

Эксперименты с клеточными культурами выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-73-10417.

Список литературы / References:

1. Butler T.J., Jackson R.W., Robson J.Y., Owen R.J., Delves H.T., et al. In vivo degradation of tungsten embolisation coils. *Br J Radiol.*, 2000, vol. 73, pp. 601-603.
2. Peuster M., Kaese V., Wuensch G., Wuebbolt P., Niemeyer M., et al. Dissolution of tungsten coils leads to device failure after transcatheter embolisation of pathologic vessels. *Heart*, 2001, vol. 85, pp. 703-704.
3. Hierholzer J., Depriester C., Fuchs H., Venz S., Maier-Hauff K., et al. *Rofo-Fortschr. Rontg*, 2002, vol. 174, pp. 328-334.
4. Firouzi M., Poursalehi R., Delavari H., Saba F., & Oghabian M. A. Chitosan coated tungsten trioxide nanoparticles as a contrast agent for X-ray computed tomography. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 98, pp. 479-485.
5. Guandalini G.S., Zhang L., Fornero E., Centeno J.A., Mokashi V.P., et al. Tissue distribution of tungsten in mice following oral exposure to sodium tungstate. *Chem Res Toxicol*, 2011, vol. 24, pp. 488-493.
6. Witten M.L., Sheppard P.R., Witten B.L. Tungsten toxicity. *Chem-Biol Interact*, 2012, vol. 196, pp. 87-88.

НАНОСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРЕМНИЕВОГО ЭКЗОСКЕЛЕТА *PSAMMODICTYON PANDURIFORME* VAR. *CONTINUA* (BACILLARIOPHYTA)

Романова Д.Ю.¹, Шевченко О.Г.², Карпенко А.А.², Пономарева А.А.², Шульгина М.А.²
¹ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН,
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ
²ФГБУН Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН,
ул. Пальчевского, 17, г. Владивосток, 690041, РФ
e-mail: driaromanova@yandex.ru

Аннотация. В работе изучены молекулярные и наномеханические свойства панциря глубоководной бентосной диатомеи *Psammodictyon panduriforme* var. *continua*. Исследование основано на интерпретации данных Рамановской спектроскопии и атомно-силовой микроскопии. Рассмотрен подход к пониманию роли кремниевого экзоскелета в физиологии клетки. Важное значение имеет формирование целостной картины для объекта исследования. Диатомовые водоросли являются перспективными модельными объектами, как для фундаментальных исследований, так и для прикладных целей биотехнологии.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, кремниевый панцирь, Рамановская спектроскопия, атомно-силовая микроскопия, наноструктурные характеристики.

NANOSTRUCTURED FEATURES OF SILICEOUS EXOSKELETON OF *PSAMMODICTYON PANDURIFORME* VAR. *CONTINUA* (BACILLARIOPHYTA)

Romanova D.Y.¹, Shevchenko O.G.², Karpenko A.A.², Ponomareva A.A.², Shulgina M.A.²
¹Kovalevsky Institute of marine biological research RAS
Nahimov ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia
²National Scientific Center of Marine Biology Far East Branch RAS,
ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia
e-mail: driaromanova@yandex.ru

Abstract. The molecular and nanomechanical properties of the deep-sea benthic diatoms *Psammodictyon panduriforme* var. *continua* were studied. The study is based on the interpretation of Raman spectroscopy and atomic force microscopy data. The approach to understanding the role of the siliceous exoskeleton in the physiology of the cell is considered. It is important to form an integral picture for the object of research. Diatoms are promising model objects, both for basic research and for applied biotechnology applications.

Key words: diatoms, silicon frustule, Raman spectroscopy, Atomic Force Microscopy, nanocharacteristics.

Диатомовые водоросли – уникальные объекты, представители кремниевой жизни в Мировом океане. Соединений кремния в составе их неорганического панциря варьирует от 80 до 95,6% [1, 2]. Осаждение молекул Si контролируется особым классом видоспецифических молекулярных белков – силаффинов [3], что соответствует огромному разнообразию форм архитектуры клеток данного таксона [4]. Находясь в условиях постоянного давления воды [5], панцири диатомовых водорослей должны быть достаточно упругими. Кроме того, неорганический каркас клетки должен выдерживать процесс фильтрации воды для обеспечения жизнеспособности микроорганизма. Данные о физиологических особенностях клеток эукариот важны для понимания базовых принципов биоразнообразия.

Новым и достаточно эффективным методом для анализа и идентификации видов становится применение Рамановской спектроскопии [6-8]. Данные спектрограмм являются уникальными для каждого микроорганизма и несут большую информативность по отношению к молекулярной структуре исследуемой поверхности клетки.

Другой не менее информативный метод – атомно-силовая микроскопия (АСМ). Суть метода заключается в картировании с высоким разрешением поверхности образца. Полученные данные помогают отметить особенности структуры поверхности панциря микроводоросли. По данным литературы известно, что с помощью метода АСМ исследовали морфологию клеток [9], особенности производства внутриклеточных полисахаридов [10], жесткость панциря [11] диатомовых водорослей.

Применение комплекса методов дает возможность разностороннего подхода к решению научных задач. Новые методы исследований позволяют расширить пул данных об объекте и, соответственно, открывают новые подходы в решении прикладных задач. И именно изучение наноструктурных морфологических характеристики диатомей могут помочь в решении многих биотехнологических задач. Так в лабораторных условиях изучают возможности кремниевых панцирей как материала для составления композитных комплексов в материаловедении [12], исследуют архитектуру порового аппарата с целью описания мезопоровой структуры пор, как модели для разработок оптоэлектроники [13].

Целью нашей работы – изучить наноструктурные свойства кремниевого экзоскелета бентосного вида *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua* с помощью Рамановской спектроскопии и атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы. Для проведения исследований была выбрана культура клеток бентосной диатомовой водоросли *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua*. Штамм содержится в коллекции Отдела экологии бентоса (ИМБИ РАН, г. Севастополь).

Таблица 1. Характеристика лабораторного штамма PP60427F

Список видов	Код штамма	Дата сбора	Координаты сбора	Глубина сбора, м
<i>Psammodyctyon panduriforme</i> var. <i>continua</i> (Grunow) Snoeijis	1PP60427F	01–02.2016	44°53'07" N	46
	2PP60427F		35°13'09" E	

Эксперимент проводили с использованием клоновой культуры в экспоненциальной фазе роста. Особенности методики подготовки панцирей бентосных диатомовых водорослей представлены ниже. 10 мл культуры выдерживали в дистиллированной воде три раза, каждый раз на период 24 ч. Затем к суспензии клеток добавляли равный объем 35 % раствора перекиси водорода; пробу выдерживали 2 ч. Дальнейшее удаление органики проводили вывариванием створок на песчаной бане на протяжении 5–6 ч. По окончании вываривания, материал промывали дистиллированной водой 8-10 раз по схеме 1:100 через циклы центрифугирования.

Схема эксперимента для створок. Для исследований суспензию панцирей диатомей помещали непосредственно на стерильную подложку с использованием 10 мкл биоматериала. Препарат подсушивали. После этого получали раман-спектры от одиночных створок или групп клеток.

Данные были получены с помощью рамановского спектрографа (in Via Reflex, Renishaw, UK). Оптические изображения и спектрограммы выводили на персональный компьютер с микроскопа (Leica DM2500M, Leica-microsystems, Germany) при увеличении 50x (объектив Leica, 50x, NA=0,6). Для возбуждения был использован диодный лазер 532 нм. Мощность составляла 5,0 мВт. Время экспозиции 1 сек. Аккумуляция сигнала осуществлялась при 40 повторах.

Изображения были получены с помощью атомно-силового микроскопа Bioscope Catalyst (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) через инвертированный микроскоп Axiovert 200 (Zeiss, Germany). Радиус кантилевера 10 нм. В работе был использован программный пакет NanoScope. Настройки параметров съемки были строго индивидуальны для каждого образца.

Референтный материал хранится в коллекции Отдела экологии бентоса (ИМБИ, г. Севастополь). Наиболее оптимальная система хранения биоматериала включает: 1 – живые клоновые культуры содержатся при постоянном пересеве с частотой 1 раз в 30 суток; 2 – очищенные панцири клеток хранятся в конических пробирках типа эппендорф объемом 1,5 мл в дистиллированной воде; 3 – клоновые культуры хранятся в пробирках типа эппендорф, зафиксированы этиловым спиртом; 4 – постоянные препараты, залиты в смолу Naphrax®.

Результаты и обсуждение. Рамановская спектроскопия. На рисунке 1 приведены Раман-спектры для подготовленных панцирей вида *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua* в активной вегетативной фазе жизненного цикла культуры клеток. Расшифровка спектров была проведена согласно Ферраро с соавторами [14]. Спектры являются частью данных молекулярного паспорта штамма *P. panduriforme* [15].

Как видно, расположение спектральных пиков для разных точек съемки (с пояска или со створки) различных панцирей различаются между собой. Однако, анализ данных показал, что имеется набор пиковых значений, повторяющийся от спектрограммы к спектрограмме. Эта особенность характерна в пределах одного штамма, что свидетельствует об уникальном «отпечатке пальцев» для видовой идентификации.

Таблица 2 – Положение полос Рамановского спектра для *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua*. Штамм 2PP60427F

С пояска	218	395	455	600	862	1079	1122	1300	1368	1441	1599	1654	1743	1756
Со створки	236	479	807	862	1003	1079	1300	1441	1667	-	-	-	-	-

Анализ данных позволяет выделить наиболее характерные пиковые значения для точек съемки створки ($862, 1079, 1300, 1441, 1654/1667 \text{ см}^{-1}$); значения являются общими для двух спектрограмм.

Соли кремниевой кислоты дают полосу частотой 862 см^{-1} , что соответствует молекулярной ассоциации с орто-кремниевой кислотой (SiO_4^{4-}). Эта полоса имеет выраженность по интенсивности. У точки съемки с пояска интенсивность значений выше, что связано с толщиной панциря исследуемого образца. В спектрах наблюдаются общие полосы, характерные для окисленного и гидроксильированного состояния кремния. Это полосы валентных и деформационных колебаний Si-O-Si с максимумами вблизи частот $455, 1079, 1122 \text{ см}^{-1}$.

Наиболее выраженное значение дают частоты 1300 и 1441 см^{-1} , которые указывают на колебания полимерной цепи и наличие соединений жирных кислот. Одновременно наблюдали незначительно выраженный пик значений в области 1654 см^{-1} (рис. 1А) и 1667 см^{-1} (рис. 1В), что соответствует С-С связи с разной степенью выраженности.

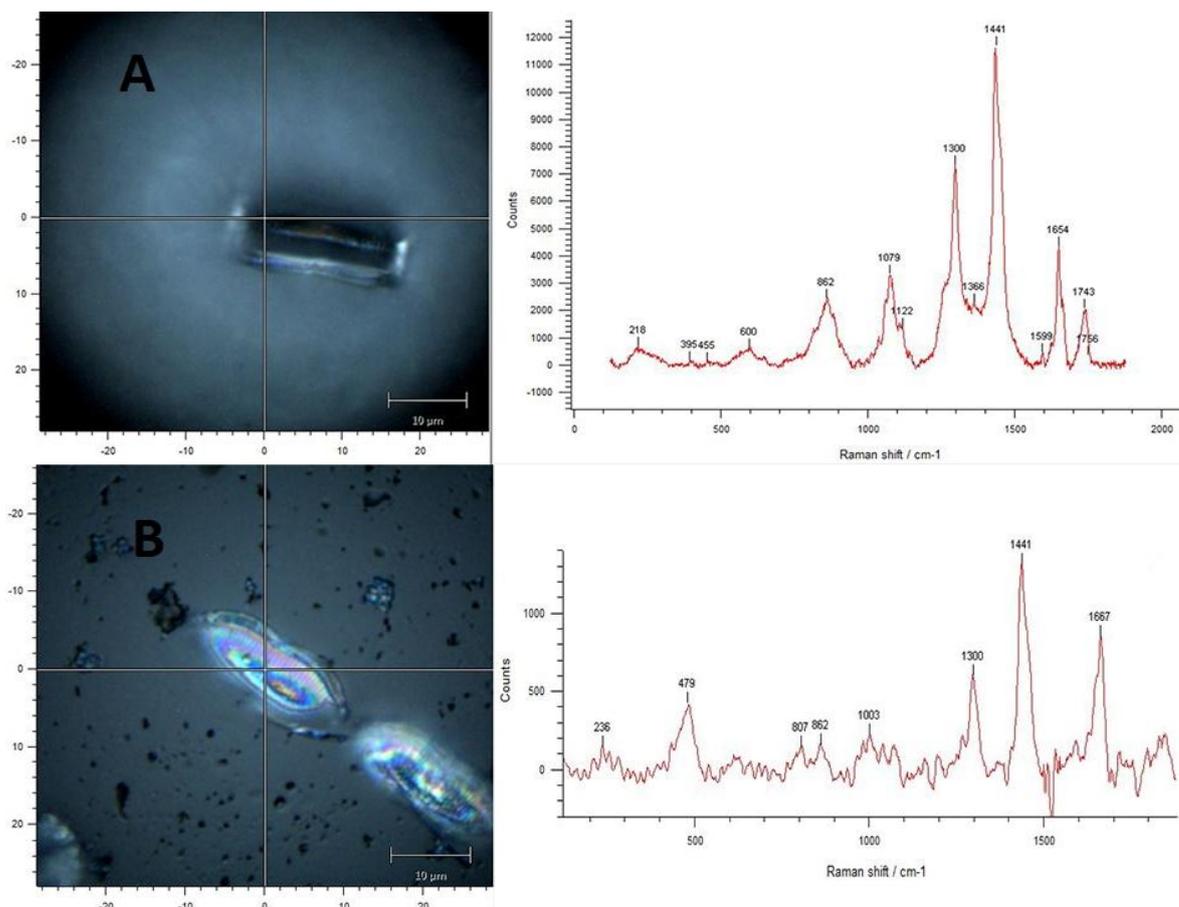


Рисунок 1 – Раман-спектры для образца клеточной культуры *Psammodyctyon panduriforme* var. *continua*: А – съемка спектра клетки с пояска и В – со стороны створки. Перекрестие линий на фотографиях – точки анализа

Сложная структура спектров, прежде всего, связана с тем, что построение панциря диатомовых водорослей может зависеть от среды обитания организмов [1, 2]. Неорганические соединения, путем встраивания необходимых элементов в створку формируют каркас клетки. В зависимости от биотопа, определенных гидрохимических параметров, молекулярные характеристики панцирей в пределах одного вида могут изменяться. Это требует дальнейших исследований данного вида.

Атомно-силовая микроскопия. Первые исследования диатомовых водорослей с помощью атомно-силовой микроскопии были направлены на изучение морфологических признаков вида [9, 16]. Далее поставленные задачи усложнялись [9-11]. В нашей работе получены и проанализированы данные картирования образца поверхности подготовленной створки с помощью метода АСМ.

Полученные данные показывают, что колебания значений упругости для поверхности клетки составили $60-300 \text{ МПа}$. Исследуемая поверхность – 500 нм . Значения вблизи нижней границы соответствовали поровому аппарату. Диапазон значений упругости был получен при прямом и обратном прохождении кантилевера по поверхности образца заданного вектора для большей достоверности.

По данным литературы, планктонный вид *Coscinodiscus* sp. имеет значения упругости в диапазоне $5,9-76 \text{ МПа}$ [11] и варьирует в зависимости от точки съемки для морфологических элементов. Эти данные

сопоставимо ниже, чем у *P. panduriforme*. Однако колебания значений для разных элементов архитектуры клетки характерны для обоих видов.

Штамм PP60427F вида *Psammodictyon panduriforme* var. *continua* [4] был найден и выделен из образца грунта на глубине 46 метров (табл. 1). Отсюда следует, что клетки этого вида физиологически приспособлены к условиям существования при ограниченной освещенности на границе фотической зоны и значительном давлении воды. Отметим, что давление на глубине моря 46 метров составляет порядка 465 кПа. Глубоководные виды диатомей должны иметь особую конфигурацию морфологической структуры, определенную жесткость и упругость панциря. Бентосные виды зачастую способны передвигаться по субстрату благодаря выделяемой ими слизи по принципу реактивного движения, а соответственно, давление на клетку меняется. Очевидно, что диатомовые водоросли имеют запас прочности клеточной конструкции. Ведь клетки данного вида обитают на глубине от 0,5 до 50 метров.

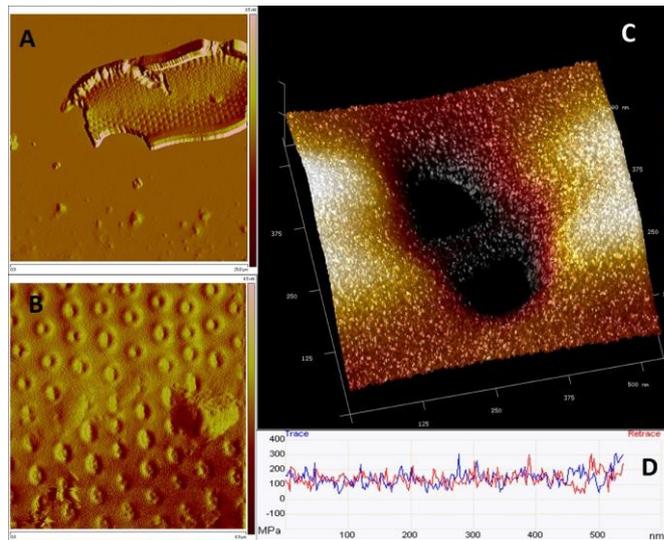


Рисунок 2 – АСМ-картирование поверхности вида *Psammodictyon panduriforme* var. *continua*:

А – общий вид подготовленной створки, В – поровый аппарат, С – ареола, D – профиль поверхности левого края изображения С сверху вниз, в единицах эластичности в двух повторностях – forward и reverse.

Размерность снимков: А – 25 мкм, В – 4,9 мкм, С – 500 нм

В дальнейшем запланирована работа с разными штаммами *P. panduriforme*, выделенными из разных биотопов с различной экологической загрязненностью с помощью методов Рамановской спектроскопии и атомно-силовой микроскопии.

Работа выполнена в рамках госзадания ИМБИ РАН по теме «Мониторинг биологического разнообразия гидробионтов Черноморско-Азовского бассейна и разработка эффективных мер по его сохранению» (гос. рег. № 0828-2014-0014) и при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-04838.

Список литературы/References:

1. Lee R.E. Phycology, 4th edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008, 547 p.
2. Левина О.В. Химический состав и термодинамические свойства створок диатомовых применительно к процессам осаждения – растворения биогенного кремнезема в озере Байкал. *Геология и геофизика*, 2001. т. 42, no 1–2. с. 319–328. [Levina O. V. Chemical composition and thermodynamic properties of diatom valves in relation to precipitation processes - dissolution of biogenic silica in Lake Baikal. *Geology and geophysics*, 2001, vol. 42, no 1-2, pp. 319-328. (in Russ.)]
3. Kröger N., Deutzmann R., Sumper M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 1999, vol. 286, no 5, pp. 1129-1132.
4. Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The Diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, 747 p.
5. Неврова Е.Л. Донные диатомовые водоросли (Bacillariophyta) Чёрного моря: разнообразие и структура таксоценов различных биотопов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва, 2015, с. 25. [Nevrova E. L. Bottom diatoms (Bacillariophyta) of the Black Sea: the diversity and structure of taxocenoses of different biotopes: *Abstract. dis. ... Doct. Biol. sci.* Moscow, 2015, pp. 25 (in Russ.)]
6. 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.
7. Parab N. D. T., Tomar V. Raman spectroscopy of algae: a review. *J. Nanomed. Nanotechnol*, 2012, vol. 3, pp. 131-137.
8. Rosch R., Harz M., Peschke R.-D., Ronneberger O., Burkhardt H., Popp O. Identification of Single Eukaryotic

Cells with Micro-Raman Spectroscopy. *Biopolymers*, 2006, vol. 82, pp. 312-316.

9. Almqvist N. et al. Micromechanical and structural properties of a pennate diatom investigated by atomic force microscopy. *Journal of microscopy*, 2001, vol. 202, no 3, pp. 518-532.

10. Pletikapić G. et al. AFM imaging of extracellular polymer release by marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reiman & JC Lewin. *Journal of molecular recognition*, 2011, vol. 24, no 3. pp. 436-445.

11. 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.

12. Pan Z. et al. Electronically transparent graphene replicas of diatoms: a new technique for the investigation of frustule morphology. *Scientific reports*, 2014, vol. 4, p. 6117.

13. Camargo E., Perez C.J.J., Chia-Feng L., Ming-Shiou L., Tzu-Yun Yu, Meng-Chuan Wu, Su-Yuan L., Min-Ying W. Chemical and optical characterization of *Psammodictyon panduriforme* (Gregory) Mann comb. nov. (Bacillariophyta) frustules. *Optical Materials Express*, 2016, vol. 6, no 5, pp. 1436-1443.

14. Ferraro J.R., Nakamoto K. and Brown C.W. *Introductory Raman Spectroscopy*. 2 ed. Academic Press, Amsterdam, 2003, 434 p.

15. Шевченко О.Г., Романова Д.Ю., Карпенко А.А., Пономарева А.А. Концепция и методические подходы к изучению наноструктурных свойств панциря диатомовых водорослей (Bacillariophyta) для идентификации вида. *Матер. XI междунар. науч. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016»*, Севастополь, 2016. с. 17-21. [Shevchenko O.G., Romanova D.Yu., Karpenko A.A., Ponomariova A.A. The concept and methodological approaches to the investigation of nanostructural properties of the shell of diatoms (Bacillariophyta) for identification of the species. *Topical issues of biological physics and chemistry. BFFC-2016*, Sevastopol, 2016, pp. 17-21 (In Russ.)]

16. Crawford S.A. et al. Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy. *Journal of Phycology*, 2001, vol. 37, no 4, pp. 543-554.

ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ НАНОУГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА МОРФОЛОГИЮ И РАСТВОРИМОСТЬ НАНОКРИСТАЛЛОВ ГИДРОКСИАПАТИТА КАЛЬЦИЯ

Захаров Н. А.¹, Орлов М.А.², Шелехов Е.В.³, Демина Л.И.^{1,4}, Алиев А.Д.⁴,
Киселёв М.Р.⁴, Матвеев В.В.⁴, Захарова Т.В.¹

¹Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН

Ленинский пр., 31, г. Москва, 119991, РФ

e-mail: zakharov@igic.ras.ru

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

Миусская пл., 9, г. Москва, 125047, РФ

³НИТУ «МИСиС»

Ленинский пр., 4, г. Москва, 119049, РФ

⁴Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина

Ленинский пр., 31, г. Москва, 19071, РФ

Аннотация. Определено влияние состава композиционного материала (КМ) и типа нанокристаллического материала (НУМ) (оксид графена (ГО), криорасширенный оксид графена (ГОК)) на размеры, морфологию и растворимость нанокристаллов биосовместимого гидроксиапатита кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА) (НКА) в составе КМ ГА/НУМ.

Ключевые слова: гидроксиапатит кальция, оксид графена, композиционные материалы, синтез, свойства.

INFLUENCE OF NANOCARBON MATERIALS ON MORPHOLOGY AND SOLUBILITY OF HYDROXYAPATITE NANOCRYSTALS

Zakharov N.A.¹, Orlov M.A.², Shelekov E.V.³, Demina L.I.³, Aliev A.D.³,
Kisilev M.R.³, Matveev V.V.³, Zakharova T.V.¹

¹Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences

Leninskiy av. 31, Moscow, 119991, Russia

e-mail: zakharov@igic.ras.ru

²Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

Miusskaj sq., Moscow, Russia

³NITU "MISiS", Moscow

Leninskiy av. 4, Moscow, 119049, Russia

⁴Frumkin Institute of physical chemistry and electrochemistry of Russian Academy of Sciences

Leninskiy av., 31, Moscow, 19071, Russia

Abstract. The composition influence of composite material (CM) and nanocarbon material (NCM) type (grapheme oxide (GO), kryoextended grapheme oxide (KGO)) on dimensions, morphology and solubility of biocompatible calcium hydroxyapatite nanocrystals $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) (NCHA) in CM HA/NCM composition.

Key words: calcium hydroxyapatite, grapheme oxyde, composite materials, synthesis, properties.