

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ЧИЖ ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 57.05; 577.32 :537.662; 616-004.6

**БІОТЕХНОЛОГІЇ НА ОСНОВІ МАГНІТОМІЧЕННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біоінформатики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор **Горобець Світлана Василівна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», завідувач кафедри біоінформатики.

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, старший науковий співробітник **Карпенко Олена Володимирівна**, Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, завідувач відділу хімії та біотехнології горючих копалин;

доктор технічних наук, професор **Уварова Ірина Володимирівна**, Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України, завідувач відділу технології тугоплавких сполук та композиційних наноструктурних покриттів.

Захист відбудеться «02» червня 2017 р. о 14-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37).

Автореферат розісланий « ____ » квітня 2017 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 26.002.28,
д.біол.н., доц.



Галкін О.Ю.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Актуальним напрямом сучасної біотехнології є використання мікроорганізмів з природними та штучно наданими феримагнітними властивостями, що використовуються як:

- Вектори для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та біологічно активних речовин [O. Felfoul, 2016];
- Біосорбенти, виготовлені на основі різноманітних мікроорганізмів (бактерій, мікрогрибів) для вилучення з водних розчинів іонів важких металів, барвників тощо [I. Safarik, 2007];
- Продуценти для отримання магнітних наночастинок з визначеними магнітними властивостями та морфологічними параметрами. Біогенні магнітні наночастинок (БМН) у низці організмів демонструють унікальні властивості і функції (монодисперсність; мультидоменність, однодоменність або суперпарамагнітні властивості, генетично запрограмовані розмір та форму тощо) [J. Xie, 2009].

Вивчення природних магнітних властивостей мікроорганізмів, що містять БМН, а також розробка нових технологій створення синтетичних аналогів БМН *in vitro*, з використанням білків біомінералізації, дозволить отримати магнітні наночастинок з контрольованими параметрами, що є надзвичайно важливою задачею для багатьох технологій: медицини – для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів, для магнітної сепарації біологічних середовищ; наноелектроніки – для створення нових пристроїв обробки та зберігання інформації тощо.

Дослідження механізмів синтезу БМН різних організмів має важливе фундаментальне значення для встановлення метаболічних функцій, та визначення їх ролі в патогенезі захворювань людини, які супроводжуються підвищенням вмісту БМН.

На практиці широко використовується штучне магнітомічення мікроорганізмів [J. Kolosnjaj-Tabi, 2013], але сучасні методи не забезпечують стабільності та гомогенності магнітної сприйнятливості комплексів мікроорганізм-магнітні наночастинок, що призводить до токсико-алергічних реакцій в медицині, при використанні магнітомічених векторів для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів, а також до обмежень використання магнітомічених біосорбентів для очищення стічних вод.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біоінформатики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» в рамках наступних науково-дослідних робіт:

- «Механізми інтенсифікації процесу сорбції іонів важких металів модифікованим магнітокерованим біосорбентом для очищення стічних вод» НДР 2515ф (номер державної реєстрації 0112U000957).

- «Механізми інтенсифікації процесу сорбції іонів важких металів сухим магнітокерованим біосорбентом для очищення стічних вод» 2866ф (номер державної реєстрації 0115U000401).

Мета і задачі дослідження.

Метою роботи є обґрунтування і розроблення теоретичних та експериментальних наукових засад біотехнології природного та штучного магнітного мічення мікроорганізмів на моделі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **задачі**:

- Провести теоретичний аналіз та виявити мікроорганізми з природним магнітоміченням серед патогенних, умовно-патогенних, бактеріальних симбіонтів людини та грибів із застосуванням методів порівняльної геноміки.
- Систематизувати мікроорганізми з природним магнітоміченням за наявністю або відсутністю кристалічної структури та локалізацією утворень БМН.
- Розрахувати силу магнітодипольної взаємодії, що виникає між БМН магнітокерованих носіїв та БМН пухлинних клітин.
- Розробити новий метод магнітомічення мікроорганізмів на моделі клітин дріжджів *S. cerevisiae* на основі магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, який забезпечить гомогенність магнітомічення.
- Визначити основні технологічні параметри та розробити технологічну схему отримання магнітоміченого біосорбенту.
- Дослідити сорбційну здатність магнітомічених дріжджів *S. cerevisiae*, щодо іонів міді.

Об'єктом досліджень є біотехнології на основі природного та штучного магнітомічення мікроорганізмів, геноми та протеоми патогенних, умовно-патогенних, бактеріальних симбіонтів людини та грибів в базі даних GenBank, штучно магнітомічені дріжджі *S. cerevisiae*.

Предметом досліджень є закономірності природного та штучного магнітомічення мікроорганізмів, процес вилучення іонів важких металів з стічних вод.

Методи дослідження. Для виконання поставлених завдань у процесі дослідження використано теоретичні та експериментальні методи. А саме: біоінформаційні методи (метод порівняльної геноміки, аналіз протеомів та масивів даних), математичного аналізу, методи оптичної мікроскопії, растрової електронної мікроскопії, магнітної силової мікроскопії, атомно-силової мікроскопії, метод електронного парамагнітного резонансу.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі отримано такі пріоритетні результати:

- Методами порівняльної геноміки визначено потенційні продуценти БМН у сукупностях патогенних, умовно-патогенних мікроорганізмів, бактеріальних симбіонтів людини та грибів, що дозволило підтвердити єдиний механізм біомінералізації БМН для представників трьох надцарств живих організмів.
- Запропоновано класифікацію мікроорганізмів: патогенних, умовно-патогенних, бактеріальних симбіонтів людини, що є потенційними продуцентами БМН, за такими ознаками: формування

внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних наночастинок, кристалічної та аморфної структури, формування ланцюжків БМН.

- Теоретичними розрахунками, на моделі взаємодії квазісферичних магнітних наночастинок доведено, що нагромадження мікроорганізмів на поверхні пухлин, та окремих органах людини, відбувається за рахунок сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів, тому її важливо враховувати при проектуванні систем для доставки лікарських форм.
- Теоретично обґрунтовано перспективність використання мікроорганізмів з природними магнітними властивостями, в якості векторів для цільової доставки лікарських препаратів до органу-мішені.
- Розроблено метод для гомогенного магнітомічення мікроорганізмів на основі магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях.
- Розроблено технологічну схему отримання магнітоміченого біосорбенту на основі експериментально визначених технологічних параметрів.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблений метод магнітомічення є перспективним для отримання векторів для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та біологічно активних речовин, для виготовлення біосорбентів, на основі різноманітних мікроорганізмів (бактерій, грибів). Останні використовуються для вилучення з водних розчинів іонів важких металів, барвників тощо, яким штучно надаються феримагнітні властивості, для використання у сучасних біотехнологіях водоочистки.

Отримано патент України на корисну модель № 101016, МПК (2006.01) C02F 1/48 «Спосіб отримання магнітокерованого біосорбенту» (Опубл. 25.08.2015, бюл. № 16.).

Створений біосорбент використовується в м. Славутич, Київська обл., а саме в хіміко-аналітичній лабораторії комунального підприємства «Управління житлово-комунального господарства» для видалення іонів заліза, фосфатів та важких металів. Отримано акт впровадження (№ 27 від 6 лютого 2017 р.).

Результати дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі в дисциплінах «Програмні засоби промислової біотехнології» для студентів напряму підготовки 6.051401 – біотехнологія та «Основи використання високоградієнтної магнітної сепарації в біології та медицині» для студентів напряму підготовки 8.05140102 – молекулярна біотехнологія.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом проведено критичний аналіз стану проблеми за даними наукової літератури та патентного пошуку, визначено завдання роботи, що дозволило обґрунтувати параметри та методи дослідження, узагальнити напрацьовані дані.

Особисто здобувачем узагальнено літературні та напрацьовано експериментальні дані, оформлено результати роботи у вигляді статей, патентів на корисну модель, тез доповідей. Науковий керівник д.т.н., проф. С.В. Горобець поставила завдання та брала участь в аналізі даних досліджень, у роботі над публікаціями, в узагальненні результатів, формулюванні висновків.

Дослідження сорбційної здатності магнітоміченого біосорбенту було проведено спільно з начальником лабораторії хіміко-аналітичного контролю

Ковальовим О.В. на базі комунального підприємства «Управління житлово-комунального господарства» м. Славутич.

Дослідження на растровому електронному мікроскопі були проведені у співпраці з к.ф.-м.н. Шпетним І.О. Дослідження феромагнітного резонансу було проведено у співпраці з д.ф.-м.н. Голубом В.О.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації доповідались та обговорювались на: VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2012); VIII International Conference «Microbial biotechnology: activities and future» (Kyiv – 2012); III Международной интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2013); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2013); International Conference “Functional Materials, ICFM (Yalta 2013); Двадцять третій всеукраїнській науково-практичній конференції "Інноваційний потенціал світової науки - XXI сторіччя" (Київ, 2013); X міжнародній науково-практичній інтернет конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки на початку третього тисячоліття у країнах Європи та Азії» (2015); IX Всеукраїнській науково – практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвячена 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (Київ, 2015).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 22 наукові праці, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 статті у виданнях іноземних держав, 3 статті у виданнях України, що включені до наукометричних баз, 1 патент на корисну модель, 14 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів досліджень з їх обговоренням, заключення, висновків, списку використаних джерел наукової літератури (186 посилань). Робота викладена на 159 сторінках та проілюстрована 45 рисунками та 13 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, сформульовані мета та завдання роботи, визначено об'єкт, предмет і методи досліджень, сформульовано наукову новизну, практичне значення одержаних результатів та особистий внесок здобувача. Надано відомості про апробацію результатів дисертації, публікації та структуру дисертаційної роботи.

Перший розділ дисертації містить аналітичний огляд методів штучного та природнього магнітомічення біооб'єктів.

Здійснено аналіз літературних джерел щодо біомінералізації БМН для низки живих організмів. Природні штами мікроорганізмів (гриби, бактерії), що здатні до біомінералізації БМН, можна використовувати в якості: біосорбентів, для вилучення з водних розчинів іонів важких металів; векторів, для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та біологічно активних речовин та ін.

На основі аналізу існуючих методів штучного магнітомічення мікроорганізмів з'ясовано, що при використанні цих методів, відбувається кластеризація композитів біооб'єкт-магнітні наночастинки, а також

спостерігається нерівномірність магнітомічення.

Виявлено, що вищепераховані недоліки характерні при магнітоміченні мікроорганізмів, які використовуються як для доставки лікарських препаратів, так і в якості біосорбентів для вилучення іонів важких металів з розчинів.

Зроблено висновок, що для мікроорганізмів, які не мають природних феримагнітних властивостей, необхідно створювати нові методи магнітомічення, позбавлені зазначених недоліків.

У другому розділі дисертаційної роботи описано характеристики об'єктів і методів дослідження.

Для підтвердження єдиного механізму біомінералізації БМН та пошуку потенційних продуцентів, що їх синтезують, використовували програму «BLAST on-line» ресурсу Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm>).

Описано розроблену схему експериментальної установки для гомогенного магнітомічення мікроорганізмів на основі магнітогідродинамічного перемішування у схрещених електричному і магнітному полях (рис.1). Установка складається з комірки (1) з електродами (2, 3), джерела живлення постійного струму (4), універсального вимірювального приладу (5), перемикача полярності електродів (6) і магнітної системи (7).

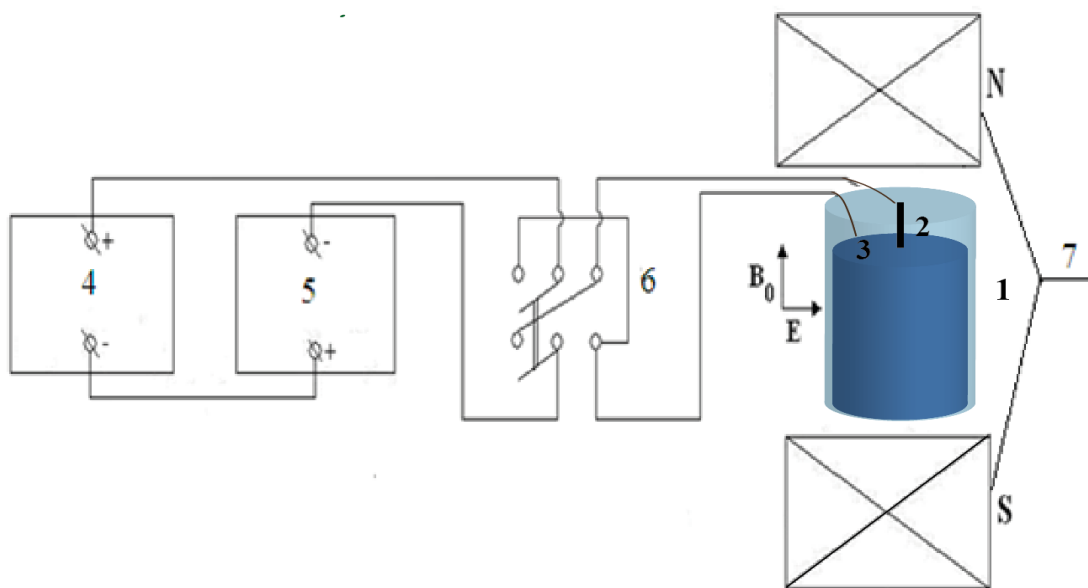


Рис. 1 – Схема експериментальної установки для гомогенного магнітомічення клітин дріжджів на основі магнітогідродинамічного перемішування у зовнішніх електричному і магнітному полях.

Перевірку ефективності розробленого методу проводили на моделі дріжджів *S. cerevisiae* (надалі – біосорбент), які всебічно вивчені та використовуються в якості біосорбенту для очистки стічних вод від іонів важких металів. Для перевірки сорбційної здатності магнітоміченого біосорбенту використовували водний розчин CuSO_4 , та перевіряли залишкову концентрацію іонів Cu^{2+} в розчині.

Для встановлення оптимальних параметрів процесу магнітомічення (напруженість зовнішнього магнітного та електричного поля, тривалість процесу

магнітомічення, величина рН, раціональне співвідношення магнітні мітки-біосорбент), в роботі використовувались методи математичного аналізу, методи оптичної мікроскопії, растрової електронної мікроскопії, магнітної силової мікроскопії, атомно-силової мікроскопії, метод електронного парамагнітного резонансу.

Третій розділ дисертації містить аналіз та виявлення мікроорганізмів, які здатні до формування внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних магнітних наночастинок, кристалічної та аморфної структури, формування ланцюжків БМН або їх відсутності.

Методами біоінформатики для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій – MamA, MamB, MamM, MamE, MamO та MamN, без яких не може відбуватися синтез БМН, визначено гомологи у анаеробних бактерій з різним типом дихання та грибів.

Методами порівняльної геноміки встановлено, що серед низки анаеробних мікроорганізмів присутні мікроорганізми з природним магнітоміченням, а також визначено потенційних продуцентів БМН серед анаеробів з нітратним, сульфатним, карбонатним, фумаратним та іншим типом дихання.

Гіпотезу про можливу гомологію підтверджено на основі оцінки статистичної значимості відповідних вирівнювань за діапазоном значень *E*-числа, відсоткового вмісту ідентичних амінокислотних залишків та збігу відомих функцій білків гомологів.

Генетичний аналіз показав, що біомінералізація БМН у анаеробних мікроорганізмів можлива за відсутності білку mamN. Проведеними дослідженнями доведено, що гомологи білку MamA відіграють транспортну роль, виступаючи носіями іонів Fe^{2+} або хелатів через клітинну мембрану мікроорганізмів, що формують внутрішньоклітинні кристалічні БМН. За відсутності цього білку відбувається формування аморфних БМН всередині клітини. Також в роботі встановлено, що при відсутності білків mamE, mamO мікроорганізми здатні формувати кристалічні БМН на поверхні клітини.

При порівнянні всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій з білками грибів, виявилось, що значимі вирівнювання були знайдені лише у представників вищих грибів (*Dikarya*): аскомікотових і базидіомікотових грибів (табл. 1).

В результаті аналізу було виявлено, що лише білки магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій mamA, mamB та mamM мають гомологічні білки у грибів, що характеризуються спільними відомими функціями та є незамінними в процесі біомінералізації.

Отже додатково підтверджено наявність єдиного генетичного механізму біомінералізації БМН у прокариотів та еукаріотів, заснованого на наборі гомологів білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких біомінералізація БМН у цих бактеріях є неможливою. Цей основний набір містить такі білки, як mamA, mamB, mamM, mamE, mamO, mamN, серед яких mamB і mamM є транспортерами (переносниками) іонів двовалентних металів Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} та ін.

Значимі вирівнювання між білками магнітосомного острівця магнітотаксисної бактерії *M. Gryphiswaldense* та білками грибів

Мікроорганізм	Е-число (I, %)				
	Білки <i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1				
	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE
<i>Fusarium oxysporum</i>	1·10 ⁻⁷ (21%)	2·10 ⁻¹⁰ (22%)	8·10 ⁻¹¹ (25%)	0.16 -	0.56 (27%)
<i>Verticillium dahliae</i>	4·10 ⁻⁶ (24%)	4·10 ⁻¹⁸ (25%)	4·10 ⁻¹⁴ (27%)	2.2 -	1.2 -
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	1·10 ⁻⁶ (23%)	6·10 ⁻²⁰ (26%)	3·10 ⁻²² (27%)	0.59 (25%)	4.5 (31%)

В четвертому розділі досліджено мікроорганізми, що є продуцентами БМН та є перспективними у використанні як векторів для доставки лікарських засобів.

Для виявлення генетичної основи механізму біомінералізації БМН в патогенних, умовно-патогенних та бактеріальних симбіонтів людини (табл. 2 та 3), геноми яких повністю секвеновано, для виявлення нових потенційних продуцентів БМН, які мають природні феримагнітні властивості, для застосування в якості векторів для доставки лікарських препаратів, здійснено вирівнювання послідовностей амінокислотних залишків білків біомінералізації БМН магнітотаксисних бактерій, та білків вказаних організмів.

Дані біоінформаційного аналізу (табл.2) свідчать, що синтезувати кристалічний наномагнетит здатні такі мікроорганізми різних таксономічних груп: *Escherichia coli* 541-15, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Clostridium perfringens* str. 13, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium perfringens* SM10, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* LMA3984-4, *Listeria monocytogenes* serotype 4b str. F2365, *Serratia marcescens* WW4, *Serratia marcescens* FGI94, *Clostridium novyi* NT, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Clostridium perfringens* E88, *Bacteroides* sp. 3_1_19, *Bacillus subtilis* BSn5, *Bacillus cereus* VD131, *Peptostreptococcus anaerobius* VPI 4330.

Порівняння білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків бактеріальних симбіонтів людини

Штам мікроорганізмів	Е-число (I, %)					
	Білки <i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
* <i>L. fermentum</i> (IFO 3956)	6-04 (28%)	2e-05 25%	6e-10 27%	1e-09 29%	1e-25 41%	5e-11 24%
<i>Bacteroides</i> (sp. 3_1_19)	1e-07 27%	2e-39 29%	7e-33 30%	6e-15 29%	2e-35 46%	2e-07 26%
<i>C. perfringens</i> (E88)	5e-12 33%	3e-43 32%	2e-37 31%	4e-14 29%	2e-35 45%	6e-14 28%

* <i>B. subtilis</i> (BSn5)	1e-07 25%	4e-45 33%	8e-32 31%	6e-06 25%	5e-33 39%	6e-11 25%
<i>B. cereus</i> (VD131)	2e-05 27%	5e-40 31%	8e-32 31%	3e-06 25%	2e-25 39%	1e-11 25%
* <i>L. plantarum</i> (JDM1)	0,035 28%	6e-05 37%	4e-07 25%	7e-06 26%	7e-26 40%	5e-12 26%
<i>L. acidophilus</i> (30SC)	0,002 23%	2e-11 24%	4e-12 24%	3e-06 25%	3e-23 39%	1e-13 28%
<i>Propionibacterium</i> (F0230a)	0.086 39%	5e-17 27%	6e-21 25%	1e-06 25%	6e-18 37%	0,003 27%
<i>Peptostreptococcus</i> (VPI 4330)	0.056 31%	7e-14 27%	1e-12 30%	2e-06 24%	5e-26 41%	2e-07 25%
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	4,0 (29 %)	1e-07 (23 %)	1e-08 (21 %)	0,017 (26 %)	2e-25 (26 %)	8e-07 (26 %)

*Мікроорганізми, в яких експериментально знайдено БМН

Проведений біоінформаційний аналіз (табл. 3) ступеню гомології білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій з білками патогенних, умовно-патогенних та симбіотичних мікроорганізмів людини показав, що такі представники як *Staphylococcus aureus* RF122, *Pseudomonas aeruginosa* M18, *Streptococcus suis* BM407, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella pneumoniae* RYC492, *Escherichia coli* MS69-1, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Clostridium sporogenes* PA 3679, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* str. LT2, *Mycobacterium bovis* BCG str. Korea 1168P, *Lactobacillus. plantarum* JDM1, *Lactobacillus. acidophilus* 30SC, *Propionibacterium propionicum* F0230a, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, є потенційними продуцентами аморфних БМН.

Встановлено, що білок matA та його близькі гомологи у бактеріальних симбіонтів людини відповідають за синтез (формування) кристалічної структури біогенних магнітних наночастинок.

Теоретично доведено, що для цільової доставки протипухлинних препаратів як вектори можуть використовуватися не тільки штучно магнітомічені вектори-мікроорганізми, але й мікроорганізми з природними феримагнітними властивостями, що зробить метод цільової доставки препаратів надійнішим та ефективним, зменшить його вартість. Це підтверджено експериментально в роботі [O. Felfoul, 2016], в якій описано використання в якості вектора для цільової доставки лікарських препаратів до пухлини бактерію *Magnetococcus marinus* штам MC-1.

У п'ятому розділі дисертаційної роботи аналізується накопичення мікроорганізмів на поверхні пухлин та їх взаємодія із залізовмісними компонентами крові у кровотоці. Зокрема доводиться, що така взаємодія відбувається в тому числі, за рахунок сили магнітодипольної взаємодії між ендogenous частинками магнетиту пухлинних клітин та ендogenous частинками магнетиту мікроорганізмів. Розрахована сила магнітодипольної взаємодії (10^{-9} Н) яка має величину близьку до відомих сил специфічного зв'язування антиген-антитіло. Величину цієї сили важливо враховувати та використовувати при проектуванні систем для доставки лікарських форм. Сила

магнітодипольної взаємодії є фактором специфічного магнітного зв'язування між біосорбентом – транспортером лікувально-профілактичних речовин, та клітинами мішені, забезпечуючи цільову доставку.

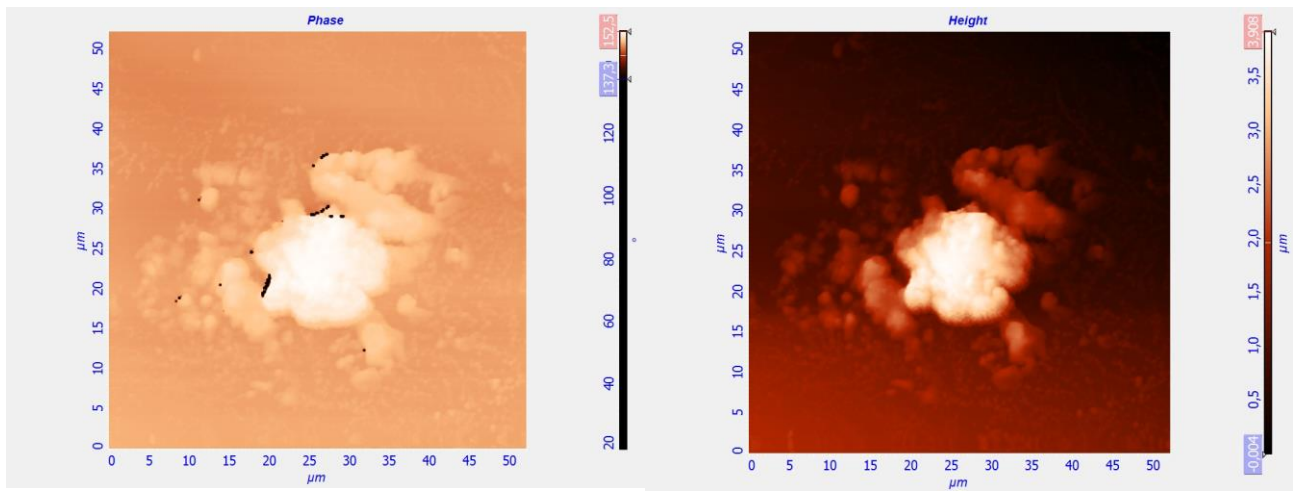
Таблиця 3

Порівняння білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів – векторів для доставки лікарських препаратів

Штам мікроорганізмів	Е-число (I, %)					
	Білки <i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	MamM	MamK	MamO	MamE
<i>C. perfringens</i> SM101	2e-05 (24 %)	1e-33 (27 %)	9e-31 (28 %)	3e-14 (28 %)	4e-31 (37 %)	4e-10 (25 %)
<i>V. cholerae</i> O1	1e-05 (26 %)	6e-17 (25 %)	8e-14 (23 %)	0,001 (24 %)	2e-37 (46 %)	5e-11 (28 %)
<i>V. cholerae</i> LMA3984-4	2e-06 (26 %)	3e-16 (24 %)	1e-14 (22 %)	6e-04 (24 %)	2e-22 (39 %)	3e-05 (28 %)
<i>L. monocytogenes</i> serotype 4b str. F2365	1e-06 (23 %)	5e-31 (28 %)	2e-30 (32 %)	4e-13 (27 %)	4e-21 (39 %)	5e-05 (32 %)
<i>S. marcescens</i> WW4	2e-04 (27 %)	4e-22 (30 %)	8e-15 (25 %)	8e-06 (25 %)	6e-36 (41 %)	1e-09 (27 %)
<i>S. marcescens</i> FGI94	3e-05 (36 %)	5e-19 (25 %)	4e-16 (25 %)	4e-05 (25 %)	4e-36 (39 %)	5e-13 (28 %)
<i>C. novyi</i> NT	9e-05 (23 %)	4e-36 (27 %)	9e-29 (31 %)	2e-14 (28 %)	3e-30 (38 %)	2e-08 (27 %)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	2e-10 (31 %)	2e-31 (24 %)	2e-28 (24 %)	8e-14 (26 %)	4e-32 (46 %)	4e-09 (27 %)
* <i>S. pyogenes</i> NZ131	0,46 (28 %)	1e-21 (23 %)	1e-23 (25 %)	0,65 (24 %)	2e-26 (25 %)	3e-04 (24 %)
<i>E. coli</i> MS69-1	0,001 (25 %)	7e-18 (28 %)	2e-13 (23 %)	7e-06 (25 %)	1e-36 (39 %)	2e-12 (29 %)
<i>C. sporogenes</i> PA 3679	0,004 (28 %)	2e-42 (28 %)	5e-39 (31 %)	1e-15 (28 %)	3e-22 (42 %)	2e-05 (26 %)
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> str. LT2	0,007 (34 %)	5e-19 (28 %)	1e-14 (23 %)	8e-06 (25 %)	3e-34 (44 %)	1e-12 (29 %)
<i>M. bovis</i> BCG str. Korea 1168P	0,56 (34 %)	6e-27 (28 %)	6e-15 (27 %)	0,37 (24 %)	1e-28 (43 %)	9e-10 (26 %)

*Мікроорганізми, в яких експериментально знайдено БМН
 __мікроорганізми, які вже використовуються як вектори

Так як ендогенні магнітні наночастинки в пухлинних клітинах локалізовані у вигляді довгих ланцюгів (рис.2), і оскільки в більшості випадків екзогенні магнітні наночастинки локалізовані теж у вигляді ланцюгів у складі лікарської форми, було розраховано силу взаємодії між ними для такої моделі (рис. 3).



А)

Б)

Рис. 2 – Зображення ланцюжків магнітних наночастинок в клітинах карциноми Ерліха, підданій впливу магнітного поля: АСМ (А) та МСМ (Б)

Вихідні дані для розрахунку:

- Намагніченість магнетиту – $M_0 = 477$ од СГСМ;
- Діаметр БМН в пухлині – 40-100 нм;
- Діаметр БМН бактеріальних векторів – 10-50 нм;
- Товщина мембрани – 10 нм.

На рис. 3 зображено два ланцюги, що містять магнітні наночастинок пухлинної тканини та магнітоліпосоми, або бактерії з БМН. Частинок знаходяться на відстані l_0 одна від одної та зміщені на відстань Δ і мають радіус r_0 .

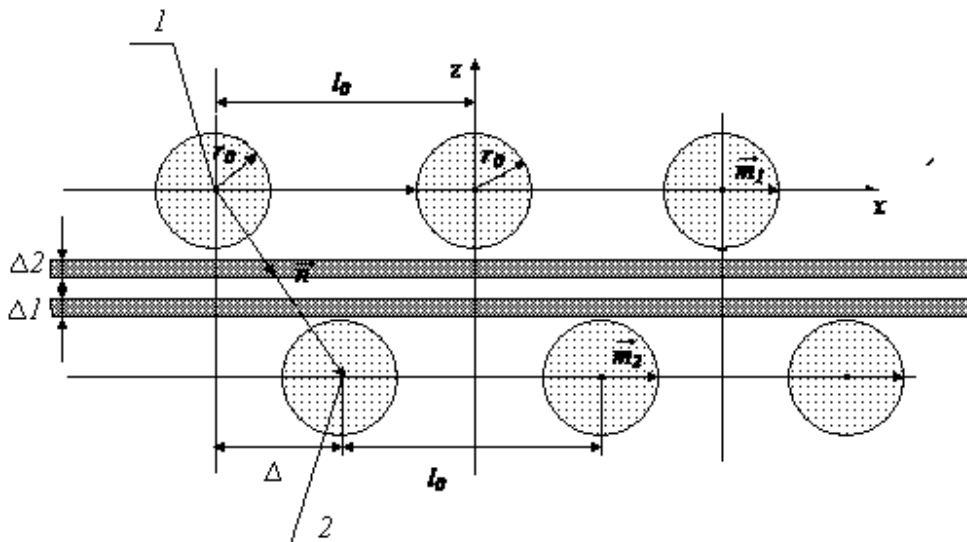


Рис. 3 – Модель взаємодії екзогенних частинок магнітоліпосоми та ендогенних частинок пухлини. 1 - ендогенна магнітна наночастинка в пухлинних клітинах, 2 - екзогенна магнітна наночастилка магнітоліпосоми, Δ_1 – товщина мембрани магнітоліпосоми, Δ_2 - товщина мембрани пухлинної клітини, $\Delta = \Delta_1 + \Delta_2$

Енергія магнітної частинки в другому ланцюгу з магнітним моментом \vec{m}_2 в магнітному полі, що створене магнітною частинкою першого ланцюга з магнітним моментом \vec{m}_1 :

$$U = -\vec{m}_2 \vec{H}_1 \quad (1)$$

де $H_1 = \frac{3(\vec{m}_1 \vec{n})\vec{n} - \vec{m}_1}{r^3}$ – магнітне поле, яке створене магнітною частинкою першого ланцюга з магнітним моментом \vec{m}_1 , де $\vec{n} = (1,0,0)$.

З цього слідує:

$$U = -\left\{ \frac{3(\vec{m}_1 \vec{n})(\vec{m}_2 \vec{n}) - \vec{m}_1 \vec{m}_2}{r^3} \right\} \quad (2)$$

Враховуючи, що сила $\vec{F} = -gradU$, отримаємо силу взаємодії двох магнітних частинок з 1-го та 2-го ланцюга:

$$\vec{F} = grad \left\{ \frac{3(\vec{m}_1 \vec{n})(\vec{m}_2 \vec{n}) - \vec{m}_1 \vec{m}_2}{r^3} \right\} \quad (3)$$

$$\text{де } |m_1| = |m_2| = M_0 \left(\frac{4}{3} \pi \cdot r_0^3 \right) \quad (4)$$

де M_0 – намагніченість магнітної частинки, r_0 – радіус частинки.

Сила взаємодії всіх частинок ланцюгу має вигляд:

$$\vec{F}_{sum} = \sum_{n=-N}^N \vec{F} \quad (5)$$

де N – кількість найближчих сусідів, взаємодію з якими враховано.

В результаті розрахунку отримано величину сили, яка дорівнює приблизно 10^{-9} Н, що має близький порядок величини до сил специфічного зв'язування антиген-антитіло, і при певних умовах навіть перевищує останні.

Побудовано графіки залежності розрахованої сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів, або штучними магнітними наночастинками магнітоліпосом в залежності від розміру та кількості БМН (рис. 4).

У шостому розділі описано розроблений новий спосіб гомогенного магнітомічення мікроорганізмів та наведено результати експериментальної перевірки його ефективності на моделі дріжджів *S. cerevisiae*, які не мають природних феримагнітних властивостей, але широко використовуються для вилучення з водних розчинів іонів важких металів, барвників тощо і є ефективним біосорбентом біологічної природи.

Використовували метод отримання магнітоміченого біосорбенту на основі магнітогідродинамічного перемішування клітин дріжджів *S. cerevisiae* та наночастинок магнетиту в схрещених магнітному та електричному полях. Визначено оптимальний час перемішування, напруженість магнітного та електричного поля, при якому не руйнується клітинна стінка дріжджів та не відбувається процес сорбції-десорбції магнітних наночастинок, які використовуються для надання біосорбенту магнітних властивостей.

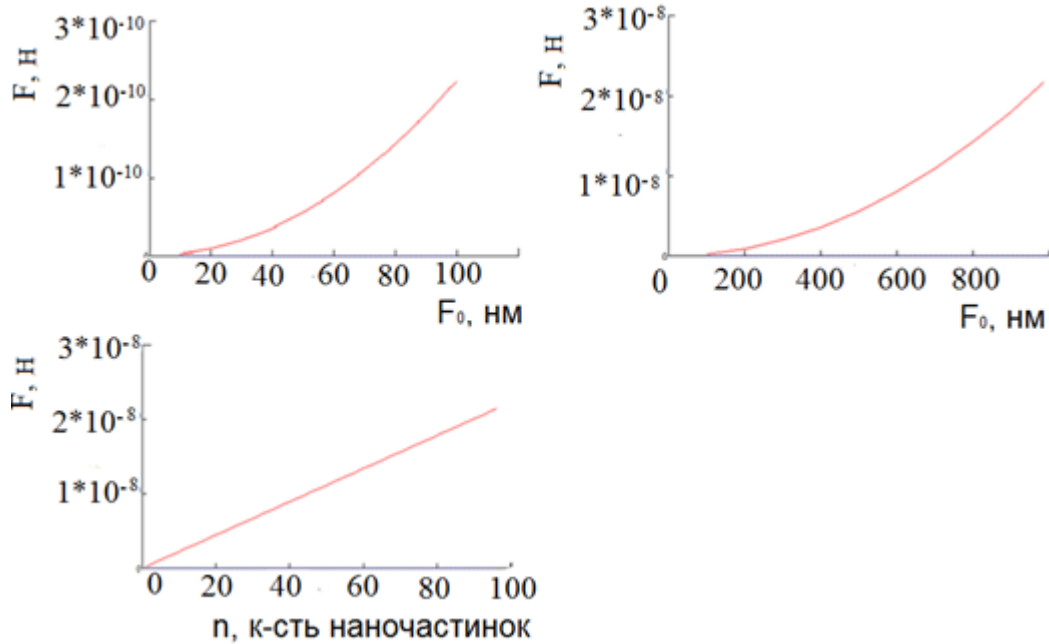


Рис. 4 – Залежність сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів, або штучними магнітними наночастинками магнітоліпосом від: а) радіусу наночастинок (10-100 нм); б) (100-1000 нм); в) кількості наночастинок.

- *Визначення оптимального часу приготування магнітоміченого біосорбенту*

Після отримання магнітоміченого біосорбенту вищеописаним методом перевіряли стійкість його магнітної сприйнятливості під час імітованої сорбції для встановлення оптимального часу перемішування.

Зниження магнітної сприйнятливості біосорбенту спостерігається на 8 хвилині його перемішування, що говорить про те, що при такому часі приготування біосорбенту за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, втрачається стійкість його магнітних властивостей. Тобто після 6-7 хвилин перемішування біосорбенту змінюється морфологія клітин (рис. 5).

Для підтвердження цих даних була виміряна магнітна сприйнятливість біосорбентів, виготовлених методом магнітогідродинамічного перемішування при 2, 4, 6, 8, 10, 30 хвилинах перемішування (рис.6).

Зниження магнітної сприйнятливості біосорбенту, спостерігається на 8-й хвилині його перемішування, що говорить про те, що при такому часі приготування біосорбенту, за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, втрачається стійкість його магнітних властивостей. Таким чином, оптимальний час для отримання магнітоміченого біосорбенту за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, з точки зору стабільності магнітних властивостей, складає 6 хвилин, так як такий біосорбент є найбільш стабільним і десорбція магнітних наноміток практично не відбувається.

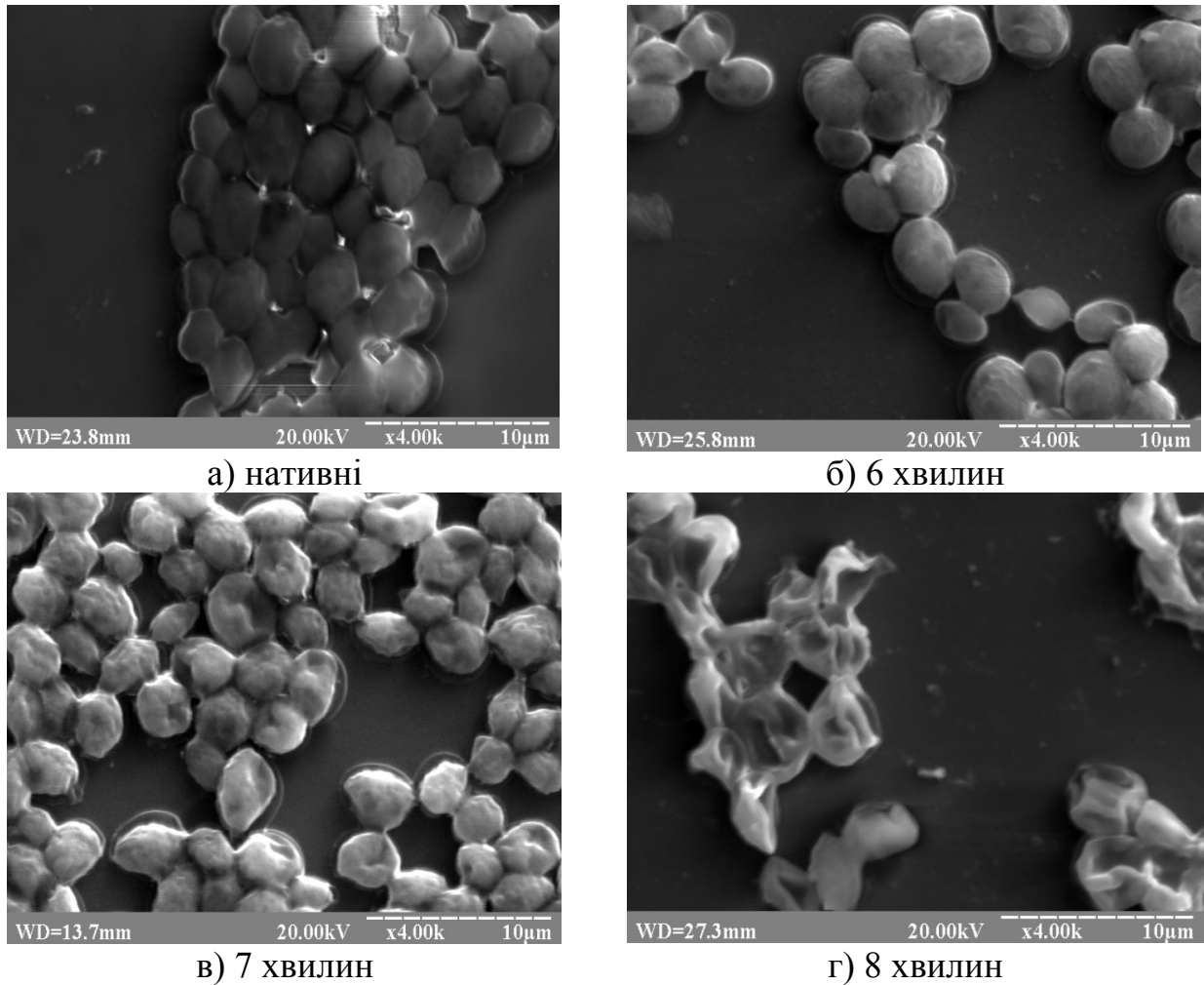


Рис. 5 – Електронно-мікроскопічне зображення клітин магнітоміченого біосорбенту, отриманих за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях при різному часі перемішування.

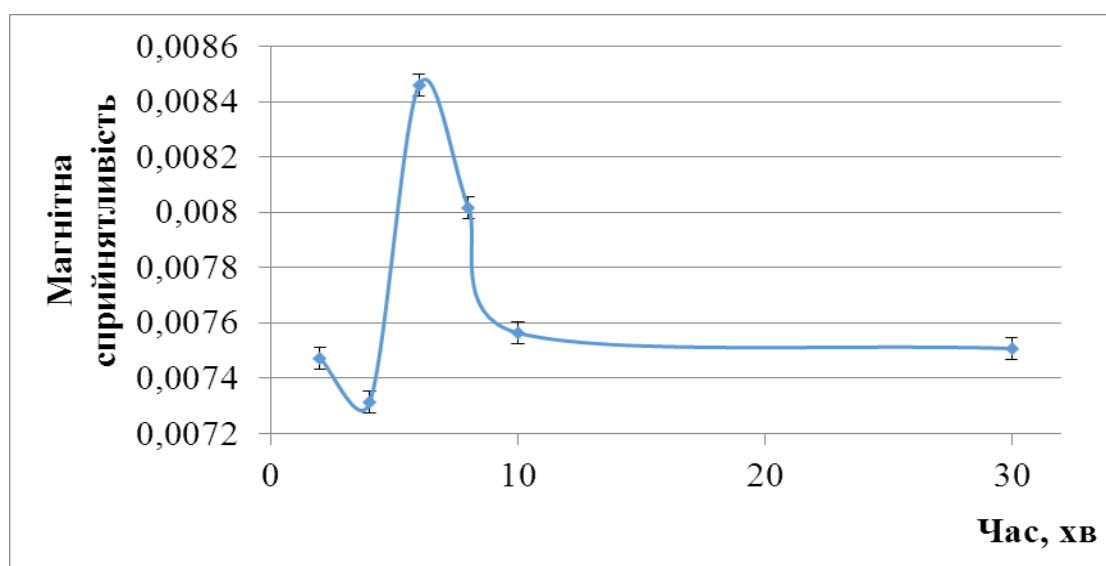


Рис. 6 – Динаміка зміни магнітної сприйнятливості магнітоміченого біосорбенту на основі дріжджів *S. cerevisiae*, виготовлених методом магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях.

- *Визначення оптимального рН розчину та величини електричного поля*

З метою оптимізації процесу магнітогідродинамічного перемішування для інтенсифікації процесу сорбції іонів Cu^{2+} , досліджували параметри, за яких сорбційна здатність дріжджів за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях була б максимальною. Для цього проводили дослідження залежності концентрації катіонів Cu^{2+} від часу сорбції за різного рН розчину та величини електричного поля.

Модифікація біосорбенту відбувалось під дією магнітного поля, напруженістю 240 кА/м. Досліджували сорбційну здатність магнітокерованого біосорбенту, виготовленого при рН 2,5; рН 3; рН 4 та величини електричного поля від 0,3 до 0,7 В.

Проведені дослідження показали, що при рН 2,5 максимальне вилучення катіонів Cu^{2+} відбувається вже через 10 хвилин, на відміну від рН 3 та рН 4, тобто при підвищенні рН необхідно збільшувати час перемішування магнітоміченого біосорбенту з середовищем, що очищується.

Максимальна сорбційна здатність магнітоміченого біосорбенту спостерігається при $U=0,5$ В та рН 2,5, отже таке значення рН є оптимальним для виготовлення магнітоміченого біосорбенту.

- *Визначення оптимального співвідношення маси магнітних наночастинок до маси біосорбенту*

Також досліджено ступінь вилучення катіонів Cu^{2+} магнітоміченим біосорбентом в залежності від співвідношення маси магнітних наночастинок до маси біосорбенту у діапазоні відношення маси магнітних міток до маси біосорбенту на моделі дріжджів *S. cerevisiae* $m_m / m_{др} = 1-10\%$ (рис. 7).

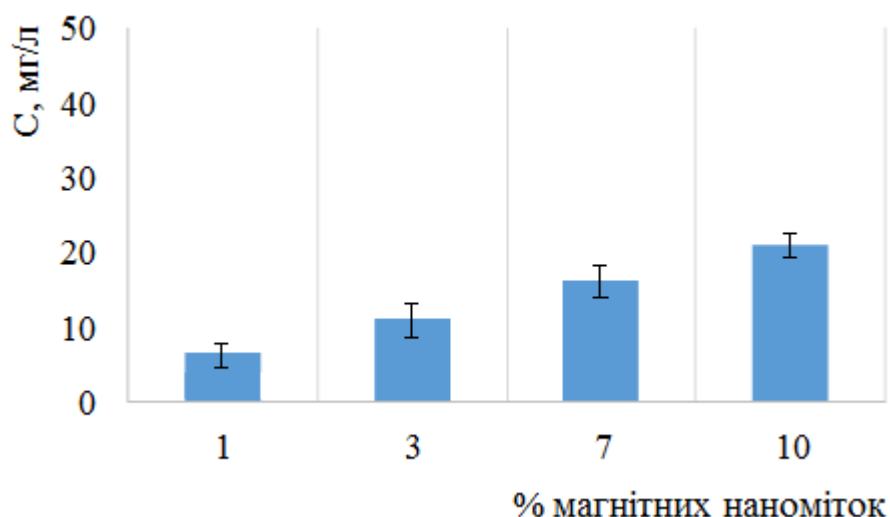


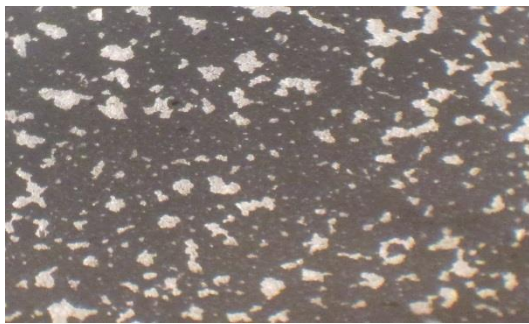
Рис. 7 – Залишкова концентрація катіонів Cu^{2+} в розчині після проведення сорбції магнітоміченими дріжджами *S. cerevisiae* в залежності від різного співвідношення наномітки-біосорбент

У випадку співвідношення мас 1% максимальна сорбційна здатність магнітомічених дріжджів складає 85% і є найбільшою серед представлених та

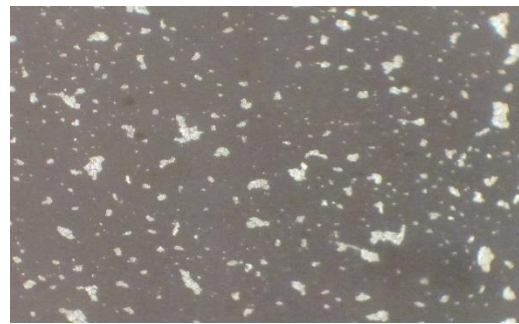
практично не відрізняється від сорбційної здатності нативних дріжджів.

- Дослідження кластеризації магнітоміченого біосорбенту, отриманого при механічному та магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещених магнітному та електричному полях

Досліджено зразки магнітоміченого біосорбенту, отриманого методом механічного перемішування та за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях. Сорбент, отриманий за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, майже не схильний до кластеризації, тобто має більшу площу поверхні, де звільняються сайти зв'язування для іонів важких металів, ніж магнітомічений біосорбент, отриманий при механічному перемішуванні, який утворює кластери, що добре видно з рис. 8. При механічному перемішуванні кластеризація магнітоміченого біосорбенту значно вища, ніж за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях.



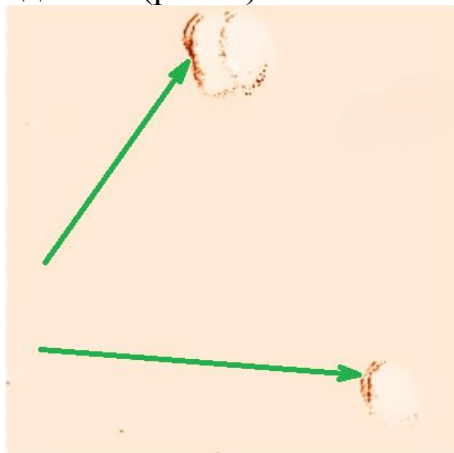
А)



Б)

Рис. 8 – Зображення оптичної мікроскопії магнітоміченого біосорбенту: А) механічне перемішування (1% магнетиту); Б) магнітогідродинамічне перемішування в схрещених електричному і магнітному полях (1% магнетиту)

Розроблений метод дозволяє наблизити якість магнітомічення до природнього (рис. 9)



А)



Б)

Рис. 9 – Ланцюжок магнітних наночастинок у А) дріжджів *S. cerevisiae* магнітоміченого методом магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях ; Б) магнітотаксисних бактерій

ВИСНОВКИ

Результатом проведеної роботи є розробка науково обґрунтованих біотехнологій магнітомічення мікроорганізмів та їх практичне використання.

З одержаних результатів можна зробити такі висновки:

1. Із застосуванням методів порівняльної геноміки визначено сукупність мікроорганізмів з природним магнітоміченням у множинах патогенних, умовно-патогенних, симбіотичних бактерій людини, анаеробних мікроорганізмів з різним типом дихання та грибів, що дозволило підтвердити єдиний механізм біомінералізації БМН для представників трьох надцарств живих організмів.
2. Виявлено, що систематизація мікроорганізмів з природним магнітоміченням серед патогенних, умовно-патогенних та симбіотичних бактерій людини може здійснюватись за наявності або відсутності кристалічної структури та локалізацією утворень БМН на такі 4 групи: внутрішньо-клітинні кристалічні, внутрішньо-клітинні аморфні, зовнішньо-клітинні кристалічні та зовнішньо-клітинні аморфні.
3. Теоретичними розрахунками визначено кількість (10-100 наночастинок) та характерні розміри штучних (40-100 нм) та природних магнітних наночастинок (10-50 нм), при яких сила магнітодипольної взаємодії між ланцюжками магнітних наночастинок в магнітомічених біооб'єктах та БМН в пухлинних клітинах становить 10^{-9} Н, і на порядок перевищує сили теплового руйнування комплексів.
4. Експериментально доведено, що розроблена технологія гомогенного магнітомічення за магнітогідродинамічного перемішування у схрещених електричному і магнітному полях, значно переважає за відповідними показниками відомі технології отримання магнітомічених біосорбентів за рахунок зменшення кластеризації біосорбенту.
5. Встановлено раціональні технологічні параметри: рН 2,5; $U = 0,5$ В; $I = 240$ кА/м; $t = 6$ хв, та розроблено технологічну схему отримання магнітоміченого біосорбенту.
6. Експериментально показано, що сорбційна здатність магнітоміченого біосорбенту відносно катіонів Cu^{2+} , виготовленого за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, на 30% більше, ніж у магнітоміченого біосорбенту, виготовленого методом механічного перемішування.

СПИСОК ОПЕБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Горобець С.В. Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей біогенних магнітних наночастинок у магнітотаксисних бактерій і людини / [С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Д.В. Сівенок, Ю.М. Чиж] // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2012. – №3. – 2012. – С.18–23. *(Журнал входить до міжнародних наукометричних баз EBSCO, Index Copernicus, PIIIC).*

Здобувачем проведено біоінформаційний аналіз гомологів білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій з білками людини методом порівняльної геноміки.

2. Gorobets S.V. Fractal dimension and magnetic susceptibility of magnetically labeled biosorbent based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast / [S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, O.V. Kovalyov, A.V. Sopina, Yu.M. Chyzh, S.V. Cherepov] // Functional materials. – 2015.–№ 2(22). – P. 193-198. **(Журнал входить до міжнародної наукометричної бази Scopus).**

*Здобувачем досліджено магнітну сприйнятливість та фрактальну розмірність модифікованого магнітокерованого біосорбенту на основі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, отриманого за магнітогідродинамічного методу перемішування дріжджової суспензії з частинками наномагнетиту.*

3. Горобець С.В. Ефективність магнітокерованого біосорбенту на основі дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* для очищення стічних вод / [С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, О.В. Ковальов, В.І. Желева, І.О. Шпетний] // Наукові вісті НТУУ “КПІ”. – 2015.–№3. – С. 1–9 **(Журнал входить до міжнародних наукометричних баз EBSCO, Index Copernicus, РІНЦ).**

*Здобувачем досліджено ефективність вилучення іонів Cu^{2+} магнітокерованим біосорбентом на основі дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* методом магнітогідродинамічного перемішування (МГДП) у схрещених електричному та магнітному полях та встановлено технологічні параметри процесу.*

4. Gorobets S.V. Magnetic dipole interaction of endogenous magnetic nanoparticles with magnetoliposomes for targeted drug delivery / [S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, Yu.M. Chyzh, D.V. Sivenok] // Biophysics. – 2013.– V.58(3). – P. 379 –384. **(Іноземне видання, Росія).**

Здобувачем розраховано силу магнітодипольної взаємодії між біогенними магнітними наночастинками пухлинних клітин та біогенними магнітними наночастинками штучних магнітоносіїв.

5. Gorobets S. Analysis of effectiveness of magnetically labeled biosorbent obtained throught the mechanical and magnetohydrodynamic stirring / [S. , O. Gorobets, Yu. Chyzh, O. Kovalev, V. Perizhok, V. Golub] // EUREKA: Physics and Engineering. – 2016. – №5. – P. 37 – 43. **(Іноземне видання, Естонія).**

Здобувачем визначено вплив різного співвідношення магнітних наночастинок і клітин дріжджів на величину магнітної сприйнятливості, проведено дослідження сорбційної ємності біосорбенту, проведено пасивну і активну сорбцію.

6. Горобець С.В. Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу наномагнетиту у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмів / [С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, І.В. Дем'яненко] // Вісник Національного чернівецького університету. Біологічні системи. – 2013. – №5(2). – С.274 –280.

Здобувачем виявлено гомологів у анаеробних організмів для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

7. Горобець С.В. Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей біогенних магнітних наночастинок у грибів / [С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж] // Вісник Національного чернівецького університету. Біологічні системи. – 2013. – №5(2). – С.143–148.

Здобувачем виявлено гомологів у грибів для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

8. Горобець С.В. Біомінералізація магнітних наночастинок бактеріальними симбіонтами людини / [С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, К.О. Бутенко] // Медичні перспективи. – 2014. – №2(19). – С.4–12.

Здобувачем проведено біоінформаційний аналіз та показано, що мікроорганізми з природними магнітними властивостями можна використовувати в якості векторів для доставки лікарських препаратів.

9. Патент Україну на корисну модель № 101016, МПК (2006.01) C02F 1/48. Спосіб отримання магнітокерованого біосорбенту / Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М., Ковальов О.В.; Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут». – № u201500909; Заявл. 05.02.2015; Опубл. 25.08.2015, бюл. № 16.

Здобувачем досліджено біосорбент, виготовлений новим методом магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях.

10. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Сівенок Д.В., Чиж Ю.М. Генетична регуляція біомінералізації магнітних наночастинок // Біотехнологія XXI століття: Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції (5 квітня 2012 р., м. Київ). – 2012. – С. 141-143.

Здобувачем досліджено основні білки магнітосомного острівця, без яких не відбувається біомінералізація біогенних магнітних наночастинок.

11. Горобець С.В., Чиж Ю.М. Вивчення впливу магнітного поля на формування магнітосом магнітотаксисних бактерій // Біотехнологія XXI століття: Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції (5 квітня 2012 р., м.Київ). – 2012. – С. 150-151.

Здобувачем досліджено процес біомінералізації біогенних магнітних наночастинок в залежності від величини зовнішнього магнітного поля.

12. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М., Дем'яненко І.В. Біоінформаційний аналіз білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій та білків анаеробів // VIII International Conference. Microbial biotechnology: activities and future. Conference of student and aspirants master (Kyiv). – 2012. – С.97 – 98.

Здобувачем виявлено гомологів у анаеробних організмів для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

13. Горобец С.В., Горобец О.Ю., Чиж Ю.Н., Демьяненко И.В. Генетический контроль биоминерализации магнетита в прокариотах и эукариотах // III Международная интернет-конференция «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань). – 2013. – С.104–106.

Здобувачем виявлено єдиний механізм біомінералізації для всіх трьох царств живих організмів, заснований на генах, що походять від спільного предка.

14. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М. Біоінформаційний аналіз білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій та білків грибів // VII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття». НТУУ «КПІ». (Київ, 24 квітня 2013 р.). – 2013. – С. 114-115.

Здобувачем виявлено гомологів у грибів для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

15. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М., Дем'яненко І.В. Біоінформаційний аналіз білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій та білків анаеробів // VII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття». НТУУ «КПІ». (Київ, 24 квітня 2013 р.). – 2013. – С. 115 –116.

Здобувачем виявлено гомологів у анаеробних організмів для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

16. Горобець С.В., Чиж Ю.М., Дем'яненко І.В., Шемендюк О.В., Панченко О.С., Нежива К.С. Біомінералізація магнітних наночастинок у тварин // VII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття». НТУУ «КПІ». (Київ, 24 квітня 2013 р.). – 2013. – С. 127–128.

Здобувачем виявлено гомологів у тварин для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

17. Горобець С.В., Чиж Ю.М., Рибальченко Є.М, Форостянка В.С. Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей біогенних наночасток у архей // VII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 24 квітня 2013 р.). – 2013. – С. 129–130.

Здобувачем виявлено гомологів у архей для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

18. Gorobets S.V., Gorobets O.Yu., Chyzh Yu.M., Bytenko K.O. Biomineralization magnetic nanoparticles by human's bacterial symbionts // International Conference “Functional Materials, ICFM‘2013” (Crimea, Yalta, 29 September 2013).–2013.– P.457.

Здобувачем виявлено гомологів у бактеріальних симбіонтів людини для всіх білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

19. Горобець С.В., Горобець О.Ю., Дем'яненко І.В., Чиж Ю.М., Заїка А.М. Біомінералізація біогенних магнітних наночастинок у ціанобактерій // Двадцять третя всеукраїнська науково-практична конференція

"Інноваційний потенціал світової науки - XXI " (10–15 грудня 2013 р.) – 2013. – С. 18

Здобувачем виявлено гомологів у ціанобактерій для всіх білків магнітосомного острівця магнітоаксисних бактерій, без яких не може відбуватися синтез біогенного магнетиту.

20. Горобець С.В., Бутенко К.О., Чиж Ю.М. Використання гіпертермії для мікроорганізмів – збудників запальних процесів // X міжнародна науково-практична інтернет конференція «Проблеми та перспективи розвитку науки на початку третього тисячоліття у країнах Європи та Азії» (30 – 31 січня 2015 р.). – 2015.

Здобувачем пояснено накопичення мікроорганізмів в ураженій тканині при запальних процесах.

21. Горобець С.В., Чиж Ю.М., Ковальов О.В., Шпетний І.О. Ефективність магнітокерowanego біосорбенту на основі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для очищення стічних вод // «Біотехнологія XXI століття»: тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченій 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (Київ, 24 квітня 2015р.). – С. 120-121

Здобувачем встановлено, що при виготовленні магнітокерowanego біосорбенту методом магнітогідродинамічного перемішування, магнітна сприйнятливість на 30% більша, ніж при механічному перемішуванні.

22. Горобець С.В., Ковальов О.В., Чиж Ю.М. Отримання сухого магнітокерowanego біосорбенту на основі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для очищення стічних вод // «Біотехнологія XXI століття»: тези доповідей IX Всеукраїнської науково – практичної конференції присвяченій 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (Київ, 24 квітня 2015р.). – С. 116

Здобувачем встановлено оптимальні параметри для отримання сухого магнітокерowanego біосорбенту.

АНОТАЦІЯ

Чиж Ю.М. Біотехнології на основі магнітомічення мікроорганізмів. –

На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, м. Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена обґрунтуванню природного магнітомічення біооб'єктів та розробці біотехнології штучного гомогенного магнітомічення мікроорганізмів на моделі клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, оснований на магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещених електричному і магнітному полях.

Виявлено мікроорганізми з феримагнітними властивостями, що можуть використовуватися в якості векторів для доставки лікарських препаратів до пухлини. Розраховано силу магнітодипольної взаємодії між ланцюжками магнітних наночастинок в магнітомічених біооб'єктах та біогенними

магнітними наночастинками в пухлинних клітинах, що становить порядку 10^{-9} Н і близька до сил зв'язування антиген-антитіло.

Розроблено технологічну схему отримання магнітоміченого біосорбенту. Встановлено оптимальні технологічні параметри: рН 2,5; $U = 0,5$ В; $t = 6$ хв, $H = 240$ кА/м.

Експериментально показано, що сорбційна ємність магнітоміченого біосорбенту, виготовленого на основі магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, на 30% більше, ніж у магнітомічених біосорбентів, виготовлених іншими методами.

Ключові слова: біогенні магнітні наночастинки, магнітомічення, сила магнітодипольної взаємодії, магнітогідродинамічне перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*.

АННОТАЦІЯ

Чиж Ю.Н. Биотехнологии на основе магнитомечения микроорганизмов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, г. Киев, 2017.

Диссертация посвящена обоснованию природного магнитомечения биообъектов и разработке биотехнологии искусственного гомогенного магнитомечения микроорганизмов на модели клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, основанной на магнитогидродинамическом перемешивании в скрещенных электрическом и магнитном полях. Так как анализ существующих методов искусственного магнитомечения микроорганизмов показал, что при использовании этих методов, происходит высокая кластеризация композитов биообъект – магнитные наночастицы, а также наблюдается неравномерность магнитомечения.

Обнаружены микроорганизмы с феримагнитными свойствами среди патогенных, условно – патогенных и бактериальных симбионтов человека, которые могут использоваться в качестве векторов для доставки лекарственных препаратов к опухоли. Генетический анализ показал, что биоминерализация БМН возможна при отсутствии белка mamN. Проведенными исследованиями доказано, что гомологи белка MamA играют транспортную роль, выступая носителями ионов Fe^{2+} или хелатов через клеточную мембрану микроорганизмов, формирующих внутриклеточные кристаллические БМН. При отсутствии этого белка происходит формирование аморфных БМН внутри клетки.

В работе объясняется накопление микроорганизмов на поверхности опухолей, что происходит за счет силы магнитодипольного взаимодействия между эндогенными наночастицами магнетита опухолевых клеток и эндогенными наночастицами магнетита микроорганизмов, и имеет близкий порядок величины к силам специфического связывания антиген-антитело, поэтому ее важно учитывать и использовать при проектировании систем для доставки лекарственных форм.

Впервые показано, что для целевой доставки противоопухолевых препаратов в качестве векторов могут использоваться не только искусственно магнитомеченые вектор-микроорганизмы, но и микроорганизмы с естественными магнитными свойствами, что делает метод целевой доставки препаратов надежным, эффективным и уменьшит его дороговизну.

Рассчитано силу магнитодипольного взаимодействия между цепочками магнитных наночастиц в магнитомеченых биообъектах и биогенными магнитными наночастицами в опухолевых клетках, которая составляет порядка 10^{-9} Н и близка к силам связывания антиген-антитело.

Установлены оптимальные технологические параметры: рН 2,5; $U = 0,5$ В; $H = 240$ кА/м; $t = 6$ мин и разработана технологическая схема получения магнитомеченого биосорбента.

Исследованы образцы магнитомеченого биосорбента, полученного методом механического перемешивания и методом магнитогидродинамического перемешивания в скрещенных электрическом и магнитном полях. Сорбент, полученный при магнитогидродинамическом перемешивании в скрещенных электрическом и магнитном полях, почти не подвержен кластеризации, то есть имеет большую площадь поверхности, где освобождаются сайты связывания для ионов тяжелых металлов, чем магнитомеченый биосорбент, полученный при механическом перемешивании, который образует кластеры. Разработанный метод позволит приблизить качество магнитомеченного к природному.

Экспериментально показано, что сорбционная емкость магнитомеченого биосорбента, изготовленного на основе магнитогидродинамического перемешивания в скрещенных электрическом и магнитном полях, на 30% больше, чем в магнитомеченых биосорбентах, изготовленных другими методами.

Ключевые слова: биогенные магнитные наночастицы, магнитомечение, сила магнитодипольного взаимодействия, магнитогидродинамическое перемешивание в скрещенных электрическом и магнитном полях, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMMARY

Chyzh Y.M. Biotechnologies-based on magnetically labeling of microorganisms. – Manuscript.

Thesis for a candidate degree in speciality 03.00.20 - biotechnology. – National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", m. Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to the substantiation of natural magnetically labeled of biological objects and the development of biotechnology of artificial magnetically labeled of microorganisms on the model yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*, based on magnetohydrodynamic stirring in crossed electric and magnetic fields.

Microorganisms with properties that can be used as vectors to deliver drugs to tumors was detected. Force of magnetic dipole-dipole interaction between chains of magnetic nanoparticles in biological objects and chains of biogenic magnetic nanoparticles in tumor cells was calculated, which is about 10^{-9} N and is close to the forces binding antigen-antibody.

Technological scheme of receiving magnetically labeled biosorbent was developed. The optimal process parameters was found: pH 2.5; $U = 0,5 \text{ V}$; $t = 6 \text{ min}$, $H = 240\text{kA/m}$.

Experimentally shown that the sorption ability of magnetically labeled biosorbent based on magnetohydrodynamic stirring in crossed electric and magnetic fields, on 30% more than in magnetically labeled biosorbents produced by other methods.

Key words: biogenic magnetic nanoparticles, magnetic labeling, magnetic dipole-dipole interaction force, magnetohydrodynamic stirring in crossed electric and magnetic fields, yeast *Saccharomyces cerevisiae*.