

3. Nakamura S., Mashino T. Water-soluble fullerene derivatives for drug discovery, *J Nippon Med Sch.*, 2012, vol. 79, pp. 248-254.
4. Bullard-Dillard R., Creek K.E., Scrivens W.A., Tour J.M., Tissue sites of uptake of <sup>14</sup>C labelled C60. *Bioorg. Chem.*, 1996, vol. 24, no. 4, pp. 376-385.
5. Rouse J.G., Yang J., Barron A.R., Monteiro-Riviere N.A. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. In Vitro*, 2006, vol. 20, no. 8, pp. 1313-1320.
6. Sayes C.M., Marchione, A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett.*, 2007, vol. 7, no. 8, pp. 2399-2406.
7. Vistica D.T., Skehan P., Scudiero D., Monks A., Pittman A., Boyd M.R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, pp. 2515-2520.
8. Holder A.L., Goth-Goldstein R., Lucas D., Koshland C.P. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chem Res Toxicol*, 2012, vol. 17, pp. 1885-1892.
9. Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Zhang L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, vol. 234, pp. 222-235.
10. Moore J.O., Palep S.R., Saladi R.N., Gao D., Wang Y., Phelps R.G., Lebowitz M.G., Wei H. Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin. *Photochem Photobiol*, 2004, vol. 80, pp. 587-595.
11. Shivji K.K., Kenny M.K., Wood R.D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 1992, vol. 69, pp. 367-374.
12. Löbrich M., Shibata A., Beucher A., Fisher A., Ensminger M., Goodarzi A.A., Barton O., Jeggo P.A. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA doublestrand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 2010, vol. 9, pp. 662-669.

#### КОНЦЕПЦИЯ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ НАНОСТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ПАНЦИРЯ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ (BACILLARIOPHYTA) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДА

Шевченко О.Г.<sup>1,2</sup>, Романова Д.Ю.<sup>3</sup>, Карпенко А.А.<sup>2</sup>, Пономарева А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН  
ул. Пальчевского, 17, г. Владивосток, 690041, РФ

<sup>2</sup>Научно-образовательный комплекс «Приморский океанариум» ДВО РАН  
о-в Русский, г. Владивосток, 690922, РФ

<sup>3</sup>ФГБУН «Карадагская научная станция им. Т.И.Вяземского – природный заповедник РАН»  
ул. Науки, 24, пгт. Курортное, г. Феодосия, 298188, РФ

e-mail: 713553@mail.ru

**Аннотация.** С применением методов электронной микроскопии и рамановской спектроскопии проведено исследование тонкой структуры панциря морской планктонной диатомовой водоросли *Skeletonema* sp. (Bacillariophyta), лабораторный клон Sk021002. В работе были использованы современные методы идентификации вида. При помощи сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии показано, что структуры панциря – створка, краевые выросты и поясok различаются по морфологическим признакам. Впервые с помощью метода Рамановской спектроскопии получены данные диатомовой водоросли рода *Skeletonema*. Выявлены различия в раман-спектрограммах органической оболочки и кремниевого панциря клона Sk021002. Применение метода Рамановской спектроскопии дает обширные, уникальные сведения по наноструктурным характеристикам различных элементов панциря диатомей. Изучение биологических объектов с помощью метода Рамановской спектроскопии не инвазивное, что является важным моментом для фундаментальных биофизических исследований.

**Ключевые слова:** идентификация, створка, Рамановская спектроскопия, наноструктурные характеристики.

**CONCEPT AND METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE STUDY OF THE PROPERTIES OF NANOSTRUCTURED FRUSTULE OF DIATOMS (BACILLARIOPHYTA) TO IDENTIFY THE SPECIES**Shevchenko O.G.<sup>1,2</sup>, Romanova D.Y.<sup>3</sup>, Karpenko A.A.<sup>2</sup>, Ponomareva A.A.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences  
*Palchevskogo Str., 17, Vladivostok, 690041, Russia*<sup>2</sup> Research and Education Center "Primorsky Aquarium", Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences  
*Russky Island, Vladivostok, 690041, Russia*<sup>3</sup> T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the RAS*Nauki Str., 24, Kurortnoe, Feodosiya, 298188, Russia**e-mail: 713553@mail.ru*

**Abstract.** The fine structure of marine planktonic diatom frustule *Skeletonema* sp. (Bacillariophyta), laboratory clone Sk021002, was studied using methods of electron microscopy and Raman spectroscopy. At the present work we were used the current methods of identification of the species. Using scanning and transmission electron microscopy showed that the structure of the shell – valve, marginal process and girdle bands were morphologically differ. The first time had been obtained by the method of Raman spectroscopy data of diatoms of the genus *Skeletonema*. The differences were found in the SERS spectra for organic casing and silicon frustule of clone Sk021002. Application of method by Raman spectroscopy provides extensive and unique information on the nanocharacteristics of the various elements of diatoms frustule. The study of biological objects by method of Raman spectroscopy is non-invasive, this is important moment for fundamental biophysical research.

**Key words:** identification, frustule, Raman spectroscopy, nanocharacteristics.

Диатомовые водоросли – одноклеточные либо колониальные формы, имеющие уникальный своеобразный панцирь, по форме, структуре и характеру орнаментации которого проводят видовую идентификацию [9]. Главной особенностью является тот факт, что на 95.6 % цитоскелет состоит из наночастиц кремния, организованных в четко заданной структуре, благодаря молекулярным белкам – силаффинам, в процессе морфогенеза. Панцирь каждой диатомовой водоросли состоит двух створок – эпитеки и гипотеки, каждая из которых содержит морфологические признаки вида. Разнообразие узоров кремниевого скелета створок чрезвычайно велико, однако воспроизведение структурных элементов, подобных тем, из которых состоят створки диатомовых водорослей в настоящее время технически недостижимо и также является перспективным направлением исследований наноматериалов и биотехнологий [7, 8].

Методы изучения морфологии тонкой структуры панциря диатомей с развитием технологий претерпевают изменения. Если еще недавно достаточно было фотографий световой микроскопии, то в настоящее время для полной идентификации вида, а также для изучения жизненных циклов микроводорослей, применяют методы сканирующей электронной микрофотографии, трансмиссионной электронной микрофотографии, молекулярно-генетического анализа. Новшеством является использование спектроскопии Рамана для получения индивидуального спектрального отпечатка, уникального по отношению к рассматриваемой молекулярной структуре изучаемого объекта; использование метода возможно для идентификации видов диатомовых водорослей в качестве дополнительного признака к традиционным морфологическим параметрам. Применение электронной микроскопии для исследования структуры клетки диатомовой водоросли позволяет разглядеть рельеф поверхности элементов панциря (сканирующая электронная микроскопия) и тонкую структуру строения панциря (трансмиссионная электронная микроскопия); методика подготовки клеток к таким исследованиям включает удаление покровов клетки, морфологические исследования строятся исключительно на форме узоров кремниевого скелета. Применение спектроскопии Рамана позволяет изучать клетку без предварительной подготовки, изучить химический состав ее оболочек и скелета [1].

Цель работы – изучить морфологические и наномеханические параметры структуры створки диатомей с помощью современных методов исследования.

**Материал и методы.** Исследования проводили на лабораторном клоне планктонной диатомовой водоросли рода *Skeletonema* Sk021002 из коллекции ИБМ ДВО РАН. Клетки изучали с применением световой микроскопии (СМ), электронной микроскопии – сканирующей (СЭМ) и трансмиссионной (ТЭМ) и Рамановской спектроскопии.

Для СЭМ материал промывали дистиллированной водой, затем обезвоживали в этиловом спирте, выдерживая в разведениях 25, 50, 75 и 100 % по 30 мин. Пробу на нуклеопоровом фильтре помещали на предметный столик и высушивали на воздухе. Поверхность образцов напыляли золотом в вакуумном посту Edwards, AUTO 306 (United Kingdom) и просматривали в SEM Carl Zeiss EVO 40 (Germany). При подготовке материала для ТЭМ применяли кипячение колоний в серной кислоте в течение 1-2 мин согласно методике [3]. Образцы 5-7 раз отмывали дистиллированной водой, затем каплю пробы наносили на бленды, покрытые формваром, высушивали на воздухе и исследовали в ТЭМ Zeiss LIBRA 200 (Germany).

Рамановские спектры (спектры комбинационного рассеяния) получали с помощью рамановского микроскопа-спектрометра (in Via Reflex, Renishaw, UK) объединённого с микроскопом падающего света (Leica DM2500M, Leica-microsystems, Germany). Для возбуждения использовали диодный лазер 532 нм при 5.0 мВт мощности на уровне объекта и времени экспозиции 0.3 сек. Лазерное пятно диаметром около 1.6 мкм на

образце формировалось объективом (50x, NA = 0.6, Leica).

**Результаты и обсуждение.** Описание морфологических структур панциря диатомовой водоросли, клон Sk021002 по данным ТЭМ и СЭМ (см. рис. 1). Створки Sk021002 от плоских до слегка выпуклых, кремниевый скелет состоит из двух слоев. Внешний слой – крибеллум представлен отчетливой сетью крупных ареол, 35-45 в 10 мкм, расположенных в радиальных рядах дихотомически разветвляющихся к краю створки. Форамены ареол преимущественно четырехугольной формы, к краю створки более крупные округлой формы. Внутренний слой – крибрум состоит из рядов многочисленных мелких пор. Краевые выросты, длинные, прямые от 19 до 26 на каждой створке; структура краевых выростов гладкая, поры отсутствуют. Поясок с многочисленными соединительными ободками. Структура соединительных ободков представлена мелкими порами, собранными в прямые вертикальные ряды, 14 в 1 мкм.

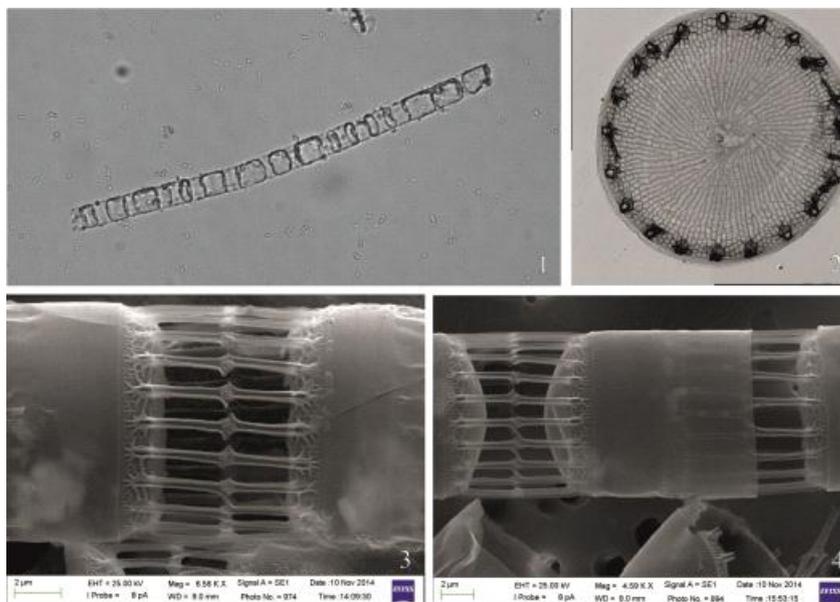


Рисунок 1 – Строение панциря Sk021002 по данным электронной микроскопии: 1 – общий вид колонии (СЭМ), 2 – наружная поверхность створки (ТЭМ), 3 – соединение соседних клеток в колонию при помощи краевых выростов (СЭМ), 4 – фрагмент колонии, клетка частично закрыта пояском (СЭМ)

Метод рамановской спектроскопии в области спектра для длины волны 532 нм показал, что данный участок несёт значительную информацию о химическом составе исследуемых клеток клоновой линии Sk021002. Полученные спектрограммы являются своего рода молекулярным паспортом клона Sk021002 (см. табл. 1).

Таблица 1 – Положение полос Рамановского спектра створки и оболочки *Skeletonema* sp. клон Sk021002

створка	115	476	560	784	1010	1050	1095	1457	1554	1666					
оболочка	123	433	475	551	631	714	784	959	1009	1049	1127	1323	1449	1597	1711

Анализ модельных данных позволяет выделить наиболее характерные пики рамановского смещения для створки (115, 560, 1010, 1050, 1095  $\text{см}^{-1}$ ), а также непосредственно для оболочки исследуемой клетки (123, 1009, 1049  $\text{см}^{-1}$ ). Известно, что полосы в диапазоне 800-1200  $\text{см}^{-1}$  принято ассоциировать с колебательными степенями свободы (изменениями длины связи Si-O) тетраэдральной ячейки кремнекислородного каркаса [5].

В колебательных спектрах диагностика исследуемого образца, проводится по наиболее интенсивным пиковым значениям, например, соли кремниевой кислоты могут давать полосы вблизи частот 850, 900 в диапазонах 950...1000 и 1050...1100  $\text{см}^{-1}$ ; указанные частоты ассоциированы с орто- ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ), пиро- ( $\text{Si}_2\text{O}_7^{6-}$ ), мета- ( $\text{SiO}_3^{2-}$ ) и дисиликатами ( $\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$ ) соответственно [2]. Таким образом, мы наблюдаем, что в исследуемых образцах в КР спектре наиболее интенсивно колебание пиковых значений, соответствующее соединениям кремния. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что створка на 95,6 % состоит из соединений Si [6].

Как видно из рисунка 2, расположение спектральных пиков для створки и оболочки различаются между собой. Для спектрограммы органической оболочки кроме выраженного диапазона присутствия соединений кремния, также характерны полосы пиковых значений 1323  $\text{см}^{-1}$  – информирует о наличии липидов, а полоса 1449  $\text{см}^{-1}$  – соответствует уширению линий колебательных уровней  $\delta(\text{CH}_2)(\text{CH}_3)$  в протеинах и липидах, входящих в состав исследуемого объекта [11]. Так же присутствуют амидные полосы – амид 1 расположена вблизи волнового числа 1597  $\text{см}^{-1}$ . Одновременно наблюдаем незначительно выраженный пик значений в

области  $1711\text{ см}^{-1}$ , отвечающих валентным колебаниям CO, связано с образованием карбонилсодержащих соединений. КР спектры были определены согласно [4].

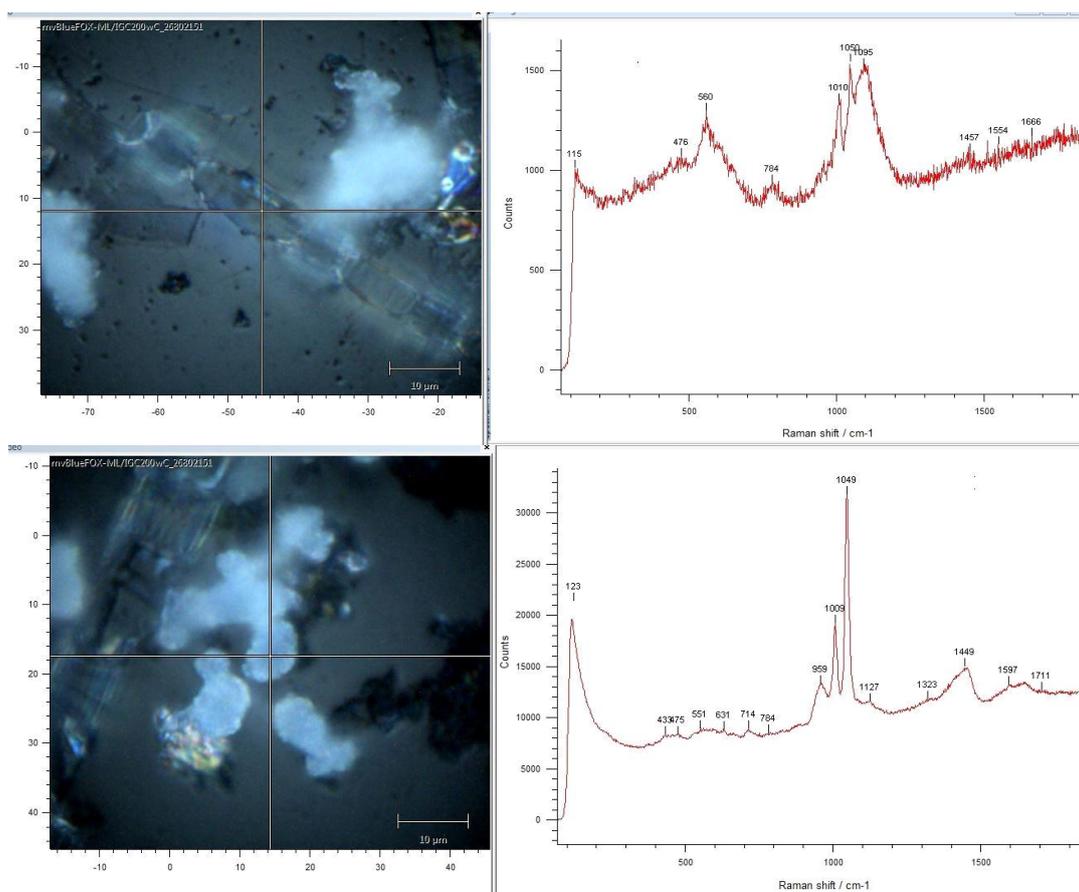


Рисунок 2 – Рамановские спектры клона Sk021002: 1 – кремниевого скелета, 2 – органической оболочки. Изображения в падающем свете. Перекрестие линий на фотографиях – точки анализа

Наиболее информативным для изучения вопросов структурного состояния является диапазон волновых чисел  $475\text{--}1100\text{ см}^{-1}$  КР-спектра, в котором наблюдаются интенсивные пиковые значения. Этот диапазон может являться модельным для дальнейших исследований наноструктурных свойств панциря диатомовых водорослей.

В результате работы показано, что основные диагностические признаки, исследованные с помощью электронной микроскопии, соответствуют приводимым в литературе для представителей рода *Skeletonema* [10]. Однако применение этих методов оказалось недостаточным для видовой идентификации. Впервые применен метод Рамановской спектроскопии для изучения панциря диатомовых водорослей рода *Skeletonema*. Синтез современных методик исследования диатомовых водорослей добавляет новые диагностические характеристики, что позволяет качественно улучшить видовую идентификацию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-04838.

#### Список литературы / References:

1. Barletta R.E., Krause J.W., Goodie T., Sabae H.E. The direct measurement of intracellular pigments in phytoplankton using resonance Raman spectroscopy. *Marine Chemistry*, 2015, vol. 176, pp. 164-173.
2. Griffith W.P. Advances in the Raman and infrared spectroscopy of minerals. *Spectroscopy of inorganic – based materials*. Eds R.J.H. Clark and R.E.Hester. John Wiley & Sons Ltd Press, 1987, pp. 119-186.
3. Hasle G.R., Fryxell G.A. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1970, vol. 89, pp. 469-474.
4. John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto and Chris W. Brown. *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, Amsterdam, Second Edition, 2003, 434 p.
5. Королев Е.В., Смирнов В.А., Земляков А.Н. Идентификация новообразований, обусловленных щелочесиликатной реакцией. *Вестник МГСУ. Научно-технический журнал*, 2013, т. 6, с. 109-116. [Korolev E.V., Smirnov V.A., Zemlyakov A.N. Identification of Alkali-silica Reaction Outcomes. *Vestnik MGSU. Proceedings of Moscow State University of Civil Engineering*, 2013, vol. 6, pp. 109-116. (In Rus.)]
6. Lee R.E. *Phycology*, 4th edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008, 547 p.
7. Lošić D., Short K., Mitchell J.G., Lal R., Voelcker N.H. AFM nanoindentations of diatom biosilica surfaces.

*Langmuir*, 2007, vol. 23, pp. 5014-5021.

8. Pletikapić G., Berquand A., Radić T.M., Svetličić V. Quantitative nanomechanical mapping of marine Diatom in seawater using peak force tapping Atomic Force Microscopy. *J. Phycol.*, 2012, vol. 48, pp. 174-185.

9. Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. *The Diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge, 1990, 747 p.

10. Sarno D., Kooistra W.H.C.F., Medlin L.K., Percopo I., Zingone A. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae): II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J. Phycol.*, 2005, vol. 41, pp. 151-176.

11. Захаров В.П., Ларин К., Братченко И.А. Повышение информативности оптической когерентной томографии при диагностировании кожных патологий. *Вестник Самарского государственного аэрокосмического университета*, 2011, т. 2, с. 232-239. [Zaharov V.P., Larin K., Bratchenko I.A. Increasing the information content of optical coherence tomography skin pathology detection. *Vestnik STAU*, 2011, vol. 2, pp. 232-239. (In Rus.)]

#### АКТИВАЦИЯ НАНОКОМПОЗИТНЫХ ЛИПОСОМ ИМПУЛЬСНЫМ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ

Потапенков К.В.<sup>1</sup>, Ким В.П.<sup>1</sup>, Ярославов А.А.<sup>1</sup>, Сыбачин А.В.<sup>1</sup>,  
Таранов И.В.<sup>2</sup>, Черепенин В.А.<sup>2</sup>, Гуляев Ю.В.<sup>2</sup>, Хомутов Г.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
*Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ*

<sup>2</sup>Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН  
*ул. Моховая, 11, стр.7, г. Москва, 125009, РФ*  
*e-mail: metalsonic@inbox.ru*

**Аннотация.** В настоящей статье представлены результаты работ по созданию и характеристике новых нанокomпозитных биомиметических биосовместимых мембранных везикул, образованных молекулами фосфолипидов, полимеров и включающих в свой состав функциональные неорганические наночастицы золота или магнетита. Также представлены результаты экспериментов по воздействию на суспензию таких везикул импульсного электрического поля напряженностью от  $5 \times 10^5$  до  $15 \times 10^6$  В/м. Установлено, что такое воздействие приводило к активации везикул, при которой происходили структурные изменения мембран и выход содержимого везикул наружу. Полученные результаты указывают на возможности использования таких везикул для создания эффективных средств капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения лекарственных и биологически активных веществ.

**Ключевые слова:** липосомы, наночастицы, капсулирование, активация, импульсное электрическое поле.

#### ACTIVATION OF NANOCOMPOSITE LIPOSOMES BY PULSED ELECTRIC FIELD

Potapenkov K.V.<sup>1</sup>, Kim V.P.<sup>1</sup>, Yaroslavov A.A.<sup>1</sup>, Sybachin A.V.<sup>1</sup>,  
Taranov I.V.<sup>2</sup>, Cherepenin V.A.<sup>2</sup>, Gulyaev Y.V.<sup>2</sup>, Khomutov G.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University

*Leninskie gory, 1, build. 2, Moscow, 119991, Russia*

<sup>2</sup>Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences  
*Mokhovaya str., 11, build. 7, Moscow, 125009, Russia*  
*e-mail: metalsonic@inbox.ru*

**Abstract.** In this article we present results of the work for creating and characterization of novel nanocomposite biomimetic and biocompatible vesicles based on phospholipids, polymers and functional inorganic gold or magnetite nanoparticles. The effect of pulsed electric field with magnitude from  $5 \times 10^5$  to  $15 \times 10^6$  Volts per meter on the aqueous suspension of vesicles have been studied. It was shown that such electric pulses caused activation of the vesicles accompanied by structural changes of membranes and resulted in release of the vesicle contents out. The data obtained point to the possibility for use of such nanocomposite vesicles for development of new effective means for capsulating, targeted delivery and controlled release of medical and bio-active compounds.

**Key words:** liposomes, nanoparticles, capsulation, activation, pulsed electric field.

Проблема создания безопасных и эффективных средств капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения биологически активных и лекарственных веществ является одной из важнейших среди проблем, в настоящее время стоящих перед биофизикой и смежными областями науки. Решение этой проблемы обеспечит прорыв в методах лекарственной терапии и дальнейший прогресс в биомедицинских, косметологических и сельскохозяйственных технологиях. В настоящее время разрабатываются и исследуются различные подходы к капсулированию и управляемому высвобождению веществ. В качестве средств капсулирования используются различные органические, композитные и неорганические структуры, в том числе, полимерные гели и капсулы, дендримеры, мицеллы, липосомы и конструкции на их основе [1-4]. В качестве внешних воздействий на капсулы используют химические и физические воздействия, как то: температурная активация [5,6], ферментативное разрушение носителей [7,8], ультразвуковое воздействие [9],