

№ 3 (59) МАЙ-ИЮНЬ 2011 г.

ИНТЕГРАЛ

Научно-практический межотраслевой журнал

Наш мир – мир новых идей и высоких технологий





ЭЛЕКТРОНОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЛЬЦИФИЦИРУЮЩИХ НАНОЧАСТИЦ. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Васильев С. В., Рудый А. С., Приходько О. Ю., физический факультет Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова, Центр коллективного пользования «Диагностика микро- и наноструктур», Шеховцова Н. В., Ягушкина А. Ю., биологический факультет Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова

Приведены результаты исследований наночастиц из Воротиловской глубокой научной скважины. Методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии исследованы морфология и фазовый состав наночастиц. На основании полученных результатов сделан вывод о принадлежности обнаруженных наночастиц к саморазмножающимся минеральным комплексам, известным под названиями кальцифицирующих наночастиц, нанобактерий или нанонов (nanons).

The article presents the results of studies of nanoparticles from Vorotilovskaya deep scientific wells. The morphology and phase composition of nanoparticles were studied by means of scanning and transmission electron microscopy. Basing on the results obtained the conclusion that the discovered nanoparticles belong to self-replicating mineral complexes, known as calcifying nanoparticles, nanobacteria or nanons, was made.

Ключевые слова: кальцифицирующие наночастицы, методы сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии.

Keywords: calcifying nanoparticles, means of scanning and transmission electron microscopy.

При исследовании чистой культуры бактерий *Planomicrobium sp.*, выделенной из гнейсов, вскрытых Воротиловской глубокой научной скважиной (ВГС), были обнаружены объекты размерами от 50 до 200 нм. Эти объекты, напоминая колонии необычайно мелких бактерий сферической формы, оказались существенно меньше, чем все известные на сегодня бактерии, споры грибов или клетки тканей многоклеточных организмов [10, с. 1–20].

Объекты правильной сферической формы с диаметром от 50 до 300 нм наблюдались и ранее исследователями из разных областей естествознания: биохимии, микробиологии, геологии и т.д. – и, соответственно, в образцах различной природы и происхождения [2–6, 9]. Эти частицы были обнаружены в минеральных отложениях горячих источников, образцах песчаника, сыворотке крови животных и в органах людей, больных такими распространенными заболеваниями, как мочекаменная болезнь, артрит, болезнь Альцгеймера, атеросклероз и т.д. [1–9, 11, 13, 14]. В ряде случаев исследователям удалось выделить чистые культуры субмикронных частиц методом отделения с помощью бактериологических фильтров и выращивания на селективных питательных средах. Все данные о наночастицах, полученные методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии при исследовании разных проб (почв, воды, конкрементов человеческих органов), в зна-

чительной степени разнятся и требуют тщательного изучения [1–6, 9].

С момента первого описания субмикронных частиц, способных к самовоспроизведению, не прекращаются споры, можно ли считать их живыми организмами [3–6, 8, 11, 13]. Размеры этих частиц, варьирующиеся в пределах 50–200 нм [2–6, 8, 9, 14], в большинстве случаев слишком малы, чтобы вместить ДНК, необходимую для воспроизведения этих объектов [10, с. 1–20]. Поэтому вопрос об их природе остается открытым и по сей день.

Из чего они состоят? Каков их минимальный размер? Способны ли они реплицироваться и что этому способствует? Можно ли считать их живыми или нет? Эти и другие вопросы, поставленные в последние годы, стимулировали многочисленные теоретические и экспериментальные исследования кальцифицирующих наночастиц.

Объектом исследования служила чистая культура бактерий *Planomicrobium sp.* СМ-9, выделенная из гнейсов, вскрытых Воротиловской глубокой научной скважиной (ВГС) на глубине 2600 м. С целью получения препаратов для электронной микроскопии бактерии выращивали при 28°C на агаризованном десятикратно разбавленном мясо-пептонном бульоне с добавлением метанола. Биомассу суточной, недельной или двухнедельной культур смывали с поверхности плотной среды 0,5% NaCl и концентрировали с помощью центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 5 минут. После удаления надосадочной жидкости концентрированную суспензию микроорганизмов в объеме 0,2 мл наносили при помощи стерильной пипетки тонким слоем на обезжиренное спирто-эфирной смесью покровное стекло. Затем препараты высушили на воздухе при комнатной температуре.

На скошенный мясо-пептонный десятикратно разбавленный (1:10) агар с метанолом выселили чистые культуры *Planomicrobium sp.* СМ-9, выделенные из кернов кристаллических пород (гнейсов). Посев инкубировали при температуре 28°C. Для штамма СМ-9 получили культуры различного возраста: 1 день, неделя и старше 2 недель. Покровные стекла помещали в спирто-эфирную смесь (1:1) для их обеззараживания. Культуры всех возрастов разбавляли в 5 мл стерильного 0,5% раствора хлорида натрия, центрифугировали 5 минут при 10 000 об/мин и сливали 4 мл надосадочной жидкости. На стекло стерильной пипеткой помещали 0,2 мл центрифугата и высушивали при комнатной температуре.

В дальнейшем образец помещали на «столик» для электронного микроскопирования. Для этого на стекла с высушенным образцом помещали каплю стерильной дистиллированной воды и разбавляли ее в 2 раза. Капилляром помещали на столик каплю бактериальной суспензии, а образцы фиксировали на углеродный скотч. Высушивали

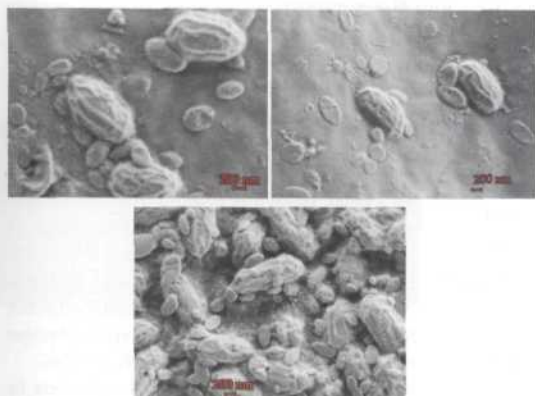


Рис. 1. Изображения во вторичных электронах бактерий *Planotribium sp.* SM-9, выделенных из гнейсов, вскрытых ВГС. Получены на сканирующем электронном микроскопе

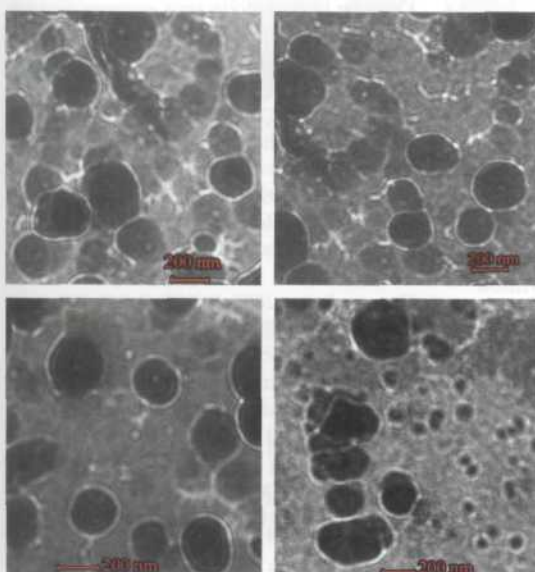


Рис. 2. Изображения наночастиц, выделенных из чистой культуры *Planotribium sp.* SM-9. Получены на просвечивающем электронном микроскопе Tescnai G2 F20 U-TWIN (FEI, Нидерланды)

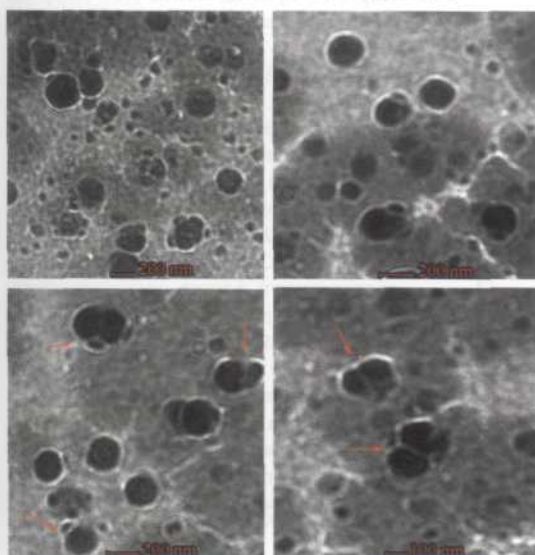


Рис. 3. Изображения наночипов, выделенных из чистой культуры *Planotribium sp.* SM-9. Получены на просвечивающем электронном микроскопе Tescnai G2 F20 U-TWIN

каплю при комнатной температуре. Так как образцы были непроводящими, то перед исследованием образцов на сканирующем микроскопе на них напыляли проводящий слой платины толщиной 10 нм.

Исследования проводились на сканирующем электронном микроскопе Supra 40 (Carl Zeiss, Германия) и просвечивающем микроскопе Tescnai G2 F20 U-Twin (FEI, Нидерланды). Результаты исследований представлены на рис. 1–3, 5.

На полученных изображениях видно, что в образце присутствуют два вида объектов, принципиально различающихся по размеру и форме. Один вид имеет поверхностный рельеф, овальную форму, поперечные размеры в пределах 0,5–0,7 мкм и продольные размеры в пределах 1–2 мкм. Объекты второго вида имеют гладкую овальную сплюснутую форму и размеры в пределах 50–200 нм. Наличие наночастиц в исходном образце естественным образом приводит к вопросу о природе их возникновения.

Авторам удалось отделить обнаруженные наночастицы (50–200 нм) от бактерий (0,5–3 мкм) с помощью трекового фильтра с диаметром пор 250 нм. Полученные образцы были исследованы на просвечивающем микроскопе Tescnai G2 F20 U-TWIN (FEI, Нидерланды). Результаты исследования представлены на рис. 2 и 3.

Как следует из рис. 1–3, наночастицы очень схожи между собой и по форме, и по размерному диапазону. Объекты на рис. 3, обозначенные стрелками, очень напоминают делящиеся клетки. Таким образом, есть основания предполагать, что исследуемые наночастицы обладают способностью к репликации. Но в данном случае, на наш взгляд, уместнее говорить о росте кристаллов, механизм которого неизвестен.

Сопоставление обнаруженных наночастиц размером 50–200 нм с наночастицами, описанными в работах [2–6, 9], позволяет утверждать, что они имеют много общего. Естественно предположить, что наночастицы из Воротиловской глубокой научной скважины также являются кальцифицирующими наночастицами.

Для подтверждения этого предположения прежде всего необходимо было установить минералы, входя-

щие в состав наночастицы. В цитированной литературе в качестве основного минерала упоминается гидроксилapatит $Ca_5(PO_4)_3OH$. Само утверждение базируется на данных элементного рентгеновского микроанализа, проведенного методом сравнения с эталонным гидроксилapatитом.

Специфика элементного рентгеновского микроанализа заключается в том, что при использовании эталона невозможно подобрать эталон с той же топографией поверхности, что и у исследуемого образца. Только при полном совпадении рельефов можно сделать вывод об идентичности полученных результатов. Дополнительная сложность заключается и в том, что при столь малых размерах образца набрать достаточную статистику счета рентгеновских квантов за разумное время не удастся. При этом возникает достаточно широкий разброс в соотношении кальция и фосфора, доходящий до 20%, что хорошо видно на рис. 4. А учитывая то обстоятельство, что эти элементы обра-

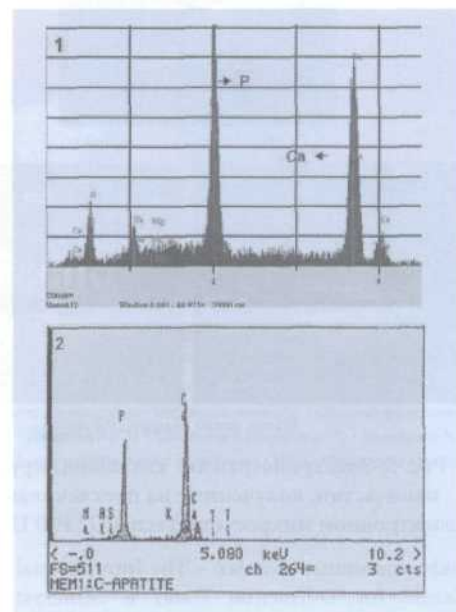


Рис. 4. Результаты элементного рентгеновского микроанализа кальцифицирующих наночастиц: 1 – по данным работы [1], 2 – по данным работы [5]

зуют целый ряд соединений, сделать однозначное заключение о химической формуле исследуемого соединения не представляется возможным.

Очевидным выходом из данной ситуации является идентификация фаз (химических соединений), входящих в состав образца, на основе электронограмм. Фиксация картин дифракции электронов на образце и последующая обработка электронограмм позволяют сделать вывод о структурном и фазовом составе минеральной составляющей наночастицы. Собственно результаты электронографических исследований,



приведенные на рис. 5, и являлись целью настоящей работы.

Данные измерений (интенсивность и углы соответствующих дифракционных максимумов), полученные в ходе эксперимента, сравнивались с базами данных ICDD PDF-2 2009 (Международный центр

технической база данных для минералов и их структурных аналогов). Результаты расшифровки представлены в таблице.

В последней колонке таблицы для сравнения приведены диагностические межплоскостные расстояния для гидроксилатапата. Именно этот минерал часто упоминается в статьях в качестве основного соединения в составе кальцифицирующих наночастиц. В данном случае это соединение, со всей очевидностью, отсутствует.

Исходя из сравнений с базами дифракционных данных был сделан вывод, что оболочка исследованных наночастиц, вероятнее всего, состоит из $\text{Ca}_2\text{Fe}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Mg}(\text{NH}_4)_8(\text{P}_3\text{O}_{10})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Выводы

Обнаруженные объекты, размером 50 - 200 нм, сравнивались с наночастицами, обнаруженными финским биохимиком Олави Кайандером, геологом из США Робертом Фолком, доктором Джоном Лиски (США) и группой австралийских исследователей под руководством Ф.Ювинса из Центра микроскопии и микроанализа в Квинсленде. В результате, можно утверждать, что обнаруженные объекты имеют много общего с наночастицами, исследуемыми зарубежными учеными.

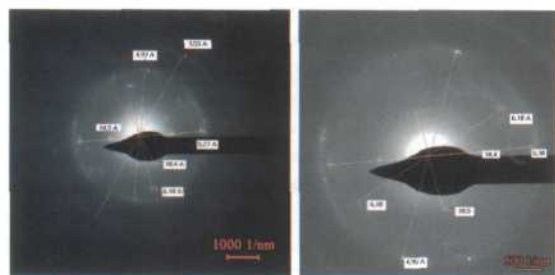
В результате электронографических исследований показано, что оболочка исследованных наночастиц, вероятнее всего, состоит из 2-х соединений: $\text{Ca}_2\text{Fe}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Mg}(\text{NH}_4)_8(\text{P}_3\text{O}_{10})_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$.

На основании полученных результатов можно утверждать, что обнаруженные нами объекты являются кальцифицирующими наночастицами. На основа-

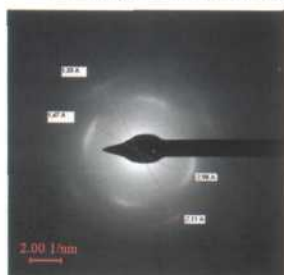
нии имеющихся косвенных данных можно также предположить, что эти части обладают способностью к репликации.

Литература

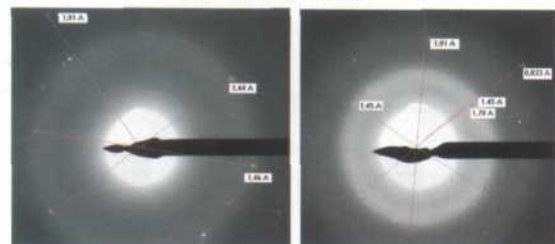
1. Çiftçioglu N., Haddad R. S., Golden D. C., Mirrison D. R., McKay D. S. A potential cause for kidney stone formation during space flight: enhanced growth of nanobacteria in microgravity // *Kidney Int.* 2005. Vol. 67. № 2. P. 483–491.
2. Folk R. Interaction Between Bacteria, Nanobacteria, and Mineral Precipitation in Hot Springs of Central Italy // *Geographie physique et Quaternaire.* 1994. Vol. 48(3). P. 233–246.
3. Kajander E. O. Inhibition of Nanobacteria by Antimicrobial Drugs as Measured by a Modified Microdilution Method // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002. № 46(7). P. 2077–2086.
4. Kajander E. O. Nanobacteria – propagating calcifying nanoparticles // *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology.* 2006. № 42(6). P. 549–552.
5. Kajander E. O., Çiftçioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation // *PNAS.* 1998. № 95(14). P. 8274–8279.
6. Lieske J. C. Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries Proof of principle // *Int. J. Nanomedicine.* 2008. № 3(2). P. 243–248.
7. Lieske J. C. etc. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves // *American journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology.* 2004. Vol. 287(3). P. 1115–1124.
8. Martel J., Young J. D. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105. 2008. P. 5549–5554.
9. Philippa J. R., Uwins R. I. W., Taylor A. P. Novel nano-organisms from Australian sandstones // *American Mineralogist.* 1998. Vol. 83. P. 1541–1550.
10. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К. Молекулярная биология клетки: Т. 1. М.: Изд-во «Мир», 1994.
11. Вальков К. С., Доронина В. В. Нанообъекты биологических жидкостей и тканей. Иваново: ГОУВПО «Ивановская государственная медицинская академия», 2008.
12. Кордюм В. А. и др. Биополимеры и клетки в измерении архитектуры микроценозов // *Biopolym. Cell.* 2009. Т. 25. С. 403–423.
13. Смирнов Г. В., Смирнов Д. Г. Нанобактерия – экологический фактор преждевременного старения человека // *Доклады ТУСУРА.* 2006. № 5. С. 119–123.
14. Ярулина Д. Р., Ильинская О. Л., Силкин Н. И., Салахов М. Х., Хайруллин Р. Н. Инфекционная природа атеросклероза. факты и гипотезы // *Ученые записки Казанского государственного университета: Естественные науки.* 2010. Т. 152. К. 1. 19 с.



Большая длина камеры (2,1 м)



Средняя длина камеры (1,3 м)



Малая длина камеры (0,6 м)

Рис. 5. Электронограммы кальцифицирующих наночастиц, полученные на просвечивающем электронном микроскопе Tescna G2 F20 U-TWIN

дифракционных данных – The International Centre for Diffraction Data) и Mincryst (Кристаллографическая и кристаллохими-

Результаты расшифровки электронограмм

Единицы измерения	Данные настоящей работы	$\text{Mg}(\text{NH}_4)_8(\text{P}_3\text{O}_{10})_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 00-044-0777	$\text{CaFe}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ 00-030-0258	$\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2\text{OH}$ для сравнения
Å	10,5	10,5		
	6,22		6,27	
	5,27			
	5,20	5,22		
	4,95	4,93	4,95	
	3,52	3,56	3,49	3,43
	2,98	2,99; 2,95	2,97	2,81; 2,78; 2,63
	2,11		2,09	2,25
	1,98		2,01	
	1,75		1,72	
	1,68			
	1,44		1,46	

Рудый А.С.: rudy@univ.uniyar.ac.ru