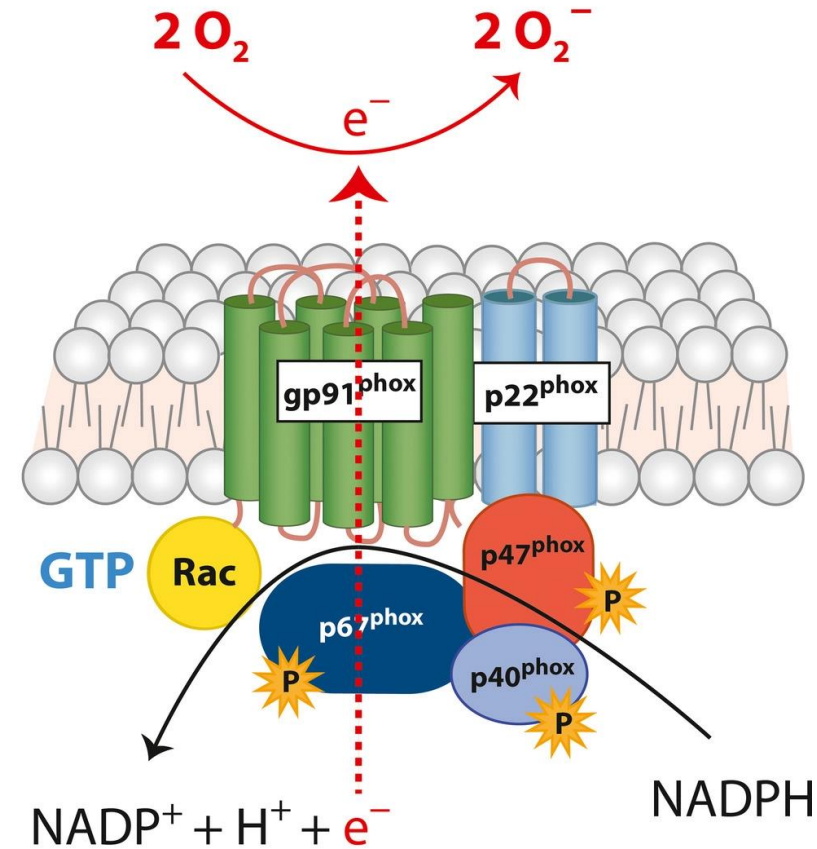
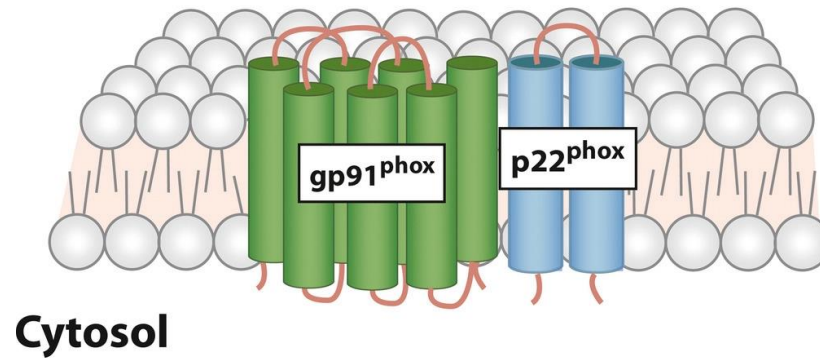
NADPH oxidase – “to live or not to live” enzyme

Inactive NADPH oxidase

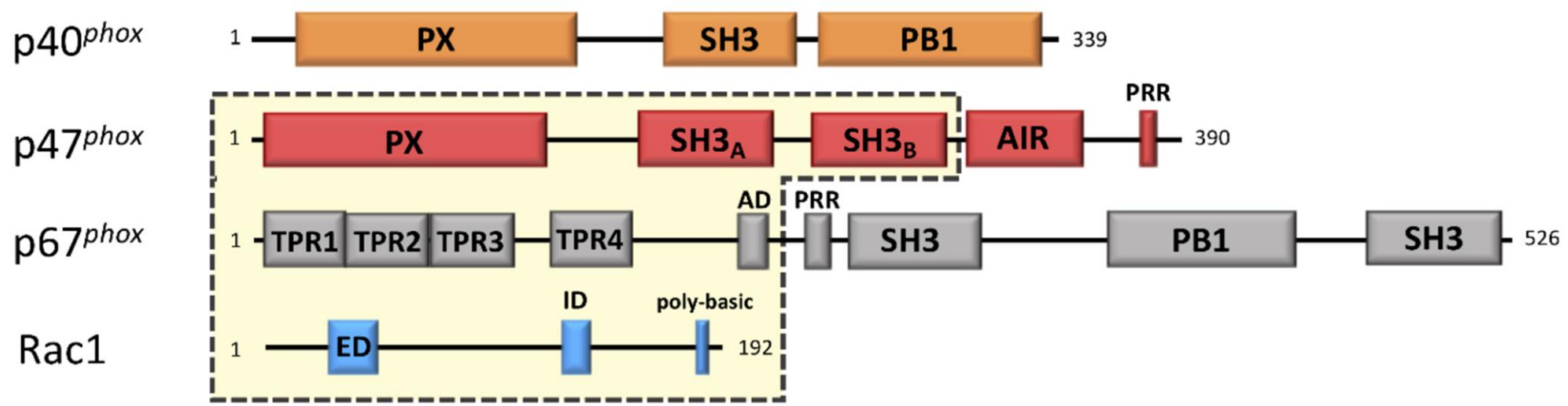
Active NADPH oxidase

быть повышена **системным переходом 2:**
с макроуровня на микроуровень, когда систему или ее часть заменяют веществом, способным при взаимодействии с полем выполнять требуемое действие.

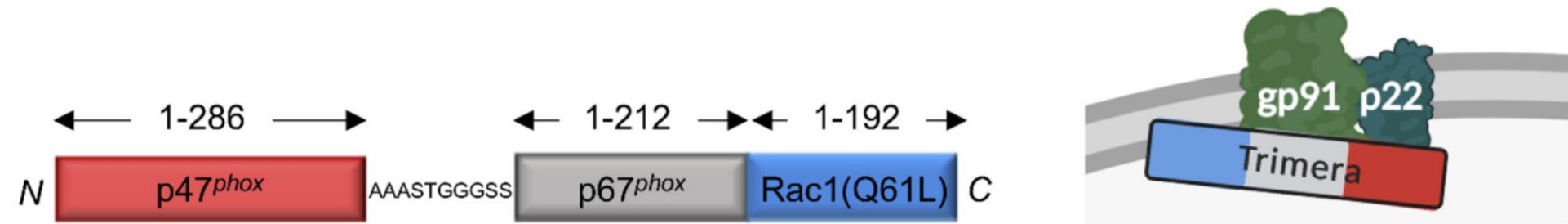
The efficiency of the system - at any stage of development - can be increased by **system transition 2:** from the macro level to the micro level, when the system or part of it is replaced by a substance capable of performing the required action when interacting with the field.



A

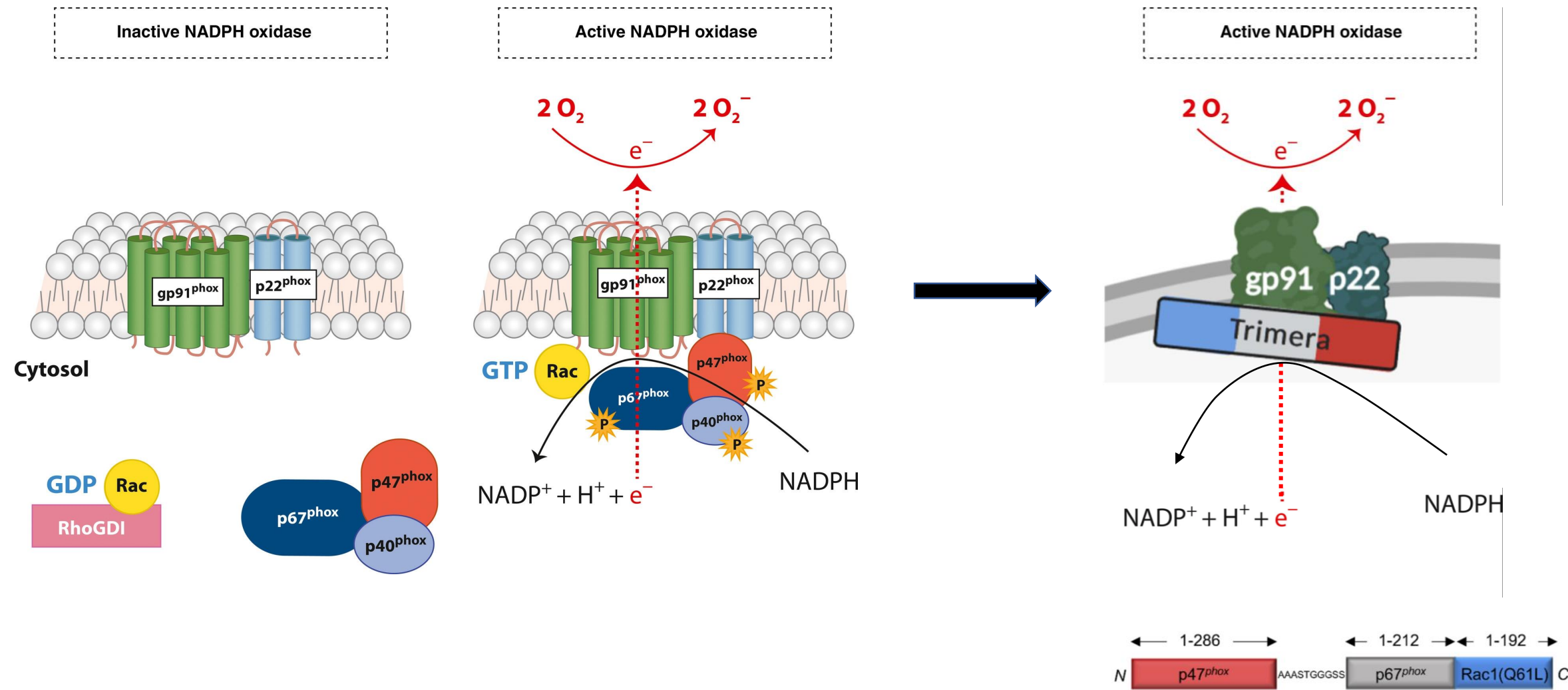


B



НАДФН-оксидаза – “жить или не жить” фермент

NADPH oxidase – “to live or not to live” enzyme



Выводы

- В работе была показана возможность использования инструментов ТРИЗ для решения задач при биомедицинских исследованиях.
- Такой подход позволяет не только значительно сократить время на решение задач при биомедицинских исследованиях, но и получить качественно новые результаты и прогнозировать новые пути биомедицинских исследований.
- Авторы хотят привлечь внимание специалистов в биомедицинских исследованиях и специалистов ТРИЗ к дальнейшим исследованиям в данной области.

Conclusion

- This work shows the possibility of using TRIZ tools for solving problems in biomedical research.
- This approach allows not only to significantly reduce the time for solving problems in biomedical research, but also to obtain qualitatively new results and predict new ways of biomedical research.
- The authors want to draw the attention of experts in biomedical research and TRIZ experts to further research in this area.