

КРЕМНИЕВЫЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ «В ПРОБИРКЕ»



Умение диатомовых водорослей искусно манипулировать кремнием, которое эволюционировало и «оптимизировалось» десятки миллионов лет, в эпоху высоких технологий вызывает живейший интерес ученых. Термин «диатомовые нанотехнологии» (*diatom nanotechnologies*) ввел еще в 1988 г. американский исследователь Р. Гордон (Gordon, Aguda, 1988). Сейчас применительно ко всей группе пигментированных гетероконтов, к которым относятся не только диатомеи, но и хризофитовые, можно говорить о крем-

ниевых нанотехнологиях (*silicon nanotechnologies*) в широком смысле (Grachev *et al.*, 2008). Поэтому неудивительно, что макро- и микропроцессы морфогенеза и сама структура кремнеземных створок водорослей привлекают сегодня внимание специалистов из самых разных областей.

Благодаря своим оптическим свойствам и большой площади поверхности, на которой могут быть иммобилизованы антитела и ферменты, панцири диатомей могут использоваться в качестве биосенсоров (Gale

Ключевые слова: диатомовые водоросли, морфогенез, колхицин, паклитаксел, биологический кремнезем, микроструктуры, наноструктуры.

Key words: diatoms, morphogenesis, colchicine, paclitaxel, biosilica, microstructures, nanostructures

Е. Д. БЕДОШВИЛИ, К. В. ГНЕУШЕВА

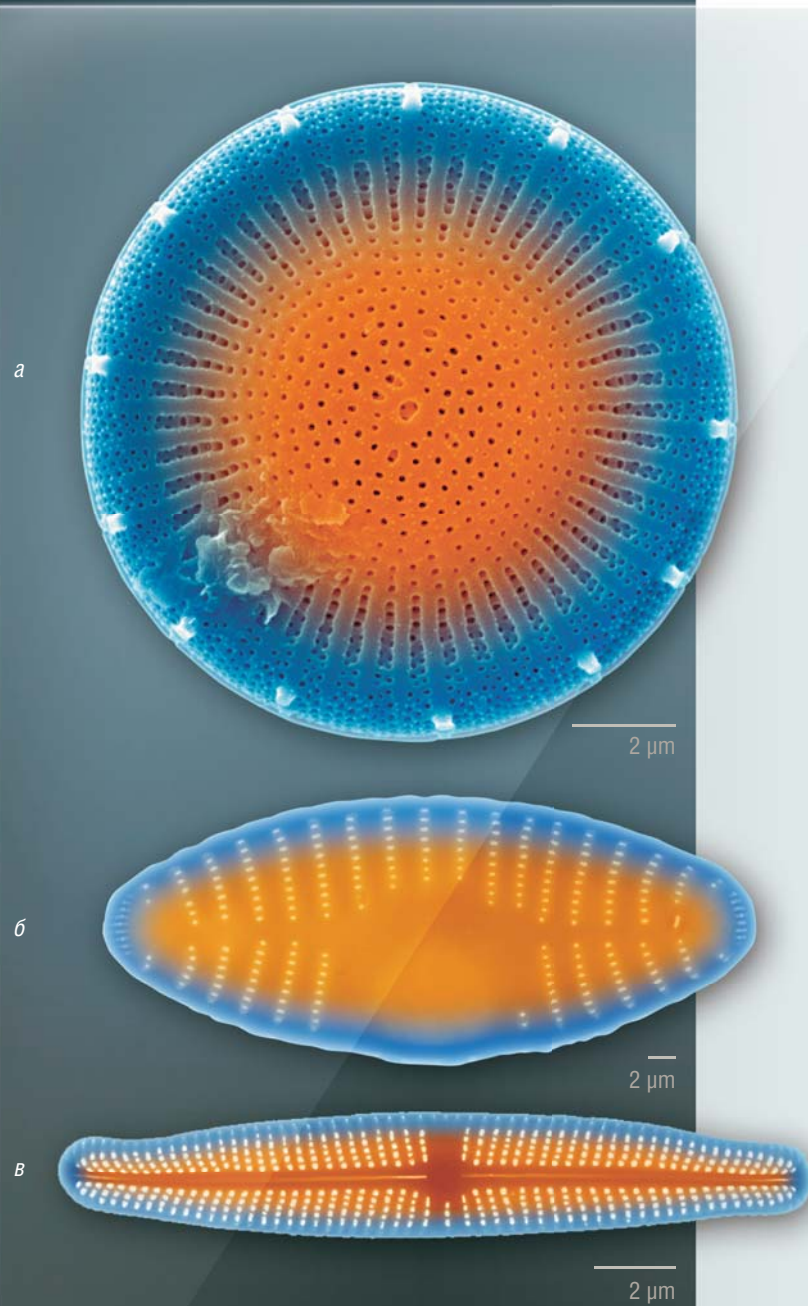


БЕДОШВИЛИ Екатерина Джамбулатовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела ультраструктуры клетки Лимнологического института СО РАН (Иркутск). Автор и соавтор 13 научных работ



ГНЕУШЕВА Ксения Васильевна – аспирант отдела ультраструктуры клетки Лимнологического института СО РАН (Иркутск). Соавтор 1 научной работы

© Е. Д. Бедошвили, К. В. Гнеушева, 2016



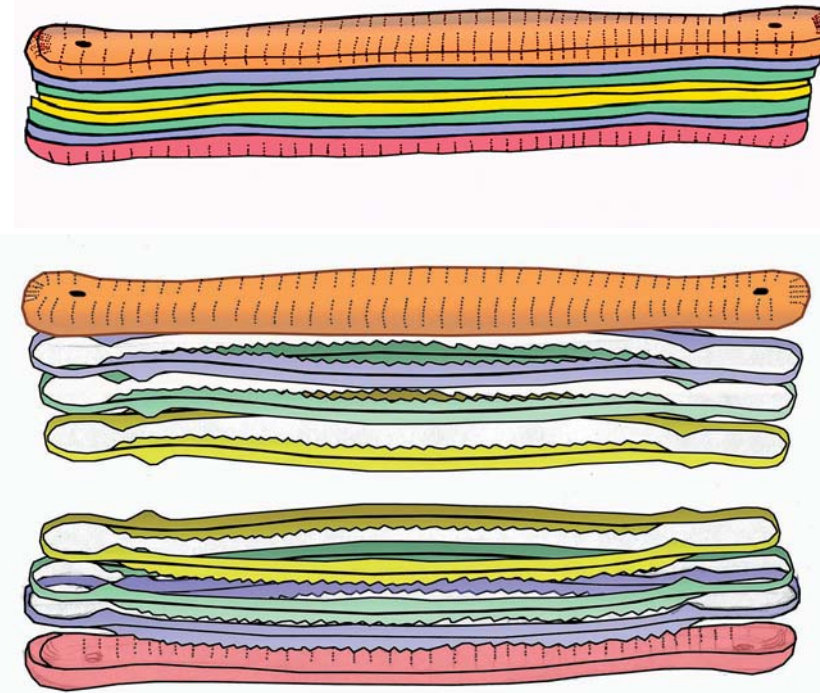
48 Среди всех одноклеточных организмов, создающих неорганические структуры микро- и наноразмера, диатомовые водоросли отличаются особым многообразием форм. По типу симметрии панцирей диатомеи делятся на три основные группы: центрические с радиальной и биполярной симметрией (самая древняя группа) и пеннатные с билатеральной симметрией. Пеннатные, в свою очередь, подразделяются на шовные и бесшовные по наличию или отсутствию щели на створке

et al., 2009; Sheppard *et al.*, 2012). Недавно была показана возможность их применения для целевой доставки плохо растворимых в воде лекарственных препаратов, например, антираковых (Delalat *et al.*, 2015).

Панцири диатомеи являются и объектом трибологии – науки, исследующей контактные взаимодействия твердых деформируемых тел при их относительном перемещении. При этом особое внимание привлекают способы объединения клеток водорослей в колонии с помощью соединительных кремнеземных конструкций и адгезивных веществ, которые они выделяют (Кроуфорд, Гибшубер, 2006, Gebeshuber, 2007). Диатомеи могли бы стать и экономичной заменой таких нанотехнологий, как планарная литография, которая используется для создания «плоских» полупроводниковых приборов, интегральных микросхем, а также некоторых сверхпроводниковых наноструктур. Один из этапов этой технологии – формирование в чувствительном слое на поверхности подложки рельефного рисунка, повторяющего топологию микросхемы. Вот если бы диатомею можно было «заказать» конкретный рисунок!

Диатомеи с разными типами симметрии панцирей:

- а – центрическая диатомея *Stephanodiscus* sp. с радиальной симметрией;
- б – пеннатная бесшовная диатомея *Fragilaria vausheriae* var. *capucina* с билатеральной симметрией;
- в – пеннатная шовная диатомея *Achnanidium sibiricum* с билатеральной симметрией



вались вещества, ингибирующие работу микротрубочек (колхицин, люмиколхицин, оризалин и др.), водоросли формировали створки с разнообразными аномалиями.

В отделе ультраструктуры клетки Лимнологического института СО РАН была впервые в мире исследована роль цитоскелета в морфогенезе створки на синхронизированной культуре диатомовых

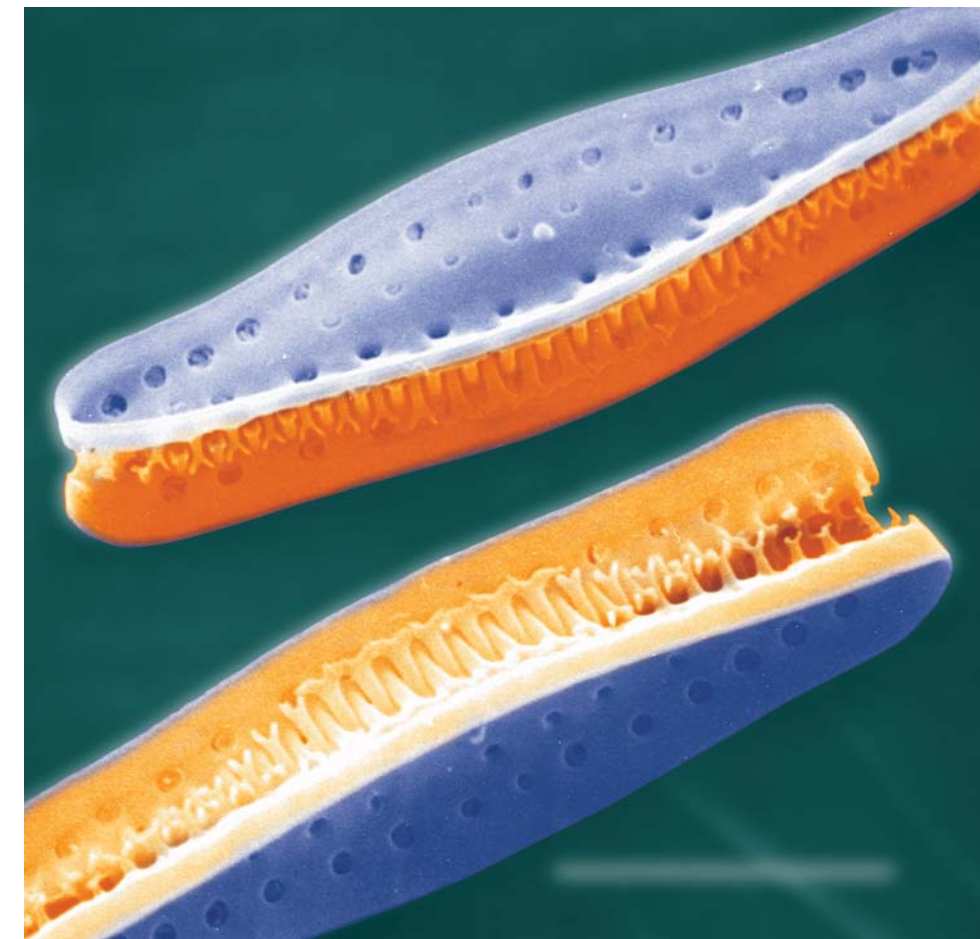
Панцирь диатомеи состоит из двух перекрывающихся створок, соединенных друг с другом подобно мыльнице с помощью системы поясковых ободков

Пары соединенных створок сестринских клеток *Cymatoseira*. Фото Р. М. Кроуфорд, И. Гибшубер

Эта мечта волнует многих – ее реализация могла бы стать основой принципиально новых биотехнологических производств. Однако несмотря на всю возможную пользу и экономическую выгоду, мы еще далеки от полного понимания генетических и клеточных процессов, лежащих в основе морфогенеза кремнеземного панциря диатомеи, хотя эти исследования ведутся с середины прошлого века.

Ключевое звено – микротрубочки

Кремнистая створка диатомовых водорослей формируется в специализированной внутриклеточной органелле – везикуле отложения кремнезема, окруженной специфической мембраной – силикалеммой. На сегодня известно, что важную роль в формировании створки играет цитоскелет, в частности, микротрубочки, которые у некоторых видов диатомеи удалось визуализировать с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии. В экспериментах, где использо-



водорослей, где все клетки находятся на одной и той же стадии клеточного цикла. Добиться синхронизации клеточных культур диатомей сравнительно несложно: для этого достаточно содержать их некоторое время в бескремневой среде. Клетки сначала будут усиленно тратить свой запасенный кремний на построение панциря, а как только он весь израсходуется, они перестанут делиться и остановятся на определенной стадии жизненного цикла. При добавлении кремния в среду клетки вновь начинают процесс формирования новых створок и деления.

«Подопытной» стала диатомея *Synedra acus* subsp. *radians* – эта водоросль в течение нескольких лет служит в ЛИН СО РАН модельным объектом при изучении всех аспектов морфогенеза створки и хорошо размножается в лабораторной культуре. В экспериментах использовались два ингибитора работы микротрубочек с разным механизмом действия – колхицин и, впервые, паклитаксел. Колхицин блокирует сборку новых микротрубочек, связываясь с их растущими концами. Микротрубочки, которые подверглись деполимеризации, уже не могут восстановиться и вскоре разрушаются; при удалении колхицина из среды они восстанавливаются. Паклитаксел, напротив, блокирует деполимеризацию микротрубочек, связываясь с белком β -тубулином, что вызывает образование пучков микротрубочек.

Эксперименты на синхронизированной культуре синедры показали, что добавление колхицина в определенный момент морфогенеза позволяет получить новые кремнеземные формы с определенной структурой (Kharitonenko *et al.*, 2015). Так, самое большое количество створок с неравномерными и непараллельными

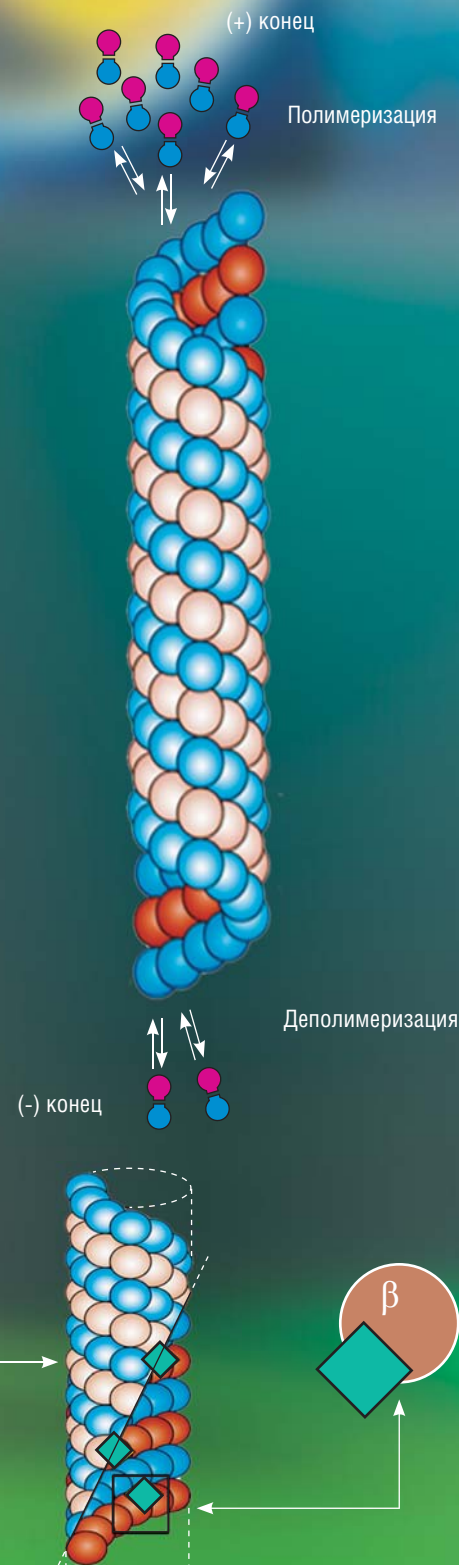
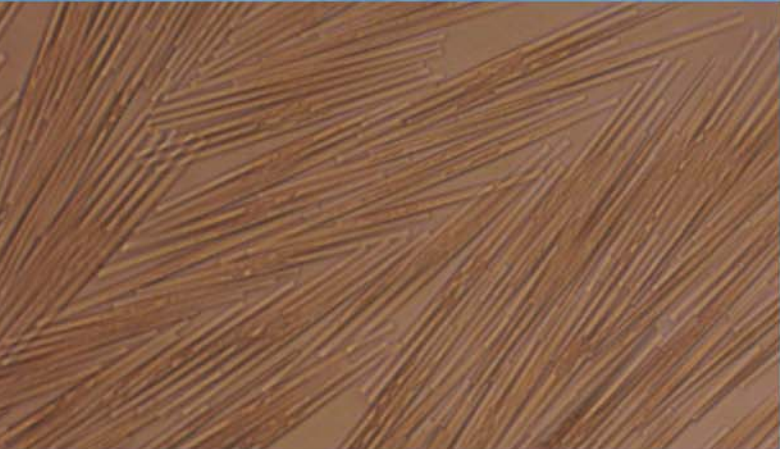
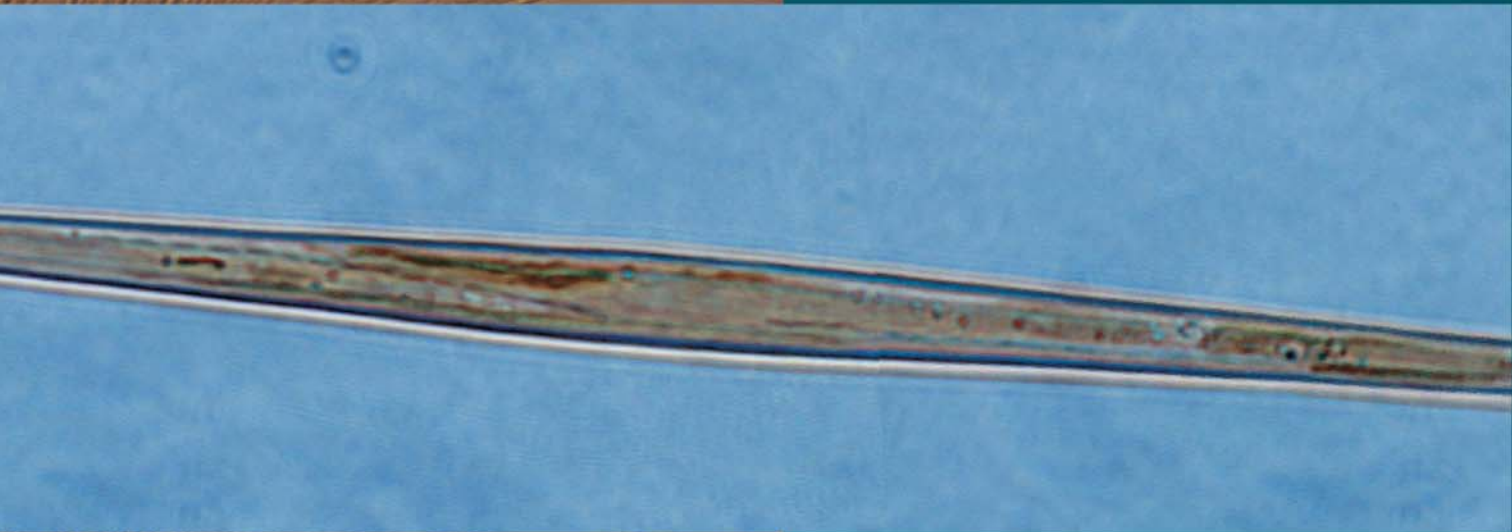


Схема работы микротрубочек и паклитаксела. По: (Dumontet, Jordan, 2010)

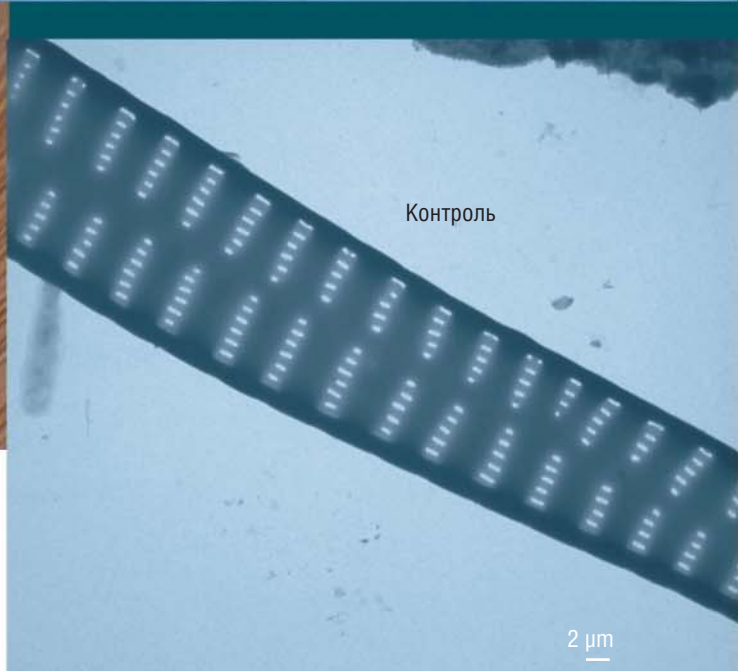




Диатомовая водоросль *Synedra acus*.
Световая микроскопия

В синхронизированной культуре клеток пеннатной бесшовной диатомовой водоросли *Synedra acus* при добавлении колхицина и паклитаксела увеличивается доля клеток с различными аномалиями строения кремнеземного панциря. В случае паклитаксела наблюдаются и такие редкие аномалии, как крупные отверстия в створке. Просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия

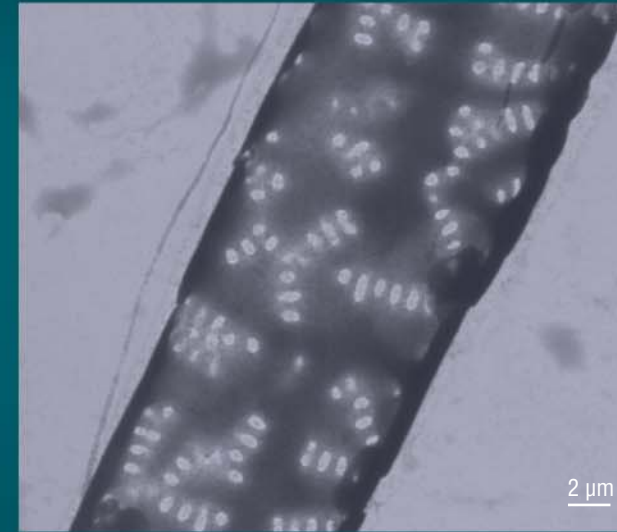
рядами ареол (отверстий) встречается при добавлении колхицина через 1,5 часа после начала морфогенеза створки, а самое большое количество искривленных створок – через 0,5 часа. Самое интересное – створки без ареол появляются, только если добавить колхицин через 2,5 часа после начала морфогенеза! Это справедливо и в отношении паклитаксела, причем при использовании обоих этих ингибиторов доля створок с аномалиями и характер изменений их морфологии



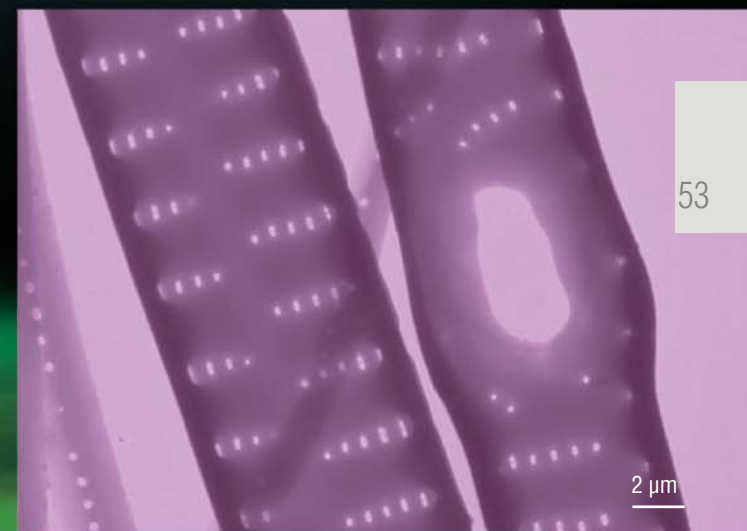
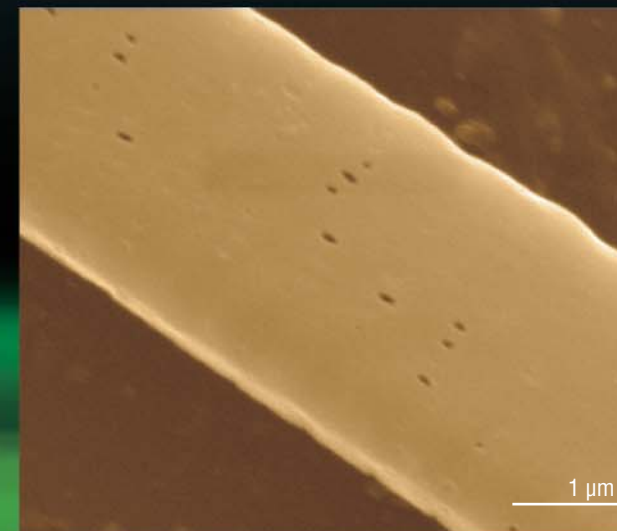
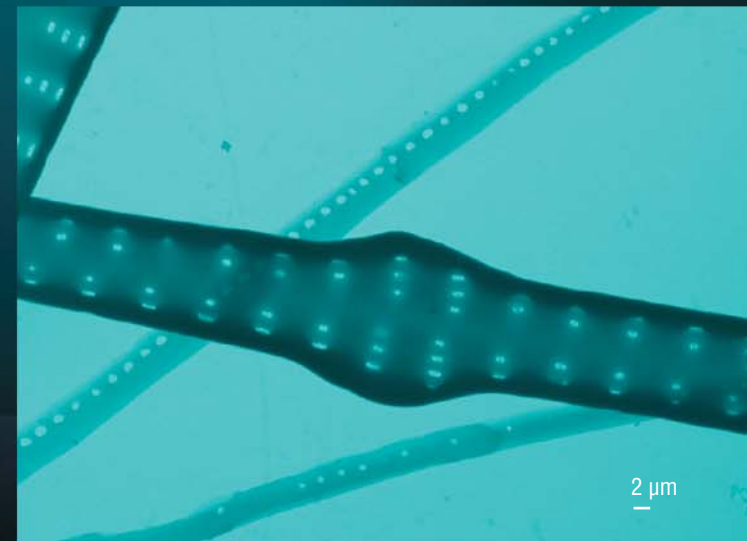
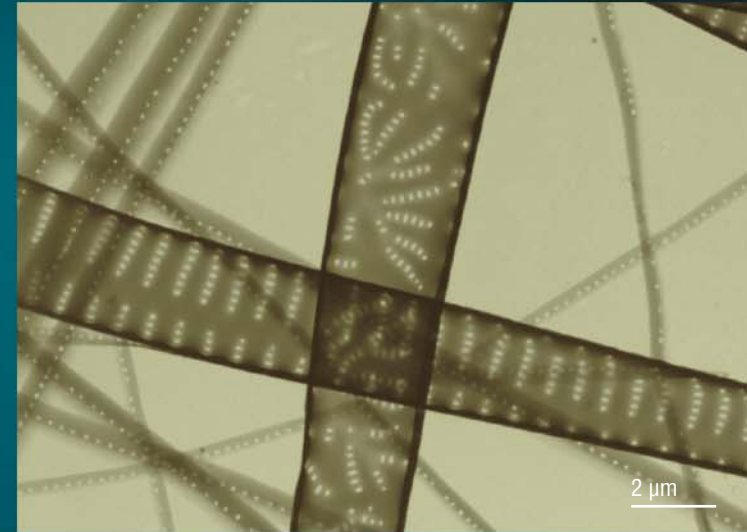
зависит от стадии морфогенеза, на которой ингибиторы добавляют в среду с культурой водоросли.

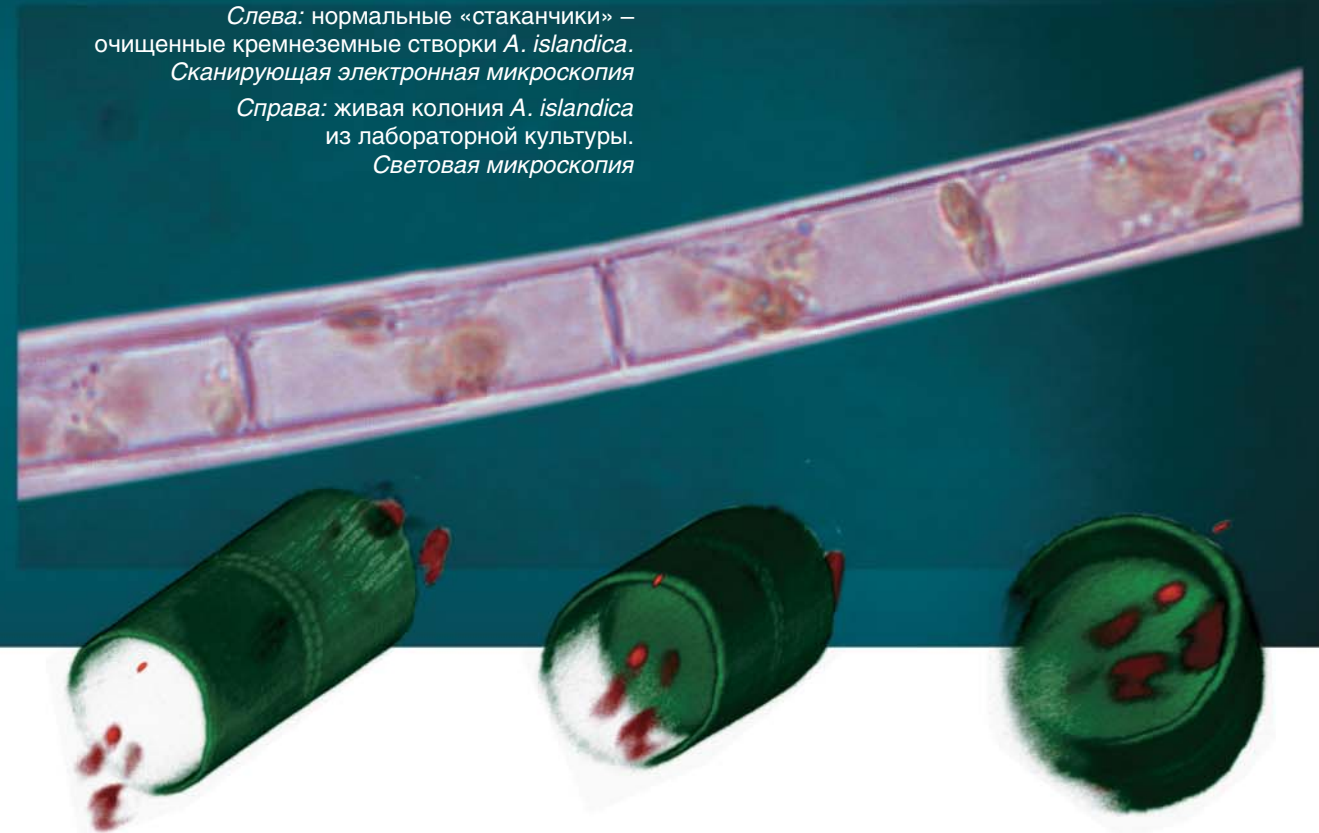
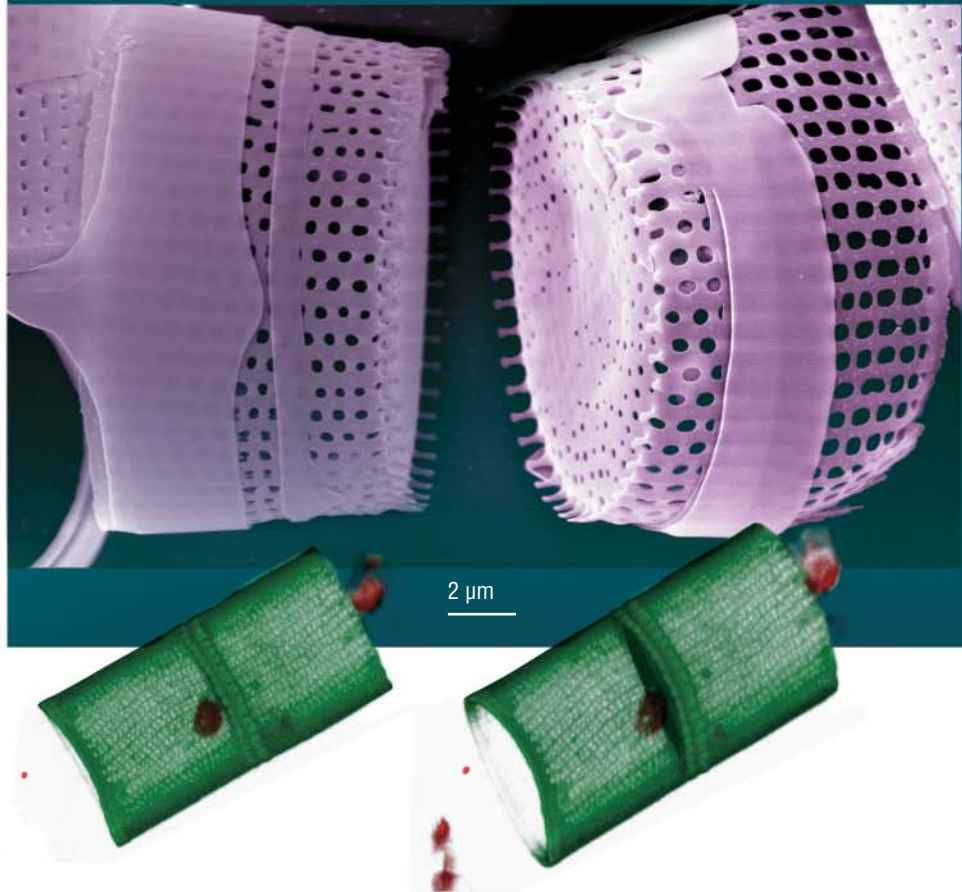
Однако воздействие паклитаксела приводит к появлению и таких аномалий в строении створки, которые не наблюдаются в случае применения колхицина. Среди них – крупные отверстия в створке (единичные случаи), а также расширение створки, довольно часто встречающееся при использовании паклитаксела на начальных стадиях морфогенеза.

Synedra acus при добавлении колхицина



Synedra acus при добавлении паклитаксела





Слева: нормальные «стаканчики» – очищенные кремнеземные створки *A. islandica*. Сканирующая электронная микроскопия
Справа: живая колония *A. islandica* из лабораторной культуры. Световая микроскопия

Как из «стаканчика» сделать «трубочку»

Сотруднице ЛИН СО РАН Надежде Волокитиной удалось выделить в лабораторную культуру еще один вид диатомовых водорослей – *Aulacoseira islandica*, доминирующий в байкальском фитопланктоне в определенные сезоны. Морфогенез этой диатомеи, в отличие от синедры, сравнительно мало изучен. У представителей рода *Aulacoseira* створка благодаря своему необычайно высокому загибу напоминает «микростаканчик», а клетки в колониях прочно скреплены особыми соединительными шипами.

Поскольку этот вид имеет тонкий панцирь, который сминается и разрывается при манипуляциях, при оценке воздействия ингибиторов на его морфогенез было решено использовать специальный флуоресцентный краситель, который встраивается в формирующиеся створки и позволяет наблюдать за результатом экспериментального воздействия в конфокальный микроскоп.

С помощью этой технологии удалось показать, что в присутствии колхицина в культуре появляются сросшиеся дочерние створки без перегородки, т.е. «микростаканчики» превращаются в «микротрубочки». Таким образом, если клетке на определенной стадии морфогенеза помешать соорудить «доннышко» (лицевую часть створки), то она впоследствии продолжит строить загиб створки по запрограммированному сценарию, как если бы строители по какой-то причине не построили фундамент здания, а следующая бригада продолжила возведение стен или крыши.

В культуре клеток центральной диатомовой водоросли *Aulacoseira islandica* при добавлении колхицина появляются сросшиеся дочерние створки, их кремнеземный панцирь приобретает вид «микротрубочки» вместо типичного для этого вида «микростаканчика». На фото: 3D-изображение нормальной створки *Aulacoseira islandica* (вверху) и створки без лицевой части (слева). Конфокальная микроскопия

Сегодняшние исследования механизмов формирования створок у диатомовых водорослей позволяют в будущем использовать эти кремнеземные бионанотехнологии на благо человечества, хотя сейчас мы находимся лишь в самом начале этого длинного пути. Не исключено, что дальнейшее изучение регуляции работы микротрубочек цитоскелета диатомей на клеточном и генетическом уровнях даст возможность получать культуры мутантных водорослей и «по заказу» создавать кремнеземные структуры с нужными характеристиками.

В публикации использованы фото авторов

Литература

- Кроуфорд Р.М. Губшубер И. Мини-наноинженеры // НАУКА из первых рук. 2006. № 4 (10). С. 48–54
- Delalat B., Sheppard V. C., Ghaemi S. R. et al. Targeted drug delivery using genetically engineered diatom biosilica // Nature Communications. 2015. N. 6.
- Dumontet C., Jordan M.A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. V. 9 P. 790–803.
- Gale D.K., Gutu T., Jiao J., Chang C.-H., Rorrer G.L. Photoluminescence detection of biomolecules by antibody-functionalized diatom biosilica. Advanced Functional Materials. 2009. V. 19. P. 926–933.
- Gebeshuber I. Biotribology inspires new technologies // Nano today. 2007. V. 2 N. 5. P. 30–37.
- Gordon, R. & B.D. Aguda. Diatom morphogenesis: natural fractal fabrication of a complex microstructure // Harris, G. & C. Walker, Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Part 1/4: Cardiology and Imaging, 4–7 Nov. 1988, New Orleans, LA, USA, New York: Institute of Electrical and Electronics Engineers. 1988. V. 10. P. 273–274.
- Grachev M.A., Annenkov V.V., Likhoshvay Ye. V. (2008) Silicon nanotechnologies of pigmented heterokonts // BioEssays. 2008. V. 30. P. 328–337.
- Sheppard V. C., Scheffel A., Poulsen N., Kröger N. Live diatom silica immobilization of multimeric and redox-active enzymes // Appl Environ Microbiol. 2012. V. 78 N. 1. P. 211–218.