

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
Міністерство освіти і науки України

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУЛАЄВСЬКА МАРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 602.44+537.621+591.67

ДИСЕРТАЦІЯ
БІОТЕХНОЛОГІЇ ШТУЧНОГО МАГНІТОМІЧЕННЯ ТА ПРИРОДНЕ
МАГНІТОМІЧЕННЯ КЛІТИН ТВАРИН

162 «Біотехнології та біоінженерія»
16 «Хімічна та біоінженерія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М. О. Булаєвська

Науковий керівник: Горобець Світлана Василівна, доктор технічних наук,
професор.

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Булаєвська М. О. Біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин тварин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія». – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2021.

Робота виконана на кафедрі біоінформатики КПІ ім. Ігоря Сікорського.

На сьогодні біогенні магнітні наночастинки (БМН) виявлено у представників усіх трьох надцарств живих організмів: Прокаріоти, Археї та Еукаріоти. У більшості філогенетичних груп тварин, які належать до багатоклітинних еукаріотичних організмів, визначено біомінералізовані БМН, зокрема у комах, амфібій та рептилій, птахів, а також ссавців. Біогенні магнітні наночастинки знайдено також у нормальних тканинах мозку, печінки, серця, селезінки, надниркових залоз та решітчастої кістки людини.

Наявність БМН вивчали, в основному, з точки зору орієнтації організмів в зовнішньому магнітному полі Землі. Ідея про магнітотаксис була дуже прогресивною і сприяла тому, що в багатьох наукових центрах світу розпочалися інтенсивні дослідження цього явища в різних мікроорганізмах. Зокрема дослідження самого процесу створення таких природних магнітів, у тому числі на генетичному рівні.

Після того ж, як БМН було виявлено в багатоклітинних організмах, ідею про магнітотаксис, як основну їх функцію, було трансформовано в ідею про важливу роль БМН у магніторецепції (відчутті організмами магнітних полів, у тому числі магнітного поля Землі). Ідею магніторецепції глибоко вивчали і продовжують вивчати, але однозначного експериментального підтвердження знайдено не було – навіть під час дослідження орієнтації перелітних птахів у геомагнітному полі, не кажучи вже про людину.

На цей час залишається відкритим питання, які ще біологічні функції, крім навігації та магніторецепції, можуть мати БМН як у магнітотаксисних бактерій, так і у інших організмів.

Вже понад 30 років увагу дослідників привертає фізіологічне походження БМН в органах та тканинах тварин. Ця проблема є дуже важливою, оскільки, наприклад, підвищений рівень БМН пов'язаний із низкою захворювань людини.

Дослідження механізмів синтезу БМН у різних організмах має важливе фундаментальне значення для визначення ролі БМН в патогенезі захворювань людини, які супроводжуються підвищенням їх вмісту. В свою чергу, магнітомічені клітини використовують у дослідженнях цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та як біосорбенти.

На даний час є докладні дослідження біомінералізації БМН мікроорганізмами, але що стосується багатоклітинних організмів, то наявні лише фрагментарні дослідження біомінералізації біогенних магнітних наночастинок.

Магнітні наночастинок знаходять все ширше біомедичне застосування: від контрастних агентів для магнітної резонансної томографії (МРТ) до досліджень знищення ракових клітин за допомогою лікування гіпертермією. Більшість з цих перспективних програм вимагає чітко визначених і керованих взаємодій між магнітними наночастинками і живими клітинами.

В зв'язку з цим актуальною задачею є дослідження наноструктурної локалізації БМН, їх морфології та кількості в різних органах та тканинах тварин, а також дослідження накопичення штучних магнітних наночастинок.

Мета роботи – теоретичне обґрунтування та експериментальне дослідження біотехнології штучного магнітомічення та природного магнітомічення клітин тварин.

Для досягнення мети роботи були поставлені такі *завдання*.

1. Виявити можливих продуцентів БМН серед немігруючих риб, використовуючи методи порівняльної геноміки.

2. Встановити наявність БМН в органах та тканинах миші *Mus musculus*, свині *Sus domestica*, коропа *Cyprinus carpio* та данію *Danio rerio*.

3. Визначити основні закономірності просторово-морфологічних властивостей БМН у різних тканинах і органах тварин та встановити відповідність з рослинами й грибами.

4. Провести дослідження накопичення магнітних наночастинок в органах данію реріо *Danio rerio* в процесі штучного магнітомічення.

5. Розробити технологію виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями.

6. Розрахувати сили взаємодії між біогенними магнітними наночастинками та штучними магнітними наночастинками.

Об'єкт дослідження – біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин у тварин, геноми та протеоми тварин в базі даних GenBank, органи та тканини тварин, біомаса магнітомічених клітин органів тварин.

Предмет дослідження – закономірності природного та штучного магнітомічення клітин тварин.

Методи дослідження: біоінформатичні (методи порівняльної геноміки), фізико-хімічні (світлова мікроскопія, електронний парамагнітний резонанс, скануюча зондова мікроскопія, методи виготовлення магнітних наноміток, рН-метрія, термометрія), біологічні (цитологічні методи, гістологічні методи), математичні (математична статистика, математичне моделювання).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше за допомогою біоінформатичних методів показано, що немігруючі риби можуть бути продуцентами біогенних магнітних наночастинок. Вперше методами електронного парамагнітного резонансу та магнітно-силової мікроскопії продемонстровано наявність біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах як мігруючих, так і немігруючих риб. Вперше показано, що БМН в органах та тканинах тварин локалізовані в провідних тканинах, так само, як у рослин та грибів. Вперше продемонстровано накопичення магнітних наночастинок в мозку, серці, печінці й нирках риб *Danio rerio* за умови штучного магнітомічення, та лише часткове їх виведення.

Практичне значення отриманих результатів. Показане у роботі накопичення штучних магнітних наночастинок у різних органах тварин важливо враховувати у разі діагностики за допомогою МРТ з використанням контрастних речовин та у разі цілеспрямованої доставки лікарських препаратів за допомогою векторів, що містять магнітні наночастинок. Показано можливість застосування системи двох постійних магнітів зі щілиною для детекції та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями.

Результати роботи впроваджено у навчальний процес у КПІ ім. Ігоря Сікорського, а саме: у викладання дисципліни «Основи біоінформатики» для студентів спеціальності 133 – Галузеве машинобудування та дисципліни «Науково-практичні основи біоінформатики» для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія на кафедрі біоінформатики.

За допомогою біоінформатичних методів в роботі показано, що серед немігруючих риб продуцентами БМН можуть бути короп звичайний (*Cyprinus carpio*) та щука звичайна (*Esox lucius*).

Досліджено органи та тканини лосося атлантичного *Salmo salar* та товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix* на предмет наявності БМН. В результаті аналізу спектрів магнітного резонансу показано, що ширина спектру сигналу решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного є однаковою. Ширина сигналу магнітного резонансу характеризує типи взаємодій, які існують між феромагнітними частинками та їх оточенням. Отже, однакова ширина піків спектрів магнітного резонансу свідчить про те, що у складі решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного наявні БМН. Максимальний розмір БМН у решітчастих кістках досліджуваних риб має однаковий порядок величини. Так само і кількість магнітних наночастинок у ланцюжках. В середньому ланцюжки БМН, які були детектовані за допомогою магнітно-силової мікроскопії, в решітчастих кістках риб, містять по 6 ± 1 магнітних наночастинок.

Визначено основні закономірності просторово-морфологічних властивостей БМН у різних тканинах та органах миші *Mus musculus*, свині *Sus domestica*, коропа *Cyprinus carpio* та показано, що:

- БМН в досліджуваних органах багатоклітинних організмів утворюють ланцюжки;
- БМН в багатоклітинних організмах входять до складу їх провідної системи.

Так, БМН у тварин розміщені в стінках капілярів (всі досліджені органи і тканини, окрім решітчастої кістки) або в околі капілярів (решітчаста кістка). БМН у рослин розміщені в стінці провідної тканини, а саме в стінці ситовидних трубок флоєми. БМН в грибах розташовані в стінці провідної тканини, а саме в стінках судиноподібних гіфів. Така локалізація БМН свідчить на користь ідеї, що ланцюжки БМН можуть бути задіяні в трофічних процесах.

Досліджено процес штучного магнітомічення клітин тварин та встановлено поступове збільшення кількості структурних елементів, які дають позитивну реакцію Перлса, на 1 добу, 7 добу, 14 добу та 28 добу експерименту в мозку, серці, печінці та нирках, що свідчить про накопичення екзогенних магнітних наночастинок переважно в тих органах, в яких показано наявність біогенних магнітних наночастинок. Через 28 діб після завершення введення штучних магнітних наночастинок *Danio rerio*, на 56 добу експерименту, кількість структурних елементів в досліджуваних органах, які дають позитивну реакцію Перлса було дещо меншою, ніж на 7, 14 та 28 добу експерименту, проте вищою у порівнянні з контролем.

Аналогічні результати отримано під час визначення магнітофоретичної рухливості. На 1 добу, 7 добу, 14 добу, 28 добу спостерігалось зростання магнітофоретичної рухливості кластерів клітин усіх досліджуваних органів *Danio rerio*. На 56 добу експерименту, через 28 діб після завершення перорального введення магнітних наночастинок, спостерігалось незначне зменшення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин мозку, серця, печінки та нирок, яке однак не досягало контрольного рівня. Отже, відбувалося лише часткове виведення штучно введених ззовні магнітних наночастинок з

досліджуваних органів. Отримані дані слід враховувати у разі використання екзогенних магнітних наночастинок з діагностичною та лікувальною метою.

Запропоновано спосіб виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями, який дає змогу зменшити витрати часу на виявлення та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями за рахунок використання системи магнітів зі щілиною, яка має більш просту конструкцію порівняно з аналогами. Такий спосіб дає змогу працювати як з сухою біомасою клітин, так і з суспензією, що є важливим для застосувань в біонанотехнологіях.

Розраховано сили магнітодипольної взаємодії, що виникають між біогенними магнітними наночастинок органів риб та екзогенними магнітними наночастинок, які знаходяться в діапазоні від 10^{-11} Н до 10^{-10} Н. Завдяки магнітодипольній взаємодії відбувається накопичення введених магнітних наночастинок в мозку, серці, печінці та нирках риб, що може зумовлювати зміни метаболічних процесів в них.

Особистий внесок здобувача. Результати наукової роботи, які викладено в дисертації, одержані автором особисто або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проведено спільно із науковим керівником. Дослідження біологічних зразків із застосуванням магніторезонансної спектроскопії проводили спільно з д. ф.-м. н., с. н. с. В. О. Голубом. Дослідження біологічних зразків із застосуванням атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії проводили спільно з к. т. н. І. В. Шарай. Розрахунки сили магніто-дипольної взаємодії між біогенними магнітними наночастинок та штучно введеними магнітними наночастинок здійснювали спільно з д. ф.-м. н., проф. О. Ю. Горобець. Особисто автором описано результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковим керівником сформульовано висновки.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 29 наукових праць: 1 стаття у періодичному науковому виданні держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу, 3 статті у

виданнях, які цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 2 статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, 23 тез доповідей.

Ключові слова: біогенні магнітні наночастинки, біотехнологія штучного магнітомічення, магнетит, магнітна сепарація, феримагнітні органели, атомно-силова мікроскопія, магнітно-силова мікроскопія, електронний парамагнітний резонанс, наноструктурна локалізація, біоінформатичний аналіз.

SUMMARY

Bulaievska M. Biotechnology of artificial magnetic labeling and natural magnetic labeling of animal cells. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for candidate of Doctor of Philosophy the degree in the specialty 162 Biotechnology and Bioengineering. – National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

The work was done at the Department of Bioinformatics Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute.

To date, biogenic magnetic nanoparticles (BMNs) have been found in representatives of all three superkingdoms of living organisms: Prokaryotes, Archaea, and Eukaryotes. Most phylogenetic groups of animals belonging to multicellular eukaryotic organisms are capable of biomineralization of BMNs, including insects, amphibians and reptiles, birds, and mammals. Biogenic magnetic nanoparticles have also been found in normal tissues of the brain, liver, heart, spleen, adrenal glands, and human ethmoid bone.

The presence of BMNs was studied mainly in terms of the orientation of organisms in the Earth's external magnetic field. The idea of magnetotaxis was very progressive and contributed to the fact that in many scientific centers around the world began intensive research into this phenomenon in various microorganisms. In particular, the study of the process of creating such natural magnets, including at the genetic level.

After BMNs was discovered in multicellular organisms, the idea of magnetotaxis as their main function was transformed into the idea of the important role of BMNs in magnetoreception (organisms' perception of magnetic fields, including the Earth's magnetic field). The idea of magnetoreception has been deeply studied and continues to be studied, but no unequivocal experimental confirmation has been found – even in

the study of the orientation of migratory birds in the geomagnetic field, let alone humans.

Today, the question remains as to what other biological functions, in addition to navigation and magnetoreception, have BMNs in both magnetotactic bacteria and other organisms.

For more than 30 years, researchers have been attracted by the physiological origin of BMNs in the organs and tissues of animals. This problem is very important because, for example, elevated BMN levels are associated with a number of human diseases.

The study of the mechanisms of BMN synthesis in different organisms is of fundamental importance for determining the role of BMNs in the pathogenesis of human diseases, which are accompanied by an increase in their content. In turn, magnetic labeled cells are used for targeted drug delivery and as biosorbents.

Currently, there are detailed studies of the biomineralization of BMNs by microorganisms, but for multicellular organisms, there are only fragmentary studies of the biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles.

Magnetic nanoparticles are increasingly used in biomedical applications, from contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) to the destruction of cancer cells through treatment with hyperthermia. Most of these promising programs require well-defined and controlled interactions between magnetic nanoparticles and living cells.

In this regard, the urgent task is to study the nanostructural localization of BMNs, their morphology and quantity in various organs and tissues of animals, as well as to study the accumulation of artificial magnetic nanoparticles.

The purpose of the work is theoretical substantiation and experimental research of biotechnology of artificial magnetic labeling and natural magnetic labeling of animal cells.

To achieve the goal of the work, the following *tasks* were set.

1. To identify possible producers of BMNs among animals, namely non-migratory fishes, using methods of comparative genomics.

2. To establish the presence of BMNs in the organs and tissues of the mouse *Mus musculus*, pig *Sus domestica*, carp *Cyprinus carpio* and zebrafish *Danio rerio*.

3. To determine the basic patterns of spatial and morphological properties of BMNs in various tissues and organs of animals and to establish compliance with plants and fungi.

4. To study the accumulation of magnetic nanoparticles in the organs of *Danio rerio* in the process of artificial magnetic labeling.

5. To develop technology for isolating cells with natural and artificial para-, ferri-, or ferromagnetic properties.

6. To calculate the forces of interaction between biogenic magnetic nanoparticles and artificial magnetic nanoparticles.

The object of research is biotechnologies of artificial magnetic labeling and natural magnetic labeling of cells in animals, genomes and proteomes of animals in the GenBank database, organs and tissues of animals, biomass of magnetic labeled cells of animal organs.

The subject of research is the laws of natural and artificial magnetic labeling of animal cells.

Research methods: bioinformatics (methods of comparative genomics), physicochemical (light microscopy, electron paramagnetic resonance, scanning probe microscopy, methods of making magnetic nanolabels, pH metry, thermometry), biological methods (cytological methods, histological methods), mathematical (mathematical statistics, mathematical modeling).

Scientific novelty of the obtained results. It was first shown by bioinformatics methods that non-migratory fishes are producers of biogenic magnetic nanoparticles. For the first time, the presence of biogenic magnetic nanoparticles in the organs and tissues of both migratory and non-migratory fishes was demonstrated by the methods of electron paramagnetic resonance and magnetic force microscopy. For the first time it was shown that BMNs in organs and tissues of animals are localized in conductive tissues, as well as in plants and fungi. For the first time, the accumulation of magnetic nanoparticles in the brain, heart, liver and kidneys of fish *Danio rerio* has been

demonstrated under the condition of artificial magnetic labeling, and only their partial excretion.

The practical significance of the results. It is important to take into account the accumulation of artificial magnetic nanoparticles in various organs of animals in the case of diagnosis by MRI using contrast agents and in the case of targeted drug delivery using vectors containing magnetic nanoparticles. The possibility of using a system of two permanent magnets with a slit for detection and isolation of cells with natural and artificial para-, ferri-, or ferromagnetic properties is shown.

The results of the work are implemented in the educational process of Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, namely: in teaching the course «Fundamentals of Bioinformatics» for students in specialty 133 – Industrial Engineering and the course «Scientific and Practical Fundamentals of Bioinformatics» for students in specialty 162 – Biotechnology and Bioengineering at the Department of Bioinformatics.

Using bioinformatics methods, it was shown that among animals, namely non-migratory fishes, the producers of BMNs are common carp (*Cyprinus carpio*) and northern pike (*Esox lucius*).

Organs and tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) were examined for the presence of BMNs. The analysis of MR spectra showed that the width of the peaks of the ethmoid bone of silver carp and the ethmoid bone of Atlantic salmon is the same. The signal width characterizes the types of interactions that exist between ferrimagnetic particles and their environment. Thus, the same width of the peaks of the MR spectra indicates that the ethmoid bone of silver carp and the ethmoid bone of Atlantic salmon contain BMNs. The maximum size of BMNs in the ethmoid bones of the studied fishes is of the same order of magnitude. So is the number of magnetic nanoparticles in the chains. On average, in the chains of BMNs, which were detected by magnetic force microscopy, in the ethmoid bones of fishes, 6 ± 1 magnetic nanoparticles.

The main regularities of spatial and morphological properties of BMNs in different tissues and organs of animals are determined and it is shown that:

- BMNs in the organs of multicellular organisms form chains;

– BMNs in multicellular organisms are part of the transport system.

Thus, BMNs in animals are located in the walls of capillaries (all studied organs and tissues except the ethmoid bone) or in the vicinity of capillaries (ethmoid bone). BMNs in plants are located in the wall of the conductive tissue, namely in the wall of the sieve-like tubes of the phloem. BMNs in fungi are located in the wall of the conductive tissue, namely in the walls of vascular hyphae. This localization of BMNs suggests the idea that BMNs chains are directly involved in metabolic processes and perform vital functions.

The process of artificial magnetic labeling of animal cells was studied and a gradual increase in the number of structural elements that give a positive Perls Prussian blue reaction on day 1, day 7, day 14 and day 28 of the experiment in the brain, heart, liver and kidneys, indicating the accumulation of exogenous magnetic nanoparticles in those organs in which the presence of biogenic magnetic nanoparticles is shown. 28 days after the end of the administration of *Danio rerio* artificial magnetic nanoparticles, on the 56th day of the experiment, the number of structural elements in the studied organs that give a positive Perls Prussian blue reaction is slightly less than on the 7th, 14th and 28th day of the experiment, but remains higher than control.

Similar results were obtained when determining the magnetophoretic mobility. On day 1, day 7, day 14, and day 28, an increase in the magnetophoretic mobility of cell clusters of all *Danio rerio* organs was observed. On day 56 of the experiment, 28 days after completion of oral administration of magnetic nanoparticles, there was a slight decrease in the magnetophoretic mobility of clusters of brain, heart, liver and kidney cells, which, however, did not reach the control level. Thus, there was only a partial removal of artificially introduced from the outside magnetic nanoparticles from the studied organs. The obtained data should be taken into account in the case of using exogenous magnetic nanoparticles for diagnostic and therapeutic purposes.

A method for detecting and isolating cells with natural and artificial magnetic properties is proposed, which reduces the time spent on detecting and isolating cells with natural and artificial para-, ferri-, or ferromagnetic properties by using a system of magnets with a slit that has a simpler design in comparable to analogues. It is also

possible to work with both dry cell biomass and suspension, which is important for applications in bionanotechnology.

The forces of magnetodipole interaction arising between biogenic magnetic nanoparticles of fish organs and exogenous magnetic nanoparticles, which are in the range from 10^{-11} N to 10^{-10} N, are calculated. Due to the magnetodipole interaction, the introduced magnetic nanoparticles accumulate in the brain, heart, liver and kidneys of fishes, which can cause changes in metabolic processes in them.

Personal contribution of the applicant. The results of scientific work, which are presented in the thesis, obtained by the author personally or with her scientific advisor participation. The planning of the experimental work was carried out jointly with the supervisors. Studies of biological samples using magnetic resonance spectroscopy were performed in conjunction with V. Golub. Studies of biological samples using atomic force microscopy and magnetic force microscopy were performed in conjunction with I. Sharay. Calculations of the strength of the magnetic dipole-dipole interaction between BMNs and artificially introduced magnetic nanoparticles were carried out jointly with O. Gorobets. The author personally describes the results of research, conducted their analysis and discussion. Conclusions are formulated together with the scientific advisor.

29 scientific works were published on the topic of the dissertation: 1 article in a periodical scientific publication of the state, which is a member of the Organization for Economic Cooperation and Development and the European Union, 3 articles in publications cited in the scientific-metric database SCOPUS; 2 articles in scientific publications included in the list of scientific professional publications of Ukraine, 23 theses reports at national and international conferences.

Key words: biogenic magnetic nanoparticles, biotechnology of artificial magnetic labeling, magnetism, magnetite, magnetic separation, ferrimagnetic organelles, atomic force microscopy, magnetic force microscopy, electron paramagnetic resonance, nanostructured localization, bioinformatics analysis.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Кігель Н. Ф., Горобець С. В., Булаєвська М. О., Гнатюк А. О., Голуб В. О. Метод детекції біогенних магнітних наночастинок у біологічному матеріалі різної природи // Продовольчі ресурси: зб. наук. пр. / НААН України; Ін-т прод. ресурсів НААН України. – К.: ННЦ «ІАЕ», 2016. – № 7, С. 33–37. *(Особистий внесок здобувача: брала участь в аналізі наукової літератури, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*
2. Горобець С. В., Кравченко О. В., Булаєвська М. О., Панченко О. С. Потенційні продуценти біогенних магнітних наночастинок серед залізо- та марганецьокиснюючих бактерій // Innovative Biosystems and Bioengineering, 2018. – Vol.2. – № 2. – P. 27–35. DOI: 10.20535/ibb.2018.2.2.124256 *(Особистий внесок здобувача: брала участь в аналізі наукової літератури, проведенні біоінформатичного аналізу, обробці результатів, підготовці статті до друку)*

Статті у наукових виданнях інших держав

3. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievskia M.**, Sharay I. Detection of Biogenic Magnetic Nanoparticles in Ethmoid Bones of Migratory and Non-migratory Fishes // SN Applied Sciences. – 2019. – 1: 63. <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0072-1> (Switzerland, ISSN 2523-3971) *(Особистий внесок здобувача: брала участь в аналізі наукової літератури, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*

Статті у закордонних виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus

4. Gorobets S., Gorobets O., Golub V., **Gromnadska M.** Ferromagnetic resonance in the ethmoid bones of salmon and silver carp // IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series. – 2017. – Vol. 903. – 012001. DOI: 10.1088/1742-6596/903/1/012001 (United Kingdom, ISSN: 1742-6596) *(Особистий внесок здобувача: брала участь в аналізі наукової літератури, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*

експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)

5. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievskia M.**, Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes // Acta Physica Polonica A. – 2018. – No. 3. – Vol. 133. – P. 734-737. DOI: 10.12693/APhysPolA.133.734 (Poland, ISSN 05874246) *(Особистий внесок здобувача: брала участь в аналізі наукової літератури, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*
6. Gorobets S., Gorobets O., Gorobets Yu., **Bulaievskia M.** Ferrimagnetic organelles in multicellular organisms. arXiv:1811.06717 [q-bio.TO] – Bioelectromagnetics. – 2021. *(Особистий внесок здобувача: брала участь в аналізі наукової літератури, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*

Тези доповідей

7. **Громнадська М. О.**, Горобець С. В., Голуб В. О. ФМР спектр решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга, 22 квітня 2016, Київ. – С. 121. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту, обробці отриманих результатів та написанні тез)*
8. Gorobets S. V., Gorobets O. Yu., Golub V. O., **Gromnadska M.** Ferromagnetic resonance in the ethmoid bones of salmon and silver carp // Joint European Magnetic Symposia (JEMS), 21-26 August 2016, Glasgow, UK. Poster Session B. Nanoparticles and interfases, nanomaterials and molecular magnetism. – PS.2.043. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
9. **Булаєвська М. О.**, Гетманенко К. А., Мікешина Г. І., Шарай І. В. Детекція біогенних магнітних наночастинок в грибах *Agaricus bisporus var. bisporus* // XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI

століття», 21 квітня 2017, Київ. – С. 89. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

10. Булаєвська М. О., Горобець О. Ю., Шарай І. В. Магнітна силова мікроскопія решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб // XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», 21 квітня 2017, Київ. – С. 90. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
11. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaevska M.**, Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes // Sol-SkyMag International Conference, 19-23 June 2017, San Sebastian (Gipuzkoa), Spain. Poster Session (17:15-19:30, June 20, 2017). – Poster 8. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту, обробці отриманих результатів та написанні тез)*
12. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievska M.**, Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes // PHYSICS OF MAGNETISM 2017 (PM'17), 26-30 June 2017, Poznan, Poland. – P-8-08. – P. 228. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
13. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievska M.**, Valverde V. M., Hetmanenko K., Sharay I. Biogenic magnetic nanoparticles in representatives of kingdom Fungi // IEEE AIM 2018, February 4 - 7, 2018, La Thuile, Italy. Posters (Tuesday February 6 th, 2018, 13:45-16:00). – P16. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
14. Gorobets S., Gorobets O., Duduk A., **Bulaievska M.**, Sharay I. Comparative characteristics of biogenic magnetic nanoparticles in plant, fungi and animal organisms // IEEE AIM 2018, February 4 - 7, 2018, La Thuile, Italy. Posters (Tuesday February 6 th, 2018, 13:45-16:00). – P17. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту, обробці отриманих результатів та написанні тез)*

15. Горобець О. Ю., Булаєвська М. О. Аналіз наявності біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин та, зокрема, людини // XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ. – С. 80. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
16. Горобець С. В., Булаєвська М. О., Медведєв О. В., Шарай І. В. Біогенні магнітні наночастинок в різних органах тварин // XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ. – С. 81. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
17. Горобець С. В., Дудук А. В., Булаєвська М. О. Порівняльна характеристика біогенних магнітних наночастинок у рослин, грибів і тварин // XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ. – С. 82. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
18. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievska M.**, Sharay I. Detection of Biogenic Magnetic Nanoparticles in Ethmoid Bones of Migratory and Non-migratory Fishes // ICSM2018, 29 April – 04 May, 2018, Beldibi/Antalya, Turkey. – Abs. ID 3416/- Board ID TUE-C7 (Tuesday, 01.05.2018). *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
19. Горобець С. В., Булаєвська М. О., Зелінська О. М. Метод детекції біогенних магнітних наночастинок у представників царства рослин // Збірник наукових праць IV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії». – Переяслав-Хмельницький, 2018 р. – С. 21-24. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
20. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievska M.** Analysis of the presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans // 9th Joint

European Magnetic Symposia (JEMS) Conference 2018, 3 - 7 September 2018, Mainz, Germany. – A-1938. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

21. Kalmykova T. V., Tarapov S. I., Gorobets S. V., Gorobets O. Y., **Bulaievskia M. O.**, Getmanenko K. A. Electronic Spin Resonance in oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, grown on a substrate with the addition of magnetite // 3rd International School on Magnonics 2018 (IASM'2018), Kyiv, Ukraine, September 17-21, 2018. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
22. Gorobets S., Gorobets O., **Bulaievskia M.** The presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans // Materials II International Scientific and Practical Internet-conference «BIOTECHNOLOGY: EXPERIENCE, TRADITIONS AND INNOVATIONS». – Nov. 15, 2018. – Kyiv, Ukraine. – p. 88. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
23. **Булаєвська М. О.**, Шарай І. В. Аналіз наявності біогенних магнітних наночастинок в м'язах мігруючих та немігруючих риб // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019) / Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – С. 85. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
24. Горобець О. Ю., **Булаєвська М. О.**, Гетманенко К. А. Пошук потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед тварин із блакитною кров'ю // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019) / Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії – Київ: КПІ ім.

- Ігоря Сікорського, 2019. – С. 89. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
25. Gorobets S. V., Gorobets O. Y., **Bulaevskaya M. O.**, Darmenko Y. A., Aznakayeva D. E. AFM and MFM of biogenic magnetic nanoparticles in human organ in norm and pathology // SPIE Optics + Photonics 2019, SanDiego, California, United States, 11-15 August 2019. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту, обробці отриманих результатів та написанні тез)*
26. **Bulaievskaya M. O.** Research advisor: Gorobets S. V. Detection of biogenic magnetic nanoparticles in muscles of migratory and non-migratory fishes // VIII Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ», Київ, Україна, 15 листопада 2019. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
27. **Bulaievskaya M. O.** Research advisor: Gorobets S. V. Producers of biogenic magnetic nanoparticles among animals with blue blood // Сьогодні біологічної науки: матеріали III Міжнародної наукової конференції, Суми, Україна, 15-19 листопада 2019. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні біоінформатичного аналізу, обробці отриманих результатів та написанні тез)*
28. **Булаєвська М. О.** Науковий керівник: Горобець С. В. Розподіл штучно введених магнітних наночастинок в організмі тварин // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Київ, 24 квітня 2020. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*
29. Горобець С. В., Горобець О. Ю., **Булаєвська М. О.** Вплив штучно введених магнітних наночастинок на метаболізм тварин // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Київ, 23 квітня 2021. – С. 122. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)*

Патенти

30. Патент 125378 UA, МПК В03С 1/00 (2017.01). Спосіб детекції та виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями / С. В. Горобець, О. Ю. Горобець, **М. О. Булаєвська**. (Україна); заявник та патентовласник Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»; заявл. 24.11.2017. *(Особистий внесок здобувача: брала участь у складанні та поданні заявки на корисну модель)*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	25
ВСТУП.....	27
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	33
1.1 Створення багатofункціональних нановекторів на основі магнітних наночастинок.....	33
1.1.1 Штучні ліпосомальні та природні магнітні нановезикули.....	35
1.1.2 Взаємодія магнітних везикул з клітинами	35
1.1.3 Магнітне націлювання <i>in vivo</i>	36
1.2 БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК.....	37
1.2.1 Дослідження біорозподілу наночастинок оксиду заліза	42
1.2.2 Дослідження токсичності магнітних наночастинок	42
1.2.3 Біотрансформація магнітних наночастинок.....	44
Висновки до розділу	46
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	48
2.1 Матеріали та обладнання	48
2.1.1 Біологічні об'єкти.....	48
2.1.2 Прилади та обладнання	49
2.2 Методи дослідження	50
2.2.1 Методи порівняльної геноміки	50
2.2.2 Електронний парамагнітний резонанс	51
2.2.3 Методи підготовки тканин до гістологічного дослідження	52
2.2.4 Скануюча зондова мікроскопія.....	53
2.2.5 Методи виготовлення магнітних наноміток	55
2.2.6 Умови утримання риб <i>Danio rerio</i>	56
2.2.7 Принципи формування експериментальних груп.....	56
2.2.8 Процедура перорального введення досліджуваної речовини	57
2.2.9 Визначення розподілу штучних магнітних наночастинок у тканинах після багаторазового введення	58

2.2.10	Визначення магнітофоретичної рухливості	58
2.2.11	Розрахунок сили, що виникає між біогенними магнітними наночастинками та штучно введеними магнітними наночастинками	59
	Висновки до розділу	61
	3 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПРИРОДНОГО МАГНІТОМІЧЕННЯ НА ПРИКЛАДІ НЕМІГРУЮЧИХ РИБ.....	62
3.1	Біоінформатичний аналіз представників риб як потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок.....	62
3.2	Експериментальне дослідження наявності біогенних магнітних наночастинок в органах мігруючих та немігруючих риб	67
3.2.1	Електронний парамагнітний резонанс спектроскопія кісток мігруючих та немігруючих риб.....	67
3.2.2	Дослідження органів мігруючих та немігруючих риб за допомогою атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії	71
	Висновки до розділу	81
4.	ВСТАНОВЛЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ ЛОКАЛІЗАЦІЇ БІОГЕННИХ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК В БАГАТОКЛІТИННИХ ОРГАНІЗМАХ ...	85
4.1	Визначення локалізації біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин	88
4.2	Визначення локалізації біогенних магнітних наночастинок органах та тканинах рослин.....	95
4.3	Визначення локалізації біогенних магнітних наночастинок в тканинах грибів	98
	Висновки до розділу	100
5	ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ШТУЧНОГО МАГНІТОМІЧЕННЯ НА ПРИКЛАДІ РИБ <i>Danio rerio</i>	103
5.1	Дослідження розподілу штучно введених магнітних наночастинок в організмі риб <i>Danio rerio</i>	103
5.2	Визначення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин органів <i>Danio rerio</i>	110

5.3 Розробка технології виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями	115
5.4 Розрахунок сили магнітодипольної взаємодії між біогенними магнітними наночастинками та штучно введеними магнітними наночастинками	120
Висновки до розділу	124
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129
ДОДАТОК А	159
ДОДАТОК Б.....	160

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ATP	– adenosine triphosphate;
BLAST	– basic local alignment search tool;
GenBank	– nucleotide sequence database;
Mam	– magnetosome-associated membrane proteins;
NADH	– nicotinamide adenine dinucleotide hydride;
NCBI	– National Center for Biotechnology Information;
PEX	– peroxisome biogenesis factor;
HTRA	– high-temperature requirement;
TPR	– tetratricopeptide repeat peptide;
ZNT	– zinc transporter;
ZIP	– zinc transporter;
АСМ	– атомно-силова мікроскопія;
БД	– база даних;
БМН	– біогенні магнітні наночастинки;
ЕК	– ендотеліальні клітини;
ЕПР	– електронний парамагнітний резонанс;
ММ	– магнітосомна мембрана;
МН	– магнітні наночастинки;
МО	– магнітосомний острівець;
МП	– магнітне поле;
МР	– магнітний резонанс;
МРТ	– магнітно-резонансна томографія;
МСМ	– магнітно-силова мікроскопія;
МТБ	– магнітотаксисна бактерія;
н/д	– не досліджено;
НЧ	– наночастинки;
РЕС	– ретикулоендотеліальна система;

- СГСМ – абсолютна електромагнітна система сантиметр-грам-секунда;
- СЕМ – скануюча електронна мікроскопія;
- СЗМ – скануюча зондова мікроскопія;
- ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія;
- ФМР – феромагнітний резонанс;
- ЦП – цитоплазма;
- ШМЧ – штучні магнітні частинки.

ВСТУП

На даний час біогенні магнітні наночастинки (БМН) виявлено у представників усіх трьох надцарств живих організмів: Прокаріоти, Археї та Еукаріоти [1]. Більшість філогенетичних груп тварин, які належать до багатоклітинних еукаріотичних організмів, здатні до біомінералізації БМН, зокрема комахи [2], молюски [3], риби [4], амфібії та рептилії [5], птахи [6], а також ссавці [7]. Біогенні магнітні наночастинки знайдено також у нормальних тканинах мозку, печінки, серця, селезінки, надниркових залоз та решітчастої кістки людини [8, 9].

Наявність БМН вивчали, в основному, з точки зору орієнтації організмів в зовнішньому магнітному полі Землі. Ідея про магнітотаксис була дуже прогресивною і сприяла тому, що в багатьох наукових центрах світу розпочалися інтенсивні дослідження цього явища в різних мікроорганізмах. Зокрема дослідження самого процесу створення таких природних магнітів, у тому числі на генетичному рівні. Після того ж, як БМН було виявлено в багатоклітинних організмах [6, 7], ідею про магнітотаксис, як основну їх функцію, було трансформовано в ідею про важливу роль БМН у магніторецепції (відчутті організмами магнітних полів, у тому числі магнітного поля Землі). Ідею магніторецепції глибоко вивчали і продовжують вивчати, але однозначного експериментального підтвердження знайдено не було – навіть під час дослідження орієнтації перелітних птахів у геомагнітному полі [10], не кажучи вже про людину.

На цей час залишається відкритим питання, які ще біологічні функції, крім навігації та магніторецепції, можуть мати БМН як у магнітотаксисних бактерій, так і у інших організмів.

Актуальність теми. Понад 30 років увагу дослідників привертає фізіологічне походження БМН в органах та тканинах тварин. Ця проблема є дуже важливою, оскільки, наприклад, підвищений рівень БМН пов'язаний із низкою захворювань людини.

Дослідження механізмів синтезу БМН у різних організмах має важливе фундаментальне значення для визначення ролі БМН в патогенезі захворювань людини, які супроводжуються підвищенням їх вмісту. В свою чергу магнітомічені клітини використовують в дослідженнях цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та як біосорбенти.

На даний час є докладні дослідження біомінералізації БМН мікроорганізмами, але що стосується багатоклітинних організмів, то наявні лише фрагментарні дослідження біомінералізації БМН.

Магнітні наночастинки знаходять все ширше біомедичне застосування, від контрастних агентів для магнітної резонансної томографії (МРТ) до досліджень знищення ракових клітин за допомогою лікування гіпертермією [11]. Більшість з цих перспективних програм вимагає чітко визначених і керованих взаємодій між магнітними наночастинками і живими клітинами.

В зв'язку з цим актуальною задачею є дослідження наноструктурної локалізації БМН, їх морфології та кількості в різних органах та тканинах тварин, а також дослідження накопичення штучних магнітних наночастинок.

Зв'язок теми дисертації з науковими програмами. Дисертація виконана на кафедрі біоінформатики КПІ ім. Ігоря Сікорського в рамках таких науково-дослідних робіт: № 2866ф «Механізми інтенсифікації процесу сорбції іонів важких металів сухим магнітокерованим біосорбентом для очищення стічних вод» (2015-2017 рр., номер державної реєстрації 0115U000401; виконавець) та № 2107ф «Дослідження біосорбентів з природними феримагнітними властивостями для очищення води» (2018-2020 рр., номер державної реєстрації 0118U003752; виконавець).

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* – теоретичне обґрунтування та експериментальне дослідження біотехнології штучного магнітомічення та природного магнітомічення клітин тварин.

Для досягнення мети роботи були поставлені такі *завдання*.

1. Виявити можливих продуцентів БМН серед немігруючих риб, використовуючи методи порівняльної геноміки.

2. Встановити наявність БМН в органах та тканинах миші *Mus musculus*, свині *Sus domestica*, коропа *Cyprinus carpio* та даніо *Danio rerio*.

3. Визначити основні закономірності просторово-морфологічних властивостей БМН у різних тканинах і органах тварин та встановити відповідність з рослинами й грибами.

4. Провести дослідження накопичення магнітних наночастинок в органах даніо *Danio rerio* в процесі штучного магнітомічення.

5. Розробити технологію виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями.

6. Розрахувати сили взаємодії між біогенними магнітними наночастинками та штучними магнітними наночастинками.

Об'єкт дослідження – біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин у тварин, геноми та протеоми тварин в базі даних GenBank, органи та тканини тварин, біомаса магнітомічених клітин органів тварин.

Предмет дослідження – закономірності природного та штучного магнітомічення клітин тварин.

Методи дослідження:

- біоінформатичні (методи порівняльної геноміки),
- фізико-хімічні (світлова мікроскопія, електронний парамагнітний резонанс, скануюча зондова мікроскопія, методи виготовлення магнітних наноміток, рН метрія, термометрія),
- біологічні (цитологічні методи, гістологічні методи),
- математичні (математична статистика, математичне моделювання).

Наукова новизна отриманих результатів:

- вперше за допомогою біоінформатичних методів показано, що немігруючі риби можуть бути продуцентами біогенних магнітних наночастинок;

– вперше методами електронного парамагнітного резонансу та магнітно-силової мікроскопії продемонстровано наявність біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах як мігруючих, так і немігруючих риб;

– вперше показано, що БМН в органах та тканинах тварин локалізовані в провідних тканинах, так само, як у рослин та грибів;

– вперше продемонстровано накопичення магнітних наночастинок в мозку, серці, печінці й нирках риб *Danio rerio* за умови штучного магнітомічення, та лише часткове їх виведення.

Практичне значення отриманих результатів. Показане у роботі накопичення штучних магнітних наночастинок у різних органах тварин важливо враховувати у разі діагностики за допомогою МРТ з використанням контрастних речовин та у разі цілеспрямованої доставки лікарських препаратів за допомогою векторів, що містять магнітні наночастинок. Показано можливість застосування системи двох постійних магнітів зі щілиною для детекції та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями.

Результати роботи впроваджено у навчальний процес у КПІ ім. Ігоря Сікорського, а саме: у викладання дисципліни «Основи біоінформатики» для студентів спеціальності 133 – Галузеве машинобудування (Додаток А) та дисципліни «Науково-практичні основи біоінформатики» для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія на кафедрі біоінформатики (Додаток Б).

Особистий внесок здобувача. Результати наукової роботи, які викладено в дисертації, одержані автором особисто або за його безпосередньої участі.

Планування експериментальної роботи проведено спільно із науковим керівником.

Дослідження біологічних зразків із застосуванням магніторезонансної спектроскопії проводили спільно з д. ф.-м. н., с. н. с. В. О. Голубом. Дослідження біологічних зразків із застосуванням атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії проводили спільно з к. т. н. І. В. Шарай. Розрахунки сили

магніто-дипольної взаємодії між БМН та штучно введеними магнітними наночастинками здійснювали спільно з д. ф.-м. н., проф. О. Ю. Горобець.

Особисто автором описано результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковим керівником сформульовано висновки.

Автор висловлює глибоку та щирю вдячність науковому керівнику за підтримку та цінні поради під час планування та виконання роботи.

Апробація результатів роботи. Основні положення роботи доповідались та обговорювались на: X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016, Київ), Joint European Magnetic Symposia (21-26 August 2016, Glasgow, UK), XI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (21 квітня 2017, Київ), Sol-SkyMag International Conference (19-23 June 2017, San Sebastian, Spain), Physics of magnetism 2017 (26-30 June 2017, Poznan, Poland), IEEE AIM 2018 (February 4-7, 2018, La Thuile, Italy), XII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 100-річчю Артура Корнберга (20 квітня 2018, Київ), ICSM2018 (29 April – 04 May, 2018, Beldibi/Antalya, Turkey), IV Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії» (31 травня 2018, Переяслав-Хмельницький), 9th Joint European Magnetic Symposia Conference 2018 (3-7 September 2018, Mainz, Germany), 3rd International School on Magnonics 2018 (17-21 September, 2018, Kyiv, Ukraine), II International Scientific and Practical Internet-conference «BIOTECHNOLOGY: EXPERIENCE, TRADITIONS AND INNOVATIONS» (November 15, 2018, Kyiv, Ukraine), XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (19 квітня 2019, Київ), SPIE Optics + Photonics 2019 (11-15 August 2019, SanDiego, California, United States), VIII Міжнародній науково-практичній онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ» (15 листопада 2019, Київ, Україна), III Міжнародній науковій конференції «Сьогодення біологічної науки» (15-19 листопада 2019, Суми,

Україна), XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (24 квітня 2020, Київ).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 29 наукових праць: 1 стаття у періодичному науковому виданні держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу, 3 статті у виданнях, які цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 2 статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, 23 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення (3 розділів), висновків, списку використаних джерел (275 найменувань), 2 додатків. Робота представлена на 160 сторінках друкованого тексту, містить 33 рисунків і 14 таблиць.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Створення багатофункціональних нановекторів на основі магнітних наночастинок

Живі організми мають генетично запрограмовану здатність утворювати широкий спектр мінералів та інших неорганічних речовин у процесі, відомому як біомінералізація [12-14]. Біосинтез так званих біогенних магнітних наночастинок із неорганічних сполук заліза представляє особливий інтерес через магнітні властивості БМН.

БМН є об'єктом інтенсивних досліджень з 1975 року, коли вони вперше були виявлені в магнітотаксисних бактеріях. МТБ демонструють магнітотаксис або рух у відповідь на магнітне поле, що змушує їх мігрувати вздовж силових ліній геомагнітного поля [15, 16]. У подальших дослідженнях БМН були виявлені у великій кількості організмів, що належать до усіх трьох надцарств живих організмів, тобто прокариотів, архей та еукаріотів. Проте переважна більшість досліджень наявності БМН в органах багатоклітинних організмів спрямована на підтвердження ідеї магніторецепції [2, 4-6, 14], саме тому особливу увагу дослідники звертали на такі органи, як решітчаста кістка, мозок та бічна лінія риб.

Кристалічні БМН представлені нанокристалами антиферомагнетиків або феритів, зокрема магнетит (Fe_3O_4), маггеміт ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), грейгіт (Fe_3S_4) та ін. [17-20]. Відомо, що БМН є нанокристалами феритів [18, 21-25]. З погляду магнітних властивостей, БМН існують у двох формах: без залишкової намагніченості (антиферомагнітні БМН і феритові БМН в суперпарамагнітному стані) та із залишковою намагніченістю (феритові БМН в однодоменному і багатодоменному станах).

В свою чергу, комбінація синтетичних ліпосом або біологічних везикул клітинного походження з магнітними наночастинами дає змогу створювати багатофункціональні нановектори з надзвичайним потенціалом для діагностики

та терапії широкого кола захворювань. По-перше, магнітні властивості, що передаються від наночастинок до везикул, роблять їх ефективними індикаторами для магнітно-резонансної томографії та медіаторами для терапевтичної магнітної гіпертермії. По-друге, магнітоміченими везикулами можна керувати за допомогою зовнішнього магніту. Ця «дія на відстані» відкриває безліч можливих застосувань, пов'язаних з індукованою магнітною рухливістю, від індукованої магнітом клітинної інтерналізації до магнітного націлювання *in vivo*. Нарешті, через їх везикулярну структуру, що забезпечує капсулювання ліків, магнітні везикули розглядаються як системи доставки ліків [26].

На цей час відомі роботи, в яких синтетичні ліпосоми об'єднують з неорганічними наночастинками (квантовими точками [27, 28], наночастинками золота [29-31] і магнітними наночастинками [32, 33]) для отримання цікавих фізичних (магнітних або оптичних) властивостей, що можуть бути використані для виявлення, візуалізації та магнітно-посиленої трансфекції, а також в розробці нових методів лікування. Головною метою цих різних дослідницьких підходів є отримання багатофункціональних нанотехнологій або векторів, здатних специфічно розповсюджуватися на певній біологічній ділянці для візуалізації або лікування.

Магнітні властивості, обумовлені магнітним матеріалом, роблять везикули ефективними перетворювачами зображень для магнітно-резонансної томографії (МРТ), носіями, які можуть управлятися магнітним полем, і генераторами тепла у разі впливу високочастотного змінного магнітного поля (магнітна гіпертермія). Таким чином, такі багатофункціональні магнітні везикули відкривають приголомшливі можливості для візуалізації і лікування широкого кола захворювань [26].

В свою чергу, використання в магнітній резонансній томографії магнітних полів потребує розробки нових контрастних агентів на основі магнітних наночастинок. Отже – магнітні наночастинки – це точки росту для сучасних медичних програм нанотехнологій [11].

1.1.1 Штучні ліпосомальні та природні магнітні нановезикули

Синтетичні ліпосоми здатні захоплювати як гідрофільні, так і ліпофільні молекули. Вони біосумісні, можуть продукуватися в широкому діапазоні розмірів, з різноманітним ліпідним складом і ємностями для інкапсуляції, а також стійкі до розчинення в воді. Магнітні ліпосоми містять наночастинки оксиду заліза (магнетит (Fe_3O_4), маггеміт ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$)) у внутрішньому середовищі. Описаний інший клас магнітоліпосом, що складається з наночастинок заліза, стабілізованих ліпідним бішаром (ліпочастинки); вони не містять водного середовища і тому не можуть транспортувати активні речовини, захищені ліпідною мембраною. Ці наночастинки оксиду заліза, покриті ліпідами, зазвичай менші, ніж магнітні ліпосоми, їх діаметр становить від 30 нм [34], до 100 нм [35], або навіть 250 нм [36]. Магнітні ліпосоми зазвичай мають розмір від 200 до 300 нм [37], але можуть досягати 1,2 мкм [38, 39]. Магнітні ліпосоми можуть бути отримані шляхом гідратації ліпідної плівки суспензією наночастинок оксиду заліза з подальшим калібруванням шляхом послідовної екструзії через полікарбонатні фільтри, що дає змогу отримувати ефективні структури везикул однорідного розміру, зазвичай в діапазоні діаметрів 200-300 нм [37].

Подібні структури з діаметром від 200 нм до 1 мкм, асоційовані з магнітними наночастинами, можуть бути отримані шляхом вивільнення везикул клітинами [37-39]. Таким чином, підходи нанотехнологій і клітинної біології об'єднуються для розробки нових магнітних векторів біологічного походження.

1.1.2 Взаємодія магнітних везикул з клітинами

Наночастинки заліза можуть бути використані як індикатори для електронної мікроскопії, що дає змогу якісно вивчати взаємодії між ліпосомами

і їх клітинами-мішенями в нанометровому масштабі. Як ліпосомальні [40], так і біологічні магнітні везикули проникають в клітини за допомогою ендоцитозу і через кілька годин концентруються в лізосомах. Поглинання магнітних ліпосом клітинами може бути посилене шляхом застосування зовнішнього магнітного поля [41, 42].

Магнітофорез клітин також можна використовувати для вимірювання ступеня намагніченості клітини і, отже, кількості зв'язаних магнітних наночастинок. Він полягає у відстеженні руху одиночної намагніченої клітини по градієнту магнітного поля [43]. Під дією магнітної сили, яка пропорційна градієнту магнітного поля і, отже, також є постійною, клітина рухається до області сильного поля на постійній швидкості. Беручи до уваги в'язкість середовища, швидкість руху клітини прямо пропорційна ступеню її намагніченості, тобто кількості наночастинок (або масі заліза, включеного в клітину) [26].

1.1.3 Магнітне націлювання *in vivo*

Можливість магнітного націлювання *in vivo* вперше була досліджена на мишах [44]. За допомогою МРТ показано накопичення ліпосом в ділянці пухлини, біля якої було поміщено потужний магніт (спостерігається накопичення магнітних ліпосом – потемніння ділянки пухлини, яка була піддана впливу магніту).

Гістологічні дослідження показали, що ліпосоми накопичуються на стінках судин, що живлять пухлину. За допомогою флуоресцентної мікроскопії *in vivo* показано ефективне накопичення флуоресцентно мічених магнітоліпосом в судинах пухлини [45].

В роботі [46] було досліджено кінетику накопичення ліпосом у внутрішньомозкових судинах під впливом сильного градієнта магнітного поля.

За присутності магніту все більше і більше ліпосом поступово притягувалися до магнітної ділянки.

За допомогою магнітного націлювання можна збільшити локальну концентрацію ліпосом в мозковому кровообігу. За відсутності впливу сильного градієнта магнітного поля спостерігалася циркуляція магнітоліпосом, тобто їх накопичення під дією магнітного поля є оборотним процесом. Автори [46] зазначають необхідність подальших досліджень для оцінки можливого транспорту деяких магнітних везикул через ендотелій судини. Справді, не можна виключати, що застосування високої магнітної сили може забезпечити проникнення везикул або їх вмісту через гематоенцефалічний бар'єр.

Із загальної точки зору, оскільки такі ліпосоми можуть бути використані для транспортування ліків або генів, їх магнітне націлювання за допомогою внутрішньовенного введення забезпечує місцеве вивільнення ліків, тим самим обмежуючи пошкодження оточуючих тканин.

1.2 Біологічні ефекти магнітних наночастинок

Відомі до теперішнього часу біологічні ефекти наночастинок (НЧ) металів можна розділити на дві великі групи [47-49]:

1. біоцидна дія (тобто здатність вбивати живі організми), застосовується, в основному, в експериментах на мікроорганізмах;
2. вплив на функції живих організмів, що виявляється на біологічних об'єктах різних рівнів організації. Зміна функцій під дією НЧ може бути як позитивною, так і негативною. Інакше кажучи, НЧ металів можуть чинити як лікувальний ефект, так і викликати появу різних патологій.

Можливості застосування НЧ для діагностики та лікування різних захворювань нині активно вивчаються і розробляються в новому напрямку експериментальної медицини, проте розвиток будь-якої нової технології має оцінюватися з позицій безпеки. На цей час у світовій літературі вже накопичено

багато інформації про те, що НЧ металів можуть викликати серйозні патології в живих організмах – «нанопатології» [47-49].

Аналіз даних літератури показав, що проводиться токсикологічна оцінка окремих НЧ металів на клітинах (*in vitro*) [50, 51, 52], цілісних організмах (*in vivo*) [53, 54, 55] і наведені поки поодинокі дані про їх вплив на навколишнє середовище [47, 56]. Показано, що токсичність наноматеріалів залежить не тільки від фізичної природи, способу отримання, розмірів, структури НЧ металів, але і від біологічної моделі, на якій проводяться дослідження.

1.2.1 Дослідження біорозподілу наночастинок оксиду заліза

Основна проблема, з якою стикаються вчені у разі лікування локалізованих захворювань, таких як рак або ревматоїдний артрит, полягає в тому, що препарати, які вводяться в організм, поширюються через кровоносну систему не тільки на хвору область, але і на здорові тканини. Тому потреба в цілеспрямованому лікуванні, заснованому на контрольованій доставці препарату до потрібного органу, обумовила розробку посилених та більш ефективних методів та пристроїв. Зокрема, протягом останніх десятиліть були розроблені магнітні наночастинок з метою вирішення таких обмежень у біомедичній галузі. Суперпарамагнітні властивості цих наносистем дають можливість їх зовнішнього маніпулювання під впливом магнітного поля [57].

В роботі [57] досліджено вплив хітозанового покриття на здатність таких МНЧ впливати на життєздатність ендотеліальних клітин (ЕК) аорти щурів та на випадковий розподіл МНЧ у тканинах мишей. МНЧ, покриті хітозаном, у дозах 1 та 10 мкг/мл, не впливали на життєздатність ЕК аорти щурів. Однак значне зниження життєздатності клітин спостерігалось після 36-годинної обробки найвищою дозою 100 мкг/мл цього наноносія.

Дослідження біорозподілу МНЧ, покритих хітозаном, в роботі [57] проводили на здорових, восьмитижневих самках через 24 години після внутрішньочеревної ін'єкції МНЧ та через 28 днів після щотижневого введення МНЧ, покритих хітозаном. Застосовувані дози становили близько 30 мг МНЧ/кг з урахуванням фізіологічних доз, застосованих до майбутніх клінічних досліджень [57].

Через 24 години після введення МНЧ, покритих хітозаном, найбільшу кількість наноносіїв виявлено у серці. Легені та печінка були тканинами, де МНЧ, покриті хітозаном, переважно розподілялися, а нирки та мозок містили найменшу кількість таких МНЧ [57].

Що стосується біорозподілу МНЧ, покритих хітозаном, через 28 днів після щотижневого введення наноносіїв, то було виявлено значні відмінності щодо кількості наночастинок, осаджених в деяких органах щодо дослідження через 24 години. Після 28 щотижневого введення найбільшу кількість МНЧ виявлено в печінці, кількість виявлених наноносіїв в легенях, нирках та мозку практично не змінилася у порівнянні з дослідженням через 24 години, в той самий час як кількість виявлених МНЧ, покритих хітозаном, суттєво зменшилась [57].

В роботі [58] було кон'юговано два різних типи поліетиленгліколів з монодисперсними карбоксильованими НЧ оксиду заліза 19,7 нм. Дослідження показали первинний розподіл введених НЧ у печінці та селезінці.

Мишам внутрішньовенно вводили НЧ (100 мкл, 2 мг Fe/мл). Зразки крові відбирали через ~ 0 (відразу після ін'єкції), через 5, 10, 15, 20, 30, 45 та 60 хв після введення. Вимірювання з використанням вібраційного магнітометра та спектрометра магнітних частинок повторювались три рази для кожного зразка і результати були усереднені. Середня намагніченість насичення, отримана від вібраційного магнітометра, і середня інтенсивність сигналу, визначена за допомогою спектрометра магнітних частинок, були порівняні зі стандартними калібрувальними лініями, що генеруються з НЧ до введення для оцінки кількості НЧ в крові після нормалізації до ваги миші (кг) [58].

У роботі [58] використано 36 мишей для досліджень кровообігу та 9 мишей для досліджень біорозподілу (25-35 г, 8 тижнів). Біорозподіл цих НЧ визначали за допомогою спектрометра магнітних частинок і сканування за допомогою *in vivo* системи візуалізації ближньо-інфрачервоної флуоресценції через 72 години після введення НЧ (рис. 1.1-1.2). Велика кількість НЧ накопичувалася в печінці. Частина, що залишилася була виявлена в селезінці, без будь-яких сигналів в нирках, мозку, серці та легенях [58].

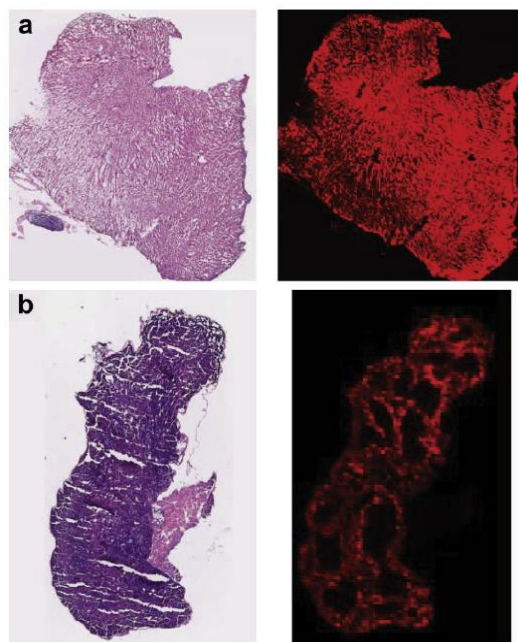


Рисунок 1.1 – Зображення на оптичному мікроскопі (зліва) відділів печінки (а) та селезінки (б) (фрагменти товщини 12 мм) порівняно з отриманими зображеннями ближньо-інфрачервоної флуоресценції (справа) [58].

Зображення ближньо-інфрачервоної флуоресценції показують, що НЧ були захоплюються червоною пульпою і крайовими зонами селезінки. Майже рівномірний розподіл НЧ спостерігався в печінці [58].

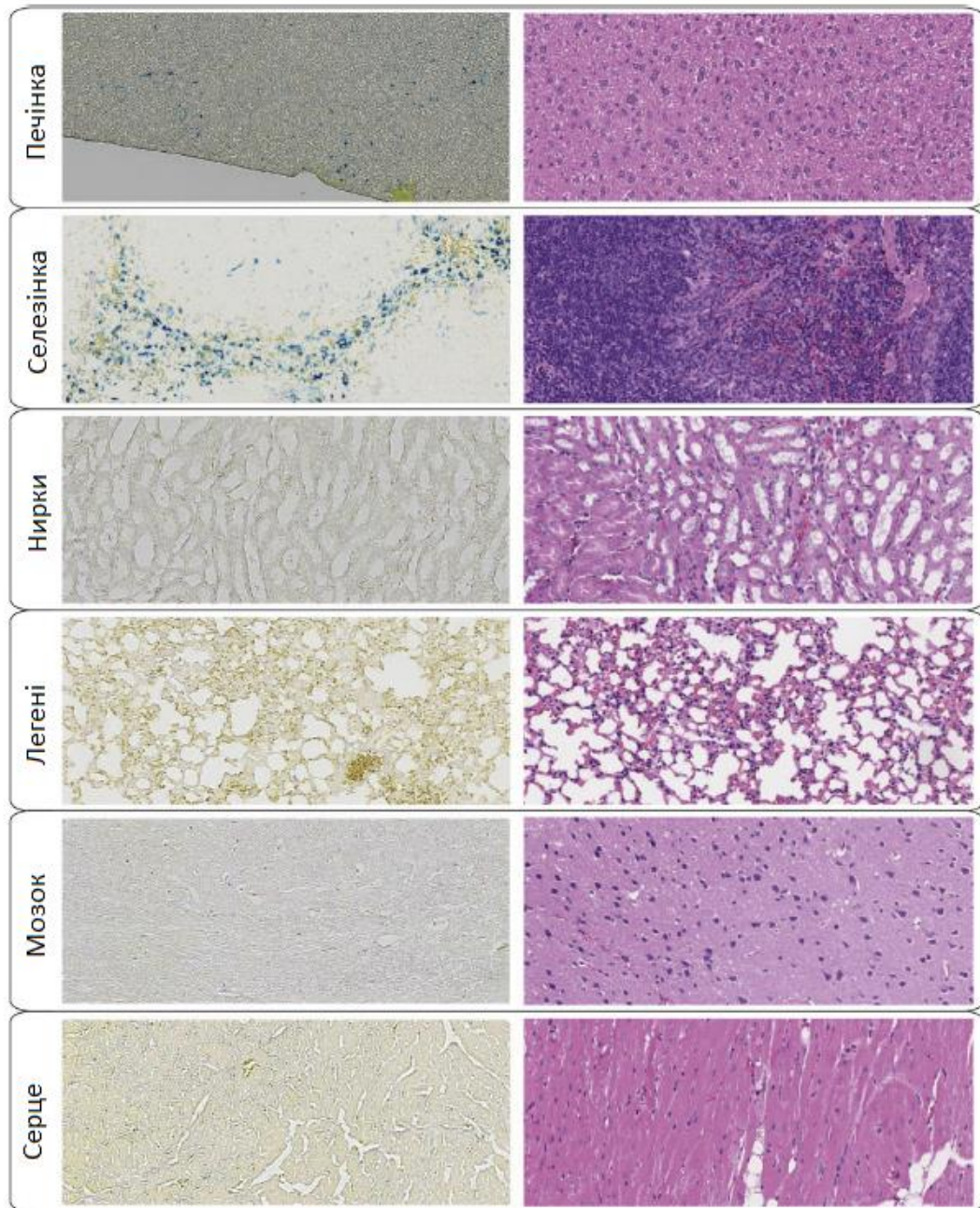


Рисунок 1.2 – Зображення на оптичному мікроскопі зрізів забарвлених Берлінською лазуррю (зліва) та гематоксилином і еозином (праворуч). Через 72 год після введення НЧ здебільшого накопичувались в печінці та селезінці [58].

Через 72 год після ін'єкції НЧ переважно спостерігалися в печінці та селезінці. Сигнал ближньо-інфрачервоної флуоресценції високої інтенсивності спостерігався в печінці порівняно з селезінкою. Інші органи (нирки, легені, серце та мозок) не показали жодного флуоресцентного сигналу. Система спектрометра магнітних частинок також не виявила жодної магнітної відповіді під час

дослідження легень, серця, мозку та нирок. Однак, спостерігався сильний сигнал спектрометра магнітних частинок, що генерується печінкою та селезінкою [58].

Як показано на рисунку 1.1 НЧ майже однорідно розподілені в печінці. Однак у селезінці НЧ спостерігали лише у червоній пульпі та крайових зонах, без будь-якої інтерфузії в білу пульпу. Таке розповсюдження спостерігається через те, що артерії селезінки направляють НЧ та інші компоненти крові до регіонів, де резидентні макрофаги селезінки поглинають НЧ в області червоної пульпи та крайової зони. З іншого боку, біла пульпа складається в основному з лімфатичної тканини і не демонструє поглинання НЧ. Ці схеми розподілу також підтверджують високу швидкість поглинання НЧ макрофагами [59]. Результати гістологічного забарвлення берлінською лазуррю (рис. 1.2) показують результати біорозподілу НЧ. Незважаючи на відносно високий рівень НЧ в печінці та селезінці, у цих органах не було виявлено видимих відхилень у порівнянні з органами контрольних мишей. Загалом, попередні оцінки токсичності показують, що НЧ добре переносяться гризунами [58].

Проте, для запобігання негативного впливу за біомедичного застосування синтетичних магнітних наночастинок слід враховувати наявність біогенних магнітних наночастинок в різних органах тварин та, зокрема, людини.

1.2.2 Дослідження токсичності магнітних наночастинок

Відомо [60], що сполуки металів у вигляді наночастинок мають зовсім інші фізико-хімічні властивості, а отже іншу біологічну дію на живі організми, порівняно з їхніми мікро- та іонними формами. Тому оцінка потенційного ризику для здоров'я людини і стану довкілля в усіх випадках є обов'язковою.

Відомо, що НЧ металів можуть проникати в організм людини різними шляхами: через слизові оболонки дихальних шляхів і травного тракту, трансдермально, через кровотік в складі вакцин та сироваток і т. ін. Небезпека поширення нанопатологій, хоча ще й не цілком усвідомлена, але, безсумнівно

велика на цей час, і, очевидно, буде наростати в майбутньому. З'ясування причин патологічної дії НЧ і розробка способів боротьби із захворюваннями, викликаними проникненням в організм НЧ, стають предметом нового напрямку в експериментальній медицині [60].

НЧ магнетиту (Fe_3O_4) все ширше використовуються в медицині як носії для доставки ліків до органів, а також маркери, керовані зовнішнім магнітним полем. Водночас у виробничих умовах й у разі забруднення атмосфери ультратонкими аерозолями, до складу яких входить ультрадисперсне залізо, воно може мати більш виражену біологічну агресивність. Тому проводяться численні дослідження з оцінки токсичності НЧ заліза на живі організми – мишей, щурів, велику рогату худобу, птахів, риб [53, 54]. Так, пероральне введення мишам суспензії наночастинок заліза в дозі 50, 100 і 500 мкг/кг не викликало яких-небудь токсичних ефектів. Тільки дробне введення доз 1000, 2000 та 5000 мкг/кг призводило до розвитку запального процесу на слизовій шлунка і кишечника, а також порушень гемопоезу. Хронічний вплив НЧ заліза в дозах 20 і 40 мкг/кг протягом 90 днів не призводив до значних відхилень від біохімічних та гематологічних показників контрольної групи. Крім того, було показано, що дози 2-6 мкг/кг стимулювали ріст тварин, бактерицидну активність сироватки крові і збільшення загального білка в крові.

Дослідження токсичності на щурах і собаках показало, що НЧ Fe_2O_3 чинять цей вплив в дозах, що перевищують 400 мг/кг. Дослідження хронічної токсичності показало цитоморфологічні зміни в печінці. Також були виявлені деякі тератогенні ефекти і показана ембріотоксичність [53].

Інгаляційний вплив НЧ оксиду заліза розмірами 22 нм і 280 нм на щурів в дозах 0,8 і 20 мг/кг викликало індукцію активних форм кисню в клітинах, гіперемію, гіперплазію і фіброз тканин легенів. Також було виявлено порушення системи згортання крові [53].

Проведена порівняльна оцінка токсичності НЧ Fe_2O_3 нанометрового (10-50 нм) і мікрометрового (1 мкм) діапазону в дозах 500 мг/кг у разі 15-кратного внутрішньочеревного введення щурам [54]. Показано, що НЧ Fe_2O_3 розміром

10 нм і 50 нм призводили до більшого накопичення заліза в печінці і селезінці щурів, ніж за введення частинок мікрометрового діапазону. Показано, що за рівних масових доз НЧ мають більш виражену токсичність, ніж частинки мікрометрового діапазону.

Під час руху по кровотоку магнітні наночастинки можуть «навантажуватися» білками плазми крові, їх поглинають імунні захисники – макрофаги. Поведінка магнітних наночастинок всередині організму людини обумовлена хімією поверхневих явищ, розміром і магнітними властивостями (магнітний момент, залишковий магнетизм). Хімія поверхневих явищ особливо важлива для того, щоб уникнути впливу ретикулоендотеліальної системи (РЕС), яка є частиною імунної системи, і збільшити час існування магнітних наночастинок в кровотоці [11].

Токсичність НЧ металів безпосередньо пов'язана з їх розмірами, а значить, з вкрай високою питомою площею, яка обумовлює високу хімічну активність і високу здатність до проникнення в організм, таким чином, чим менше розмір матеріалу, тим більше його питома площа і тим більше ступінь токсичності матеріалу.

1.2.3 Біотрансформація магнітних наночастинок

Наночастинки оксиду заліза, завдяки своїм унікальним магнітним властивостям, залишаються ключовими структурами для розвитку сучасних біомедичних застосувань. Однак, всебічні оцінки їх стабільності та долі після інтерналізації клітин все ще обмежені. Нещодавно було продемонстровано, що наночастинки оксиду заліза можуть поступово руйнуватися як *in vivo*, так і *in cellulo* [61-63], що дає змогу виділеним іонам повноцінно інтегруватися в метаболізм організму в довгостроковій перспективі. Ці дослідження в основному базувались на дрібних штучних магнітних наночастинок (в діапазоні 10 нм). Питання біотрансформації біогенних магнітних наночастинок, які мають

витримувати біологічне середовище, що так само деградує або залишаються цілими, все ще залишається відкритим [64].

Зменшення розміру магнітних частинок до наномасштабу наділяє матеріали новими властивостями, одночасно підвищуючи реактивність частинок. Процесинг НЧ *in vivo* включає біотрансформацію, деградацію, біоасиміляцію, елімінацію або просто персистенцію – процеси, організовані складними і динамічними взаємодіями з різними компонентами біологічного середовища. Нещодавні дослідження показали, що біологічні взаємодії безперервно змінюють ідентичність і властивості наночастинок [65]. Молекули в біологічних рідинах сильно змінюють форму поверхні НЧ [66, 67] та ініціюють агрегацію частинок, опсонізацію або ферментативну атаку і деградацію [68]. Таке ремоделювання може регулювати транспорт наночастинок в фізіологічному середовищі, інтерналізацію клітин і потенційну токсичність [69]. Таким чином, основна складність полягає в тому, щоб охарактеризувати і простежити складні взаємодії між магнітними наночастинами і біологічною масою *in situ*.

Дивно, але в той час як науковці можуть легко управляти синтезом наночастинок і налаштовувати розміри, форму, організацію та властивості наночастинок, дослідження життєвого циклу наночастинок *in vivo* все ще перебуває в зародковому стані. Безсумнівно, більшість досліджень зосереджені на вивченні поведінки НЧ в перші години або дні після їх введення, але рідко такі дослідження демонструють вплив НЧ через декілька місяців після введення, які можуть бути необхідні організму для виведення або розкладання магнітних частинок. Відсутність часу на всебічні дослідження частково пояснює цей факт, але також виникають методологічні проблеми, пов'язані з дослідженням магнітних НЧ *in vivo* протягом тривалого періоду часу. Відповідно, залишається відкритим питання розробки спеціальних методологій для виявлення і кількісної оцінки магнітних наноматеріалів, їх видового складу та залишків в біологічних тканинах, а також для характеристики їх морфологічних модифікацій у відповідних масштабах з плином часу.

В результаті досліджень біогенного синтезу магнітосом показано, що ферригідрит є хімічним попередником біомінералізації магнетиту [70], і було запропоновано додатковий механізм синтезу, що включає фазові перетворення в магнетит з гідроксиду заліза [71]. Однак питання про здатність магнітосом до розкладання залишається спірним, оскільки в кількох дослідженнях повідомлялося про їх прогресуючу деградацію з плином часу у найпростіших або у мишей [72-74], але не в клітинах людини.

З огляду на постійно зростаючу кількість тераностичних підходів із використанням магнітосом, надзвичайно важливо зрозуміти їх тривалу долю після інтерналізації в клітинах людини. В роботі [64] показано, що процесинг магнітосом стовбуровими клітинами людини призводить до двох явищ біотрансформації. В одному випадку магнітосоми поступово деградують, тоді як стан заліза еволюціонує від магнетиту до ферригідриту. У другому випадку магнітосоми спочатку деградували, але потім динамічно перетворювались на магнітні наночастинки, біосинтезовані *in situ*, в ендосомних компартментах клітин. Потім внутрішньоклітинний перехід стану заліза від магнетиту до ферригідриту повертається до магнетиту і демонструє повний цикл трансформації магнітосом в клітинах людини. Це не тільки показує, що магнітосоми можуть деградувати і повністю інтегрувати метаболізм заліза у стовбурових клітинах, але й те, що ці клітини здатні утворювати магнітні наночастинки [64].

Висновки до розділу

На цей час активно вивчаються можливості застосування магнітних наночастинок для діагностики та лікування різних захворювань і зумовлюють розвиток нового напрямку експериментальної медицини, проте розвиток будь-якої нової технології має оцінюватися з позицій безпеки.

Адже відомі до теперішнього часу біологічні ефекти наночастинок металів можуть бути як позитивними – наночастинок металів мають біоцидну дію, що застосовується, в основному, в експериментах на мікроорганізмах, так і негативними – наночастинок металів подекуди впливають на функції живих організмів, що виявляється на біологічних об'єктах різних рівнів організації, включаючи людину. Інакше кажучи, наночастинок металів можуть чинити як лікувальний ефект, так і викликати появу різноманітних патологій.

Незважаючи на можливий згубний вплив наночастинок металів, на цей час магнітні наночастинок є ефективними індикаторами для магнітно-резонансної томографії та медіаторами для терапевтичної магнітної гіпертермії.

Так само комбінація синтетичних ліпосом або біологічних везикул клітинного походження з магнітними наночастинками дає змогу створювати багатофункціональні нановектори для діагностики та лікування широкого кола захворювань.

Саме тому дослідження технології штучного магнітомічення та природного магнітомічення клітин тварин є надзвичайно важливим.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та обладнання

2.1.1 Біологічні об'єкти

В роботі для визначення потенційних продуцентів БМН серед немігруючих риб використовували протеоми магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та протеоми лосося атлантичного *Salmo salar*, лосося тихоокеанського *Oncorhynchus nerka*, коропа звичайного *Cyprinus carpio*, товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix*, карася звичайного *Carassius carassius* та щуки звичайної *Esox lucius*, трансльовані нуклеотидні послідовності з бази даних GenBank.

Для аналізу спектрів електронного парамагнітного резонансу використовували по 0,1 г висушеної біомаси клітин *Escherichia coli* та *Saccharomyces cerevisiae*, а також висушені в сушильній шафі за температури 105 °C та подрібнені за допомогою лабораторного млина решітчасті кістки лосося атлантичного та товстолобика звичайного масою 0,1 г. Зразки досліджуваних тканин приготовано в Лабораторії магнітних нанотехнологій в біології та медицині кафедри біоінформатики КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Для визначення закономірностей наноструктурної локалізації БМН використовували гістологічні препарати системи бічної лінії та решітчастих кісток лосося атлантичного *Salmo salar*, товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix* та щуки звичайної *Esox lucius*; печінки, кишківника та підшлункової залози миші *Mus musculus*; легенів, нирок та селезінки свині *Sus domestica*; мозку коропа *Cyprinus carpio*. Препарати грибів: плодове тіло печериці *Agaricus bisporus*. Препарати рослин: стебло та бульба картоплі *Solanum tuberosum*, листя та корені тютюну *Nicotiana tabacum*. Тютюн *Nicotiana tabacum* вирощували в асептичних умовах. Насіння *Nicotiana tabacum* стерилізували у 5 % розчині гіпохлориту натрію протягом 10 хв, потім тричі

промивали у стерильній дистильованій воді. Насіння висівали на чашки Петрі з поживним середовищем Мурасіге-Скуга без гормонів у ламінарному боксі. Пагони з листям переносили у скляні ємності об'ємом 150-250 мл, наповнені 10-15% поживним середовищем такого ж складу. Скляні ємності з рослинами тримали в спеціально обладнаному кліматичному приміщенні при температурі 22-24 °С, фотоперіод 16 год. Вказані умови вирощування *Nicotiana tabacum* виключають забруднення екзогенними магнітними наночастинками.

Гістологічні препарати печінки, кишківника та підшлункової залози миші *Mus musculus* надано Українським науково-практичним центром ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів та тканин МОЗ України. Гістологічні препарати органів лосося атлантичного *Salmo salar*, товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix*, щуки звичайної *Esox lucius*, коропа *Cyprinus carpio*, а також препарати рослин і грибів приготовано в Лабораторії магнітних нанотехнологій в біології та медицині кафедри біоінформатики КПІ ім. Ігоря Сікорського.

В роботі використовували дикий тип риби *Danio rerio*. Риб утримували в Лабораторії магнітних нанотехнологій в біології та медицині на базі кафедри біоінформатики КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Для дослідження магнітофоретичної рухливості використовували висушені в сушильній шафі за температури 105 °С та подрібнені за допомогою лабораторного млина мозок, серце, печінку та нирки риби *Danio rerio*.

2.1.2 Прилади та обладнання

Для проведення наукових експериментів та отримання дослідних зразків використовували такі прилади та обладнання: сушильна шафа СНОЛ 75/600; лабораторний млин ЛЗМ-1; ваги електронні лабораторні Axis ANG200С; ротаційний мікротом Leica RM 2125 RTS; оптичний біокулярний мікроскоп XS-5520 MICROmed; цифровий мікроскоп Digital microscope; скануючий зондовий

мікроскоп Solver PRO-M; спектрометр електронного парамагнітного резонансу ELEXSYS E500 Bruker BioSpin.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Методи порівняльної геноміки

У дослідженні використано методи попарного вирівнювання з використанням вільної в доступі програми BLAST (basic local alignment search tool) Національного центру біотехнологічної інформації [75].

Проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mat, без яких неможлива біомінералізація БМН в *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, з протеомами мігруючих та немігруючих риб:

- лосось атлантичний *Salmo salar*;
- лосось тихоокеанський *Oncorhynchus nerka*;
- короп звичайний *Cyprinus carpio*;
- товстолобик звичайний *Hypophthalmichthys molitrix*;
- карась звичайний *Carassius carassius*;
- щука звичайна *Esox lucius*.

Для оцінки ступеня подібності було враховано такі показники:

1. Ident (%) – кількість ідентичних амінокислотних залишків білків, що порівнюються, за оптимального вирівнювання. У такому разі, якщо два білки мають більш, ніж 45% ідентичних залишків в їх оптимальному вирівнюванні, то білки будуть мати дуже схожі структури та з великою ймовірністю однакові чи, принаймні, спільні функції; якщо в двох білків понад 25% ідентичних залишків, то, ймовірно, вони не мають аналогічної структури, проте механізми фолдингу є подібними, тому гомологія білків не є виключеною; ділянки з кількістю ідентичних амінокислот, що становить 18-24%, визначають як «twilight zone»

(«сумнівна зона»), в якій допускається гомологія, але необхідним є проведення її додаткової перевірки [76].

2. E-число – показник, який відображає статистичну значимість вирівнювання, зниження значення якого вказує на менший рівень прояву фактору випадковості у разі співпадіння амінокислотних залишків білків, які порівнюють. Величина показника E-числа залежить від значення показника кількості ідентичних амінокислотних залишків у двох білків та кількості відповідної інформації про амінокислотні послідовності протеому відповідного виду у базі даних. Для аналізу використано класифікацію для величин значень E-числа: якщо воно має значення $\leq 0,05$, то можна стверджувати, що послідовності повністю гомологічні; якщо величина E-числа знаходиться в межах від $0,05 - 1$, гомологія не може бути виключеною; якщо $E \geq 1$, то виявлене співпадіння може мати випадковий характер [76].

3. Length – довжина вирівнювання (довжина вирівнювання має бути > 100 амінокислотних залишків).

4. Функції білків досліджуваних мігруючих та немігруючих риб у порівнянні з функціями білків магнітосомного острівця (МО) магнітотаксисної бактерії (МТБ) *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, без яких неможлива біомінералізація магнітних наночастинок.

2.2.2 Електронний парамагнітний резонанс

Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) спектроскопія є методом для вивчення матеріалів з неспареними електронами. Явище електронного парамагнітного резонансу полягає в резонансному поглинанні електромагнітного випромінювання речовинами, поміщеними в постійне магнітне поле. Сигнал ЕПР є першою похідною від спектра поглинання. Площа під лінією поглинання пропорційна концентрації парамагнітних частинок у

зразку. Ширина спектра ЕПР залежить від взаємодії магнітного моменту електрона з магнітними моментами оточуючих ядер і електронів [77].

ЕПР використовується в різних галузях науки, таких як біологія, хімія і фізика, для виявлення та ідентифікації вільних радикалів і парамагнітних центрів. ЕПР спектрометр призначений для реєстрації спектрів і вимірювання параметрів спектрів зразків парамагнітних речовин в рідкому, твердому або порошкоподібному стані [78].

Визначення магнітних властивостей досліджуваних зразків здійснено за допомогою спектрометра електронного парамагнітного резонансу ELEXSYS E500 Bruker BioSpin. Вимірювання магнітних властивостей тканин мігруючих (лосось атлантичний) та немігруючих (товстолобик звичайний) риб проведено за стандартною методикою [78].

2.2.3 Методи підготовки тканин до гістологічного дослідження

Підготовка кісток мігруючих та немігруючих риб до дослідження за допомогою СЗМ.

Першим етапом обробки шматочків решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб є фіксація, мета якої: закріпити структуру кісткової тканини в тому стані, в якому вона перебувала в момент її занурення в фіксуючу рідину.

Для фіксації кісткової тканини як фіксуючу рідину використовували 10% розчин формаліну. Тривалість фіксації решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб у 10% розчині формаліну становила 24 години в добре закупореній ємності. Потім шматочки кісткової тканини промивали у дистильованій воді й проводили через спирти зростаючої концентрації (від 50% до 100%).

Для отримання гістологічних зрізів кісткової тканини необхідно розчинити солі кальцію. Декальцинації піддавали невеликі й тонкі шматочки кісткової тканини (товщиною 0,5-1 см). Для декальцинації використовували 5% водний

розчин азотної кислоти, тривалість декальцинації 24 години. Після декальцинації зразки решітчастих кісток промивали протягом 24 год в 70% етиловому спирті [79].

Після декальцинації шматочки решітчастих кісток заливали рідким парафіном. Після просочення об'єкта парафіном за температури 55-56 ° С дали йому затверднути за кімнатної температури разом з парафіном у спеціальних формочках, отримували парафіновий блок [79].

Підготовка органів та тканин тварин до дослідження за допомогою СЗМ.

Для виготовлення препарату першим етапом є одержання біологічного матеріалу. Для цього вирізали шматочки мозку коропа розміром близько 1 см³ за допомогою керамічного леза.

Фіксацію матеріалу, зневоднення фіксованого матеріалу та отримання парафінового блоку здійснювали за вище описаною методикою [79].

Виготовляли з парафінових блоків зрізи завтовшки 3-7 мкм. Виготовлення зрізів проводили на мікротомі Leica RM 2125 RTS. Після отримання зрізів їх поміщали на предметні скла та звільняли від заливального середовища. Отримані зрізи решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб на предметному склі були досліджені за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) та магнітно-силової мікроскопії (МСМ).

2.2.4 Скануюча зондова мікроскопія

Для дослідження органів та тканин тварин на предмет наявності в них БМН використовували методи атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії.

За допомогою АСМ отримують зображення поверхні зразків в наномасштабі шляхом вимірювання сил взаємодії між «зондом» – голкою з діаметром кінчика меншим за 10 нм та поверхнею зразка. Відстань, на якій вимірюється сила взаємодії коливається в межах 0,2-10 нм. Рух голки вздовж

поверхні супроводжується відхиленням її у вертикальній площині від початкового положення. Реєстрація відхилення «зонда» від початкового положення реєструється по руху відбитого від закріпленої на верхній частині «зонда» дзеркальної поверхні лазерного променя. Коливання лазерного пучка передаються на комп'ютер, що за сумою всіх повздовжніх проходів «зонда» будує тривимірну картину аналізованої поверхні [80].

MCM дає змогу отримати зображення магнітної карти досліджуваної поверхні. Основним елементом MCM також є зонд. На відміну від АСМ, в магнітно-силовому мікроскопі сили, що вимірюються, є магнітними. Намагнічений зонд реагує на зміну орієнтації магнітного поля у зразку. Зонд зазвичай намагнічений так, щоб лінії напруженості магнітного поля (МП) були спрямовані вниз, до досліджуваної поверхні. Таким чином, якщо на поверхні зразка є магнітний домен з орієнтацією напруженості МП антипаралельною відносно орієнтації напруженості МП зонду, то зонд здійснить коливання у вертикальній площині, спрямоване вгору, а якщо орієнтація ліній напруженості МП буде взаємопаралельною до орієнтації ліній напруженості МП зонду, то кінчик голки здійснить коливання вниз. Реєстрація таких коливань за допомогою лазера, як у випадку з АСМ, і обробка їх комп'ютером в результаті дає картину однотонної поверхні з плямами чи цятками паралельно й антипаралельно орієнтованих ліній напруженості МП в магнітних доменах поверхні, що досліджується, відносно ліній напруженості МП зонду [81].

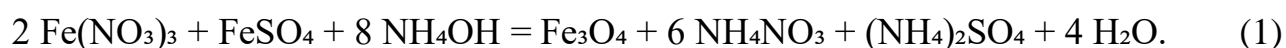
Дослідження наявності БМН та їх локалізації в біологічному матеріалі проводили за допомогою скануючого зондового мікроскопа «Solver PRO-M» методом АСМ та МСМ.

Використано магнітний зонд серії MFM_LM з розміром мікросхеми $3,4 \times 1,6 \times 0,3$ мм, з покриттям CoCr. Цей зонд використовувався як для АСМ, так і для МСМ візуалізації. Застосовано безконтактний режим АСМ. Сканування МСМ проводили на постійній відстані від поверхні зразка після сканування АСМ. Висота «підйому» зонда становила 100 нм. Консоль відкалібрована за

допомогою тестових зразків. Калібрування зонда проводили безпосередньо перед вимірами.

2.2.5 Методи виготовлення магнітних наноміток

Для приготування магнітної рідини в роботі використовували метод співосадження солей II та III валентного заліза концентрованим розчином аміаку [82].



Для цього згідно з методом [82] наважки солей 2,2 г $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 7,99 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ розчиняли в 25 мл дистильованої води, розчин $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ підігрівали у полум'ї горілки для кращого розчинення. В колбу місткістю 100 мл додавали 15 мл 25%-го розчину аміаку та поміщали у простір між магнітами. Напруженість магнітного поля встановлювали 2000 Е. В розчин аміаку за постійного перемішування тонкою цівкою вливали суміш солей. Суміш тримали в постійному магнітному полі протягом 15 хв за постійного перемішування. В результаті зазначеної реакції утворюється осад магнетиту чорного кольору (Fe_3O_4).

Осад відділяли від надосадової рідини за допомогою постійного магніта, та промивали дистильованою водою для зниження рН колоїдного розчину магнетиту до 7. Після промивання до осаду додавали 25 мл 2 М розчину перхлорної кислоти (HClO_4) та перемішували протягом 50 хв за допомогою механічної мішалки, після чого виділяли осад магнетиту за допомогою постійного магніту. Осад заливали 50 мл дистильованої води та перемішували протягом 30 хв за допомогою механічної мішалки.

В 1 г отриманої магнітної рідини 0,2 г Fe_3O_4 . Розмір наночастинок магнетиту знаходиться в діапазоні від 2 нм до 23 нм, середній розмір наночастинок магнетиту 11 нм.

2.2.6 Умови утримання риб *Danio rerio*

Риб *Danio rerio* утримували в скляних акваріумах об'ємом 20 л, які обладнані автоматизованими системами аерації, освітлення, нагріву та фільтрування води. Дослідних риб утримували в циклі 14:10 год світло:темно в акваріумі з контрольованою температурою води ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). У експерименті використовували дорослі особини *Danio rerio* (вагою від 0,5 до 0,8 г маси тіла) у віковій групі 5-6 місяців. Риб годували двічі на день кормом TetraMin Flakes.

Всі експерименти на тваринах у цьому дослідженні проводились з дотриманням загальних правил та норм Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятих Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та Законом України «Про захист тварин від жорстокої поведінки» (2006), а також відповідно до «Правил поводження з тваринами, що використовуються в наукових експериментах, тестуванні, навчальному процесі, виробництві біологічних препаратів».

2.2.7 Принципи формування експериментальних груп

Загалом 20 особин риб *Danio rerio* були випадковим чином розділені на дві групи, що склалися з однієї контрольної групи та однієї тестової групи. Кожна група включала по десять риб *Danio rerio*.

Контрольну та тестову групи риб *Danio rerio* утримували в окремих акваріумах.

2.2.8 Процедура перорального введення досліджуваної речовини

Наведена нижче процедура являє собою модифікацію раніше описаного протоколу [83]. Даний спосіб введення штучних магнітних частинок (ШМЧ) дає змогу надійно, безпечно та ефективно перорально вводити точний об'єм розчину дорослим рибам *Danio rerio*.

Мікропіпетку надійно фіксували у штативі. Голку-метелик закріплювали на мікропіпетку 1000 мкл, що містила розчин ШМЧ.

За допомогою вологої тканини (для того, щоб підтримувати тіло у вологому стані), *Danio rerio* утримували в такому положенні, що пластиковий кінець голки-метелика обережно вводили в пащу *Danio rerio*. Відповідний об'єм досліджуваного розчину магнетиту повільно випускали в ротову порожнину риби.

Після успішного введення рибу відпускали назад у кінцевий резервуар.

Риби з тестової групи отримували перорально приблизно 100 мкл розчину наночастинок магнетиту Fe_3O_4 у дозі 20 мкг/г/день відповідно до розробленого графіка.

Було обрано графік дозування тривалістю 28 днів, оскільки він відповідає стандартній тривалості експозиції для досліджень з використанням *Danio rerio* згідно з рекомендаціями Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу.

Контрольній групі вводили дистильовану воду в тому ж об'ємі.

2.2.9 Визначення розподілу штучних магнітних наночастинок у тканинах після багаторазового введення

Для визначення розподілу наночастинок магнетиту Fe_3O_4 у основних органах (мозок, серце, печінка, нирки) *Danio rerio* застосовували методику виявлення окисних сполук заліза за допомогою реакції Перлса [84]. Після закінчення тривалості впливу наночастинок магнетиту Fe_3O_4 проводили розтин для виділення органів. Зразки піддавали механічній дезінтеграції.

Після дезінтеграції біомасу клітин досліджуваних органів наносили на предметне скло та готували препарати, які знебарвлювали солянокислим спиртом (етиловий спирт 96 % – 97 мл та концентрована соляна кислота – 3 мл). Після знебарвлення препарати обполіскували в дистильованій воді. Заливали 1 Н розчином соляної кислоти на 30 хв. Додавали в кислоту рівну кількість 2% розчину калію гексаціаноферату тригідрату (жовтої кров'яної солі), перемішували і забарвлювали протягом 10 хв [84]. Потім обполіскували препарати в дистильованій воді та висушували.

Мікроскопіювання досліджуваних зразків проводили за допомогою оптичного бінокулярного мікроскопу XS-5520 MICROmed за збільшення 600×.

2.2.10 Визначення магнітофоретичної рухливості

Магнітофоретична рухливість – це рухливість парамагнітних і феромагнітних частинок, що переміщуються під дією зовнішнього магнітного поля. В даній роботі для визначення магнітофоретичної рухливості використовували магнітну систему на основі постійних магнітів для отримання високоградієнтного магнітного поля в заданій області. Визначено рух наночастинок у потоці рідини за накладання зовнішнього магнітного поля, що створюється магнітною системою. Порівняння магнітофоретичної рухливості

зразків проводили шляхом вимірювання середньої швидкості руху кластерів клітин досліджуваних органів до лінії контакту системи двох постійних магнітів.

Співвідношення значень магнітофоретичної рухливості кластерів клітин досліджуваних органів контрольної та тестової груп тварин, на основі отриманих значень середніх швидкостей руху клітин в магнітному полі, розраховували за формулою:

$$\frac{\chi^{(1)}}{\chi^{(2)}} = \frac{V_{\chi}^{(1)} [r_{кл}^{(2)}]^2}{V_{\chi}^{(2)} [r_{кл}^{(1)}]^2} \quad (2)$$

де $\chi^{(1)}$ – магнітофоретична рухливість кластерів клітин досліджуваних органів тестової групи тварин;

$\chi^{(2)}$ – магнітофоретична рухливість кластерів клітин досліджуваних органів контрольної групи тварин;

$V_{\chi}^{(1)}$ – середня швидкість руху кластерів клітин досліджуваних органів тестової групи тварин;

$V_{\chi}^{(2)}$ – середня швидкість руху кластерів клітин досліджуваних органів контрольної групи тварин;

$r_{кл}^{(1)}$ – середній радіус кластерів клітин досліджуваних органів тестової групи тварин;

$r_{кл}^{(2)}$ – середній радіус кластерів клітин досліджуваних органів контрольної групи тварин.

2.2.11 Розрахунок сили, що виникає між біогенними магнітними наночастинками та штучно введеними магнітними наночастинками

В даній роботі для виявлення ролі БМН під час штучного магнітомічення розраховані сили взаємодії ланцюжків БМН та штучно введеними магнітними наночастинками.

Для розрахунку сил взаємодії ланцюжка БМН з штучно введеними магнітними наночастинками розглянуто модель лінійного ланцюжка з радіусом БМН r_0 , з відстанню між БМН в ланцюжку Δ , відстанню від кінчика ланцюжка БМН до штучно введеної магнітної наночастинки Δ_0 , радіусом штучно введеної магнітної наночастинки R_0 , як зображено на рисунку 2.1.

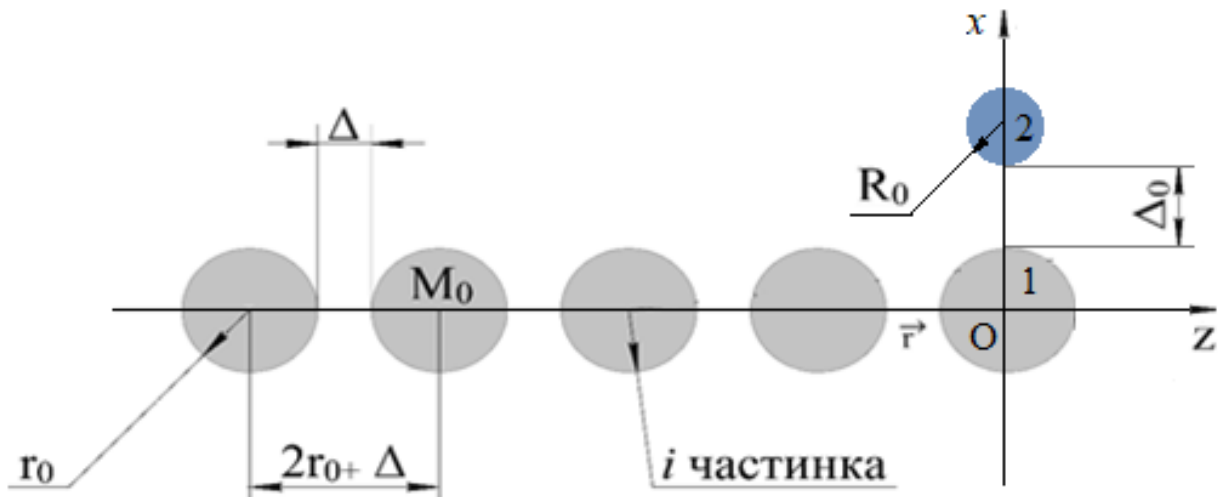


Рисунок 2.1 – Схематичне зображення взаємодії штучно введеної магнітної наночастинки та БМН в клітині: 1 – перша біогенна магнітна наночастинка, i – i -та біогенна магнітна наночастинка в клітині, 2 – штучно введена магнітна наночастинка, Δ – відстань між біогенними наночастинками, Δ_0 – відстань від біогенної наночастинки до штучної магнітної наночастинки, M_0 – намагніченість біогенної магнітної наночастинки, точка O позначає координату $z=0$.

Під час розрахунку сили магнітодипольної взаємодії F_z враховано табличне значення намагніченості для магнетиту: $M_0 = 477$ од СГСМ [85] і дані про розміри, розташування і кількість БМН в клітинах: $R_0 = 1-20$ нм, $r_0 = 10-250$ нм, $N=100$ частинок [86]. Характерні розміри БМН у живих організмів, як вже зазначалося, знаходяться в межах від 10 нм до 250 нм.

Висновки до розділу

Методики досліджень, що використовуються у роботі, дають змогу адекватно оцінити процес накопичення штучних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин, а також визначити основні закономірності наноструктурної локалізації біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин, що цілком дає змогу вирішити поставлені задачі досліджень.

3 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПРИРОДНОГО МАГНІТОМІЧЕННЯ НА ПРИКЛАДІ НЕМІГРУЮЧИХ РИБ

3.1 Біоінформатичний аналіз представників риб як потенційних продуцентів БМН

До білків, без яких неможливий процес біомінералізації магнетиту відносяться білки MamA, MamB, MamM, MamE, MamO, MamN [87]. На даний момент ще детально не проаналізовано всі функції білків магнітосомного острівця МТБ, тому ця задача залишається актуальною [88]. Інші білки магнітосомного острівця МТБ – mamK, mamZ, mamQ, mamL, mamI, mamJ, mamD, mamC, mamG, mamX, mamY, mamP, mamT, mamR, mamS, mamH, mamF – відносяться до набору регуляторних білків, які відповідають за форму, розміри, кількість у клітині, утворення магнітосомних везикул та формування ланцюжків БМН [87].

Для формування кристалічних БМН в досліджуваних мікроорганізмах достатньо наявності гомологів білків МО МТБ: MamA, MamB, MamE, MamO, MamM, а для формування аморфних БМН необхідна наявність гомологів білків МО МТБ: MamB, MamE, MamO, MamM [88].

На сьогодні в БД немає жодного повного геному риб [75]. Оскільки магнітосомний острівець міг не потрапити в розшифровану область генома, то генетичний аналіз має бути підтверджений порівнянням функцій білків для його достовірності. Проте наявність БМН у мігруючих риб, таких як: лосось атлантичний, нерка, тунець жовтоперий та вугор європейський доведена експериментально [4, 89, 90]. Мігруючими рибами серед досліджуваних є лосось атлантичний та лосось тихоокеанський, наявність БМН у різних тканинах останнього доведена науковцями експериментально [90].

Вирівнювання білків МО МТБ MamA, MamB, MamM, MamE, MamO та MamK, без яких неможлива біомінералізація БМН, та білків тварин [91-93] – мігруючих та немігруючих риб, приведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та амінокислотних послідовностей білків мігруючих і немігруючих риб.

Мігруючі та немігруючі риби	Повнота генома	Е-число (Ident, %)					
		Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
		Мам А	Мам В	Мам М	Мам О	Мам Е	Мам К
		Е-число					
		Ident, %					
		Length					
Лосось атлантичний <i>Salmo salar</i>	●	0.023	2e-08	9e-07	1e-08	1e-29	4e-05
		31%	30%	29%	27%	41%	23%
		59	107	114	177	171	172
Лосось тихоокеанський <i>Oncorhynchus nerka</i>	геном органел	32	1399	84	0.18	29	2e-05
		38%	26%	28%	45%	44%	23%
		16	19	39	40	16	172
Короп звичайний <i>Cyprinus carpio</i>	●	2e-05	3e-11	5e-07	9e-08	5e-16	5e-05
		22%	22%	28%	25%	42%	23%
		153	270	114	163	139	175
Товстолобик звичайний <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	геном органел	0.71	2.1	1.1	1.2	6.3	2e-04
		56%	27%	32%	45%	47%	23%
		27	56	50	40	15	171
Карась звичайний <i>Carassius carassius</i>	геном органел	17	1.7	0.11	0.11	28	0.002
		31%	35%	33%	45%	42%	40%
		45	20	36	40	24	30
Щука звичайна <i>Esox lucius</i>	●	2e-05	1e-05	5e-07	8e-09	6e-28	2e-04
		28%	28%	29%	27%	42%	29%
		114	101	114	143	168	174

* ● – геном організму розшифровано на $\frac{3}{4}$, ● – геном організму розшифровано на $\frac{1}{2}$.

Гомологи білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 серед білків мігруючих та немігруючих риб наведено в таблиці 3.2 [94].

Таблиця 3.2 – Гомологи білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 серед білків мігруючих та немігруючих риб.

Мігруючі та немігруючі риби	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	МамА	МамВ	МамМ	МамО	МамЕ	МамК
	Білки мігруючих та немігруючих риб					
Лосось атлантичний <i>Salmo salar</i>	TPR	ZIP 4	ZIP 9	serine protease HTRA1	serine protease HTRA1	actin
Лосось тихоокеанський <i>Oncorhynchus nerka</i>	vomeronasal 1 receptor-like protein	transferrin	NADH dehydrogenase	cytochrome c oxidase	transferrin	beta-actin
Короп звичайний <i>Cyprinus carpio</i>	TPR	ZIP 9	ZIP 9	serine protease HTRA1B	serine protease HTRA1B	actin-related protein
Товстолобик звичайний <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	ATP synthase	hypoxia-inducible factor 2 alpha A	NADH dehydrogenase	cytochrome c oxidase	matrix metalloproteinase 2	beta-actin
Карась звичайний <i>Carassius carassius</i>	toll-like receptor 3	HMG box protein Sox9	ribonucleotide reductase	cytochrome c oxidase	heat shock protein 60	beta-actin
Щука звичайна <i>Esox lucius</i>	PEX5-related protein	ZIP 4	ZIP 9	serine protease HTRA1A	serine protease HTRA1A	actin

Проведений біоінформаційний аналіз показав, що такі організми можуть бути продуцентами БМН: коропа звичайний (*Cyprinus carpio*) та щука звичайна (*Esox lucius*). Про що свідчить значення наступних показників: Ident більше ніж 18% для всіх досліджуваних білків коропа звичайного та щуки звичайної,

значення E-числа становить менше 0,05, що виключає вірогідність випадковості співпадінь, а також довжина вирівнювання становить більше 100 амінокислотних залишків.

Судячи з результатів вирівнювання можна стверджувати, що досліджувані організми можуть бути продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН. Про це свідчать значення статистичних чисел, які знаходяться в тому діапазоні, де можлива подібність білків досліджуваних риб з білками МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, без яких неможлива біомінералізація магнітних наночастинок [95].

Наявність гомологів білку MamK в усіх досліджених організмах говорить про можливе формування ланцюжків БМН даними організмами, що підтверджено результатами скануючої зондової мікроскопії, які наведено нижче. Також наявність гомологів білку MamK в усіх досліджених організмах може свідчити про асоційованість БМН даних організмів з мембраною клітини.

Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків МТБ та білків риб показали, що короп звичайний та щука звичайна можуть бути продуцентами БМН, оскільки подібність білків підтверджує не тільки E-число, кількість ідентичних амінокислотних залишків білків (Ident) та довжина вирівнювання (Length), а й спільні функції білків (табл. 3.3) [94].

Таблиця 3.3 – Порівняння відомих функцій білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків риб.

Назва та функції білку МО МТБ	Назва та функції білку риб
MamA – містить домен TPR залучений до функцій білок-білкових взаємодій, функції шаперонів, клітинного циклу, транскрипції, транспорту білків.	TPR – це біспіральний білок, який кодується одноіменним геном. TPR-домен бере участь в таких біологічних процесах як білок-білкові взаємодії, транспорт білків, клітинний цикл, транспорт мРНК.

Продовження таблиці 3.3

Назва та функції білку МО МТБ	Назва та функції гомологічного білку риб
MamB – транспортер катіонів Co, Zn, Cd.	Zinc transporter 4 – транспортер катіонів Zn ²⁺ . Представник сімейства ZNT, транспортер цинку ZNT4, бере участь в транспортуванні Zn ²⁺ з ЦП. Представник сімейства ZIP, транспортер цинку ZIP4, бере участь в транспортуванні Zn ²⁺ в ЦП та відіграє важливу роль в підтримці клітинного гомеостазу цинку [96].
MamM – транспортер катіонів Co, Zn, Cd.	Zinc transporter 9 – транспортер катіонів Zn ²⁺ . ZNT9 локалізується в ЦП і регулює експорт катіонів цинку з клітини. ZIP9 бере участь у транспортуванні Zn ²⁺ в клітину. Точна біологічна роль ZIP9 нез'ясована [96].
MamO – серинова протеаза.	Cytochrome C oxidase – є ключовим ферментом аеробного метаболізму.
MamE – серинова протеаза. PDZ домен трипсиноподібної серинової протеази залучений до відгуку на тепловий шок, функції шаперонів, апоптозу, за впізнавання субстрату і/або його зв'язування.	Serine protease HTRA1 – фермент, який кодується одноіменним геном. Складається з чотирьох білкових доменів. Ген <i>HTRA1</i> кодує білки сімейства трипсино-подібних серинових протеаз. HTRA1 є регулятором росту клітин [97].

Як видно з таблиці 3.3 функції білків MamA, MamB, MamM та MamE є аналогічними до функцій білків риб, що підтверджує спільність походження вирівняних доменів.

3.2 Експериментальне дослідження наявності біогенних магнітних наночастинок в органах мігруючих та немігруючих риб

3.2.1 Електронний парамагнітний резонанс спектроскопія кісток мігруючих та немігруючих риб

В роботах [98-101] здійснено детекцію БМН в біологічних матеріалах з різними магнітними властивостями із застосуванням магніторезонансної спектроскопії.

Об'єктами дослідження обрано біологічний матеріал з різними магнітними властивостями, а саме: біологічний матеріал решітчастої кістки лосося атлантичного *Salmo salar*, бактерії *Escherichia coli* K13, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та біологічний матеріал решітчастої кістки товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix*.

Вибір біологічного матеріалу було здійснено за допомогою аналізу літературних даних про наявність в ньому магнітних наночастинок та залізовмісних білків, зокрема феритину (табл. 3.4).

Відомо, що *E. coli* має щонайменше два білки для зберігання заліза: бактеріоферитин і феритин [102], проте не містить БМН, натомість у решітчастій кістці лосося атлантичного *Salmo salar* присутній як феритин, так і БМН, а клітини *S. cerevisiae* не містять ні феритину, ні БМН. Клітини *S. cerevisiae* слугували контролем.

Таблиця 3.4 – Зразки біологічного матеріалу для дослідження спектрів магнітного резонансу.

Біологічний матеріал, в якому експериментально знайдено феритин та БМН (мігруючі риби)	Біологічний матеріал, що містить феритин та не містить БМН	Біологічний матеріал, що не містить ні феритин, ні БМН	Біологічний матеріал, що містить феритин, але не досліджено на предмет наявності БМН (немігруючі риби)
Решітчаста кістка лосося атлантичного <i>Salmo salar</i> [102]	<i>E.coli</i> K13 [102]	<i>S. cerevisiae</i> [103]	Решітчаста кістка товстолобика звичайного <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>

Результати магніторезонансного вимірювання зразків *E. coli* K13, біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося атлантичного та товстолобика звичайного, а також зразків *S. cerevisiae* представлено на рисунку 3.1.

Зокрема, спектр МР клітин *S. cerevisiae* характеризується значно меншою амплітудою піків, ніж МР-спектр інших зразків, незалежно від величини накладеного поля, а проте дріжджі не містять магнітних наночастинок, що повністю узгоджується з літературними даними. МР-спектр біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося атлантичного та решітчастої кістки товстолобика звичайного демонструє вузький пік за 3,5 кГц, тоді як ширина піку спектру МР для *E. coli* K13 є значно більшою.

Слід зауважити, що амплітуда піку зразків *E. coli* K13 є на порядок меншою, ніж для аналогічних зразків біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося атлантичного та товстолобика звичайного. Поясненням цьому може бути наявність у біологічному матеріалі решітчастої кістки лосося атлантичного та товстолобика звичайного як феритину, так і БМН.

Методи МР-спектроскопії дають змогу чітко ідентифікувати феритин та біогенні магнітні наночастинок в біологічному матеріалі, що підтверджується відповідними МР-спектрами біологічного матеріалу різного походження. А

саме: МР-спектр біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося атлантичного та товстолобика звичайного демонструє вузький пік, який, вірогідно, відповідає БМН, у той час коли зразки *E.coli*, які містять феритин дають в рази ширший пік. Цей висновок слідує з того, що, як відомо, широка частина спектру МР характерна для феритину [104], а вузька частина спектру МР є специфічною для монорозмірних наночастинок магнетиту.

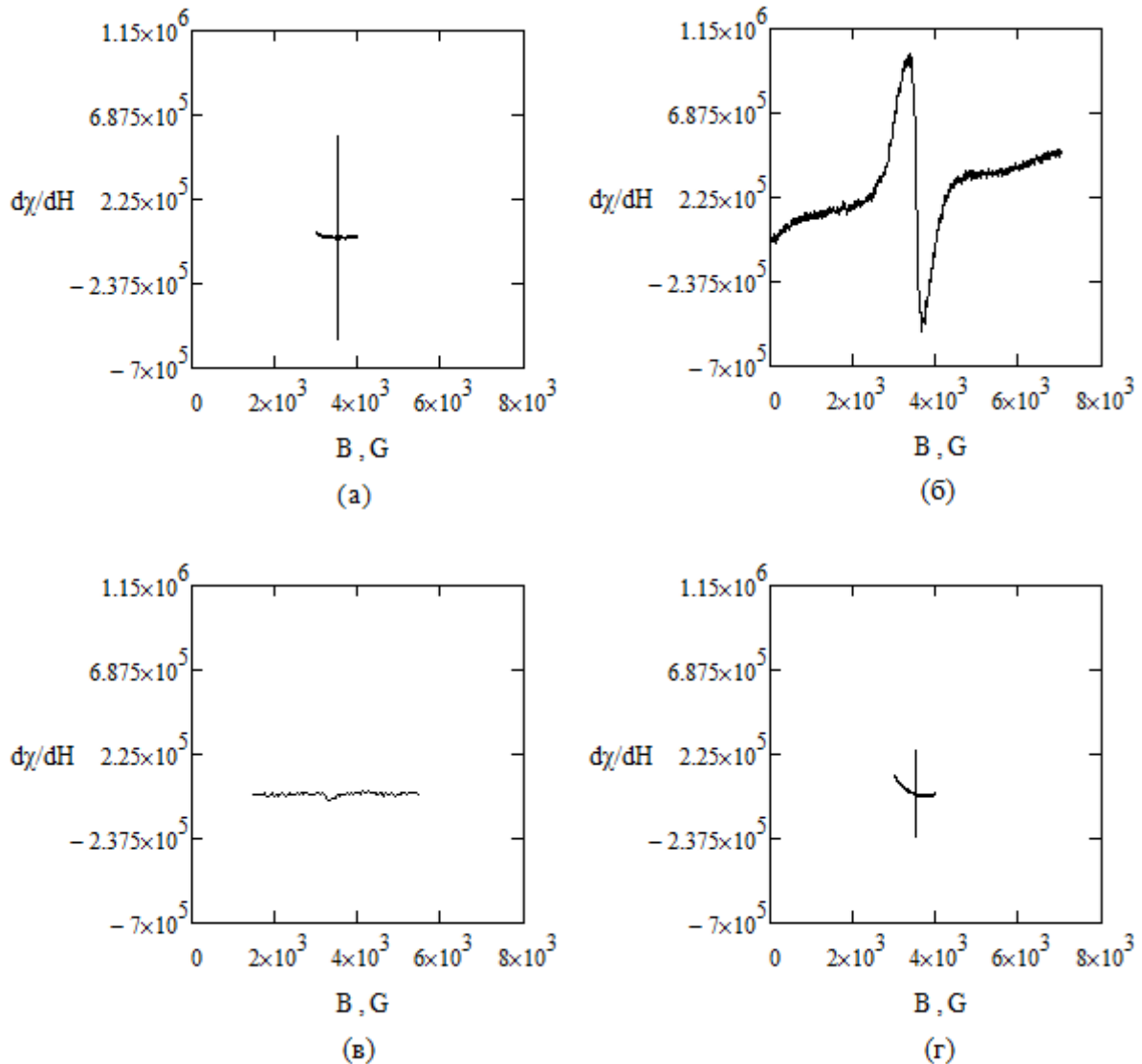


Рисунок 3.1 – Спектр магнітного резонансу: (а) – решітчастої кістки лосося атлантичного *Salmo salar*, (б) – бактерій *E. coli* K13, (в) – дріжджів *S. cerevisiae*, (г) – решітчастої кістки товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix*.

На рисунку: $d\chi/dH$ – перша похідна енергії адсорбції електромагнітного випромінювання; B , Гс – індукція магнітного поля.

Для дослідження спектрів електронного парамагнітного резонансу мігруючих та немігруючих риб обрали біологічні зразки решітчастої кістки лосося атлантичного *Salmo salar* (рис. 3.1а) та біологічні зразки решітчастої кістки товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix* (рис. 3.1г). Оскільки перша похідна спектру поглинання є найбільш поширеним способом для запису і представлення спектрів ЕПР, то в даній роботі обрано саме такий спосіб представлення результатів [78].

Протягом тривалого часу науковці вважали, що наявність біогенних магнітних наночастинок в решітчастій кістці тварин, які мігрують на великі відстані (птахів, риб) необхідна для орієнтації в геомагнітному полі Землі [105, 106]. Але, як показали недавні дослідження вчених на прикладі птахів – голубів, наявність біогенних магнітних наночастинок в решітчастій кістці птахів не пов'язана зі здатністю орієнтуватися в геомагнітному полі Землі [10].

Раніше наявність біогенних магнітних наночастинок у решітчастій кістці визначали лише у риб, які здатні мігрувати на великі відстані (лосось атлантичний, нерка, тунець жовтоперий). Оскільки на прикладі птахів показано, що БМН решітчастої кістки не беруть участі у орієнтації птахів у просторі, то важливим є дослідження наявності БМН у решітчастій кістці немігруючих риб. Визначення наявності БМН у тканинах немігруючих риб необхідне для уточнення їх функції.

Як видно з рисунку 3.1а,г ширина піків спектрів МР решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного є однаковою. Ширина сигналу характеризує типи взаємодій, які існують між феримагнітними частинками та їх оточенням. Як відомо, сигнал ЕПР є дуже чутливим до зміни мікрооточення молекули/частинки, що і робить даний метод цінним джерелом інформації про структуру багатьох об'єктів та матеріалів. Із подібності спектрів на рисунку 3.1а,г видно, що мікрооточення джерела ЕПР-сигналу є практично однаковим. Спектри ЕПР решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного відрізняються лише інтенсивністю. Цей факт – додаткове підтвердження того, що вони виникають

від БМН. У випадку наночастинок Fe_3O_4 оточення джерела ЕПР-сигналу на спектр електронного спінового резонансу (феримагнітного резонансу) практично не впливає. Отже, однакова ширина піків свідчить про те, що у складі решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного містяться БМН.

Амплітуда сигналу характеризує концентрацію феримагнітних наночастинок в резонаторі. Амплітуда МР спектру решітчастої кістки лосося атлантичного є дещо більшою, ніж амплітуда МР спектру решітчастої кістки товстолобика звичайного. Тобто кількість МН у решітчастій кістці лосося атлантичного є дещо вищою, ніж кількість МН у решітчастій кістці товстолобика звичайного, що узгоджується з результатами дослідження цих зразків за допомогою скануючої зондової мікроскопії, які наведено нижче.

3.2.2 Дослідження органів мігруючих та немігруючих риб за допомогою атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії

Аналіз літератури, присвячений наявності БМН в органах та тканинах мігруючих риб, показав, що у багатьох органах цих риб присутні БМН, як показано на рисунку 3.2 [89, 90, 107-109].

На цей час є багато розрізнених даних про наявність БМН в органах мігруючих риб, але переважна більшість досліджень також спрямована на підтвердження ідеї магніторецепції. Тому, в основному, досліджували такі органи, як решітчаста кістка, бічна лінія та мозок [89, 107].

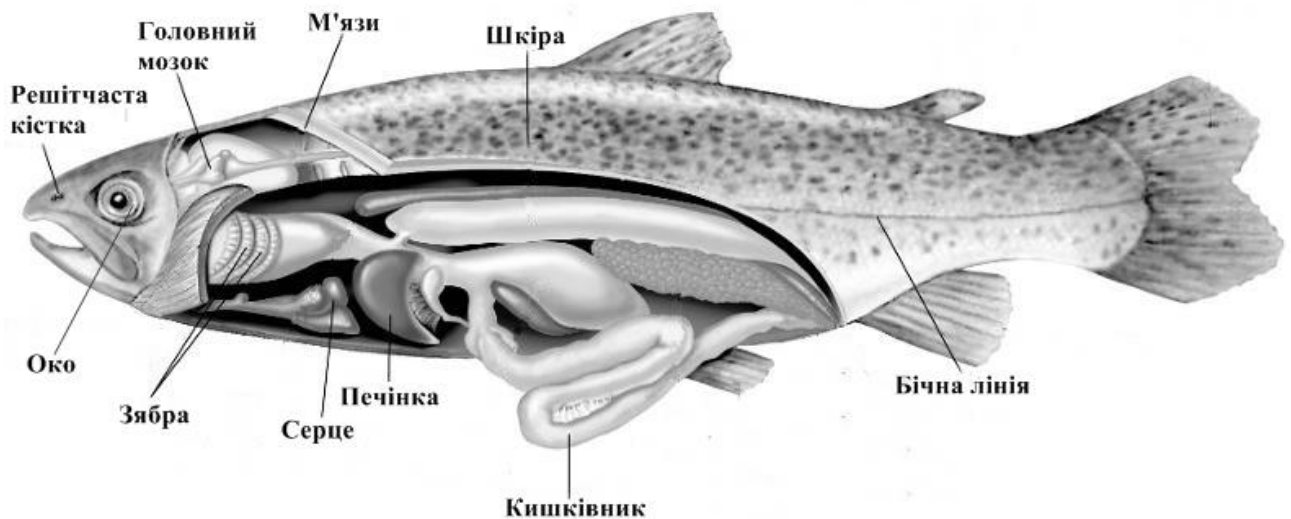


Рисунок 3.2 – Органи мігруючих риб, які досліджено на предмет наявності БМН [89, 90, 107-109].

Дослідження даних робіт [89, 90, 107-109] корелюють з роботами по дослідженню наявності БМН в різних органах та тканинах організму людини. В нормі БМН експериментально знайдено в серці, печінці, селезінці [9], надниркових залозах [8], решітчастій кістці [110] і головному мозку [17, 111-113]. Крім того, біоінформаційний аналіз показав, що і у людини практично у всіх органах і тканинах можлива біоінералізація БМН [114-116].

У даній роботі досліджено локалізацію БМН в органах і тканинах мігруючих та немігруючих риб за допомогою АСМ та МСМ [91, 94, 117-122].

Під час дослідження використано двохпрохідну методику, яка складається з мікроскопії двох видів: АСМ напівконтактним методом та МСМ. Режим сканування використано – напівконтактний та магнітний, тип зонду – магнітний кобальтовий.

Зразки біологічного матеріалу лосося атлантичного, щуки звичайної та товстолобика звичайного досліджено за допомогою скануючого зондового мікроскопа «Solver PRO-M».

На рисунку 3.3 зазначені органи немігруючих риб (*Hypophthalmichthys molitrix*, *Esox lucius* та *Cyprinus carpio*), які досліджені на предмет наявності БМН в даній роботі.

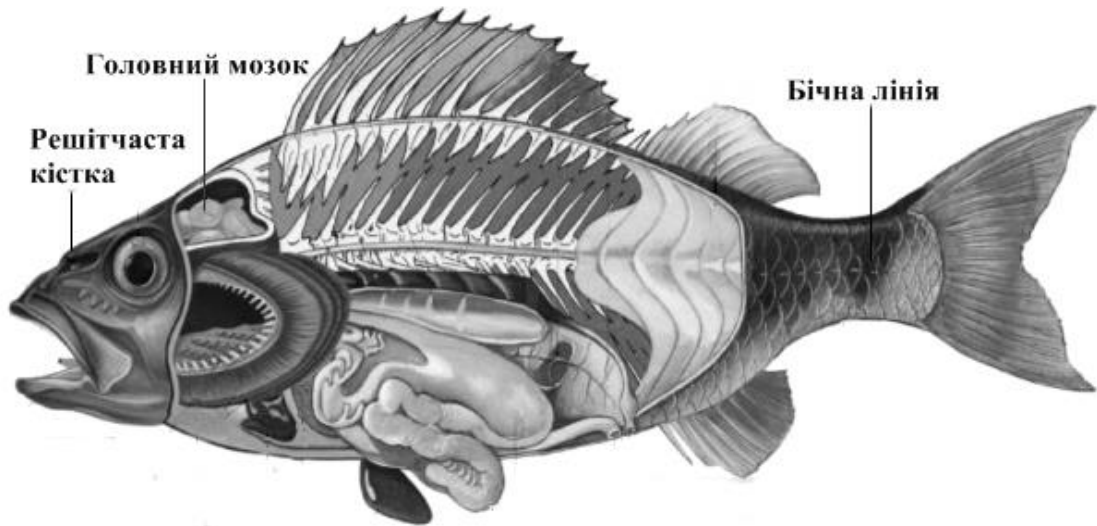


Рисунок 3.3 – Органи немігруючих риб (*Hypophthalmichthys molitrix*, *Esox lucius* та *Cyprinus carpio*), які досліджені на предмет наявності БМН.

МСМ зображення відображають просторовий розподіл БМН в біологічному матеріалі решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб, які представлені чорними та білими точками на МСМ зображеннях.

Результати дослідження решітчастих кісток мігруючих на немігруючих риб за допомогою скануючої зондової мікроскопії наведено на рисунках 3.4 – 3.5.

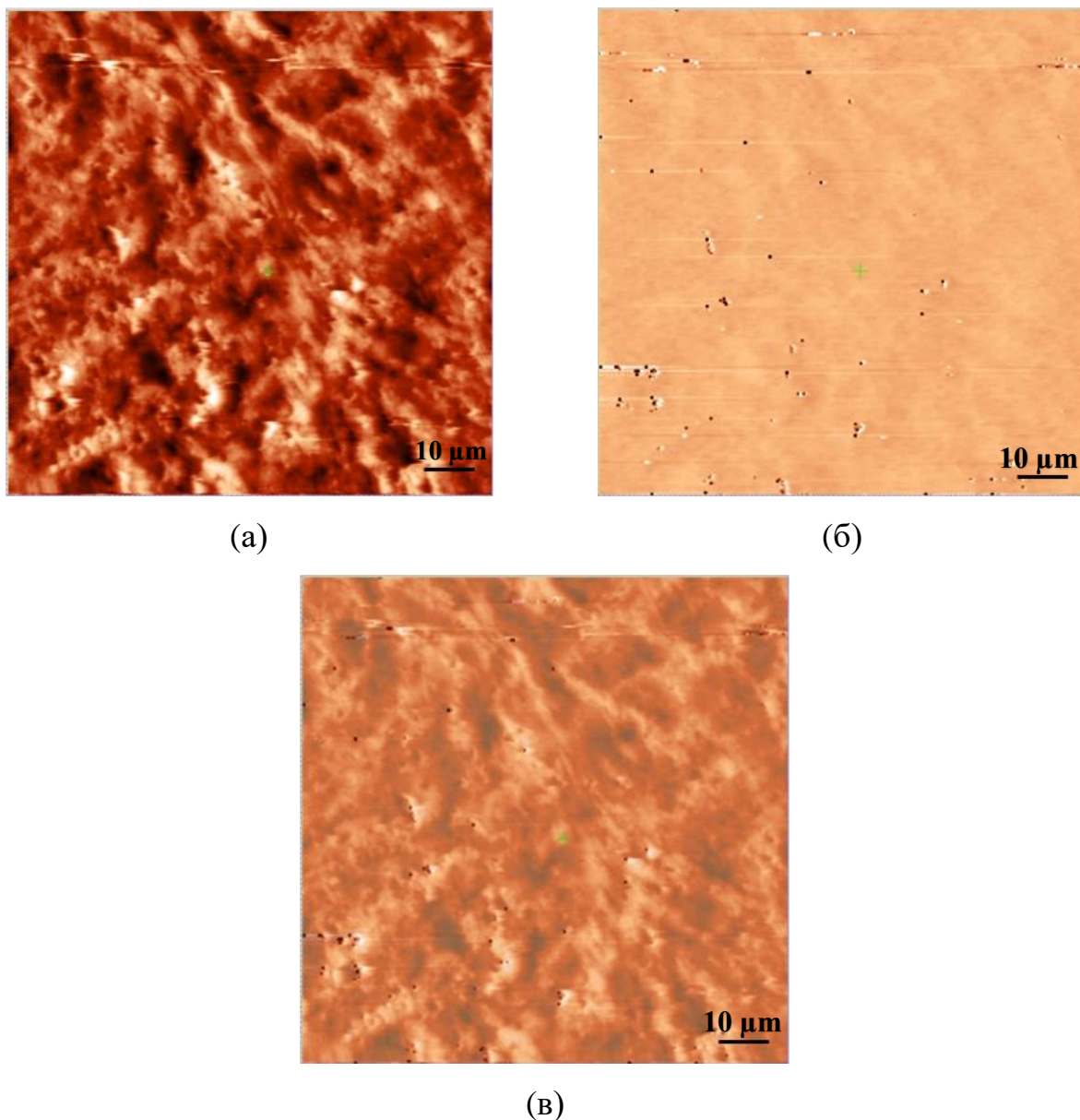
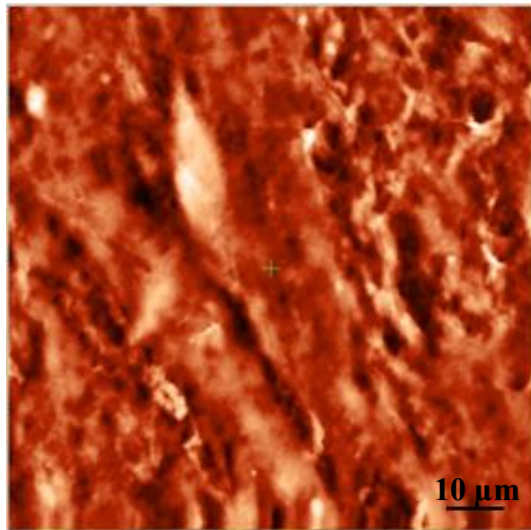
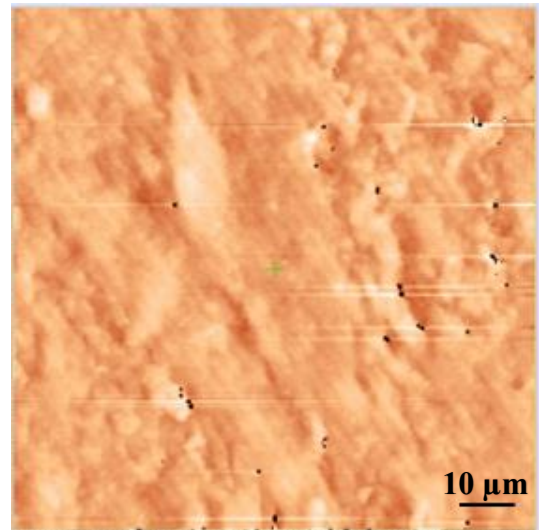


Рисунок 3.4 – Дослідження решітчастої кістки лосося атлантичного *Salmo salar* за допомогою скануючої зондової мікроскопії: (а) – АСМ зображення поверхні зразка; (б) – МСМ зображення (фрагмент, що містить БМН); (в) – накладені АСМ та МСМ зображення. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображеннях.

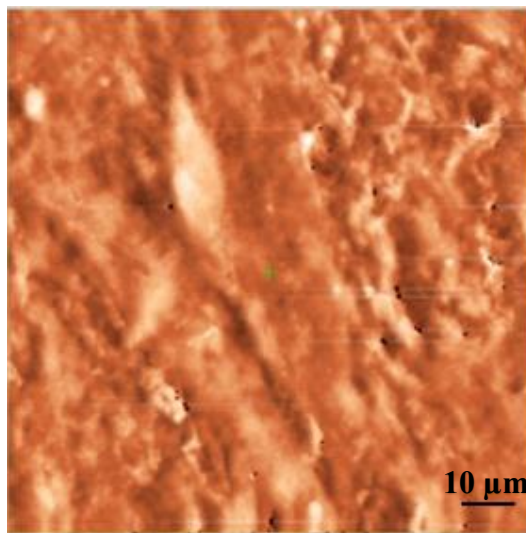
Як видно з рисунку 3.4, решітчаста кістка лосося атлантичного містить багато магнітної фази. На МСМ зображенні виявлено поодинокі БМН та їх ланцюжки.



(a)



(б)



(в)

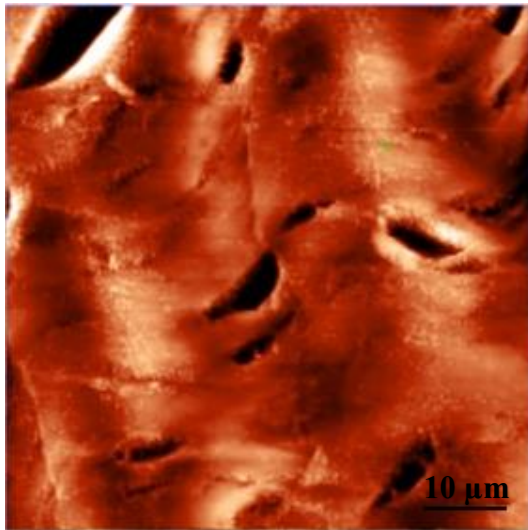
Рисунок 3.5 – Дослідження решітчастої кістки товстолобика звичайного *Huorophthalmichthys molitrix* за допомогою скануючої зондової мікроскопії: (а) – АСМ зображення поверхні зразка; (б) – МСМ зображення (фрагмент, що містить БМН); (в) – накладені АСМ та МСМ зображення. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображеннях.

Кількість БМН у решітчастій кістці товстолобика звичайного є дещо меншою, ніж кількість БМН у решітчастій кістці лосося атлантичного. БМН у решітчастій кістці товстолобика звичайного розташовані здебільшого поодинокі, або зібрані в ланцюжки, які містять в середньому по 5 магнітних наночастинок.

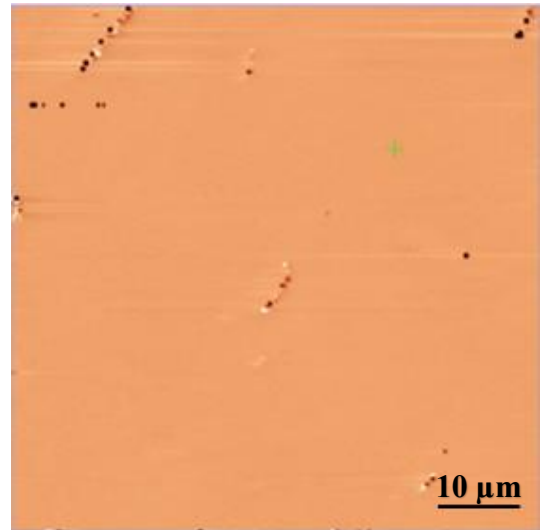
Бічна лінія риб є органом, який сприймає рухи і вібрації навколишнього середовища та використовується для орієнтації у воді. Ззовні виглядає як тонка лінія з обох боків тіла від зябер до основи хвоста та складається з каналів, заповнених рідиною специфічного іонного складу, ампул і поверхневих епідермальних органів. У стінках цього каналу проходять нервові закінчення, по яких передаються сигнали з навколишнього середовища. За допомогою бічної лінії риби здатні сприймати зміни тиску води. У деяких видів риб частина нервових закінчень бічної лінії виконують функції електрорецепторів, уловлюючи електричні коливання навколишнього середовища.

Водночас під час досліджень магніторецепції показано наявність магнітних наночастинок в бічній лінії мігруючих риб, як-от тунець жовтоперий та лосось тихоокеанський [89, 107]. В даній роботі показано наявність магнітних наночастинок в бічній лінії немігруючих риб щуки звичайної *Esox lucius* та товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix*.

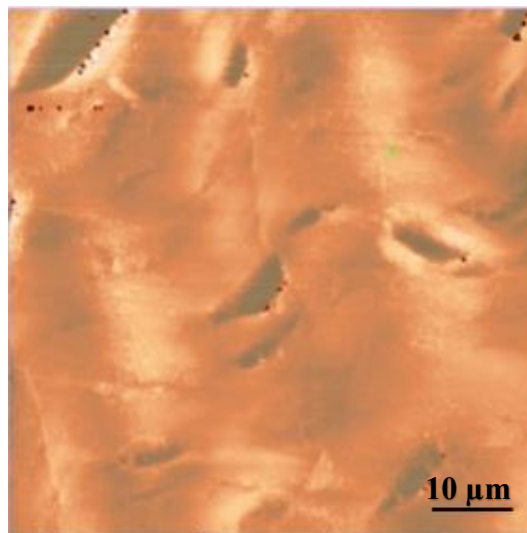
Результати дослідження бічної лінії лосося атлантичного, щуки звичайної та товстолобика звичайного за допомогою СЗМ наведено на рисунках 3.6 – 3.8.



(a)



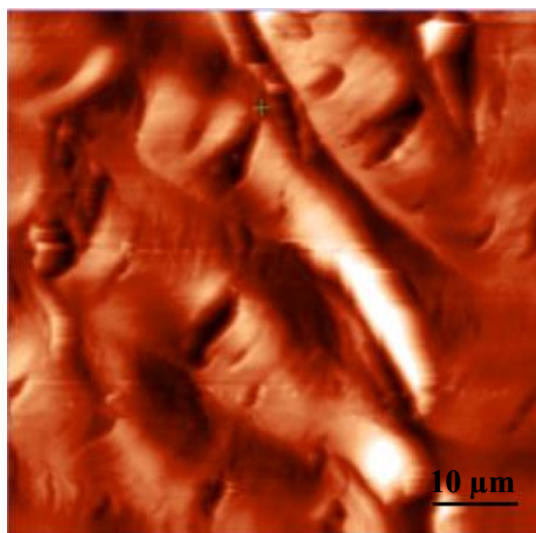
(б)



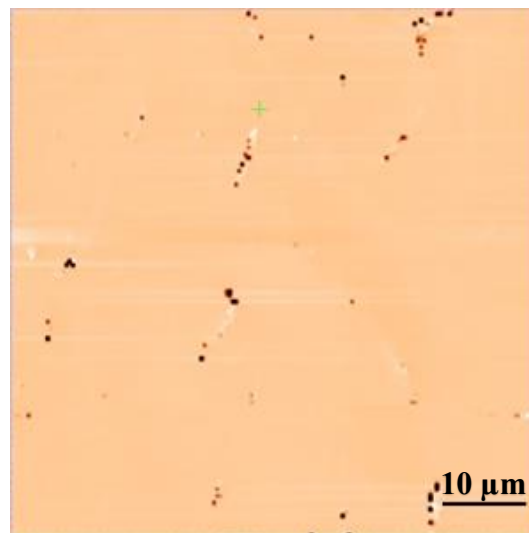
(в)

Рисунок 3.6 – Дослідження системи бічної лінії лосося атлантичного *Salmo salar* за допомогою скануючої зондової мікроскопії: (а) – АСМ зображення поверхні зразка; (б) – МСМ зображення (фрагмент, що містить БМН); (в) – накладені АСМ та МСМ зображення. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображеннях.

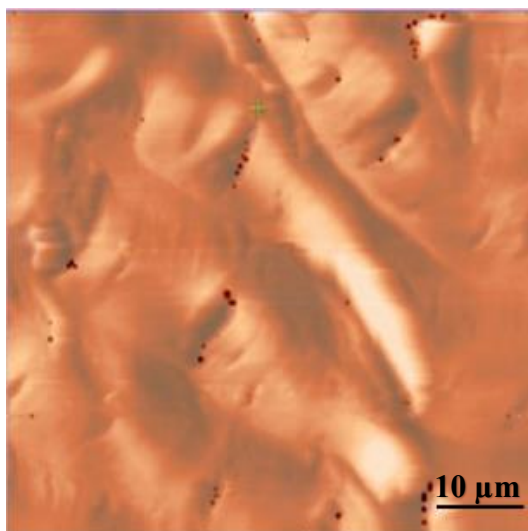
З рисунку 3.6 видно, що БМН у бічній лінії лосося атлантичного асоційовані здебільшого у ланцюжки, які містять в середньому по 15 магнітних наночастинок.



(a)



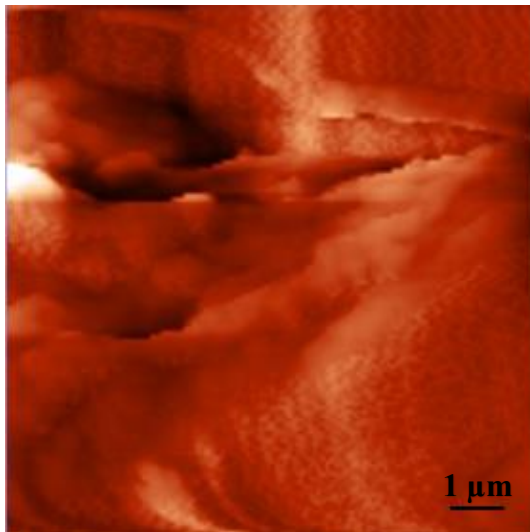
(б)



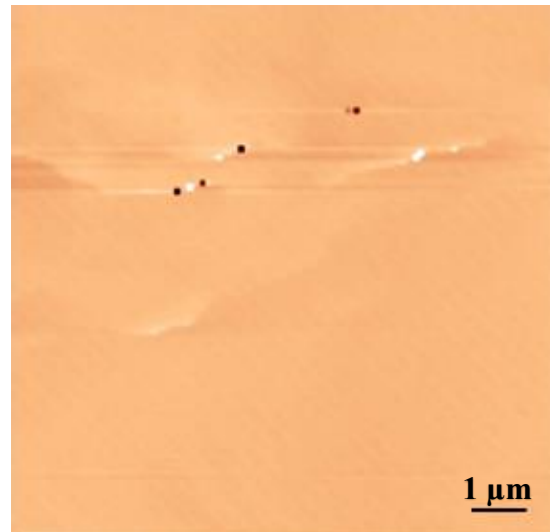
(в)

Рисунок 3.7 – Дослідження системи бічної лінії щуки звичайної *Esox lucius* за допомогою скануючої зондової мікроскопії: (а) – АСМ зображення поверхні зразка; (б) – МСМ зображення (фрагмент, що містить БМН); (в) – накладені АСМ та МСМ зображення. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображеннях.

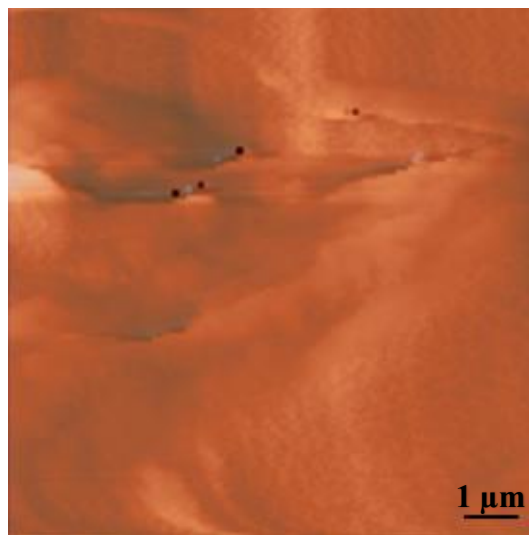
БМН у бічній лінії щуки звичайної розташовані здебільшого поодинокі або зібрані в ланцюжки.



(a)



(б)



(в)

Рисунок 3.8 – Дослідження системи бічної лінії товстолобика звичайного *Hypophthalmichthys molitrix* за допомогою скануючої зондової мікроскопії: (а) – АСМ зображення поверхні зразка; (б) – МСМ зображення (фрагмент, що містить БМН); (в) – накладені АСМ та МСМ зображення. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображеннях.

В таблиці 3.3 наведено наступні характеристики БМН: оцінка максимального розміру магнітних наночастинок, кількість в 100 мкм² досліджуваного органу та кількість магнітних наночастинок в ланцюжку. Максимальний розмір магнітних наночастинок визначали за допомогою програми «Nova». Як правило БМН або вкриті везикулою (у МТБ) [123], або

містяться в складі органічної матриці, або вкриті органічним матеріалом білкового походження [124].

Таблиця 3.5 – Кількість та оцінка максимального розміру магнітних наночастинок в органах мігруючих та немігруючих риб.

Орган досліджуваного організму	Кількість магнітних наночастинок в 100 мкм²	Оцінка максимального розміру магнітних наночастинок, нм	Кількість частинок в ланцюжках
Решітчаста кістка лосося атлантичного	150±19	405±36	7±1
Решітчаста кістка товстолобика звичайного	86±16	382±16	5±1
Бічна лінія лосося атлантичного	89±22	395±36	15±1
Бічна лінія щуки звичайної	128±38	392±47	10±1
Бічна лінія товстолобика звичайного	137±23	380±19	5±1

З таблиці 3.5 видно, що найбільша кількість БМН міститься в решітчастій кістці лосося атлантичного і становить 150±19 магнітних наночастинок в 100 мкм². Кількість БМН у решітчастій кістці товстолобика звичайного є меншою та становить 86±16 БМН в 100 мкм².

Максимальний розмір магнітних наночастинок у решітчастих кістках досліджуваних риб має однаковий порядок величини. Так само і кількість

магнітних наночастинок у ланцюжках. В середньому в ланцюжках БМН, які були детектовані в решітчастих кістках риб, по 6 магнітних наночастинок.

Що стосується системи бічної лінії риб, то кількість БМН в 100 мкм^2 в бічній лінії щуки звичайної та в бічній лінії товстолобика звичайного має однаковий порядок величини, а також є дещо вищою, ніж кількість БМН в бічній лінії лосося атлантичного.

Максимальний розмір БМН у системі бічної лінії досліджуваних риб має однаковий порядок величини та в середньому становить 389 нм.

Середня кількість наночастинок в ланцюжках БМН в системі бічних ліній риб коливається в межах від 5 ± 1 БМН в бічній лінії товстолобика звичайного до 15 ± 1 БМН в бічній лінії лосося атлантичного.

Висновки до розділу

На даному етапі роботи було показано, що короп звичайний (*Cyprinus carpio*) та щука звичайна (*Esox lucius*) можуть бути продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних біогенних магнітних наночастинок. Про що свідчать значення статистичних чисел, які знаходяться в тому діапазоні, де можлива подібність білків досліджуваних риб з білками МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, без яких неможлива біомінералізація магнітних наночастинок.

Наступним етапом роботи був аналіз спектрів магнітного резонансу решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного. Ширина сигналу характеризує типи взаємодій, які існують між феримагнітними частинками та їх оточенням. Із подібності спектрів МР решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного слідує, що мікрооточення джерела ЕПР-сигналу є практично однаковим. Спектри ЕПР решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного відрізняються лише інтенсивністю. Цей

факт – додаткове підтвердження того, що вони виникають від БМН. У випадку наночастинок Fe_3O_4 оточення джерела ЕПР-сигналу на спектр електронного спінового резонансу (феримагнітного резонансу) практично не впливає. Отже, однакова ширина піків свідчить про те, що у складі решітчастої кістки товстолобика звичайного та решітчастої кістки лосося атлантичного містяться БМН.

За допомогою атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії показано, що найбільша кількість БМН міститься в решітчастій кістці лосося атлантичного і становить 150 ± 19 БМН в 100 мкм^2 . Кількість БМН у решітчастій кістці товстолобика звичайного є меншою та становить 86 ± 16 БМН в 100 мкм^2 . Отримані дані узгоджуються з результатами аналізу МР спектрів решітчастих кісток досліджуваних риб.

Максимальний розмір магнітних наночастинок у решітчастих кістках досліджуваних риб має однаковий порядок величини і знаходиться у діапазоні 380-405 нм. Так само і кількість магнітних наночастинок у ланцюжках. В середньому в ланцюжках БМН, які були детектовані в решітчастих кістках риб, по 6 магнітних наночастинок.

Отримані результати свідчать, що БМН у решітчастій кістці мігруючих та немігруючих риб, найімовірніше, є сепараторами для вловлювання ефективно-парамагнітних кластерних компонентів, таких як везикули та гранули.

Результати, отримані у даному розділі, опубліковано у таких працях:

1. Кігель Н. Ф., Горобець С. В., Булаєвська М. О., Гнатюк А. О., Голуб В. О. Метод детекції біогенних магнітних наночастинок у біологічному матеріалі різної природи // Продовольчі ресурси: зб. наук. пр. / НААН України; Ін-т прод. ресурсів НААН України. – К.: ННЦ «ІАЕ», 2016. – № 7, С. 33–37.
2. Горобець С. В., Кравченко О. В., Булаєвська М. О., Панченко О. С. Потенційні продуценти біогенних магнітних наночастинок серед залізо- та

- марганецьокиснюючих бактерій // *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 2018. – Vol.2. – № 2. – P. 27–35. DOI: 10.20535/ibb.2018.2.2.124256
3. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievska M., Sharay I. Detection of Biogenic Magnetic Nanoparticles in Ethmoid Bones of Migratory and Non-migratory Fishes // *SN Applied Sciences*. – 2019. – 1: 63. DOI: 10.1007/s42452-018-0072-1 (Switzerland, ISSN 2523-3971)
 4. Gorobets S., Gorobets O., Golub V., Gromnadska M. Ferromagnetic resonance in the ethmoid bones of salmon and silver carp // *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*. – 2017. – Vol. 903. – 012001. DOI: 10.1088/1742-6596/903/1/012001 (United Kingdom, ISSN: 1742-6596)
 5. Громнадська М. О., Горобець С. В., Голуб В. О. ФМР спектр решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб // X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга, 22 квітня 2016, Київ. – С. 121.
 6. Gorobets S. V., Gorobets O. Yu., Golub V. O., Gromnadska M. Ferromagnetic resonance in the ethmoid bones of salmon and silver carp // *Joint European Magnetic Symposia (JEMS)*, 21-26 August 2016, Glasgow, UK. Poster Session B. Nanoparticles and interfases, nanomaterials and molecular magnetism. – PS.2.043.
 7. Булаєвська М. О., Горобець О. Ю., Шарай І. В. Магнітна силова мікроскопія решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб // XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», 21 квітня 2017, Київ. – С. 90.
 8. Gorobets S., Gorobets O., Bulaevska M., Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes // *Sol-SkyMag International Conference*, 19-23 June 2017, San Sebastian (Gipuzkoa), Spain. Poster Session (17:15-19:30, June 20, 2017). – Poster 8.
 9. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievska M., Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes // *PHYSICS OF MAGNETISM 2017 (PM'17)*, 26-30 June 2017, Poznan, Poland. – P-8-08. – P. 228.

10. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskaya M., Sharay I. Detection of Biogenic Magnetic Nanoparticles in Ethmoid Bones of Migratory and Non-migratory Fishes // ICSM2018, 29 April – 04 May, 2018, Beldibi/Antalya, Turkey. – Abs. ID 3416/ - Board ID TUE-C7 (Tuesday, 01.05.2018).
11. Булаєвська М. О., Шарай І. В. Аналіз наявності біогенних магнітних наночастинок в м'язах мігруючих та немігруючих риб // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019) / Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – С. 85.
12. Bulaievskaya M. O. Research advisor: Gorobets S. V. Detection of biogenic magnetic nanoparticles in muscles of migratory and non-migratory fishes // VIII Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ», Київ, Україна, 15 листопада 2019.

4. ВСТАНОВЛЕННЯ ЗАКОНОМІРНОСТЕЙ ЛОКАЛІЗАЦІЇ БІОГЕННИХ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК В БАГАТОКЛІТИННИХ ОРГАНІЗМАХ

Біогенний феримагнетизм інтенсивно досліджується більше чотирьох десятиліть в зв'язку з відкриттям біогенних магнітних наночастинок у великому різноманітті організмів [124-154]. В широкому сенсі біогенні магнітні наночастинок – це наночастинок залізовмісних матеріалів, таких що мають достатню магнітну сприйнятливості для руху в магнітному полі лабораторних магнітів. Біогенними ці наночастинок називаються тому, що їх біосинтез запрограмовано на генетичному рівні [155-157].

Основним поштовхом для дослідження біогенного феримагнетизму стала здатність магнітотаксисних бактерій рухатися вздовж силових ліній магнітного поля Землі [15]. Згодом ідея магнітотаксису була розвинута до ідеї про магніторецепцію тварин за рахунок наявності БМН [4]. Але у разі дослідження органів і тканин на предмет наявності БМН ці магнітні наночастинок було виявлено не лише в тих органах і тканинах, які можуть відповідати за орієнтацію тварин в зовнішньому магнітному полі Землі (мозок, дзьоб перелітних птахів, бічна лінія та решітчаста кістка мігруючих риб), а й в низці інших органів як мігруючих, так і немігруючих організмів [151].

На цей час наявність біогенних магнітних наночастинок теоретично передбачено методами порівняльної геноміки у низці органів та тканин людини [153], що підтверджується експериментальними роботами про наявність БМН в органах людини, а також аналогічних і гомологічних органах тварин, зокрема досліджених в даній роботі [158] (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. – Органи людини та аналогічні і гомологічні органи тварин, в яких знайдено БМН.

Органи та тканини людини, в яких теоретично передбачено наявність БМН (+)	Органи людини, в яких експериментально підтверджено наявність БМН	Аналогічні та гомологічні органи тварин, в яких експериментально підтверджено наявність БМН, зокрема в даній роботі
1	2	3
Мозок (+) [153]	Головний мозок [17, 111, 112]	Мозок <i>Oncorhynchus nerka</i> [108], мозок кита <i>Megaptera novaeangliae</i> [151], голова <i>Pachycondyla marginata</i> [2], мозок коропа звичайного (рис. 4.8)
Серце (+) [153]	Серце [9]	Серце <i>Sus domestica</i> [152], серце риб [108]
Печінка (+) [153]	Печінка [9]	Печінка <i>Sus domestica</i> [152], печінка риб [108], печінка миші звичайної <i>Mus musculus</i> (рис. 4.1, 4.2)
Селезінка (+) [153]	Селезінка [9]	Селезінка <i>Sus domestica</i> [153]
Надниркові залози (+) [153]	Надниркові залози [8]	н/д

Продовження таблиці 4.1

1	2	3
Решітчаста кістка (+) [153]	Решітчаста кістка [110]	Решітчаста кістка <i>Salmo salar</i> , решітчаста кістка <i>Cyprinus carpio</i> , решітчаста кістка <i>Esox lucius</i> , [91, 94], решітчаста кістка <i>Oncorhynchus nerka</i> [107], решітчаста кістка <i>Delphinus delphis</i> [145], решітчаста кістка <i>Thunnus albacares</i> [89], антени <i>Pachycondyla marginata</i> [2]
Легені (+) [153]	н/д	Легені <i>Sus domestica</i> [152], з'ябра риби [108]
Нирки (+) [153]	н/д	Нирки <i>Sus domestica</i> , [153]
Кишківник (+) [153]	н/д	Кишківник риб [108], черевна порожнина мурахи [2], кишківник миші звичайної <i>Mus musculus</i> (рис. 4.4)
М'язова тканина (+) [153]	н/д	М'язи риб [89, 109]
Шкіра (+) [153]	н/д	Шкіра <i>Salmo salar</i> [109], шкіра <i>Oncorhynchus Nerka</i> [90], шкіра <i>Thunnus albacares</i> [89]
Очі	н/д	Очі риб [108, 109]
Суглоби	н/д	Суглоби <i>Pachycondyla marginata</i> [2]

4.1 Визначення локалізації біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин

Результати досліджень зразків печінки миші з застосуванням АСМ та МСМ показали, що БМН в печінці миші розташовані в стінці синусоїдів (капілярів печінки) (рис. 4.1-4.2 та табл. 4.2). Визначені в даній роботі морфологія та розміри синусоїдів, синусоїдальних ендотеліальних клітин печінки, ядер синусоїдальних ендотеліальних клітин печінки, гепатоцитів, ядер гепатоцитів, фенестр (отвори, які полегшують транспорт речовин між кров'ю і тканиною), представлених на рисунках 4.1-4.2, узгоджуються з даними про морфологію та розмір зазначених структурних елементів, наведеними в роботах [159-163].

Таблиця 4.2 – Розмірні характеристики печінки миші

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.1-4.2)	Розміри з літератури
Густина синусоїдів/мм ²	400-600	400-500 [164]
Синусоїди (капіляри печінки), мкм	5-20	5-15 [165-167]
Синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки, мкм	15-25	20-25 [160]
Гепатоцити, мкм	15-25	20-30 [160]
Ядра гепатоцитів, мкм	5-8	6-8 [160]
Фенестри, мкм	200-500	50-500 [160-163]

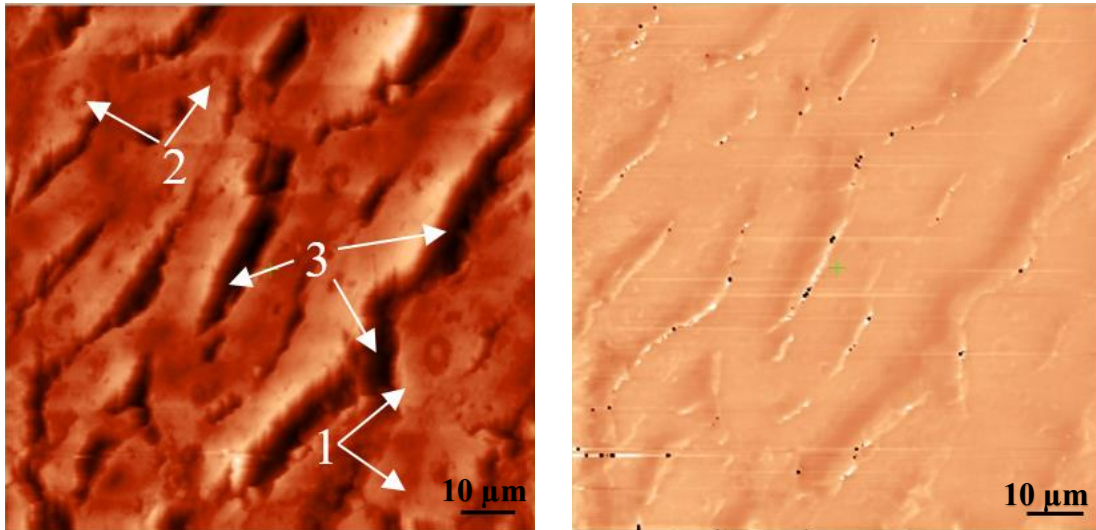


Рисунок 4.1 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка печінки миші звичайної *Mus musculus*: 1 гепатоцити, 2 ядра гепатоцитів та 3 синусоїди (капіляри печінки). Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

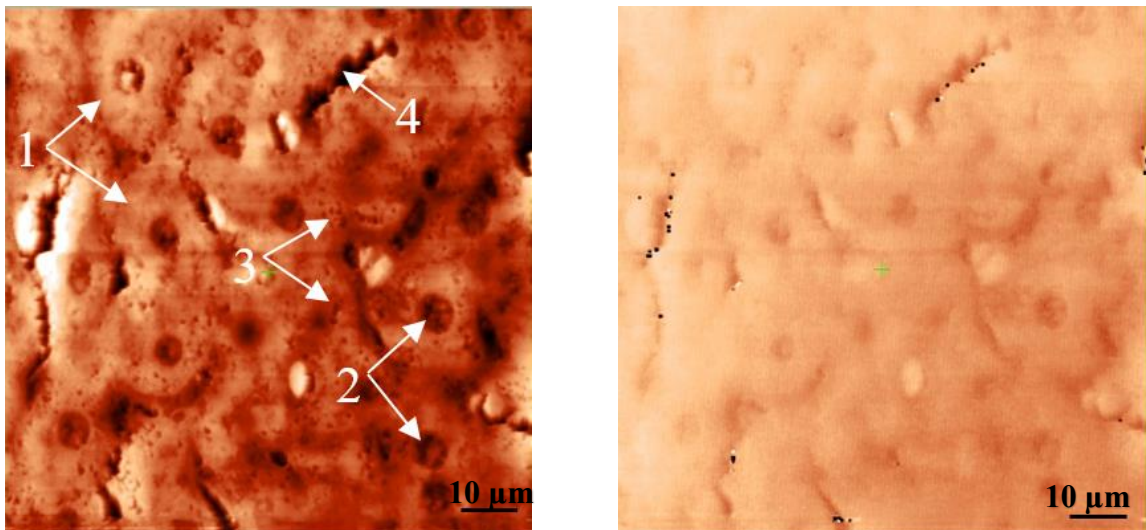


Рисунок 4.2 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка печінки миші звичайної *Mus musculus*: 1 синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки, 2 ядра синусоїдальних ендотеліальних клітин печінки, 3 фенестри та 4 синусоїди (капіляри печінки). Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

Аналогічні результати отримані щодо розташування БМН в зразках підшлункової залози та кишківника миші. Так, як видно з рисунків 4.3-4.4 та даних щодо розмірів та відстані між капілярами в таблицях 4.3-4.4, БМН в підшлунковій залозі та кишківнику миші розташовані в стінці капілярів. Визначені в даній роботі морфологія та розміри капілярів підшлункової залози, представлених на рисунку 4.3, узгоджуються з даними про морфологію та розмір зазначених структурних елементів, наведеними в роботах [168-170].

Таблиця 4.3 – Розмірні характеристики підшлункової залози миші

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.3)	Розміри з літератури
Відстань між капілярами, мкм	10-30	20-50 [168]
Капіляри, мкм	4-10	3-7 [168-170]

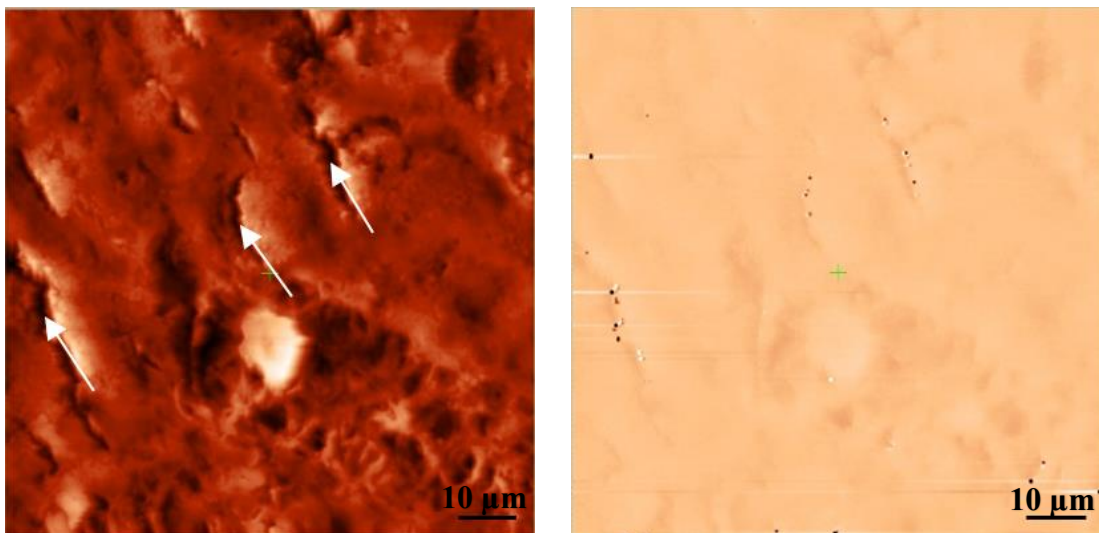


Рисунок 4.3 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка підшлункової залози миші звичайної *Mus musculus*: стрілочками позначено капіляри. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

Визначені в даній роботі морфологія та розміри капілярів кишківника, представлених на рисунку 4.4, також узгоджуються з даними про морфологію та розмір зазначених структурних елементів, наведеними в роботі [171].

Таблиця 4.4 – Розмірні характеристики кишківника миші

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.4)	Розміри з літератури
Відстань між капілярами, мкм	5-30	30-40 [172, 173]
Капіляри, мкм	3-6	3-5 [171]

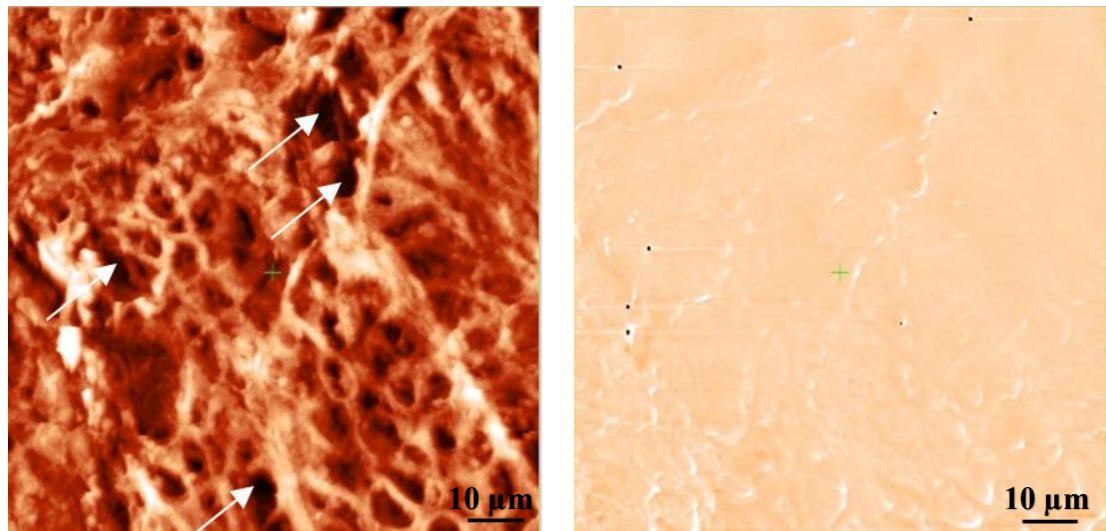


Рисунок 4.4 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка кишківника миші звичайної *Mus musculus*: стрілочками позначено капіляри. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

АСМ та МСМ дослідження зразків органів свині дали аналогічні результати, а саме, БМН в легенях (рис. 4.5 та табл. 4.5), нирках (рис. 4.6 та табл. 4.6) та селезінці (рис. 4.7 та табл. 4.7) свині розташовані в стінці капілярів. Так, визначені в даній роботі морфологія та розміри капілярів легень,

представлені на рисунку 4.5, узгоджуються з даними про морфологію та розмір зазначених структурних елементів, наведеними в роботах [174-179].

Таблиця 4.5 – Розмірні характеристики легень свині

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.5)	Розміри з літератури
Відстань між капілярами, мкм	5-25	10-20 [174]
Густина капілярів/мм ²	600-900	700-900 [176-179]
Капіляри, мкм	5-10	5-20 [174, 176]

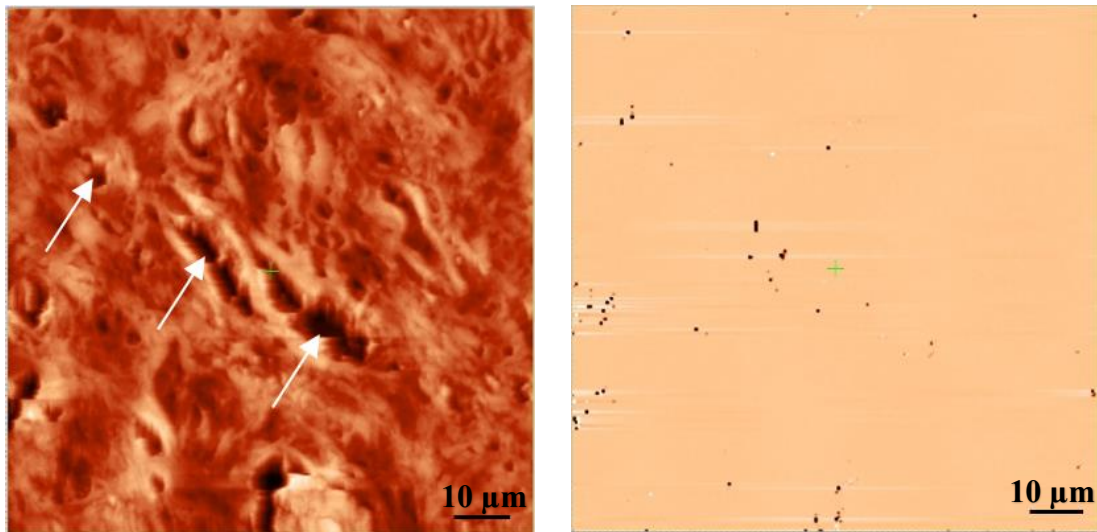


Рисунок 4.5 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка легень свині домашньої *Sus domestica*: стрілочками позначено капіляри. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

Визначені в даній роботі морфологія та розміри капілярів нирок, представлені на рисунку 4.6, узгоджуються з даними про морфологію та розмір зазначених структурних елементів, наведеними в роботі [180].

Таблиця 4.6 – Розмірні характеристики нирок свині

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.6)	Розміри з літератури
Густина капілярів/мм ²	100-300	25-220 [181-182]
Капіляри, мкм	7-10	3-20 [183-184]

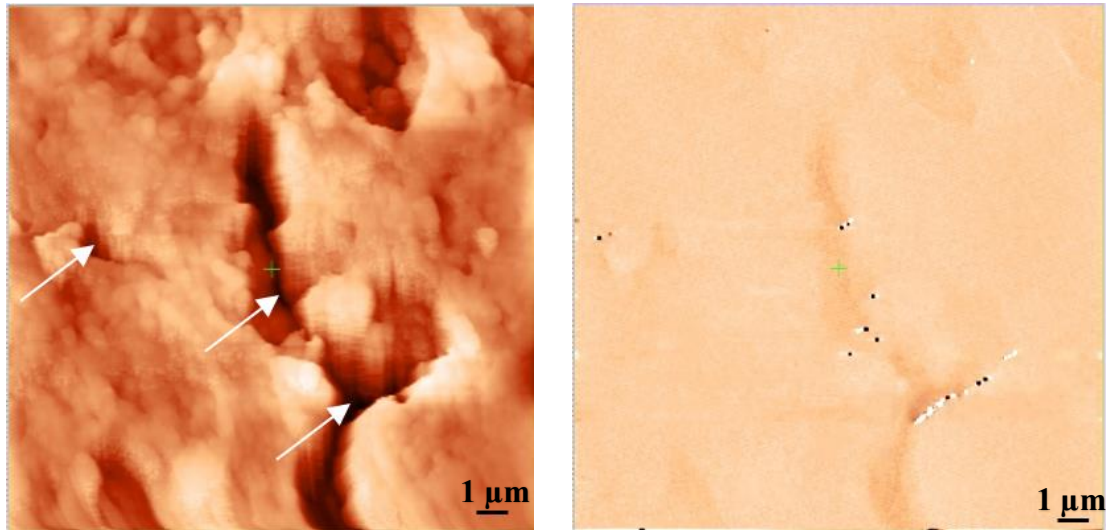


Рисунок 4.6 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка нирок свині домашньої *Sus domestica*: стрілочками позначено капіляри. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

Визначені в даній роботі морфологія та розміри капілярів селезінки свині домашньої, представлених на рисунку 4.7, є типовими до охарактеризованих в роботах [185-186] морфології та розмірів капілярів селезінки тварин.

Таблиця 4.7 – Розмірні характеристики селезінки свині

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.7)	Розміри з літератури
Відстань між капілярами, мкм	5-10	10-30 [187]
Капіляри, мкм	4-7	4-10 [188-190]

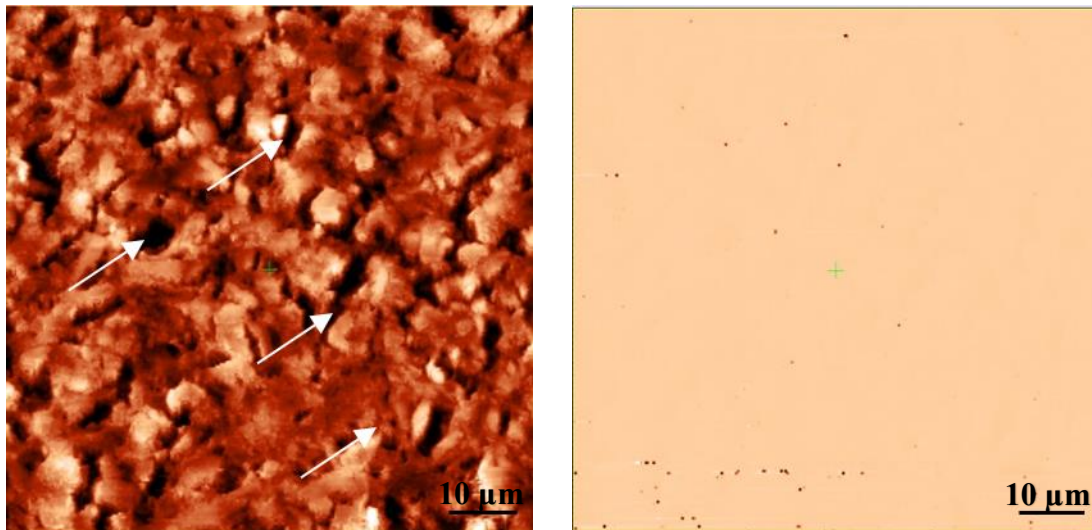


Рисунок 4.7 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка селезінки свині домашньої *Sus domestica*: стрілочками позначено капіляри. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

Як вже зазначалося вище, БМН найбільш докладно досліджено в органах і тканинах риб. Проте з усіх експериментальних методів, що на сьогоднішній день використовуються для дослідження БМН [191-213], тільки ТЕМ та МСМ дають змогу отримати інформацію про розташування БМН. В даній роботі наведено результати АСМ та МСМ досліджень зразків мозку коропа та показано, що БМН в мозку коропа, як і в органах миші та свині, розташовані в стінці капілярів (рис. 4.8, табл. 4.8). Визначені в даній роботі морфологія та розміри капілярів мозку коропа, представлених на рисунку 4.8, є типовими до охарактеризованих в роботі [214] морфології та розмірів капілярів мозку риб.

Таблиця 4.8 – Розмірні характеристики мозку коропа

Структурні компоненти	Розміри розраховані (див. рис. 4.8)	Розміри з літератури
Відстань між капілярами, мкм	10-30	15,3 [215]
Капіляри, мкм	3-9	3-8 [215, 216]

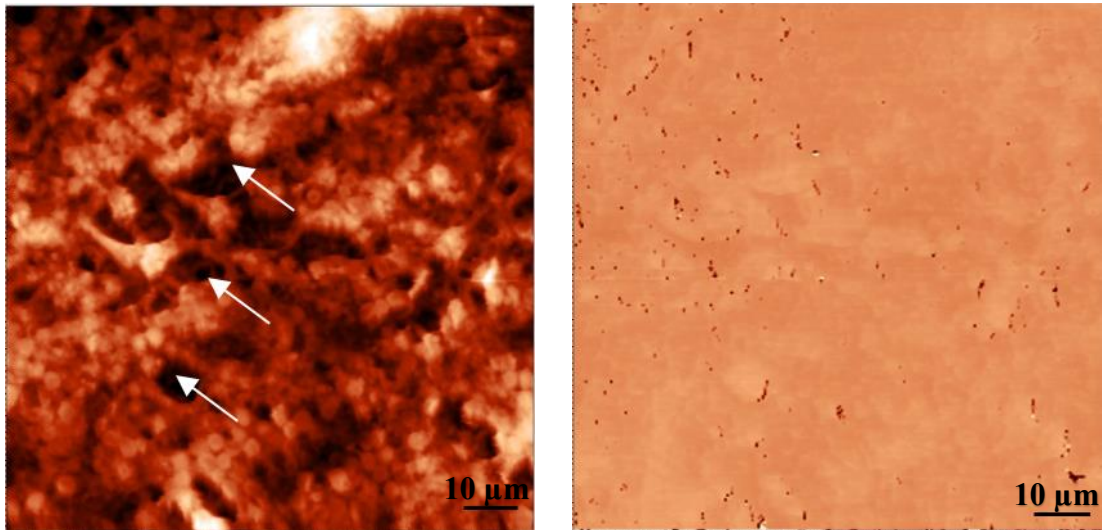


Рисунок 4.8 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка мозку коропа звичайного *Cyprinus carpio*: стрілочками позначено капіляри. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

БМН в решітчастій кістці людини розташовані в пазухах кістки [110], через які проходять капіляри та нерви [217-221]. Аналогічним є розташування БМН в решітчастій кістці риб. Таким чином, спільною рисою особливостей розташування БМН в решітчастій кістці та в інших органах різних тварин (рис. 4.1-4.8, табл. 4.1) є їх локалізація в околі капілярів [221-224].

4.2 Визначення локалізації біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах рослин

Внаслідок того, що протягом багатьох років БМН досліджували в основному в зв'язку з ідеями про магнітотаксис та магніторецепцію, БМН у рослин та грибів мало досліджені. Наприклад, в роботі [225] наведені експериментальні дані про виявлення магніточутливих наночастинок в рослинах, але автори зазначеної роботи вважають більш ймовірним, що вони виявили фітоферитин та його агрегати, а не рослинні БМН. Щодо грибів, то БМН

експериментально виявлено лише в мікрогрибах *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.* [226].

Дослідження БМН в рослинах здійснено на прикладі тютюну, як найбільш вивченого модельного організму серед рослин, а також картоплі. БМН в листку та корені тютюну (рис. 4.9-4.10) розташовані на мембрані ситовидних трубок флоєми. Флоєма – це провідна тканина рослин, яка утворює мережу ситовидних трубок, через які забезпечується транспорт органічних речовин до всіх органів рослини [227-231], на відміну від провідної тканини рослин – ксилеми, яка забезпечує транспорт води та мінеральних речовин з ґрунту [232-235]. Визначені в даній роботі морфологія та розміри ситовидних трубок листка тютюну, представлених на рисунку 4.9, є типовими до охарактеризованих в роботі [236].

Аналогічні дані щодо розташування БМН отримані на зразках картоплі. В даній роботі встановлено, що БМН в стеблі картоплі розташовані в стінках провідної тканини (флоєми) (рис. 4.11-4.12), яка охарактеризована в роботі [237]. В даній роботі показано, що БМН в бульбї картоплі розташовані на границі між крохмальними зернами, охарактеризованими в роботі [238], та флоємою.

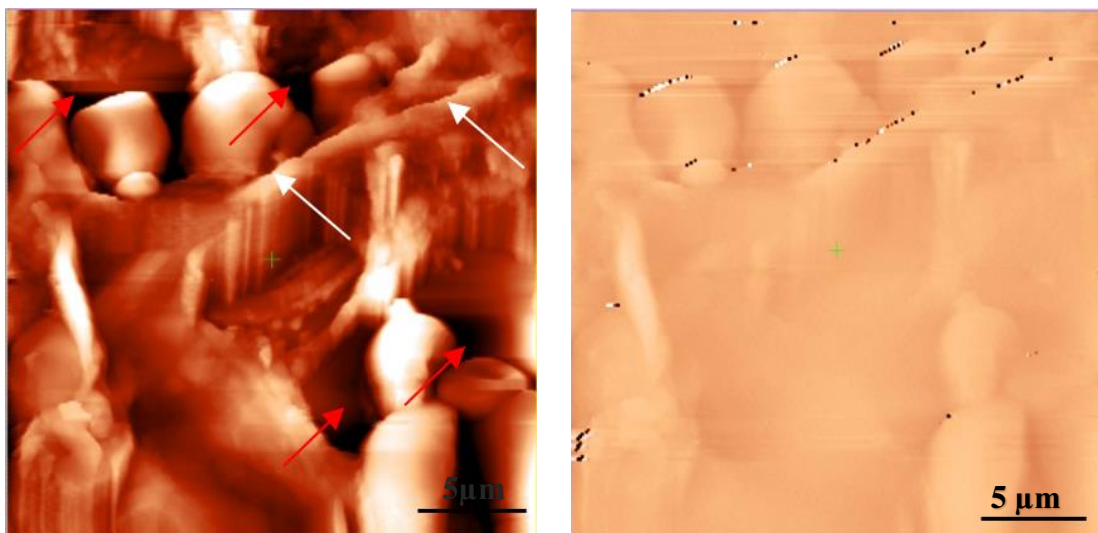


Рисунок 4.9 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразку листка тютюну справжнього *Nicotiana tabacum*. Білими стрілками на АСМ зображенні позначено мембрану ситовидної трубки, червоними стрілками – пори ситовидних трубок. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

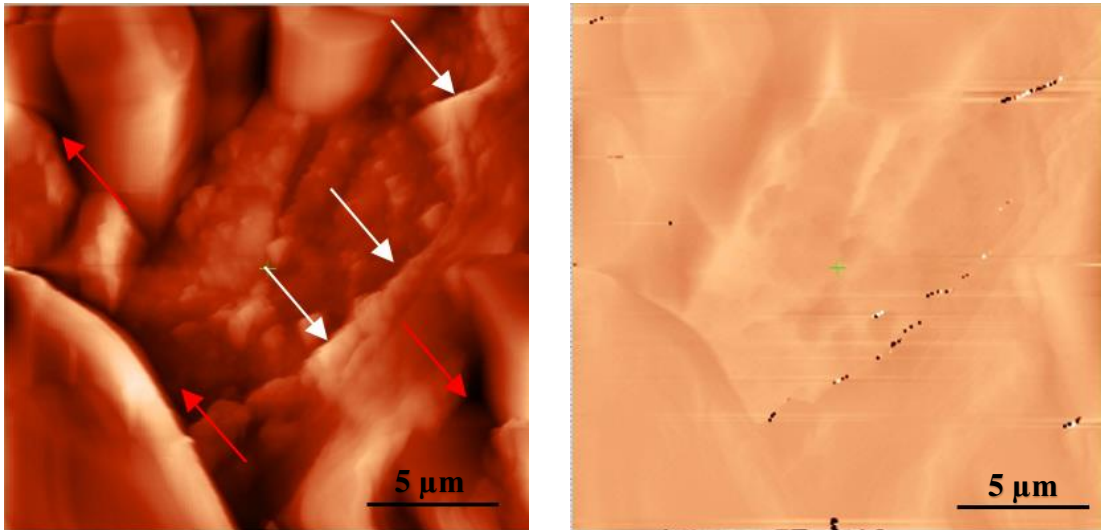


Рисунок 4.10 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка кореня тютюну справжнього *Nicotiana tabacum*. Білими стрілками на АСМ зображенні позначено мембрану ситовидної трубки, червоними стрілками – пори ситовидних трубок. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

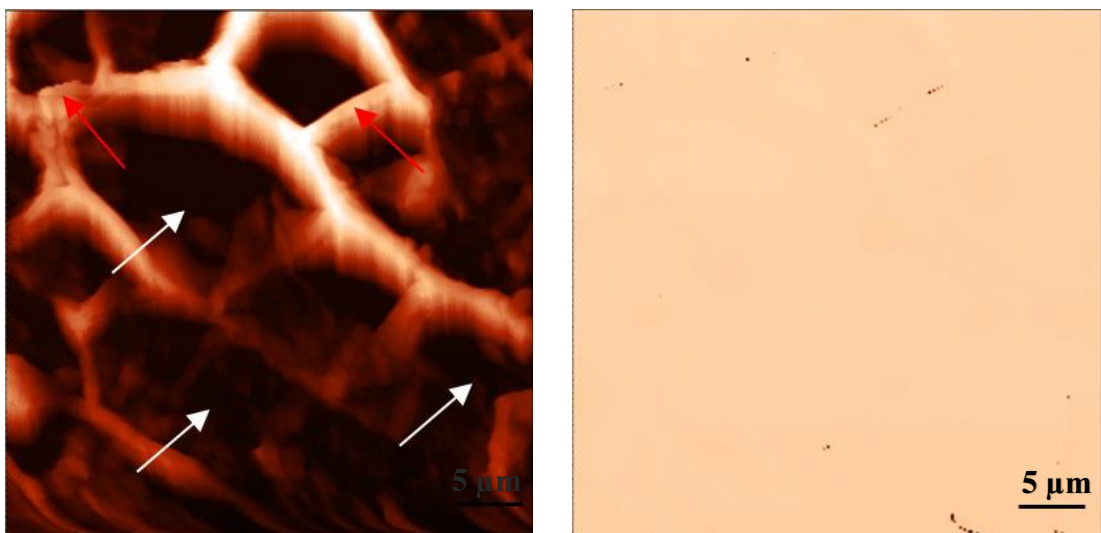


Рисунок 4.11 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка стебла картоплі *Solanum tuberosum*: провідна тканина/ситовидні трубки (білі стрілочки) флоєми, клітинна стінка (червоні стрілочки). Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

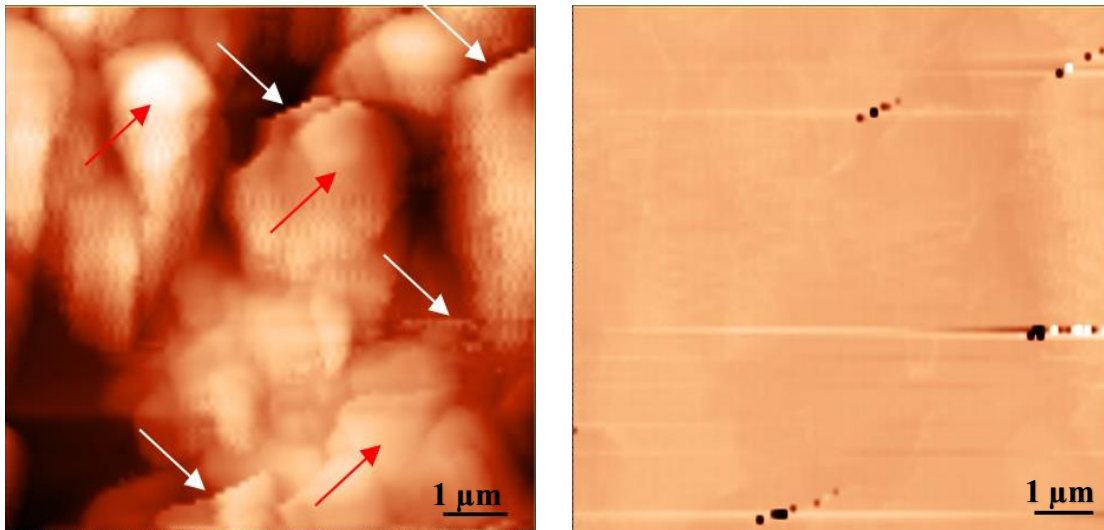


Рисунок 4.12 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка бульби картоплі *Solanum tuberosum*: провідна тканина/ситовидні трубки (білі стрілочки) флоєми, крохмальні зерна (червоні стрілочки). Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

4.3 Визначення локалізації біогенних магнітних наночастинок в тканинах грибів

Дослідження БМН в грибах здійснено на прикладі вищих грибів печериці двоспорової, які є найбільш розповсюдженими їстівними грибами. Як видно з рисунка 4.13, БМН в грибі печериці розташовані в стінках судиноподібних гіфів. Морфологія та розміри судиноподібних гіфів грибів, встановлені в даній роботі, є типовими до охарактеризованих в роботах [239-241].

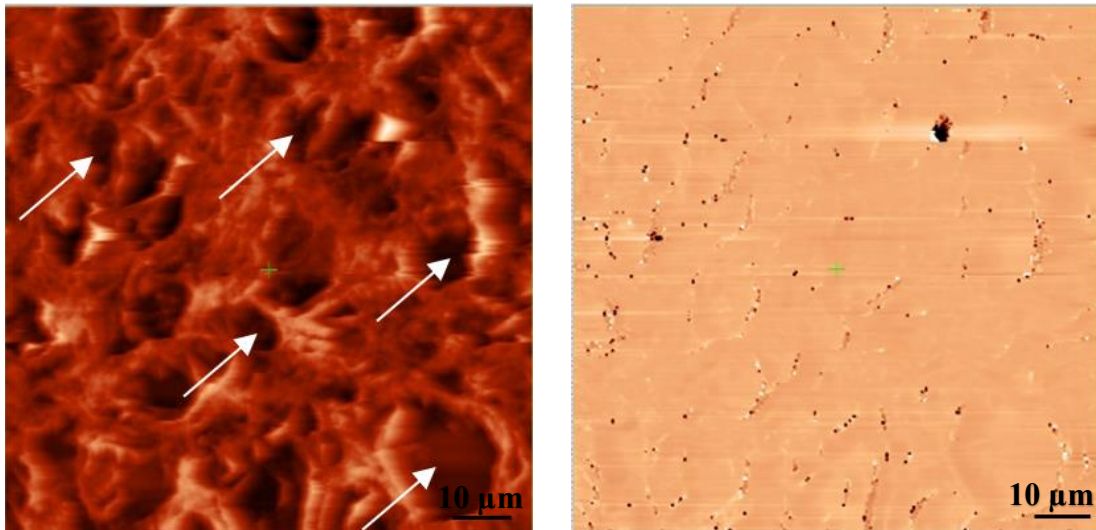


Рисунок 4.13 – АСМ зображення поверхні (ліворуч) та МСМ (праворуч) зображення зразка печериці двоспорової *Agaricus bisporus*: стрілочками позначено гіфи. Магнітні наночастинки представлені чорними та білими точками на МСМ зображенні.

Таким чином, дослідження БМН в зразках органів та тканин тварин, рослин та грибів, проведені в даній роботі [242-247], показали що:

- БМН в органах багатоклітинних організмів розташовані ланцюжками;
- БМН в багатоклітинних організмах можуть бути задіяні у трофічних процесах.

Так, БМН у тварин розміщені в стінках капілярів (всі досліджені органи і тканини, окрім решітчастої кістки) або в околі капілярів (решітчаста кістка). БМН у рослин розміщені в стінці провідної тканини, а саме в стінках ситовидних трубок флоєми. БМН в грибах розташовані в стінці провідної тканини, а саме в стінках судиноподібних гіфів.

Ланцюжки магнітних наночастинок є компонентами клітин, що формують стінки капілярів тварин та стінки провідної тканини рослин та грибів. При цьому функції капілярів тварин та функції провідної тканини флоєми рослин, а також судиноподібних гіфів грибів є подібними [248-249]. А саме, капіляри (обмінні судини) здійснюють обмін поживних речовин, газів, рідини, метаболітів, сигнальних речовин (гормонів), імунних клітин тощо між кров'ю і тканинами

організму [250-252]. Провідна тканина флоєми рослин служить для перенесення по організму органічних речовин, гормонів тощо. Такі ж функції і судиноподібних гіфів грибів [253-255]. Розташування БМН в різних органах і тканинах тварин, рослин і грибів в складі систем з подібними функціями не може бути випадковим. Така локалізація БМН свідчить на користь ідеї, що ланцюжки БМН можуть брати участь в трофічних процесах.

В зв'язку з вищезазначеним [256], зрозуміло, що надзвичайно важливою задачею є пошук спільних функцій БМН в різних органах і тканинах багатоклітинних організмів. Для розв'язання цієї задачі необхідним є виявлення типів та функцій структур, що містять БМН, в різних органах багатоклітинних організмів. В даній роботі показано, що у всіх досліджених зразках органів і тканин рослин, грибів та тварин магнітні наночастинки виявлено лише в складі провідної системи, тобто в тих структурах, де наявний рух рідин. Виявлені закономірності локалізації магнітних наночастинок в органах і тканинах багатоклітинних організмів важливо враховувати у разі використання магнітних носіїв для цілеспрямованої доставки лікарських засобів. Що дозволить уникнути скупчення магнітних наноносіїв лікарських засобів у місцях локалізації магнітних наночастинок в організмі та, як наслідок, закупорювання судин (як показано на грибах та рослинах, за їх вирощування на ґрунтах з додаванням високих концентрацій магнетиту).

Висновки до розділу

В даному розділі визначено основні закономірності наноструктурної локалізації біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин, та здійснено порівняння з рослинами та грибами.

Аналіз зображень, отриманих за допомогою атомно-силової мікроскопії та магнітно-силової мікроскопії показав, що магнітні наночастинки в органах багатоклітинних організмів утворюють ланцюжки. Зокрема, магнітні

наночастинки в органах тварин розміщені в стінках капілярів, у рослин розташовані в стінках ситовидних трубок флоєми, в грибах магнітні наночастинки локалізовані в стінках судиноподібних гіфів.

Визначені закономірності локалізації біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин, рослин та грибів свідчить на користь ідеї, що ланцюжки БМН можуть бути задіяні в трофічних процесах.

Результати, отримані у даному розділі, опубліковано у таких працях:

1. Gorobets S., Gorobets O., Gorobets Yu., Bulaievskia M. Ferrimagnetic organelles in multicellular organisms. arXiv:1811.06717 [q-bio.TO].
2. Булаєвська М. О., Гетманенко К. А., Мікешина Г. І., Шарай І. В. Детекція біогенних магнітних наночастинок в грибах *Agaricus bisporus var. bisporus* // Тези доповідей. XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття», 21 квітня 2017, Київ. – С. 89.
3. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskia M., Valverde V. M., Hetmanenko K., Sharay I. Biogenic magnetic nanoparticles in representatives of kingdom Fungi // IEEE AIM 2018, February 4 - 7, 2018, La Thuile, Italy. Posters (Tuesday February 6 th, 2018, 13:45-16:00). – P16.
4. Gorobets S., Gorobets O., Duduk A., Bulaievskia M., Sharay I. Comparative characteristics of biogenic magnetic nanoparticles in plant, fungi and animal organisms // IEEE AIM 2018, February 4 - 7, 2018, La Thuile, Italy. Posters (Tuesday February 6 th, 2018, 13:45-16:00). – P17.
5. Горобець О. Ю., Булаєвська М. О. Аналіз наявності біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин та, зокрема, людини // Тези доповідей. XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ. – С. 80.

6. Горобець С. В., Булаєвська М. О., Медведєв О. В., Шарай І. В. Біогенні магнітні наночастинки в різних органах тварин // Тези доповідей. XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ. – С. 81.
7. Горобець С. В., Дудук А. В., Булаєвська М. О. Порівняльна характеристика біогенних магнітних наночастинок у рослин, грибів і тварин // Тези доповідей. XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ. – С. 82.
8. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskaya M. Analysis of the presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans // 9th Joint European Magnetic Symposia (JEMS) Conference 2018, 3 - 7 September 2018, Mainz, Germany. – A-1938.
9. Svitlana Gorobets, Oksana Gorobets, Maryna Bulaievskaya. The presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans // Materials II International Scientific and Practical Internet-conference «BIOTECHNOLOGY: EXPERIENCE, TRADITIONS AND INNOVATIONS». – Nov. 15, 2018. – Kyiv, Ukraine. – p. 88.
10. Gorobets S. V., Gorobets O. Y., Bulaevskaya M. O., Darmenko Y. A., Aznakayeva D. E. AFM and MFM of biogenic magnetic nanoparticles in human organ in norm and pathology // SPIE Optics + Photonics 2019, San Diego, California, United States, 11-15 August 2019.

5 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ШТУЧНОГО МАГНІТОМІЧЕННЯ НА ПРИКЛАДІ *Danio rerio*

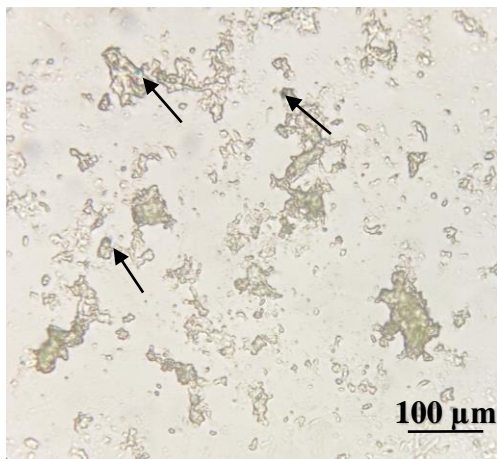
Магнітні наночастинки на основі магнетиту Fe_3O_4 знайшли широке застосування у сучасних медичних дослідженнях і практиках. Наприклад, їх досліджують з метою використання у разі магнітної гіпертермії для елімінації пухлин, у магнітно-резонансній томографії, магнітоміченні клітин та мікроорганізмів. В свою чергу, магнітомічені клітини та мікроорганізми знаходять все ширше застосування в якості векторів таргетної доставки ліків [11, 26]. Дані численних досліджень дають змогу проаналізувати кінетику штучно введених магнітних наночастинок і дослідити фізіологічні особливості розподілу частинок в тваринних організмах.

5.1 Дослідження розподілу штучно введених магнітних наночастинок в організмі риб *Danio rerio*

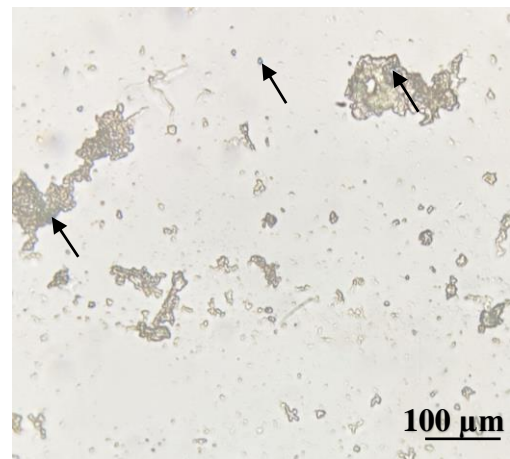
Під час дослідження літератури було виявлено протиріччя між необхідністю вивчення впливу наночастинок металів, в тому числі заліза на органи і організм в цілому і недостатністю даних щодо структурних і функціональних змін, що виникають у внутрішніх органах під впливом наночастинок [264, 265], що, безсумнівно, важливо для можливості їх широкого застосування в біотехнології [84].

В нашій роботі [266] біорозподіл МНЧ в мозку, серці, печінці та нирках *Danio rerio* визначали за допомогою оптичного мікроскопу після постановки специфічної реакції на наявність заліза – реакцію Перлса. Реакція Перлса використовується для гістохімічного виявлення сполук тривалентного заліза в зрізах різних органів і тканин. Магнітна рідина, яку використовували для дослідження біорозподілу магнітних наночастинок в органах риби *Danio rerio*, містить суміш оксидів заліза (II) та (III). Магнетит у своєму складі містить 31 %

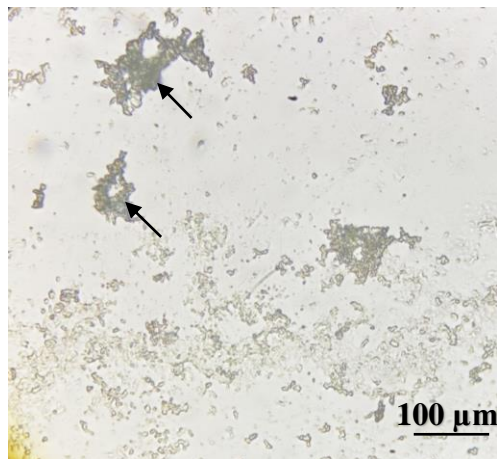
FeO та 69 % Fe₂O₃. Виявлення сполук заліза за методом Перлса засноване на реакції утворення Берлінської лазурі. Зразки досліджуваних органів відбирали через 1, 7, 14, 28 днів та 56 днів (через 28 днів після завершення введення штучних магнітних наночастинок). Збільшення кількості Перлс-позитивних включень на препаратах досліджуваних органів риби *Danio rerio* свідчить про накопичення в них сполук заліза після перорального введення магнітних наночастинок (рис. 5.1-5.6).



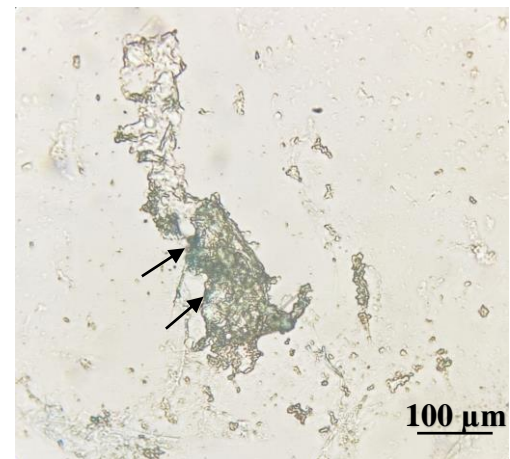
(a)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 5.1 – Мікроскопічне зображення препаратів мозку (а), серця (б), печінки (в) та нирок (г) інтактних тварин *Danio rerio*, забарвлених Берлінською лазурю (контроль). Стрілками позначено виявлені сполуки заліза.

Як видно з рисунку 5.1, в мозку, серці, печінці та нирках контрольної групи *Danio rerio* спостерігали наявність магнітних наночастинок, про що свідчить наявність поодиноких включень, які дають позитивну реакцію Перлса (забарвлення кластерів клітин Берлінською лазуррю). Виявлені магнітні наночастинок в досліджених органах інтактних риб *Danio rerio*, найімовірніше, мають біогенне походження, проте не можна виключати можливість екзогенного потрапляння наночастинок заліза.

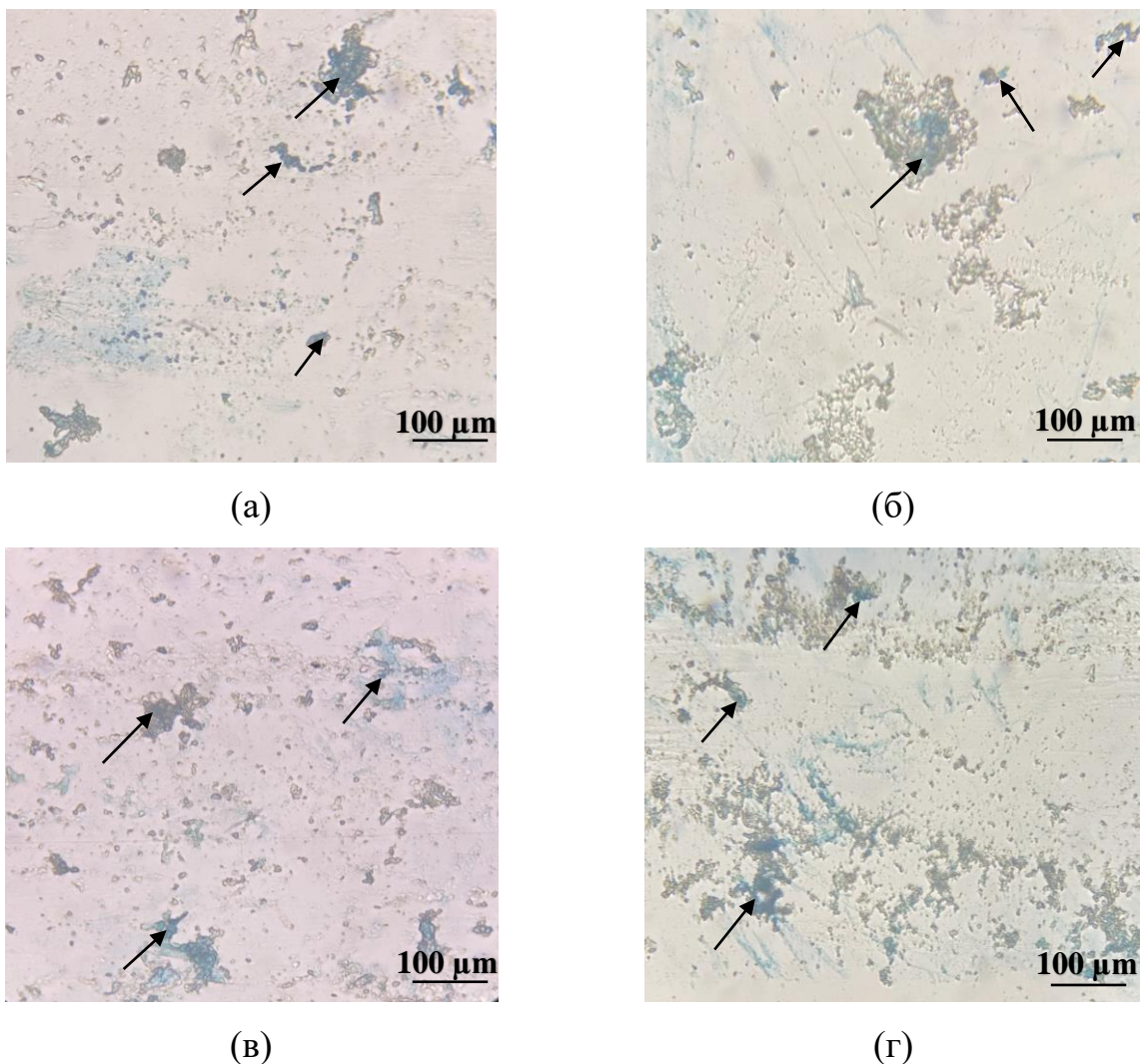


Рисунок 5.2 – Мікроскопічне зображення препаратів мозку (а), серця (б), печінки (в) та нирок (г) *Danio rerio*, забарвлених Берлінською лазуррю через 1 добу після введення магнітних наночастинок. Стрілками позначено виявлені сполуки заліза.

З рисунку 5.2 видно, що через 24 години після введення штучних магнітних наночастинок спостерігали збільшення кількості структурних елементів, які дають позитивну реакцію Перлса у всіх досліджуваних органах. Найбільшу кількість сполук тривалентного заліза спостерігали в мозку та нирках, дещо менша в печінці та серці.

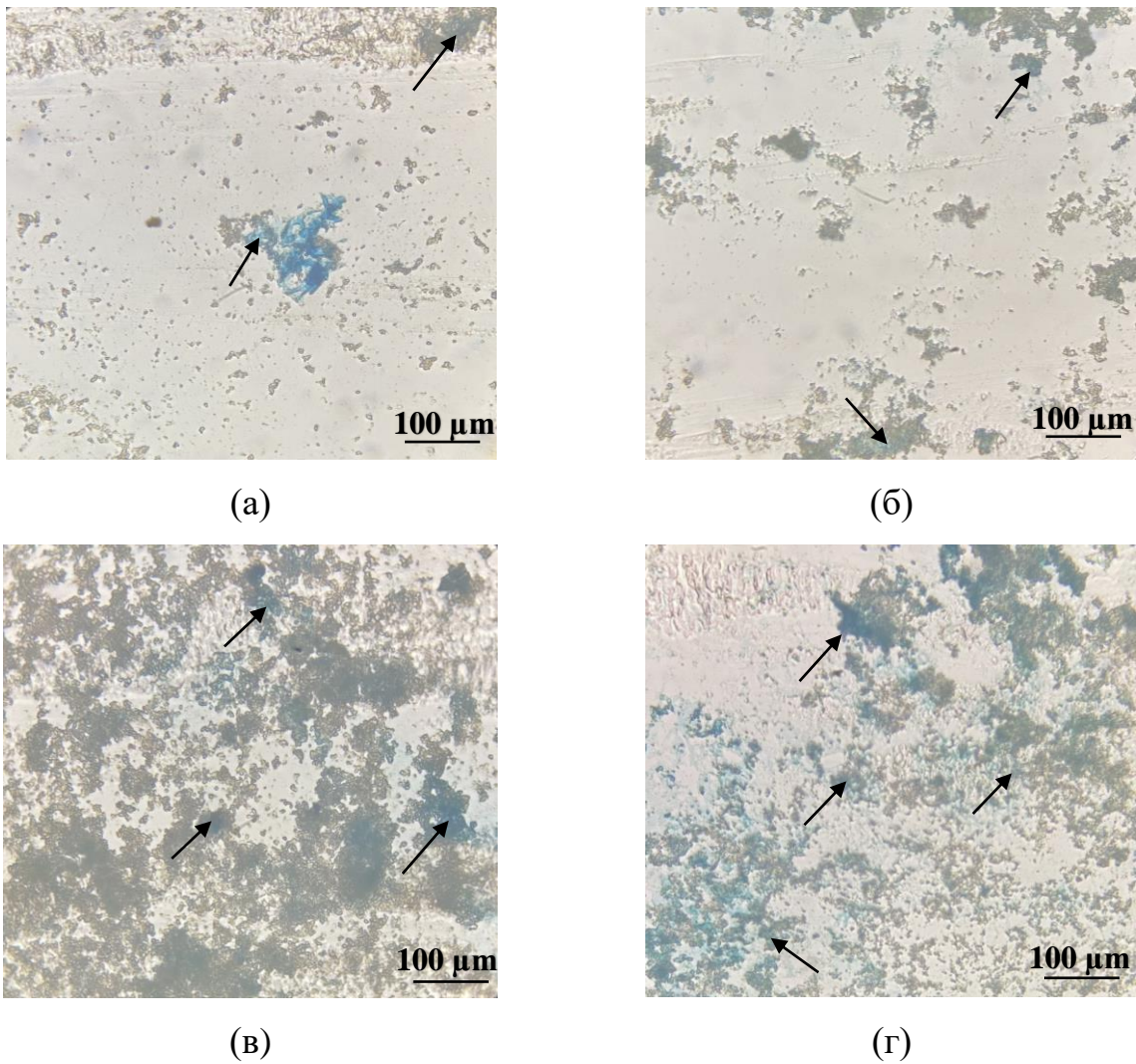


Рисунок 5.3 – Мікроскопічне зображення препаратів мозку (а), серця (б), печінки (в) та нирок (г) *Danio rerio*, забарвлених Берлінською лазуррю після 7 діб введення магнітних наночастинок. Стрілками позначено виявлені сполуки заліза.

З рисунку 5.3 видно, що на 7 добу експерименту спостерігали значне накопичення сполук тривалентного заліза в нирках, печінці та мозку. Дещо меншу кількість структурних елементів, які дають позитивну реакцію Перлса, спостерігали у серці.

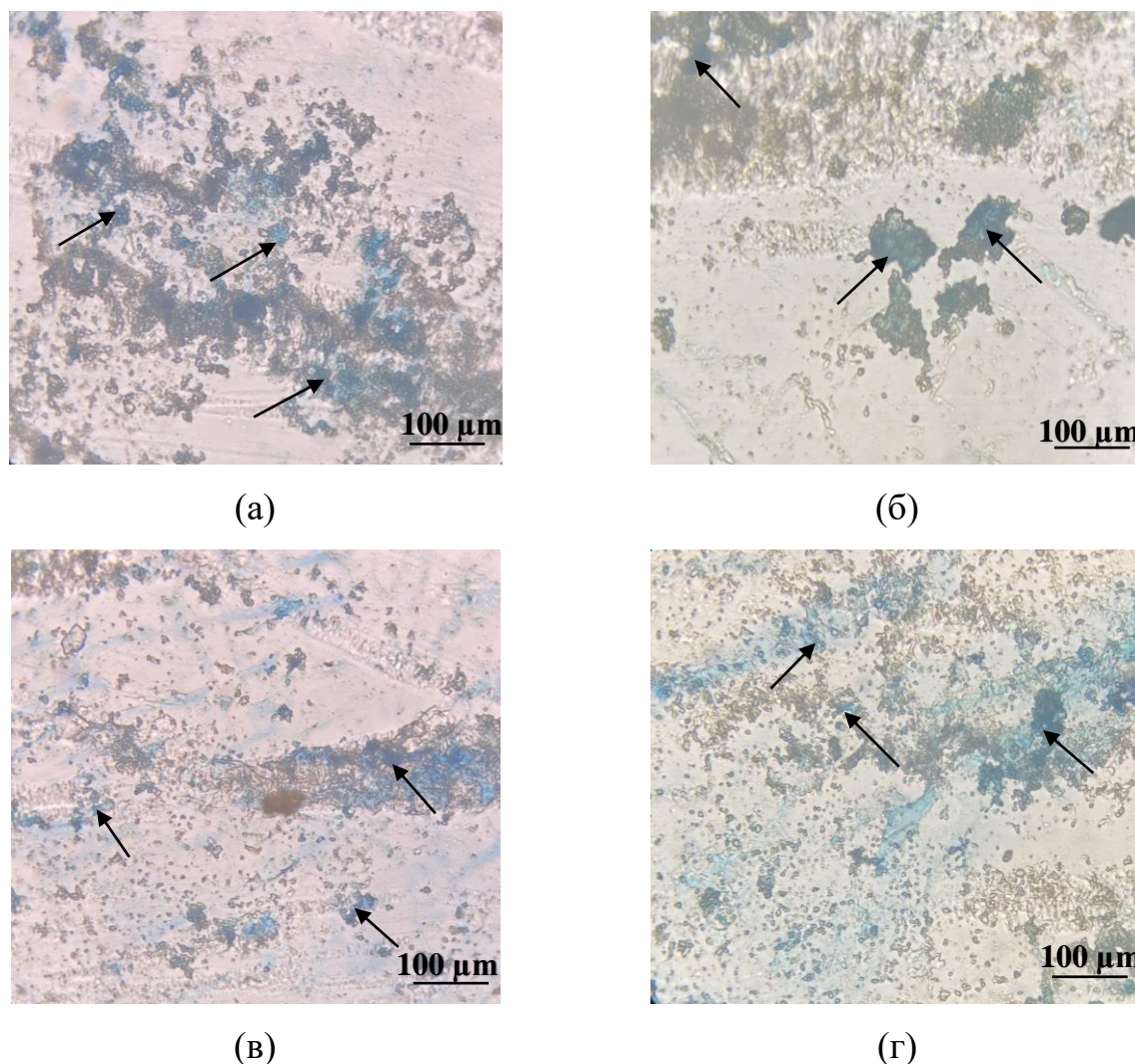
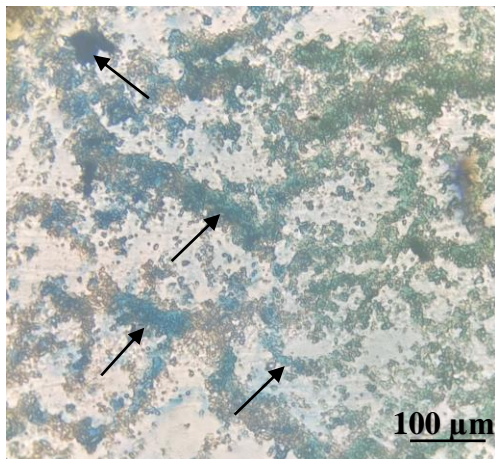


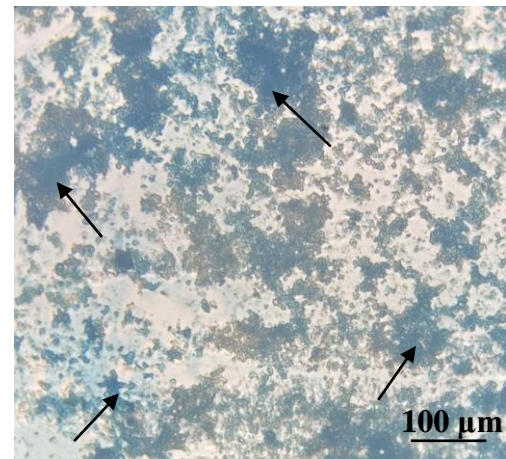
Рисунок 5.4 – Мікроскопічне зображення препаратів мозку (а), серця (б), печінки (в) та нирок (г) *Danio rerio*, забарвлених Берлінською лазуррю після 14 діб введення штучних магнітних наночастинок. Стрілками позначено виявлені сполуки заліза.

На рисунку 5.4 видно, що на 14 добу дослідження введення штучних магнітних наночастинок в мозку, печінці та нирках *Danio rerio* спостерігалася

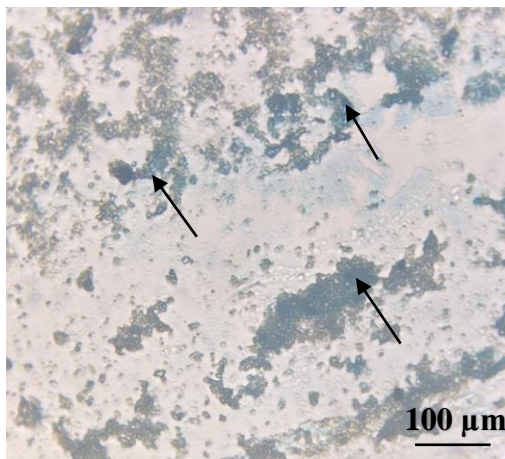
велика кількість кластерів клітин, які дають позитивну реакцію Перлса. Дещо менша кількість таких кластерів спостерігалася у серці.



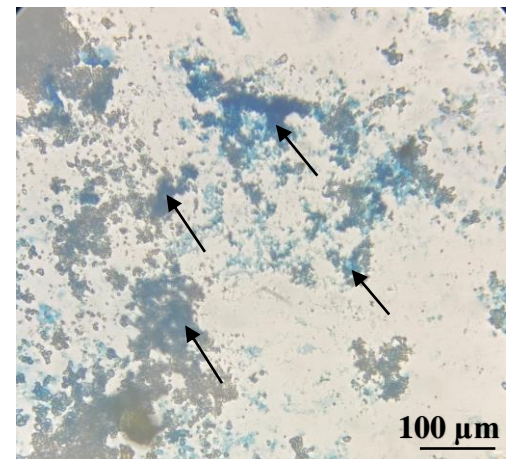
(a)



(б)



(в)

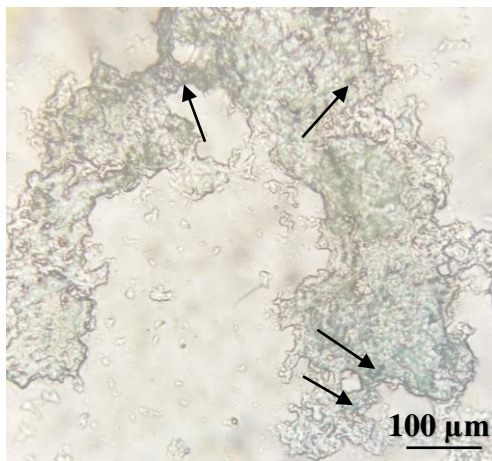


(г)

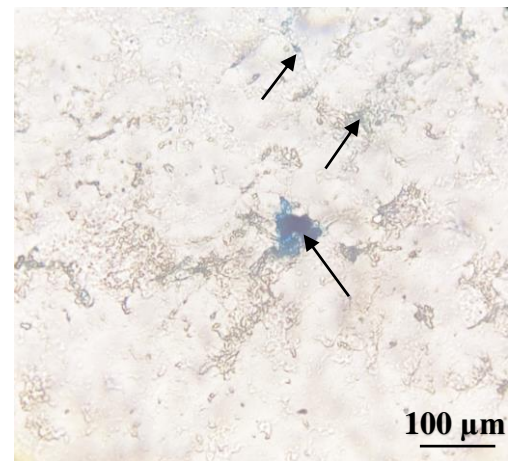
Рисунок 5.5 – Мікроскопічне зображення препаратів мозку (а), серця (б), печінки (в) та нирок (г) *Danio rerio*, забарвлених Берлінською лазуррю після 28 діб введення магнітних наночастинок. Стрілками позначено виявлені сполуки заліза.

На рисунку 5.5 видно, що на 28 добу дослідження спостерігається значне накопичення штучних магнітних в усіх досліджуваних органах, а саме в мозку, серці, печінці та нирках *Danio rerio*. На рисунку 5.5 видно велику кількість структурних елементів, забарвлених Берлінською лазуррю, тобто таких, які дають позитивну реакцію Перлса та свідчать про накопичення сполук заліза в

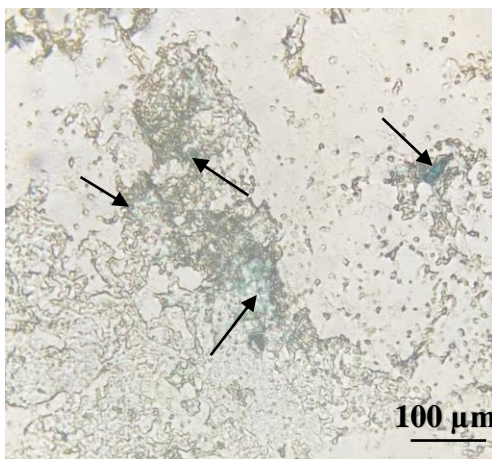
досліджуваних органах. Можна передбачити, що в дані органи потрапляють штучні магнітні частинки, які, розщеплюючись, дають позитивну реакцію Перлса.



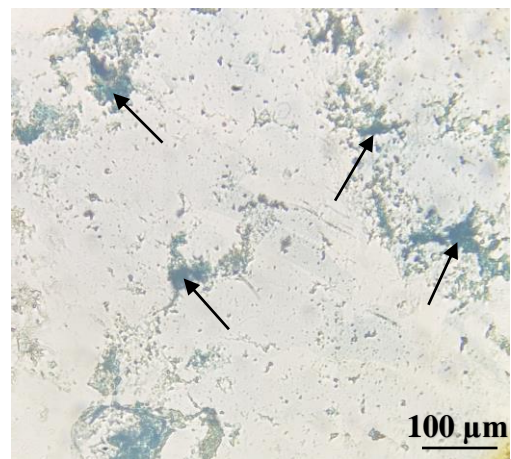
(a)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 5.6 – Мікроскопічне зображення препаратів мозку (а), серця (б), печінки (в) та нирок (г) *Danio rerio*, забарвлених Берлінською лазуррю через 28 діб після завершення введення магнітних наночастинок (56 діб експерименту). Стрілками позначено виявлені сполуки заліза.

З рисунку 5.6 видно, що на 56 добу експерименту, через 28 діб після завершення введення штучних магнітних наночастинок *Danio rerio* кількість структурних елементів в досліджуваних органах, які дають позитивну реакцію

Перлса є дещо меншою, ніж на 7, 14 та 28 добу експерименту. Проте кількість сполук заліза на 56 добу дослідження є вищою у порівнянні з контролем. Найбільша кількість структурних елементів, забарвлених Берлінською лазуррю, спостерігається в мозку, нирках та печінці. Дещо менша кількість сполук заліза накопичується у серці.

В мозку, серці, печінці та нирках виявлено елементи, які дають позитивну реакцію Перлса. Кількість таких елементів у контролі значно менша, ніж після штучного магнітомічення, що свідчить про накопичення екзогенних магнітних наночастинок переважно в тих органах, в яких показана наявність біогенних магнітних наночастинок [158].

5.2 Визначення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин органів *Danio rerio*

Останнім часом в області нанотехнологій проводяться інтенсивні дослідження з вивчення можливостей використання нанорозмірних магнітних частинок для біомедичних цілей. До числа таких досліджень відносяться роботи в області нанобіотехнології, пов'язані із застосуванням металевих наночастинок як субстанцій для створення нових медикаментів, в діагностичних цілях, для адресної доставки лікарських засобів і для гіпертермії тканин живих організмів, уражених пухлиною [267-269]. Метод магніторідинної гіпертермії заснований на магнітокерованому русі магнітних частинок в біологічній рідині до місця локалізації пухлини і подальшому нагріванні даної зони за допомогою високочастотного магнітного поля до температури 42-45 °С, за якої відбувається руйнування пухлинних клітин [267-270].

Одним з ключових питань у разі розробки методів магнітокерованої адресної доставки ліків і магніторідинній гіпертермії є отримання в певній області визначеної концентрації магнітних наночастинок з потоку біологічної рідини, за рахунок накладання зовнішнього неоднорідного магнітного поля.

Велику практичну цінність у такому разі має завдання дослідження кількісних характеристик руху наночастинок у потоці рідини за накладання зовнішнього магнітного поля – характеристик магнітофоретичного руху наночастинок в неоднорідному магнітному полі.

Порівняння магнітофоретичної рухливості досліджуваних зразків проводили шляхом вимірювання середньої швидкості руху кластерів клітин до поверхні контакту системи двох постійних магнітів (рис. 5.7).

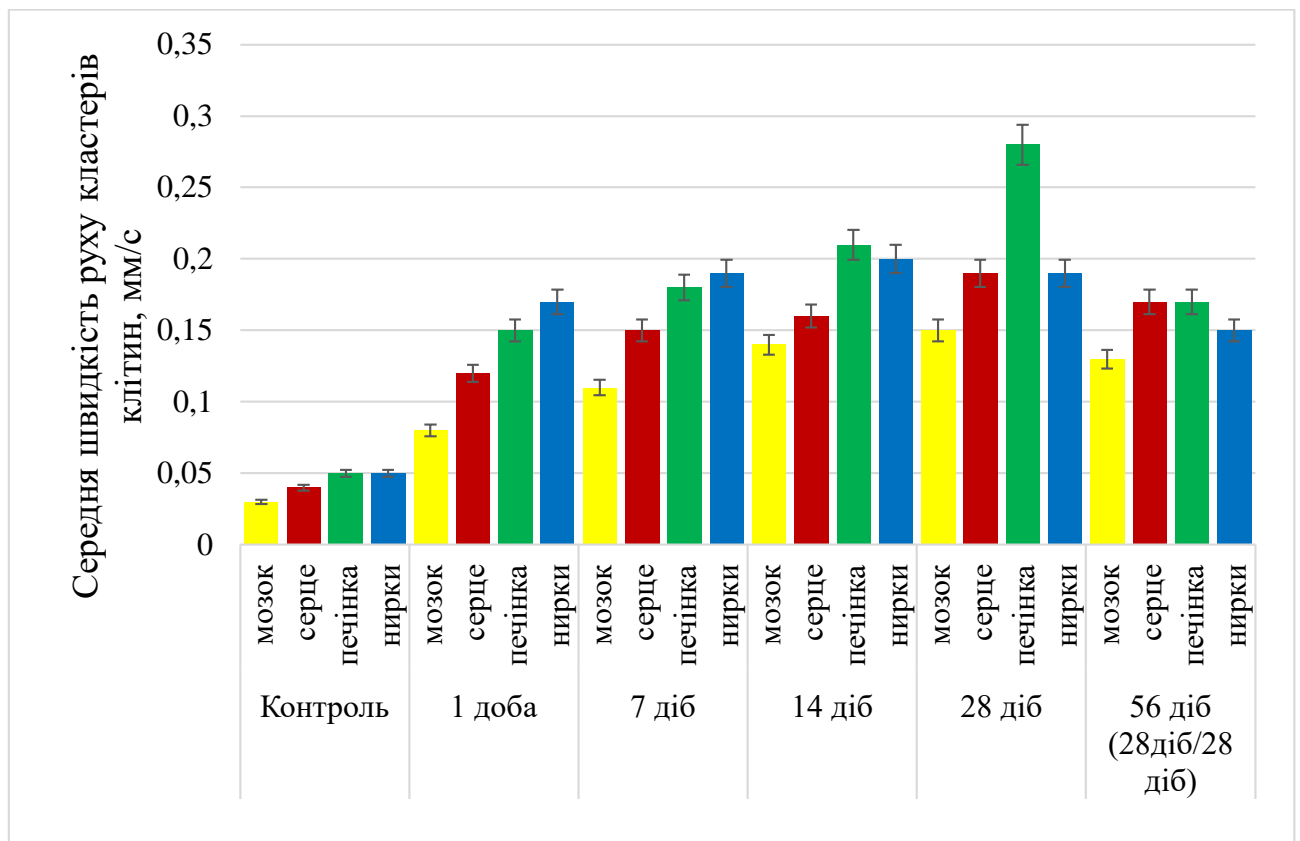


Рисунок 5.7 – Середня швидкість руху кластерів клітин досліджуваних органів до поверхні контакту системи двох постійних магнітів

Як видно з рисунку 5.7, середня швидкість руху кластерів клітин усіх досліджуваних органів *Danio rerio* була вищою на 1 добу, 7 добу, 14 добу, 28 добу та 56 добу експерименту в порівнянні з контролем.

Максимальна швидкість руху до поверхні контакту системи двох постійних магнітів кластерів клітин мозку спостерігалась на 28 добу експерименту, та була в 5 разів вищою у порівнянні з контролем.

Спостерігалось суттєве збільшення середньої швидкості руху кластерів клітин серця вже через 1 добу після введення наночастинок магнетиту з подальшим незначним зниженням через 28 днів після завершення введення штучних магнітних наночастинок.

Середня швидкість руху кластерів клітин печінки до поверхні контакту системи двох постійних магнітів значно збільшувалася у порівнянні з контролем. На 28 добу експерименту швидкість руху кластерів клітин печінки досягала максимуму та була у 6 разів більшою у порівнянні з контролем, що узгоджується з літературними даними по дослідженню токсичного впливу магнітних наночастинок [264].

Середня швидкість руху кластерів клітин нирок до поверхні контакту системи двох постійних магнітів на 14 добу експерименту була вищою в 4 рази у порівнянні з контролем.

На 56 добу експерименту, через 28 діб після завершення перорального введення магнітних наночастинок, спостерігалось незначне зменшення середньої швидкості руху кластерів клітин усіх досліджуваних органів *Danio rerio*, що, ймовірно, зумовлене частковою біодеградацією введених магнітних наночастинок. Найбільш суттєве зниження середньої швидкості руху кластерів клітин на 56 добу експерименту спостерігалось для нирок та печінки, що можна також пояснити належністю останніх до органів виділення.

Рух кластерів клітин мозку, серця, печінки та нирок контрольної групи риб *Danio rerio* до поверхні контакту системи двох постійних магнітів обумовлений вже наявними магнітними наночастинами в досліджуваних органах, які, ймовірно, мають біогенне походження (проте не можна виключати вірогідність потрапляння певної кількості магнітних наночастинок із навколишнього середовища). Збільшення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин мозку, серця, печінки та нирок тестової групи риб *Danio rerio* на 1 добу, 7 добу, 14 добу,

28 добу перорального введення наночастинок магнетиту у дозі 20 мкг/г/день свідчить про накопичення введених магнітних наночастинок в усіх досліджуваних органах. Проте зменшення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин мозку, серця, печінки та нирок риб *Danio rerio* через 28 діб після завершення перорального введення наночастинок магнетиту свідчить про їхню деградацію, що зумовлює позитивну реакцію Перлса.

Співвідношення значень магнітофоретичної рухливості кластерів клітин досліджуваних органів контрольної та тестової груп тварин, на основі отриманих значень середніх швидкостей руху клітин в магнітному полі, наведено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Результати розрахунку співвідношень магнітофоретичної рухливості кластерів клітин досліджуваних органів контрольної та тестової груп тварин

Час забору проб тестової групи тварин	Досліджуваний орган	Магнітофоретична рухливість відносно контролю
1 доба	мозок	1,0
	серце	1,3
	печінка	1,7
	нирки	1,5
7 діб	мозок	1,3
	серце	1,7
	печінка	3,6
	нирки	1,7

Продовження таблиці 5.1

Час забору проб тестової групи тварин	Досліджуваний орган	Магнітофоретична рухливість відносно контролю
14 діб	мозок	1,7
	серце	1,8
	печінка	9,5
	нирки	1,8
28 діб	мозок	1,8
	серце	2,1
	печінка	5,6
	нирки	3,8
56 діб (28діб/28 діб)	мозок	1,6
	серце	1,1
	печінка	1,9
	нирки	1,3

Таким чином, магнітофоретична рухливість, яка характеризує магнітні властивості кластерів клітин досліджуваних органів тестової групи тварин на 1 добу, 7 добу, 14 добу, 28 добу та 56 добу експерименту збільшувалася у порівнянні з контролем. Максимальне значення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин мозку спостерігалось на 28 добу (у 1,8 рази вище у порівнянні з контролем), для кластерів клітин серця на 28 добу (у 2,1 рази вище у порівнянні з контролем), для кластерів клітин печінки на 14 добу (у 9,5 разів вище у порівнянні з контролем) та для кластерів клітин нирок на 28 добу (у 3,8 разів вище у порівнянні з контролем).

Отже, на 1 добу, 7 добу, 14 добу, 28 добу спостерігалось зростання магнітофоретичної рухливості кластерів клітин усіх досліджуваних органів *Danio rerio*. На 56 добу експерименту, через 28 діб після завершення

перорального введення магнітних наночастинок, спостерігалось незначне зменшення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин мозку, серця, печінки та нирок, але не досягає контрольного рівня. Це свідчить, про те, що відбувається лише часткове виведення магнітних наночастинок з досліджуваних органів. Отримані дані слід враховувати у разі використанні екзогенних магнітних наночастинок з діагностичною та лікувальною метою.

5.3 Розробка технології виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями

Нанотехнології в останні роки стали однією з найбільш перспективних галузей знань, що динамічно розвивається. Розвиток нанотехнологій забезпечується міждисциплінарним характером досліджень, широким взаємопроникненням ідей і розробок, інтеграцією матеріалів, методів і процесів з різних областей знань. Застосування наноматеріалів в медицині і фармакології є пріоритетним напрямком, що дає змогу вирішувати найактуальніші проблеми в цих галузях. Такі технології трансформують усталені наукові дисципліни і дають змогу створювати нові напрямки досліджень. Об'єднання наукових досягнень нанотехнології та біотехнології привело до створення нової галузі науки – нанобіотехнології, розвиток якої обіцяє привести до створення наноконструкцій, здатних управляти біосистемами на молекулярному рівні [271].

Магнітні наночастинок знаходять все більш широке застосування в біонанотехнологіях [272]. Поряд з відомими застосуваннями *in vivo* для гіпертермії у разі лікування злоякісних новоутворень [273] або підвищення контрастності зображень в магнітно-резонансній томографії [272] досить цікавим напрямком є застосування МНЧ *in vitro* в біомедичному аналізі у разі створення аналітичних мікро- і наносистем [274, 275]. Однією з ключових технічних проблем створення таких систем для біомедицини є організація в них

адресного транспорту речовин до функціональних компонентів. З цієї точки зору магнітні наночастинки представляють великий інтерес, з одного боку, як мікроскопічні засоби доставки, які «виловлюють» і доставляють до аналітичних компонентів речовини-мішені, а з іншого – як актуатори, що генерують рух обсягу рідини, зокрема на основі відомого принципу магнітогідродинамічного насоса [276].

Розуміння фізичних і біологічних процесів на нанорівні – вирішальна рушійна сила в розвитку застосувань нанотехнологій в медицині [11].

Розмір наночастинки є критичним параметром, що визначає значною мірою її властивості. Залежно від розміру можуть змінюватися властивості наночастинок, такі як магнітні властивості, токсичність, адсорбційні властивості та багато інших [11].

В рамках розвитку зазначеного напрямку проводяться дослідження властивостей магнітних мікро- і наночастинок різної природи з метою визначення їх характеристик та оптимізації виділення з їх допомогою цільових компонентів шляхом виборчого зв'язування і транспорту до функціональних вузлів аналітичних мікросистем в магнітному полі заданої геометрії.

В даній роботі запропоновано спосіб детекції та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями за допомогою використання системи магнітів зі щілиною, який дає змогу працювати як з сухою біомасою клітин, так і з суспензією.

На цей час відомий спосіб магнітної сепарації слабомагнітних рідинних або пилогазових продуктів, який включає пропускання потоку продукту, що підлягає сепарації, через багатошарову високоградієнтну насадку магнітного сепаратора, яка знаходиться під дією зовнішнього магнітного поля сепаратора, осадження магнітосприйнятливих частинок продукту на елементи насадки, очищення насадки від осаджених на неї частинок і транспортування осаду в дренаж шляхом продування повітрям або промиванням водою високоградієнтної насадки магнітного сепаратора [277].

Даний спосіб має суттєві недоліки, а саме використання магнітного сепаратора з високоградієнтними насадками, які створюють в своєму околі магнітні поля на 3-4 порядки більші, ніж зовнішнє магнітне поле сепаратора, що не дає змогу використовувати такі магнітні сепаратори для детекції та виділення клітин з природними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями.

В роботі [278] запропоновано спосіб виділення мікроорганізмів шляхом пропускання множинного потоку через імуномагнітний сепаратор. Суспензію клітин за допомогою перистальтичного насоса пропускають через силіконові трубки по магнітній системі. Клітини, які містять у своєму складі магнітний матеріал, залишаються на стінках труби, в зоні, що прилягає до феромагнітних стрижнів. Частина суспензії, що залишилася, проходить у накопичувальну камеру. Захоплені клітини очищають, клітини видаляють з магнітного поля і поміщають в окремі пробірки [278].

Недоліком зазначеного способу є неможливість виділення мікроорганізмів, якщо їх кількість незначна ($<0,5$ мікроорганізмів/г) та неможливість роботи з сухою біомасою клітин.

В роботі [4] описано спосіб детекції клітин, які містять у своєму складі ланцюжки магнітних наночастинок, з використанням обертового магнітного поля. Для виявлення магнітних клітин краплю клітинної суспензії розміщують на силанізованому покривному склі. Безперервно обертають напрямком магнітного поля у фокальній площині за частоти обертання $f_B = 0,33$ Гц і магнітної індукції $B = 2$ мТл та досліджують суспензію шляхом сканування препарату до тих пір, поки буде виявлено клітини, що обертаються. Для того, щоб розрізнити клітини та можливі неорганічні забруднення, застосовують ліпофільний флуоресцентний барвник в кінцевій концентрації 5 мкМ в розчині зразка. Клітини, які містять у своєму складі магнітний матеріал, екстрагують за допомогою мікрокапіляру шляхом відсмоктування [4].

Проте недоліками зазначеного способу є неможливість детекції та виділення клітин, які містять у своєму складі поодинокі магніточутливі включення, а також необхідність обертання магнітного поля для візуалізації

клітин, які містять у своєму складі магнітний матеріал та неможливість роботи з сухою біомасою клітин, а лише з суспензією.

В даній роботі запропоновано спосіб детекції та виділення клітин з магнітними властивостями для застосування останніх в біонанотехнологіях [279, 280], який долає зазначені вище недоліки. Таким чином, детекцію та виділення клітин здійснюють за допомогою системи магнітів зі щілиною, на якій розміщено предметне скло товщиною 0,15 мм з клітинами у вигляді суспензії або у вигляді сухої біомаси клітин, які мають природні та штучні пара-, фери-, або феромагнітні властивості (рис. 5.8).

Експериментальна установка для детекції та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями представлена системою двох постійних магнітів зі щілиною, які розміщені на магнітопроводі.

Скляну підкладку товщиною 0,15 мм поміщали на системі двох постійних магнітів, що розташована на магнітопроводі, таким чином, щоб щілина проходила через центр скляної підкладки. На скляну підкладку наносять клітини з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями у вигляді суспензії або висушеної біомаси. Клітини, які містять у своєму складі магніточутливі включення будуть концентруватися в області щілини, де утворюється максимальне магнітне поле з сильним градієнтом. В свою чергу, рух клітин, які не мають у своєму складі магніточутливих структур, спостерігатися не буде, такі клітини розташовуються на периферії скляної підкладки. Клітини з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями відділяють від клітин, які таких властивостей не мають.

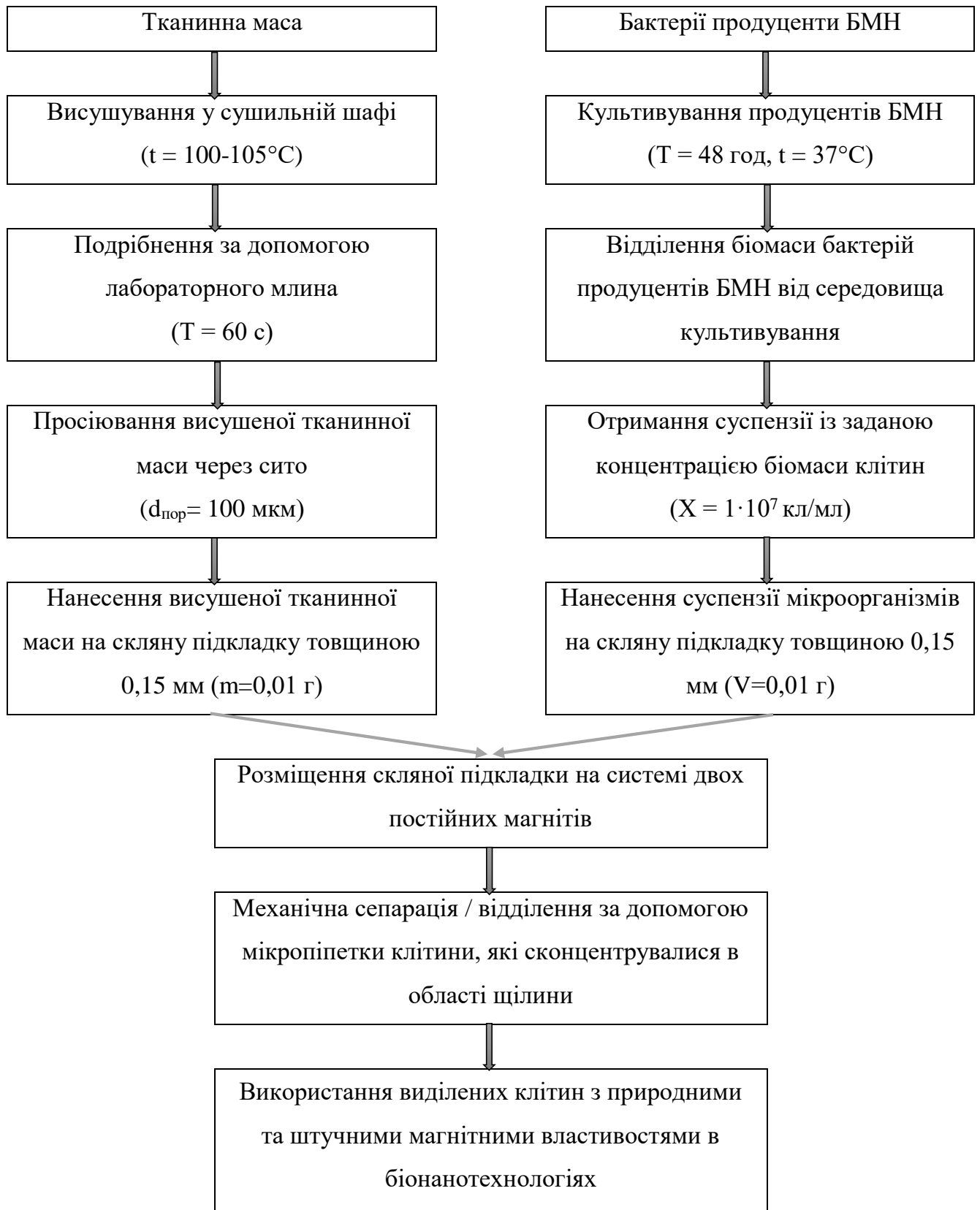


Рисунок 5.8 – Процесуальна схема детекції та виділення клітини з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями для застосувань в біонанотехнологіях

Завдяки запропонованій технології детекції та виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями зменшуються витрати часу на детекцію та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями за рахунок використання системи магнітів зі щільною, яка має більш просту конструкцію у порівнянні з аналогами. А також з'являється можливість роботи як з сухою біомасою клітин, так і з суспензією, що є важливим для застосувань в біонанотехнологіях.

5.4 Розрахунок сили магнітодипольної взаємодії між біогенними магнітними наночастинками та штучно введеними магнітними наночастинками

Оскільки магнітні наночастинки в органах риб локалізовані у вигляді довгих ланцюгів [107], і, оскільки, в більшості випадків екзогенні магнітні наночастки у складі лікарської форми локалізовані теж у вигляді ланцюгів [281], було розраховано силу взаємодії між ними. Незважаючи на те, що екзогенні та ендогенні наночастинки можуть мати дещо різні характерні розміри, для спрощення розрахунків було обрано модель однакових за розміром частинок.

Вихідні дані для розрахунків:

- намагніченість магнетиту – $M_0 = 477$ од;
- діаметр БМН в органах риб – $2,5 \times 10^{-8}$ - 5×10^{-8} м;
- діаметр екзогенних магнітних НЧ – 1×10^{-9} - 2×10^{-8} м;
- відстань між штучними введеними та наявними в капілярах наночастинками – 1×10^{-8} м.

Магнітне поле, утворене i -ою БМН в ланцюжку з намагніченістю \vec{M}_0 можна записати як:

$$\vec{H}_i^{(m)} = \frac{4}{3} \pi r_0^3 \left\{ \frac{3(\vec{M}_0 \vec{n}_i) \vec{n}_i - \vec{M}_0}{r_i^3} \right\}, \quad (3)$$

де $\vec{H}_i^{(m)}$ – вектор напруженості магнітного поля, \vec{M}_0 – намагніченість біогенної магнітної наночастинки, r_i – радіус i -ої біогенної магнітної частинки.

В формулі (3) припускається, що всі наночастинки у ланцюжку є однаковими, частинки намагнічені вздовж ланцюжка, тобто

$$\vec{m}_i = \vec{m} \quad (4)$$

та магнітний момент i -ої частинки описується формулою:

$$\vec{m}_i = \vec{M}_0 \cdot \frac{4}{3} \pi r_0^3, \quad (5)$$

де $V = \frac{4}{3} \pi r_0^3$ – об'єм частинки.

В формулі (3) координати вектора, проведеного з центру i -ої частинки до елементу об'єму штучної магнітної наночастинки мають вигляд (якщо штучна магнітна наночастинка розташована на осі ланцюжка магнітних наночастинок біля його кінчика):

$$\vec{r}_i = (x, y, z_i), \quad (6)$$

де

$$z_i = \left\{ (r_0 + R_0 + \Delta_0 + (2r_0 + \Delta)(i-1)) \right\}. \quad (7)$$

Або в інших позначеннях:

$$z_i = \left\{ (z + (2r_0 + \Delta)(i-1)) \right\}, \quad (8)$$

де z – координата штучної магнітної наночастинки дорівнює $z=r_0 + R_0 + \Delta_0$.

Одиничний вектор, що задає напрямок радіус-вектору, має наступні компоненти:

$$\vec{n}_i = \left(\frac{x}{\sqrt{x^2 + y^2 + z_i^2}}, \frac{y}{\sqrt{x^2 + y^2 + z_i^2}}, \frac{z_i}{\sqrt{x^2 + y^2 + z_i^2}} \right) \quad (9)$$

Проекції магнітного поля, що утворені магнітною частинкою з магнітним моментом \vec{m} на осі декартової системи координат мають вигляд:

$$H_{ix}^{(m)} = \frac{4}{3} \pi r_0^3 \cdot \frac{3M_0 z_i x}{(x^2 + y^2 + z_i^2)^{5/2}}, \quad (10)$$

$$H_{iy}^{(m)} = \frac{4}{3} \pi r_0^3 \cdot \frac{3M_0 z_i y}{(x^2 + y^2 + z_i^2)^{5/2}}, \quad (11)$$

$$H_{iz}^{(m)} = \frac{4}{3} \pi r_0^3 \cdot \left\{ \frac{3M_0 z_i^2}{(x^2 + y^2 + z_i^2)^{5/2}} - \frac{M_0}{(x^2 + y^2 + z_i^2)^{3/2}} \right\}. \quad (12)$$

Запишемо енергію взаємодії штучної магнітної наночастинки з намагніченістю $\vec{\mu}$ з магнітним полем, створеним ланцюжком магнітних наночастинок, що знаходяться в капілярі:

$$U_i = - \sum_{i=1}^n \int \frac{\chi}{2} \left(\vec{H}_i^{(m)} \right)^2 dV \quad (13)$$

де χ – ефективна магнітна сприйнятливність штучної магнітної наночастинки, яка дорівнює різниці магнітної сприйнятливості штучної магнітної наночастинки і середовища, в якому вона знаходиться.

Запишемо сумарну енергію магнітних наночастинок:

$$F_z = - \frac{d}{dz} U \quad (14)$$

В результаті отримаємо:

$$F_z = \frac{\chi}{2} \sum_{i=1}^n \int_V \frac{d \left(H_i^{(m)} \right)^2}{dz} dx dy dz \quad (15)$$

В результаті розрахунків отримано силу, яка дорівнює близько 10^{-10} Н, та має близький порядок величини з силами специфічного зв'язування, які наведено в роботах [111, 282].

Далі наводяться графіки залежності розрахованої сили магнітодипольної взаємодії між магнітними наночастинками органів риб та екзогенними магнітними наночастинками від розміру та кількості магнітних наночастинок (рис. 5.9).

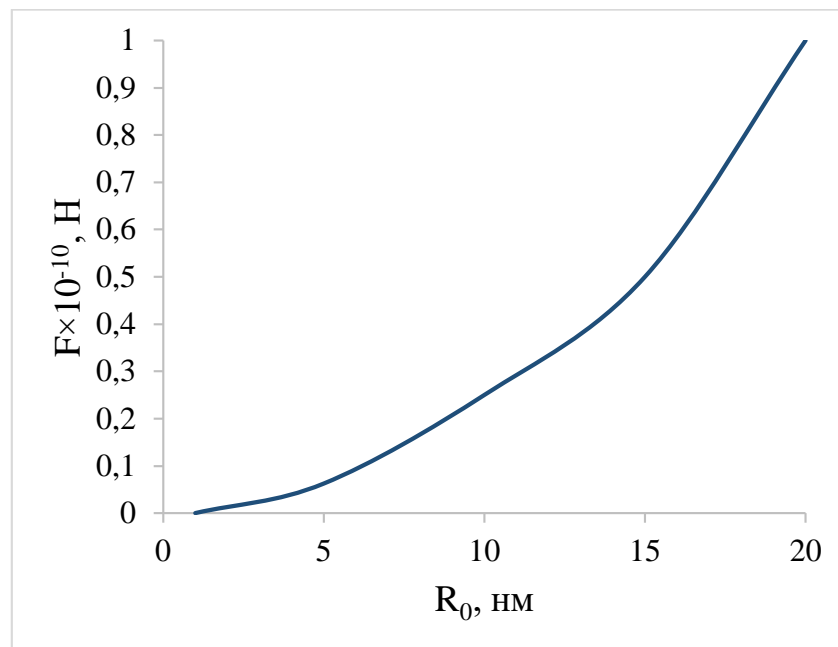


Рисунок 5.9 – Визначення сили магнітодипольної взаємодії F , що виникає між БМН органів риб та екзогенними магнітними наночастинками. R_0 – радіус екзогенних магнітних наночастинок, який становить від 1 нм до 20 нм.

Сили магнітодипольної взаємодії, які виникають всередині клітини між БМН органів риб та екзогенними магнітними наночастинками, знаходяться в діапазоні від 10^{-11} Н до 10^{-10} Н.

Отже, теоретичними розрахунками доведено, що накопичення штучно введених магнітних наночастинок в органах риб відбувається за рахунок сил магнітодипольної взаємодії, які виникають всередині клітини між магнітними наночастинками органів риб та екзогенними магнітними наночастинками.

Отримані результати важливо враховувати у разі використання магнітних наночастинок для цільової доставки лікарських препаратів чи у складі контрастних речовин у разі діагностики за допомогою МРТ з метою уникнення небажаних ефектів від екзогенного введення магнітних наночастинок.

Висновки до розділу

В даному розділі досліджено процес штучного магнітомічення клітин тварин та встановлено поступове збільшення кількості структурних елементів, які дають позитивну реакцію Перлса, на 1 добу, 7 добу, 14 добу та 28 добу експерименту в мозку, серці, печінці та нирках, що свідчить про накопичення введених перорально наночастинок магнетиту переважно в тих органах, в яких показано наявність магнітних наночастинок. Через 28 діб після завершення введення штучних магнітних наночастинок *Danio rerio*, на 56 добу експерименту, кількість структурних елементів в досліджуваних органах, які дають позитивну реакцію Перлса є дещо меншою, ніж на 7, 14 та 28 добу експерименту, проте залишається вищою у порівнянні з контролем.

Було показано поступове зростання магнітофоретичної рухливості кластерів клітин мозку, серця, печінки та нирок риби *Danio rerio* на 1 добу, 7 добу, 14 добу та 28 добу перорального введення. Проте, на 56 добу експерименту, через 28 діб після завершення перорального введення магнітних наночастинок, спостерігалось незначне зменшення магнітофоретичної рухливості кластерів клітин усіх досліджуваних органів риби *Danio rerio*, але не досягало контрольного рівня. Тобто, відбувається часткове виведення магнітних наночастинок з досліджуваних органів.

На наступному етапі роботи було запропоновано спосіб детекції та виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями, який дає змогу зменшити витрати часу на виявлення та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями за

рахунок використання системи магнітів зі щілиною, яка має більш просту конструкцію у порівнянні з аналогами. А також з'являється можливість роботи як з сухою біомасою клітин, так і з суспензією, що є важливим для застосувань в біонанотехнологіях.

Розраховано сили магнітодипольної взаємодії, які виникають всередині клітини між БМН органів риб та екзогенними магнітними наночастинками. Теоретично доведено, що накопичення штучно введених магнітних наночастинок в органах риб відбувається за рахунок сили магнітодипольної взаємодії останніх з БМН, що необхідно враховувати у разі використання магнітних наночастинок з лікувальною та діагностичною метою, щоб уникнути небажаних ефектів від екзогенного введення магнітних наночастинок.

Результати, отримані у даному розділі, опубліковано у таких працях:

1. Горобець С.В. Метод детекції біогенних магнітних наночастинок у представників царства рослин / Горобець С.В., Булаєвська М.О., Зелінська О.М. // Збірник наукових праць IV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії». – Переяслав-Хмельницький, 2018 р. – С. 21-24.
2. Svitlana Gorobets, Oksana Gorobets, Maryna Bulaievskya. The presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans // Materials II International Scientific and Practical Internet-conference «BIOTECHNOLOGY: EXPERIENCE, TRADITIONS AND INNOVATIONS». – Nov. 15, 2018. – Kyiv, Ukraine. – p. 88.
3. Булаєвська М. О. Науковий керівник: Горобець С. В. Розподіл штучно введених магнітних наночастинок в організмі тварин // «Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Київ, 24 квітня 2020.

4. Горобець С. В., Горобець О. Ю., Булаєвська М. О. Вплив штучно введених магнітних наночастинок на метаболізм тварин // «Біотехнологія ХХІ століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Київ, 23 квітня 2021. – С. 122. (Особистий внесок здобувача: брала участь у проведенні експерименту та написанні тез)

ВИСНОВКИ

1. Вперше за допомогою біоінформатичних методів показано, що серед немігруючих риб, продуцентами БМН можуть бути короп звичайний (*Cyprinus carpio*) та щука звичайна (*Esox lucius*). Це дає підстави для пошуку інших функцій БМН у багатоклітинних організмах, окрім магніторецепції.
2. Показано за допомогою магнітно-силової мікроскопії наявність БМН в таких життєво важливих органах тварин, як печінка, підшлункова залоза миші, легені, нирки, селезінка свині та мозок коропа.
3. Визначено основні закономірності просторово-морфологічних властивостей БМН у різних тканинах та органах тварин та показано, що:
 - БМН в органах багатоклітинних організмів утворюють ланцюжки;
 - БМН в багатоклітинних організмах входять до складу провідної системи.

Так, БМН у тварин розміщені в стінках капілярів (всі досліджені органи і тканини окрім решітчастої кістки) або в околі капілярів (решітчаста кістка). БМН у рослин розміщені в стінці провідної тканини, а саме в стінці ситовидних трубок флоєми. БМН в грибах розташовані в стінці провідної тканини, а саме в стінках судиноподібних гіфів. Така локалізація БМН свідчить на користь ідеї, що ланцюжки БМН можуть бути задіяні в трофічних процесах.

4. Встановлено поступове збільшення кількості структурних елементів, які дають позитивну реакцію Перлса, до 28 доби перорального введення наночастинок магнетиту у дозі 20 мкг/г/день в мозку, серці, печінці та нирках *Danio rerio*, що, разом зі зменшенням до цього часу магнітофоретичної рухливості клітин цих органів, свідчить про поступове накопичення та детоксикацію екзогенних магнітних наночастинок переважно в тих органах, в яких показано наявність біогенних магнітних наночастинок.

Через 28 діб після завершення введення штучних магнітних наночастинок *Danio rerio* кількість структурних елементів в досліджуваних органах, які дають позитивну реакцію Перлса дещо знижується, проте залишається вищою у порівнянні з контролем. Отже, відбувається лише часткове виведення накопичених магнітних наночастинок з досліджуваних органів, що слід враховувати у разі використання екзогенних магнітних наночастинок з діагностичною та лікувальною метою.

5. Запропоновано спосіб виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями, який дає змогу зменшити витрати часу на виявлення та виділення клітин з природними та штучними пара-, фери-, або феромагнітними властивостями за рахунок використання системи магнітів зі щілиною, яка має більш просту конструкцію у порівнянні з аналогами та забезпечує можливість роботи як з сухою тканинною масою, так і з суспензією. Виділені клітини з природними та штучними магнітними властивостями придатні для застосувань в біотехнологіях.
6. Розраховано сили магнітодипольної взаємодії, що виникають між БМН органів риб та екзогенними магнітними наночастинками, які знаходяться в діапазоні від 10^{-11} Н до 10^{-10} Н. Завдяки магнітодипольній взаємодії відбувається накопичення введених магнітних наночастинок в мозку, серці, печінці та нирках риб, що може зумовлювати зміни метаболічних процесів в них.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gorobets O. Yu., Gorobets S. V., Gorobets Yu. I. Biogenic magnetic nanoparticles. Biomineralization in Prokaryotes and Eukaryotes. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014. Edition 3. P. 300–308.
2. de Oliveira J. F., Wajnberg E., Esquivel D. M., Weinkauff S., Winklhofer M., Hanzlik M. Ant antennae: are they sites for magnetoreception. *J. R. Soc. Interface*. 2010. Vol. 7. P. 143–152.
3. Gordon L. M., Joester D. Nanoscale chemical tomography of buried organic-inorganic interfaces in the chiton tooth. *Nature*. 2011. P. 194–197.
4. Eder S. H. K. Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109. P. 12022–12027.
5. Perry A., Bauer G. B., Dizon A. E. Magnetoreception and biomineralization of magnetite in amphibians and reptiles. *New York: Plenum Press*. 1985. P. 439–453.
6. Walcott C., Gould J. L., Kirschvink, J. L. Pigeons have magnets. *Science*. 1979. Vol. 205. P. 1027–1029.
7. Zoeger J., Dunn J., Fuller M. Magnetic material in the head of a dolphin (abst.). *Trans. Am. geophys. Urn. 61*. 1980. P. 225.
8. Kirschvink J. L. Ferromagnetic crystals (magnetite?) in human tissue. *J. Exp. Biol.* 1981. Vol. 92. P. 333–335.
9. Grassi-Schultheiss P. P., Heller F., Dobson J. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. *BioMetals*. 1997. Vol. 10. P. 351–355.
10. Ritz T., Thalau P., Phillips J. B. Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature*. 2004. P. 177–179.
11. Nikiforov V. N., Filinova E. Yu. Biomedical applications of the magnetic nanoparticles. *Weinheim: Wiley*. 2009. P. 393–444.
12. Meldrum F. C., Colfen H. Controlling Mineral Morphologies and Structures in Biological and Synthetic Systems. *Chemical Reviews*. 2008. Vol. 108. P. 4332–4432.

13. Ehrlich H. Biomineralization special issue. *Acta Biomater.* 2014. Vol.10, № 9. P. 3813–3814.
14. Mann S. Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials. Chemistry. *Oxford Univ. Press.* 2001. Ch. 3. P. 24–37.
15. Blakemore R. P. Magnetotactic bacteria. *Science.* 1975. Vol. 190. P. 377–379.
16. Frankel R. B., Blakemore R. P., Wolfe R. S. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science.* 1979. Vol. 203. P. 1355–1356.
17. Brem F., Hirt A. M., Winklhofer M. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumor and hippocampal tissue. *J. R. Soc. Interface.* 2006. Vol. 3. P. 833–841.
18. Faivre D., Godec T. U. From Bacteria to Mollusks: The Principles Underlying the Biomineralization of Iron Oxide Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Vol. 54. P. 4728–4747.
19. Sakaguchi T., Burgess J. G., Matsunaga T. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium. *Nature.* 1993. Vol. 365. P. 47–49.
20. Mann S., Sparks N., Frankel R. B., Bazilinski D. A., Jannasch Y. W. Biomineralization of ferrimagnetic greigite (Fe_3S_4) and iron pyrite (FeS_2) in a magnetotactic bacterium. *Nature.* 1990. Vol. 343. P. 258–261.
21. Dunlop D. J., Özdemir Ö. Rock Magnetism: Fundamentals and Frontiers. *Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K.* 1997. P. 573.
22. Goss C. J. Saturation magnetisation, coercivity and lattice parameter changes in the system Fe_3O_4 - $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, and their relationship to structure. *Phys Chem Minerals.* 1988. Vol. 16. P. 164–171.
23. Kletetschka G., Wasilewski P.J., Taylor P.T. Hematite vs. magnetite as the signature for planetary magnetic anomalies? *Phys. Earth Planet. Interiors* 2000. Vol. 119, № 3–4, P. 259–267.
24. Pannalal S. J., Crowe S. A., Cioppa M. T., Symons D. T. A., Sturm A., Fowle D. A. Room-temperature magnetic properties of ferrihydrite: A potential magnetic remanence carrier? *Earth and Planetary Science Letters.* 2005. Vol. 236, № 3–4. P. 856–870.

25. Roberts A. P., Chang L., Rowan C. J. Magnetic properties of sedimentary greigite (Fe_3S_4): An update. *Reviews of Geophysics*. 2011. Vol. 49. P. RG1002.
26. Lesieur S., Gazeau F., Luciani N., Ménager C., Wilhelm C. Multifunctional nanovectors based on magnetic nanoparticles coupled with biological vesicles or synthetic liposomes. *J. Mater. Chem.* 2011. Vol. 21, № 38. P. 14387–14393.
27. Al-Jamal W. T., Al-Jamal K. T., Bomans P. H., Frederik P. M., Kostarelos K. Functionalized-quantum-dot-liposome hybrids as multimodal nanoparticles for cancer. *Small*. 2008. Vol. 4. P. 1406–1415.
28. Beaune G., Menager C., Cabuil V. Location of Magnetic and Fluorescent Nanoparticles. Encapsulated inside Giant Liposomes. *J. Phys. Chem. B*. 2008. Vol. 112. P. 7424–7429.
29. Park S. H., Oh S. G., Mun J. Y., Han S. S. Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Colloids Surf. B*. 2006. Vol. 48. P. 112–118.
30. Paasonen L., Sipila T., Subrizi A., Laurinmaki P., Butcher S. J., Rappolt M., Yaghmur A., Urtti A., Yliperttula M. Gold-embedded photosensitive liposomes for drug delivery: Triggering mechanism and intracellular release. *J. Controlled Release*. 2010. Vol. 147. P. 136–143.
31. Pornpattananangkul D., Olson S., Aryal S., Sartor M., Huang C. M., Vecchio K. and Zhang L. Stimuli-Responsive Liposome Fusion Mediated by Gold Nanoparticles. *ACS Nano*. 2011. Vol. 4. P. 1935–1942.
32. Meyre M. E., Raffard G., Franconi J. M., Duguet E., Lambert O. and Faure C. Production of magnetic multilamellar liposomes as highly T2-efficient MRI contrast agents. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011. Vol. 7. P.18–21.
33. Soenen S. J., Hodenius M. and De Cuyper M. Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. *Nanomedicine*. 2009. Vol. 4. P. 177–191.
34. De Cuyper M. and Soenen S. J. Cationic magnetoliposomes. *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 605. P. 97–111.

35. Shinkai M., Suzuki M., Iijima S. and Kobayashi T. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1995. Vol. 21. P.125–137.
36. Ito A., Ino K., Kobayashi T. and Honda H. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. P. 6185–6193.
37. Martina M. S., Fortin J. P., Ménager C., Clément O., Barratt G., Grabielle-Madelmont C., Gazeau F., Cabuil V., Lesieur S. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127. P.10676–10685.
38. Jain S., Mishra V., Singh P., Dubey P. K., Saraf D. K. and Vyas S. P. RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting. *Int. J. Pharm.* 2003. Vol. 261. P. 43–55.
39. Elmi M. M. and Sarbolouki M. N. A simple method for preparation of immunomagnetic liposomes. *Int. J. Pharm.* 2001. Vol. 215. P. 45–50.
40. Plassat V., Wilhelm C., Marsaud V., Menager C., Gazeau F., Renoir J.-M. and Lesieur S. Anti-estrogen-loaded superparamagnetic liposomes for intracellular magnetic targeting and treatment of breast cancer tumors. *Adv. Funct. Mater.* 2011. Vol. 21. P. 83–92.
41. Wilhelm C., Gazeau F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, № 22. P. 3161–3174.
42. Luciani N., Gazeau F. and Wilhelm C. Reactivity of the monocyte/macrophage system to superparamagnetic anionic nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2009. Vol. 19. P. 6373–6380.
43. Wilhelm C., Gazeau F. and Bacri J. C. Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur. Biophys. J.* 2002. Vol. 31. P. 118–125.
44. Fortin-Ripoche J. P., Martina M. S., Gazeau F., Menager C., Wilhelm C., Bacri J. C., Lesieur S. and Clement O. Magnetic targeting of magnetoliposomes to

- solid tumors with MR imaging monitoring in mice: feasibility. *Radiology*. 2006. Vol. 239. P. 415–424.
45. Martina M. S., Fortin J. P., Fournier L., Menager C., Gazeau F., Clement O. and Lesieur S. Magnetic Targeting of Rhodamine-Labeled Superparamagnetic Liposomes to Solid Tumors: *In Vivo* Tracking by Fibered Confocal Fluorescence Microscopy. *Mol. Imaging*. 2007. Vol. 6. P. 140–146.
46. Riviere C., Martina M. S., Tomita Y., Wilhelm C., Tran Dinh A., Menager C., Pinard E., Lesieur S., Gazeau F. and Seylaz J. Magnetic targeting of nanometric magnetic fluid loaded liposomes to specific brain intravascular areas: a dynamic imaging study in mice. *Radiology*. 2007. Vol. 244. P. 439–448.
47. Чекман И. С., Мовчан Б. А., Загородный М. И. Наносеребро: технологии получения, фармакологические свойства, показания к применению. *Препарати і технології*. 2008. Вип. 5, №51. С. 32–40.
48. Hasselov M., Readman J.W., Ranville J.F., Tiede K. Nanoparticles and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineering nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008. Vol. 14. P. 344–361.
49. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Env. health perspective*. 2005. Vol. 113. P. 823–839.
50. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Env. health perspect*. 2006. Vol. P.114, № 2. P.165–172.
51. Huo Q. A perspective on biconjugated nanoparticles and quantum dots. *Colloids and surfaces*. 2007. Vol. 59. P. 1–10.
52. Hussan S.M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*. 2005, Vol. 19. P.975–983.
53. Коваленко Л. В., Фолманис Г. Э. Биологически активные нанопорошки железа. М.: Наука, 2006. С. 124.

54. Канцельсон Б. А., Привалова Л. И., Кузьмин С. В. Экспериментальные данные к оценке пульмонотоксичности и резорбтивной токсичности частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазона. *Токсикологический вестник*. 2010. Вып. 2. С. 17–24.
55. Song H. M., Ye P. D. Elastomeric nanoparticle composites covalently bound to $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GaAs}$ surfaces. *A. Ivanisevic Langmir*. 2007. Vol. 23. – P. 9472–9480.
56. Bellantone M., Williams H. D., Hench L. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag_2O -doped bioactive glass. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002. Vol. 46, №6. P.1940–1945.
57. Agotegaray M., Campelo A., Zysler R., Gumilar F., Bras C., Minetti A., Lassalle V. Influence of chitosan coating on magnetic nanoparticles in endothelial cells and acute tissue biodistribution. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2016. Vol. 27, №11. P. 1069–1085.
58. Arami H., Khandhar A. P., Tomitaka A., Yu E., Goodwill P. W., Conolly S. M., Krishnan K. M. *In vivo* multimodal magnetic particle imaging (MPI) with tailored magneto/optical contrast agents. *Biomaterials*. 2015. Vol. 52. P. 251–261.
59. Lee M. J. E., Veisheh O., Bhattarai N., Sun C., Hansen S. J., Ditzler S. Rapid pharmacokinetic and biodistribution studies using choleroxin-conjugated iron oxide nanoparticles: a novel non-radioactive method. *Plos One*. 2010. Vol. 5. P. e9536.
60. Александрова Г. П., Грищенко Л. А., Фадеева Т. В. Дизайн наноразмерных биоконпозитов серебра для создания новых антимикробных средств. *Второй СанктПетербургский международный экологический форум "Окружающая среда и здоровье человека"*. 2008. С. 6.
61. Kolosnjaj-Tabi J., Lartigue L., Javed Y., Luciani N., Pellegrino T., Wilhelm C., Alloyeau D., Gazeau F. Biotransformations of Magnetic Nanoparticles in the Body. *Nano Today*. 2016. Vol. 11. P. 280–284.
62. Mazuel F., Espinosa A., Luciani N., Reffay M., Le Borgne R., Motte L., Desboeufs K., Michel A., Pellegrino T., Lalatonne Y. Massive Intracellular

- Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano*. 2016. Vol. 10. P. 7627–7638.
63. Feliu N., Docter D., Heine M., del Pino P., Ashraf S., Kolosnjaj-Tabi J., Macchiarini P., Nielsen P., Alloyeau D., Gazeau F., Stauber R. H., Parak W. J. *In Vivo* Degeneration and the Fate of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45. P. 2440–2457.
64. Curcio A., Van de Walle A., Serrano A., Preveral S., Péchoux C., Pignol D., Wilhelm C. Transformation Cycle of Magnetosomes in Human Stem Cells: From Degradation to Biosynthesis of Magnetic Nanoparticles Anew. *ACS Nano*. 2020. Vol. 14, №2. P. 1406–1417.
65. Lowry G. V., Gregory K. B., Apte S. C., Lead J. R. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 46. P. 6893–6899.
66. Fadeel B., Feliu N., Vogt C., Abdelmonem A. M., Parak W. J. Bridge over troubled waters: understanding the synthetic and biological identities of engineered nanomaterials: Bridging nanotoxicology and nanomedicine. *Wiley Interdisciplin. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 2013. Vol. 5. P. 111–129.
67. Monopoli M. P., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nano.* 2012. Vol. 7. P. 779–786.
68. Soenen S. J., Parak W. J., Rejman J., Manshian B. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* 2015. Vol. 115. P. 2109–2135.
69. Loeve S., Vincent B. B., Gazeau F. Nanomedicine metaphors: from war to care. Emergence of an oecological approach. *Nano Today*. 2013. Vol. 8. P. 560–565.
70. Fdez-Gubieda M. L., Muela A., Alonso J., García-Prieto A., Olivi L., Fernandez-Pacheco R., Barandiarán J. M. Magnetite Biomineralization in *Magnetospirillum Gryphiswaldense*: TimeResolved Magnetic and Structural Studies. *ACS Nano*. 2013. Vol. 7. P. 3297–3305.

71. Baumgartner J., Morin G., Menguy N., Gonzalez T. P., Widdrat M., Cosmidis J., Faivre D. Magnetotactic Bacteria Form Magnetite from a Phosphate-Rich Ferric Hydroxide Via Nanometric Ferric (Oxyhydr) Oxide Intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol.110. P. 14883–14888.
72. Alphandery E. Applications of Magnetosomes Synthesized by Magnetotactic Bacteria in Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2014. Vol. 2. P. 5.
73. Monteil C. L., Menguy N., Préveral S., Warren A., Pignol D., Lefevre C. T. Accumulation and Dissolution of Magnetite Crystals in a Magnetically Responsive Ciliate. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. Vol. 84. P. e02865-17.
74. Liu R.-t., Liu J., Tong J.-q., Tang T., Kong W.-C., Wang X.-W., Li Y., Tang J.-T. Heating Effect and Biocompatibility of Bacterial Magnetosomes as Potential Materials Used in Magnetic Fluid Hyperthermia. *Prog. Nat. Sci.* 2012. Vol. 22. P. 31–39.
75. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
76. Li W., Pio F., Pawłowski K., Godzik A. Saturated BLAST: an automated multiple intermediate sequence search used to detect distant homology. *Bioinformatics.* 2000. Vol. 16, № 12. P. 1105–1110.
77. Schweiger A. Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance Arthur Schweiger. *Gunnar Jeschke Oxford University Press.* 2001. P. 578.
78. Козицина А. Н. ЭПР-спектроскопия, электрохимические и комбинированные методы анализа. Екатеринбург: *Издательство Уральского университета.* 2018. С. 60.
79. Корьяк В. А. Основы гистологической техники. Иркутск: *ИГМУ.* 2013. С. 35.
80. Wilson R. A., Bullen A. H. Basic Theory of Atomic Force Microscopy (AFM). Department of Chemistry, Northern Kentucky University, Highland Heights. Available online: Users.metu.edu.tr (accessed on 10 March 2021).
81. Magnetic Force Microscopy (MFM) High Resolution and High Sensitivity Imaging of Magnetic Properties [Электронный ресурс]. Режим доступа

[http://www.parkafm.com/images/spmmodes/magnetic/Magnetic-Force-Microscopy-\(MFM\).pdf](http://www.parkafm.com/images/spmmodes/magnetic/Magnetic-Force-Microscopy-(MFM).pdf).

82. Дудченко Н. О. Магнітні властивості наномагнетиту, синтезованого в температурному діапазоні 40-90 °С. *Мінералогічний журнал*. 2011. Том 33, № 2. С. 38–41.
83. Kulkarni P., Chaudhari G. H., Sripuram V., Banote R. K., Kirla K. T., Sultana R. Oral dosing in adult zebrafish: Proof-of-concept using pharmacokinetics and pharmacological evaluation of carbamazepine. *Pharmacological Reports*. 2014. Vol. 66. P. 179–183.
84. Meguro R., Asano Y., Odagiri S., Li C., Iwatsuki H., Shoumura K. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch Histol Cytol*. 2007. Vol. 70, № 1. P. 1–19.
85. Бабичев А. П. Физические величины: Справочник. Под ред. И. С. Григорьева, Е. З. Мейлихова. М.: Энергоатомиздат. 1991. С. 1231.
86. Суздалев И. П. Нанотехнология. Физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. М.: КомКнига. 2006. С. 589.
87. Schubbe S., Williams T. J., Xie G., Kiss H. E., Brettin T. S., Martinez D., Ross C. A., Schüler D., Lea Cox B., Nealson K. H., Bazylinski D. A. Complete genome sequence of the chemolithoautotrophic marine magnetotactic coccus strain MC-1. *Appl. Environ. Microbiol*. 2009. Vol.75, № 14. P. 4835–4852.
88. Gorobets O. Yu., Gorobets S. V. Functions of biogenic magnetic nanoparticles in organisms. *Functional Materials*. 2012. Vol.19, № 1. P. 18–26.
89. Walker M. M., Kirschvink J. L., Chang S.-B. R., Dizon A. E. A Candidate Magnetic Sense Organ in the Yellowfin Tuna, *Thunnus albacares*. *Science*. 1984. Vol. 224. P. 751 – 753.
90. Walker M. M., Quinn T. P., Kirschvink J. L., Groot C. Production of single-domain magnetite throughout life by Sockeye Salmon, *Oncorhynchus Nerka*. *J. exp. Biol*. 1998. Vol.140. P. 51 – 63.

91. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskia M., Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes. *Acta Physica Polonica A*. 2018. Vol. 133, № 3. P. 734–737.
92. Горобець О. Ю., Булаєвська М. О., Гетманенко К. А. Пошук потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед тварин із блакитною кров'ю «Біотехнологія ХХІ століття»: матеріали ХІІІ Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019). Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ: *КПІ ім. Ігоря Сікорського*, 2019. С. 89.
93. Bulaievskia M. O. Research advisor: Gorobets S. V. Producers of biogenic magnetic nanoparticles among animals with blue blood. *Сьогодні біологічної науки: матеріали ІІІ Міжнародної наукової конференції, Суми, Україна, 15-19 листопада 2019*.
94. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskia M., Sharay I. Detection of Biogenic Magnetic Nanoparticles in Ethmoid Bones of Migratory and Non-migratory Fishes. *SN Applied Sciences*. 2019. Vol. 1. P. 63.
95. Горобець С. В., Кравченко О. В., Булаєвська М. О., Панченко О. С. Потенційні продуценти біогенних магнітних наночастинок серед залізо- та марганецьокиснюючих бактерій. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 2018. Vol. 2, № 2. P. 27–35.
96. Jeong J., Eide D. J. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Aspects Med.* 2013. Vol. 34, № 2–3. P. 612–619.
97. Zumbunn J. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *Trueb FEBS Lett.* Vol. 398. 1997. P.187 – 192.
98. Кігель Н. Ф., Горобець С. В., Булаєвська М. О., Гнатюк А. О., Голуб В. О. Метод детекції біогенних магнітних наночастинок у біологічному матеріалі різної природи. *Продовольчі ресурси: зб. наук. пр. НААН України; Ін-т прод. ресурсів НААН України. К.: ННЦ «ІАЕ»*. 2016. Вип. 7. С. 33–37.

99. Gorobets S., Gorobets O., Golub V., Gromnadska M.. Ferromagnetic resonance in the ethmoid bones of salmon and silver carp. *Journal of Physics: Conf. Series*. 2017. Vol. 903. P. 012001.
100. Громнадська М. О., Горобець С. В., Голуб В. О. ФМР спектр решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб Тези доповідей. *X Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга, 22 квітня 2016*, Київ. – С. 121.
101. Gorobets S. V., Gorobets O. Yu., Golub V. O., Gromnadska M. O. Ferromagnetic resonance in the ethmoid bones of salmon and silver carp Joint European Magnetic Symposia (JEMS), 21-26 August 2016, Glasgow, UK. *Poster Session B. Nanoparticles and interfaces, nanomaterials and molecular magnetism*. PS.2.043.
102. Hudson A. J., Andrews S. C., Hawkins C., Williams J. M., Izuhara M., Meldrum F. C., Mann S., Harrison P. M., Guest Eur J. R. Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *J. Biochem.* 1993. Vol.15. P. 985–995.
103. Hassett R. F., Romeo A. M., Kosman D. J. Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, №13. P. 7628–7636.
104. Wajnberg E., El-Jaick L. J., Linhares M. P., Esquivel D. M. Ferromagnetic resonance of horse spleen ferritin: core blocking and surface ordering temperatures. *J. Magn. Reson.* 2001. Vol. 153. P. 69–74.
105. Cadiou H., McNaughton P. A. Avian magnetite-based magnetoreception: a physiologist's perspective. *J. R. Soc. Interface.* 2010. Vol. 7. P. 193–205.
106. Mora C. V., Davison M., Wild J. M., Walker M. M. Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature.* 2004. Vol. 432. P. 508–511.
107. Mann S., Sparks N. H., Walker M. M., Kirschvink J. L. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon,

- Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J Exp Biol.* 1988. Vol. 140. P. 35 – 49.
108. Walker M. M., Kirschvink J. L., Dizon A. E. Magnetoreception and Biomineralization of Magnetite Fish. *Chapter Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms.* 1985. Vol. 5. P. 417–437.
109. Moore A., Freake S. M., Thomas I. M. Magnetic Particles in the Lateral Line of the Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 1990. Vol. 329. P. 11–15.
110. Baker R. R., Mather J. G., Kennaugh J. H. Magnetic bones in human sinuses. *Nature.* 1983. Vol. 303. P. 78–80.
111. Kirschvink J. L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B. Magnetite biomineralization in the human brain. *J. Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 7683 – 7687.
112. Kobayashi A., Yamamoto N., Kirschvink J. Studies of inorganic crystals in biological tissue: magnetite in human tumor. *J. Jap. Soc. Powd. Metallurgy.* 1997. Vol. 44. P. 94–102.
113. Collingwood J., Dobson J. Mapping and characterization of iron compounds in Alzheimer's tissue. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2006. Vol. 10. P. 215–222.
114. Медведєв О. В., Горобець О. Ю. Аналіз рівнів експресії генів, що кодують гомологи білків магнітосомного острівця магнітотаксисних бактерій в різних тканинах та органах людини. Міністерство освіти і науки України, Національний технічний університет України «КПІ», Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. К.: НТУУ «КПІ». 2016. С. 130.
115. Горобець С. В., Булаєвська М. О., Медведєв О. В., Шарай І. В. Біогенні магнітні наночастинки в різних органах тварин. Тези доповідей. *XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ.* С. 81.

116. Medviediev O., Gorobets O. Y., Gorobets S. V., Yadrykhins'ky V. S. The prediction of biogenic magnetic nanoparticles biomineralization in human tissues and organs. *J. Phys. Conf. Ser.* 2017. Vol. 903. P. 012002.
117. Булаєвська М. О., Горобець О. Ю., Шарай І. В. Магнітна силова мікроскопія решітчастих кісток мігруючих та немігруючих риб. Тези доповідей. *XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 21 квітня 2017, Київ. С. 90.
118. Горобець С. В., Горобець О. Ю., Булаєвська М. О. Вплив штучно введених магнітних наночастинок на метаболізм тварин. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Київ, 23 квітня 2021.* С. 122.
119. Gorobets S., Gorobets O., Bulaevska M., Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes. *Sol-SkyMag International Conference*, 19-23 June 2017, San Sebastian, Spain. Poster 8.
120. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievska M., Sharau I. Magnetic force microscopy of the ethmoid bones of migratory and non-migratory fishes. *PHYSICS OF MAGNETISM 2017 (PM'17)*, 26-30 June 2017, Poznan, Poland. P-8-08. P. 228.
121. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievska M., Sharau I. Detection of Biogenic Magnetic Nanoparticles in Ethmoid Bones of Migratory and Non-migratory Fishes. *ICSM2018*, 29 April – 04 May, 2018, Beldibi/Antalya, Turkey. Abs. ID 3416 – Board ID TUE-C7 (Tuesday, 01.05.2018).
122. Булаєвська М. О., Шарай І. В. Аналіз наявності біогенних магнітних наночастинок в м'язах мігруючих та немігруючих риб. *«Біотехнологія XXI століття»: матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Київ, 19 квітня 2019)* Міністерство освіти і науки України, КПІ ім. Ігоря Сікорського, Національна академія наук України, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ: *КПІ ім. Ігоря Сікорського*, 2019. С. 85.

123. Gorby Y. A., Beveridge T. J., Blakemore R. P. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J. Bacteriol.* 1988. Vol. 170. P. 834–841.
124. Vainshtein M., Suzina N., Kudryashova E., Ariskina E. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells. *Biol. Cell.* 2002. Vol. 94. P. 29–35.
125. Hsu Ch.-Y., Ko F.-Y., Li Ch.-W., Fann K., Lue J.-T. Magnetoreception System in Honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE.* 2007. Vol. 4. P. e395.
126. Maher A. B. Magnetite biomineralization in termites. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1998. Vol. 265. P. 733 – 737.
127. Cranfield C. G. Dawe A., Karloukovski V., Dunin-Borkowski R. E., de Pomerai D., Dobson J. Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Biol. Sci.* 2004. Vol. 271. P. 436–439.
128. Gajdardziska-Josifovska M., McClean R. G., Schofield M. A., Sommer C. V. and Kean W. F. Discovery of nanocrystalline botanical magnetite. *Eur. J. Mineral.* 2001. Vol. 13. P. 863-870.
129. de Barros H. G., Esquivel D. M., Danon J. and de Oliveira L. P. Magnetotactic algae. *An. Acad. Bras. Cienc.* 1982. Vol. 54. P. 257–258.
130. Suzuki Y., Kopp R. E., Kogure T., Suga A., Takai K., Tsuchida S., Ozaki N., Endo K., Hashimoto J., Kato Y., Mizota C., Hirata T., Chiba H., Neilson K. H., Horikoshi K., Kirschvink J. L. Sclerite formation in the hydrothermal-vent “scaly-foot” gastropod-possible control of iron sulphide biomineralization by the animal. *Earth Planet. Sci. Lett.* 2006. Vol. 242. P. 39–50.
131. Gould J. L., Kirschvink J. L. and Deffeyes K. S. Bees have magnetic remanence. *Science.* 1978. Vol. 202. P. 1026–1028.
132. Wajnberg E., Acosta-Avalos D., Alves O. C., de Oliveira J. F., Srygley R. B., Esquivel D. M. Magnetoreception in eusocial insects: an update. *Journal of The Royal Society Interface.* 2010. Vol. 7. P. 207 – 225.
133. Lohmann K. J. Magnetic Remanence in the Western Atlantic Spiny Lobster, *Panulirus Argus*. *J. Exp. Biol.* 1984. Vol. 113. P. 29–41.

134. Brassart J., Kirschvink J. L., Phillips J. B. and Borland S. C. Ferromagnetic material in the eastern red-spotted newt *Notophthalmus viridescens*. *J. Exp. Biol.* 1999. Vol. 202. P. 3155–3160.
135. Kirschvink J. L. Magnetite biomineralization and geomagnetic sensitivity in higher animals: an update and recommendations for future study. *Bioelectromagnetics*. 1989. Vol. 10. P. 239–259.
136. Diebel C. E., Proksch R., Greenk C. R., Walker P. N. and Walker M. M. Magnetite denies a vertebrate magnetoreceptor. *Nature*. 2000. Vol. 406. P. 299–302.
137. Moore A., Riley W. D. Magnetic particles associated with the lateral line of the European eel *Anguilla*. *J. Fish Biol.* 2009. Vol. 74. P. 1629–1634.
138. Oguram M., Katom M., Arain N., Sasadat T. and Sakakyi Y. Magnetic particles in chum salmon (*Oncorhynchus keta*): extraction and transmission electron microscopy. *Can. J. Zool.* 1992. Vol. 70. P. 874–877.
139. Irwin W. P., Lohmann K. J. Disruption of magnetic orientation in hatchling loggerhead sea turtles by pulsed magnetic fields. *J. Comp. Physiol. A*. 2005. Vol. 191. P. 475–480.
140. Falkenberg G. Avian magnetoreception: elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds. *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. P. e9231.
141. Fleissner G., Fleissner G., Stahl B. and Falkenberg G. Iron-mineral-based magnetoreception in birds: the stimulus conducting system. *J. Ornitholog.* 2003. Vol. 148. P. 643–648.
142. Edwards H. H., Schnell G. D., DuBois R. L. and Hutchison V. H. Natural and induced remanent magnetism in birds. *Auk*. 1992. Vol. 109. P. 43–56.
143. Edelman N. B., Fritz T., Nimpf S., Pichler P., Lauwers M., Hickman R. W., Papadaki-Anastasopoulou A., Ushakova L., Heuser T., Resch G. P., Saunders M., Shaw J. A., Keays D. A. No evidence for intracellular magnetite in putative vertebrate magnetoreceptors identified by magnetic screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. Vol. 112. P. 262–267.

144. Holland R. A., Kirschvink J. L., Doak T. G., Wikelski M. Bats use magnetite to detect the Earth's magnetic field. *PLoS ONE*. 2008. Vol. 3. P. 1676.
145. Zoeger J., Dunn J. R. and Fuller M. Magnetic material in the head of the common pacific dolphin. *Science*. 1981. Vol. 213. P. 892–894.
146. Quintana C., Cowley J. M. and Marhic C. Electron nanodiffraction and high-resolution electron microscopy studies of the structure and composition of physiological and pathological ferritin. *J. Struct. Biol.* 2004. Vol. 147. P. 166–178.
147. Collingwood J. F. Chong R. K., Kasama T., Cervera-Gontard L., Dunin-Borkowski R. E., Perry G., Pósfai M., Siedlak S. L., Simpson E. T., Smith M. A., Dobson J. Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J. Alzheimer's Dis.* 2008. Vol. 14. P. 235–245.
148. Grassi-Schultheiss P. P., Dobson J. Magnetic analysis of human brain tissue. *BioMetals*. 1999. Vol. 12. P. 67–72.
149. Posfai M., Dunin-Borkowski R. E. Magnetic nanocrystals in organisms. *Elements*. 2009. Vol. 5. P. 235–240.
150. Gorobets Yu. I., Gorobets S. V. Stationary flows of electrolytes in the vicinity of ferromagnetic particles in a constant magnetic field. *Bull. Herson State Tech. Univ.* 2000. Vol. 3. P. 276–281.
151. Kirschvink J. L., Jones D. S., MacFadden B. J. Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism. New York, *Plenum Press*. 1985. Vol. 5. P. 704.
152. Gorobets S. V., Gorobets O. Yu., Medviediev O. V., Golub V. O. and Kuzminykh L. V. Biogenic magnetic nanoparticles in lung, heart and liver. *Funct. Mater.* 2017. Vol. 24. P. 405–408.
153. Gorobets S. V., Medviediev O., Gorobets O. Y., and Ivanchenko A. Biogenic magnetic nanoparticles in human organs and tissues. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2018. Vol. 135. P. 49–57.

154. Holland R. A., Thorup K., Vonhof M. J., Cochran W. W. and Wikelski M. Navigation: Bat orientation using Earth's magnetic field. *Nature*. 2006. Vol. 444. P. 702.
155. Gorobets O. Yu., Gorobets S.V. and Gorobets Yu. I. Biomineralization of intracellular biogenic magnetic nanoparticles and their possible functions. *Research Bulletin of NTUU "KPI"*. 2013. Vol. 3. P. 28–33.
156. Gorobets O. Yu., Gorobets S. V. and Sorokina L. V. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi. *Funct. Mater.* 2014. Vol. 21. P. 427–436.
157. Gorobets S. V., Gorobets O. Yu., Demianenko I. V., Nikolaenko R. N. Self-organization of magnetite nanoparticles in providing *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with magnetic properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2013. Vol. 337–338. P. 53–57.
158. Gorobets S., Gorobets O., Gorobets Yu., Bulaievska M. Ferrimagnetic organelles in multicellular organisms. 2021. *arXiv:1811.06717* [q-bio.TO].
159. Melling M., Karimian-Teherani D., Mostler S., Behnam M., Hochmeister S. 3-D morphological characterization of the liver parenchyma by atomic force microscopy and by scanning electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 2004. Vol. 64. P. 1–9.
160. Braet F., Taatjes D. and Wisse E. Probing the unseen structure and function of liver cells through atomic force microscopy. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. Vol. 73. P. 13–30.
161. Braet F., de Zanger R., Seynaeve C., Baekeland M., and Wisse E. A comparative atomic force microscopy study on living skin fibroblasts and liver endothelial cells. *J. Electron Microsc.* 2001. Vol. 50. P. 283–290.
162. Zapotoczny B., Szafranska K., Kus E., Chlopicki S. and Szymonski M. Quantification of fenestrations in liver sinusoidal endothelial cells by atomic force microscopy. *Micron*. 2017. Vol. 101. P. 48–53.
163. Zapotoczny B., Szafranska K., Owczarczyk K., Kus E., Chlopicki S., Szymonski M. 2017. Atomic force microscopy reveals the dynamic morphology

- of fenestrations in live liver sinusoidal endothelial cells. *Sci. Rep.* Vol. 7. P. 79–94.
164. Mattsson G., Jansson L., and Carlsson P.-O. Decreased vascular density in mouse pancreatic islets after transplantation. *Diabetes.* 2002. Vol. 51. P. 1362–1366.
165. MacPhee P. J., Schmidt E. E. and Groom A. C. Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution *in vivo* microscopy. *Am. J. Physiol.* 1995. Vol. 269. P. G692–G698.
166. Yoon Y. J., Chang S., Kim O. Y., Kang B. K., Park J., Lim J. H., Yun Huang J., Kim Y. K., Byun J. H., Gho Y. S. Three-dimensional imaging of hepatic sinusoids in mice using synchrotron radiation micro-computed tomography. *PLoS One.* 2013. Vol. 8. P. e68600.
167. Benten D., Follenzi A., Bhargava K. K., Kumaran V., Palestro C. J., Gupta S. Hepatic targeting of transplanted liver sinusoidal endothelial cells in intact mice. *Hepatology.* 2005. Vol. 42. P. 140–148.
168. Goh S. K., Bertera S., Olsen P., Candiello J. E., Halfter W., Uechi G., Balasubramani M., Johnson S. A., Sicari B. M., Kollar E., Badylak S. F., Banerjee I. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials.* 2013. Vol. 34. P. 6760–6772.
169. Simionescu M., Simionescu N. and Palade G. E. Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J. Cell Biol.* 1974. Vol. 60. P. 128–152.
170. Henderson J. R., Moss M. C. A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. *Q. J. Exp. Physiol.* 1985. Vol. 70. P. 347–356.
171. Clementi F., Palade G. E. Intestinal capillaries. I. Permeability to peroxidase and ferritin. *J Cell Biol.* 1969. Vol. 41. P. 33–58.
172. Wiedeman, M. P., Tuma, R. F. and Magrovitz, H. N. 1981. An introduction to microcirculation. Biophysics and Bioenergetics Series 2. *New York, Washington.* 1981. P. 216.

173. Bohlen H. G. Tissue PO₂ in the intestinal muscle layer of rats during chronic diabetes. *Circ. Res.* 1983. Vol. 52. P. 677–682.
174. Townsley M. I. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr. Physiol.* 2011. Vol. 2. P. 675–709.
175. Sicard D., Fredenburgh L. E. and Tschumperlin D. J. Measured pulmonary arterial tissue stiffness is highly sensitive to AFM indenter dimensions. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2017. Vol. 74. P. 118–127.
176. Gruber S., Spielauer I., Böhme S., Baron D., Markstaller K., Ullrich R., and Klein K. U. Real-time in-vivo imaging of pulmonary capillary perfusion using probe-based confocal laser scanning endomicroscopy in pigs. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2015. Vol. 32. P. 392–399.
177. Winkler G. C., Cheville N. F. Morphometry of postnatal development in the porcine lung. *Anat. Rec.* 1985. Vol. 211. P. 427–433.
178. Schiraldi L. Functional capillary density for *in vivo* estimation of intestinal perfusion using real-time confocal endomicroscopy. *J. Cytol. Histol.* 2015. Vol. 6. P.334.
179. Winkler G. C., Cheville N. F. Postnatal colonization of porcine lung capillaries by intravascular macrophages: an ultrastructural, morphometric analysis. *Microvasc. Res.* 1987. Vol. 33. P. 224–232.
180. Penuela L., Villaggio B., Raiteri R., Fiocca R., and Vellone V. G. Kidney Ultrastructure by Atomic Force Microscopy Imaging Directly From Formalin Fixed-Paraffin Embedded Biopsy: Is This a Dream Come True? *Int. J. Surg. Pathol.* 2017. Vol. 10. P. 1–2.
181. Sun D., Eirin A., Zhu X. Y., Zhang X., Crane J. A., Woollard J. R., Lerman A., Lerman L. O. Experimental coronary artery stenosis accelerates kidney damage in renovascular hypertensive swine. *Kidney Int.* 2015. Vol. 87. P. 719–727.
182. Khairoun M., van den Heuvel M., van den Berg B. M., Sorop O., de Boer R., van Ditzhuijzen N. S., Bajema I. M., Baelde H. J., Zandbergen M., Duncker D. J., Rabelink T. J., Reinders M. E., van der Giessen W. J., Rotmans J. I. Early

- systemic microvascular damage in pigs with atherogenic diabetes mellitus coincides with renal angiotensin dysbalance. *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10. P. e0121555.
183. Tiedemann K., Egerer G. Vascularization and glomerular ultrastructure in the pig mesonephros. *Cell Tissue Res*. 1984. Vol. 238. P. 165–175.
184. Vodenicharov A., Simoens P. Morphologic peculiarities of the renal cortical vasculature connected with blood redistribution in the kidney of the domestic pig. *J. Vet. Med. C*. 1998. Vol. 27. P. 257–262.
185. Hubert O. et. al. Rat spleen in the course of *Babesia microti* invasion: histological and submicroscopic studies. *Acta Protozool*. 2017. Vol. 56. P. 129–137.
186. Snook T. Studies on the perifollicular region of the rat's spleen. *Anat. Rec*. 1964. Vol. 148. P. 149–159.
187. Steiniger B. S., Ulrich C., Berthold M., Guthe M. and Lobachev O. Capillary networks and follicular marginal zones in human spleens. Three-dimensional models based on immunostained serial sections. *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13. P. e0191019.
188. Miyata H., Abe M., Takehana K., Iwasa K., and Hiraga T. Electron microscopic studies on reticular fibers in the pig sheathed artery and splenic cords. *J. Vet. Med. Sci*. 1993. Vol. 55. P. 821–827.
189. Saxena P. R., Verdouw P. D. Tissue blood flow and localization of arteriovenous anastomoses in pigs with microspheres of four different sizes. *Pflugers Arch*. 1985. Vol. 403. P. 128–135.
190. Seki A., Abe M. Scanning electron microscopic studies on the microvascular system of the spleen in the rat, cat, dog, pig, horse and cow. *Jpn. J. Vet. Sci*. 1985. Vol. 47. P. 237–249.
191. Hautot D., Pankhurst Q. A., Kha N. and Dobson J. P. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue. *Proc. Roy. Soc. B*. 2003. Vol. 270. P. S62–S64.

192. Chekchun V. F., Gorobets O. Yu., Gorobets S. V. and Demianenko I. V. Magnetically sensitive nanostructures of endogenous origin in Ehrlich's carcinoma cells. *Nanostruct Mater.* 2011. Vol. 2. P. 102–109.
193. Alekseeva T. A., Gorobets S. V., Gorobets O. Yu., Demyanenko I. V. and Lazarenko O. M. Magnetic force microscopy of atherosclerotic plaques. *Med. Perspect.* 2014. Vol. 1. P. 4–10.
194. Koralewski M., Pochylski M., Mitroova Z., Timko M., Kopcansky P. and Melnikova L. Magnetic birefringence of natural and synthetic ferritin. *J. Magn. Magn. Mater.* 2011. Vol. 323. P. 2413–2417.
195. Chuanlin L., Yunan H., Chenghua G., Chengsheng L. and Xiguang C. Properties of biogenic magnetite nanoparticles in the radula of chiton *Acanthochiton rubrolineatus lischke*. *J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed.* 2011. Vol. 26. P. 478–482.
196. Papaefthymiou G. C. The Mössbauer and magnetic properties of ferritin cores. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1800. P. 886–897.
197. Oshtrakh M. I., Alenkina I. V., Kuzmann E., Klencsar Z. and Siemionkin V. A. Anomalous Mössbauer line broadening for nanosized hydrous ferric oxide cores in ferritin and its pharmaceutical analogue FerrumLek in the temperature range. *J. Nanoparticle Res.* 2014. Vol. 16. P. 23–63.
198. Joos A., Rümenapp C., Wagner F. E. and Gleich B. Characterisation of iron oxide nanoparticles by Mössbauer spectroscopy at ambient temperature. *J. Magn. Magn. Mater.* 2016. Vol. 399. P. 123–129.
199. Jin W. Y., Xu G. Z., Sclabassi J., Zhu J. G, Bagic A. and Sun M. G. Detection of magnetic nanoparticles with magnetoencephalography. *J. Magn. Magn. Mater.* 2008. Vol. 320. P. 1472–1478.
200. Pan Y. H., Sader K., Powell J. J., Bleloch A., Gass M., Trinick J., Warley A., Li A., Brydson R., Brown A. 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: New evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *J. Struct. Biol.* 2009. Vol. 166. P. 22–31.

201. Quintana C., Lancin M., Marhic C., Pérez M., Martin-Benito J., Avila J., Carrascosa J. L. Initial studies with high resolution TEM and electron energy loss spectroscopy studies of ferritin cores extracted from brains of patients with progressive supranuclear palsy and Alzheimer disease. *Cell. Mol. Biol.* 2000. Vol. 46. P. 807–820.
202. Gossuin Y., Hautot D., Muller R. N., Pankhurst Q., Dobson J., Morris C., Gillis P., Collingwood J. Looking for biogenic magnetite in brain ferritin using NMR relaxometry. *NMR Biomed.* 2005. Vol. 18. P. 469–472.
203. Daniels S. L, Ngunjiri J. N. and Garno J. C. Investigation of the magnetic properties of ferritin by AFM imaging with magnetic sample modulation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. Vol. 394. P. 215–223.
204. Mikhaylova A., Davidson M., Toastmann H., Channell J. E. T., Guyodo Y., Batich C. and Dobson J. Detection, identification and mapping of iron anomalies in brain tissue using X-ray absorption spectroscopy. *J. R. Soc. Interface.* 2005. Vol. 2. P. 33–37.
205. Espinosa, A. et. al. On the discrimination between magnetite and maghemite by XANES measurements in fluorescence mode. *Meas. Sci. Technology.* 2012. Vol. 23. P. 015602.
206. Gálvez N., Fernández B., Sánchez P., Cuesta R., Ceolín M., Clemente-León M., Trasobares S., López-Haro M., Calvino J. J., Stéphan O., Domínguez-Vera J. M. Comparative structural and chemical studies of ferritin cores with gradual removal of their iron contents. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130. P. 8062–8068.
207. Melníková L., Petrenko V. I., Avdeev M. V., Garamus V. M., Almásy L., Ivankov O. I., Bulavin L. A., Mitróová Z., Kopčanský P. Effect of iron oxide loading on magnetoferritin structure in solution as revealed by SAXS and SANS. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2014. Vol. 123. P. 82–88.
208. Pershant P. S. Magneto-optical effects. *J. Appl. Phys.* 1967. Vol. 38. P. 1482–1490.

209. Koralewski M., Balejčíková L., Mitróová Z., Pochylski M., Baranowski M., Kopčanský P. Magnetic birefringence study of the magnetic core structure of ferritin. *Acta Phys. Pol. A*. 2012. Vol. 121. P. 1237–1239.
210. Koralewski M., Kłos J. W., Baranowski M., Mitróová Z., Kopčanský P., Melníková L., Okuda M., Schwarzacher W. The Faraday effect of natural and artificial ferritins. *Nanotechnology*. 2012. Vol. 23. P. 355704.
211. Koralewski M., Pochylski M. and Gierszewski J. Magnetic properties of ferritin and akaganeite nanoparticles in aqueous suspension. *J. Nanopart. Res.* 2013. Vol. 15. P. 1902.
212. Dobosz B., Krzyminiewski R., Koralewski M. and Hałupka-Bryl M. Computer enhancement of ESR spectra of magnetite nanoparticles *J. Magn. Magn. Mater.* 2016. Vol. 407. P. 114–121.
213. Raikher Y. L., Stepanov V. I. The effect of thermal fluctuations on the FMR line shape in dispersed ferromagnets. *Sov. Phys. JETP*. 1992. Vol. 75. P. 764–771.
214. Hemmer R., Hall A., Spaulding R., Rossow B., Hester M., Caroway M., Haskamp A., Wall S., Bullen H. A., Morris C., Haik K. L. Analysis of biotinylated generation 4 poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer distribution in the rat brain and toxicity in a cellular model of the blood-brain barrier. *Molecules*. 2013. Vol. 18. P. 11537–11552.
215. Scheich H., Honegger H. W., Warrell D. A. and Kennedy G. Capillary dilatation in response to hypoxia in the brain of a gobiid fish. *Respir Physiol*. 1972. Vol. 15. P. 87–95.
216. Miller D. S., Graeff C., Droulle L., Fricker S., Fricker G. Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002. Vol. 282. P. R191–R198.
217. Кравченко Т. И. Соотношение систем внутричерепной гемолитвородинамики и цереброваскулярная патология. *Журнал «Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»*. 2004. Том. 11, №4. С.81–83.

218. Saladin K. S., Sullivan S. J. and Gan C. A. Anatomy and physiology: the unity of form and function. *New York: McGraw-Hill Education*. 2015. Vol. 1. P.1129.
219. Fehrenbach M., Herring S. Illustrated Anatomy of the Head and Neck. *Elsevier*. 2012. Vol. 4. P. 336.
220. Jacobs S. Human anatomy. *Elsevier*. 2008. Vol. 1. P. 244.
221. Горобець О. Ю., Булаєвська М. О. Аналіз наявності біогенних магнітних наночастинок в органах та тканинах тварин та, зокрема, людини. Тези доповідей. *XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга, 20 квітня 2018, Київ*. С. 80.
222. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskia M. Analysis of the presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans. *9th Joint European Magnetic Symposia (JEMS) Conference 2018, 3 – 7 September 2018, Mainz, Germany*. A-1938.
223. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievskia M.. The presence of biogenic magnetic nanoparticles in organs and tissues of animals and humans. *Materials II International Scientific and Practical Internet-conference «BIOTECHNOLOGY: EXPERIENCE, TRADITIONS AND INNOVATIONS»*. Nov. 15, 2018. Kyiv, Ukraine. P. 88.
224. Bulaievskia M. O. Research advisor: Gorobets S. V. Detection of biogenic magnetic nanoparticles in muscles of migratory and non-migratory fishes VIII *Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «БІОТЕХНОЛОГІЯ: ЗВЕРШЕННЯ ТА НАДІЇ»*, Київ, Україна, 15 листопада 2019.
225. Gajdardziska-Josifovska M., McClean R. G., Schofield M. A., Sommer C. V., Kean W. F. Discovery of Nanocrystalline Botanical Magnetite. *Eur. J. Mineral.* 2001. Vol. 13. P. 863–870.
226. Bharde A., Rautaray D., Bansal V., Ahmad A., Sarkar I., Yusuf S. M., Sanyal M., Sastry M. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. *Small*. 2006. Vol. 2. P. 135–141.

227. Lalonde S., Wipf D. and Frommer W. B. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 341–372.
228. Buvat R. Ontogeny, cell differentiation, and structure of vascular plants. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg XVII.* 1989. P. 58.
229. Raven P. H., Evert R. F. and Eichhorn S. E. Biology of plants. *Worth Publishers, New York.* 1992. Vol. 5. P. 791.
230. Turgeon R., Wolf S. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009. Vol. 60. P. 207–221.
231. Lucas W. J., Groover A., Lichtenberger R., Furuta K., Yadav S. R., Helariutta Y., He X. Q., Fukuda H., Kang J., Brady S. M., Patrick J. W., Sperry J., Yoshida A., López-Millán A. F., Grusak M. A., Kachroo P. The plant vascular system: evolution, development and functions. *J. Integr. Plant. Biol.* 2013. Vol. 55. P. 294–388.
232. McCulloh K. A., Sperry, J. S. and Adler F. R. Water transport in plants obeys Murray's law. *Nature.* 2003. Vol. 421. P. 939–942.
233. Yeo A., Flowers T. Plant solute transport. *Oxford UK: Blackwell Publishing.* 2007. P. 424.
234. Zimmermann U., Schneider H., Wegner L. H., Wagner H. J., Szimtenings M., Haase A., Bentrup F. W. What are the driving forces for water lifting in the xylem conduit? *Physiol. Plant.* 2002. Vol. 114. P. 327–335.
235. Melvin T. The cohesion-tension theory of sap ascent: current controversies. *J. Exp. Bot.* 1997. Vol. 48. P. 1753.
236. Ding B., Parthasarathy M. V., Niklas K., Turgeon R. A morphometric analysis of the phloem unloading pathway in developing tobacco leaves. *Planta.* 1988. Vol. 176. P. 307–318
237. Mullendore D. L., Windt C. W., Van As. H. and Knoblauch M. Sieve tube geometry in relation to phloem flow. *Plant Cell.* 2010. Vol. 22. P. 579–593.
238. Szymońska J., Targosz-Korecka M., Krok F. Characterization of starch nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series.* 2009. Vol. 146. P.012027.

239. Tian Y., Zhao Y., Huang J., Zeng H. and Zheng B. Effects of different drying methods on the product quality and volatile compounds of whole shiitake mushrooms. *Food Chem.* 2016. Vol. 197. P. 714–722.
240. García-Segovia P., Andrés-Bello A. and Martínez-Monzó J. Rehydration of air-dried Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) caps: Comparison of conventional and vacuum water immersion processes. *LWT-Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 44. P. 480–488.
241. Santana Nunes J., Rocha de Brito M., Cunha Zied D., Aparecida das Graças Leite E., Souza Dias E., Alves E. Evaluation of the infection process by *Lecanicillium fungicola* in *Agaricus bisporus* by scanning electron microscopy. *Rev. Iberoam. Micol.* 2017. Vol. 34. P. 36–42.
242. Булаєвська М. О., Гетманенко К. А., Мікешина Г. І., Шарай І. В. Детекція біогенних магнітних наночастинок в грибах *Agaricus bisporus var. bisporus* Тези доповідей. *XI Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 21 квітня 2017, Київ. С. 89.
243. Gorobets S., Gorobets O., Bulaievska M., Valverde V. M., Hetmanenko K., Sharay I. Biogenic magnetic nanoparticles in representatives of kingdom Fungi *IEEE AIM 2018*, February 4 – 7, 2018, La Thuile, Italy. P16.
244. Gorobets S., Gorobets O., Duduk A., Bulaievska M., Sharay I. Comparative characteristics of biogenic magnetic nanoparticles in plant, fungi and animal organisms *IEEE AIM 2018*, February 4 – 7, 2018, La Thuile, Italy. P17.
245. Горобець С. В., Дудук А. В., Булаєвська М. О. Порівняльна характеристика біогенних магнітних наночастинок у рослин, грибів і тварин Тези доповідей. *XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття» присвячена 100-річчю Артура Корнберга*, 20 квітня 2018, Київ. С. 82.
246. Горобець С. В., Булаєвська М. О., Зелінська О. М. Метод детекції біогенних магнітних наночастинок у представників царства рослин. *Збірник наукових праць IV Міжнародної науково-практичної інтернет-*

конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії». – Переяслав-Хмельницький. 2018. С. 21–24.

247. Kalmykova T. V., Tarapov S. I., Gorobets S. V., Gorobets O. Y., Bulaievska M. O., Getmanenko K. A. Electronic Spin Resonance in oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, grown on a substrate with the addition of magnetite. *3rd International School on Magnonics 2018 (IASM'2018)*, Kyiv, Ukraine, September 17–21, 2018.
248. Nagy J. A., Benjamin L., Zeng H., Dvorak A. M. and Dvorak H. F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008. Vol. 11. P. 109–119.
249. Moore D. R., Geoffrey D. T. and Anthony P. J. 21st century guidebook to fungi. *Cambridge University Press*. 2011. P. 639.
250. Sukriti S., Tauseef M., Yazbeck P. and Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm. Circ.* 2014. Vol. 4. P. 535–551.
251. Bauer H., Pllana A. EEG-based local brain activity feedback training–tomographic neurofeedback. *Front. Hum. Neurosci.* 2014. Vol. 8. P. 1005.
252. Guyton A. C. Textbook of medical physiology. Philadelphia, Pennsylvania. *Elsevier Inc.* 2006. Vol. 11. P. 503.
253. Maheshwari R. Fungi: experimental methods in biology, Second Edition. *CRC Press*. 2016. Vol. 2. P. 358.
254. Gooday G. W. The dynamics of hyphal growth. *Mycol. Res.* 1995. Vol. 99. P. 385–394.
255. Steinberg G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot. Cell.* 2007. Vol. 6. P. 351–360.
256. Gorobets S. V., Gorobets O. Y., Bulaevskaya M. O., Darmenko Y. A., Aznakayeva D. E. AFM and MFM of biogenic magnetic nanoparticles in human organ in norm and pathology. *SPIE Optics + Photonics 2019, SanDiego, California, United States*, 11-15 August 2019.
257. Богословская О. А., Сизова Е. А., Полякова В. С. Мирошников С. А., Лейпунский И. О., Ольховская И. П., Глущенко Н. Н. Изучение

- безопасности введения наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками в организм животных г. Оренбург. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2009. Вып. 2. С. 124.
258. Глущенко Н. Н., Ольховская И. П., Плетенева Т. В., Фаткуллина Л. Д., Ершов Ю. А., Федоров Ю. И. Биологическое действие высокодисперсных порошков металлов г. Москва, *Известия РАН*. 1989. Вып 3. С. 415.
259. Булаєвська М. О. Науковий керівник: Горобець С. В. Розподіл штучно введених магнітних наночастинок в організмі тварин. «*Біотехнологія XXI століття*»: матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції, Київ, 24 квітня 2020.
260. Налескіна Л. А., Бородай Н. В., Чехун В. Ф. Сьогодення та перспективи створення наносистем спрямованої доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин. *Онкологія*. 2009. Вип. 11, № 3. С. 166–173.
261. Розенфельд Л. Г., Москаленко В. Ф., Чекман І. С., Мовчан Б. О. Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику *Укр. мед. часопис*. 2008. Вип. 5, № 67. С. 63–68.
262. Wilfried A., Nowak H. Magnetism in medicine: A Handbook. 2nd ed. *Weinheim: Wiley-VCH*. 2007. P. 96.
263. Кириленко А. В., Чехун В. Ф., Кондратенко И. П., Подольцев А. Д., Кучерявая И. Н., Бондар В. В. Компьютерное моделирование и исследование электромагнитных и тепловых процессов при магнитно-жидкостной гипертермии опухолевых клеток. *Доп. НАН України*. 2009. Вип. 11. С. 183–190.
264. Ernest H., Shetty R. Impact of nanotechnology on biomedical sciences: Review of current concepts on convergence of nanotechnology with biology. *J. of Nanobiotechnol.* 2005.

265. Nikolaev B. P., Eliseev O. V., Marchenko Ya. Yu. et al. Preparation of Magnetite Nanoemulsion Stabilized by Tween 81 for MRI Contrast Enhancement. *AIP Conf. Proc.* V. 2010. Vol. 1311. P. 458–465.
266. Kapp D. S., Hahn G. M., Carlson R. W. Principles of Hyperthermia. In: Bast R. C. Jr., Kufe D. W., Pollock R. E., et al., editors. *Cancer Medicine* e.5. 5th ed. Hamilton, Ontario: B.C. Decker Inc., 2000.
267. Hahn Y. K., Jin Z., Kang J. H. Magnetophoretic immunoassay of allergen specific IgE in an enhanced magnetic field gradient. *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. P. 2214–2220.
268. Gijs M. A. M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications Microfluid. *Nano-fluid.* 2004. Vol. 1. P. 22–40.
269. West J., Karamata B., Lillis B. Application of magnetohydrodynamic actuation to continuous flow chemistry. *Lab. Chip.* 2002. Vol. 2. P. 224–230.
270. Патент UA 91607. «Спосіб магнітної сепарації слабомагнітних рідинних або пилогазових продуктів і магнітний сепаратор для його здійснення». МПК В03С 1/00, опубл. 10.08.2010, бюл. 15.
271. Rotariu O., Ogden I. D., MacRae M., Udrea L. A., Strachan N. J. C. Multiple sample flow through immunomagnetic separator for concentrating pathogenic bacteria. *Physics in Medicine and Biology.* 2005. Vol. 50, № 12. P. 2967–2977.
272. Патент 125378 UA, МПК В03С 1/00 (2017.01). Спосіб детекції та виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями С. В. Горобець, О. Ю. Горобець, М. О. Булаєвська. (Україна); заявник та патентовласник Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»; заявл. 24.11.2017.
273. Заявка на винахід a201711508. Україна, МПК (2017.01) В03С 1/00. Спосіб детекції та виділення клітин з природними та штучними магнітними властивостями С. В. Горобець, О. Ю. Горобець, М. О. Булаєвська. (Україна); заявник та патентовласник Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»; заявл. 24.11.2017.

274. Haumann B. F. Liposomes offer hope as medical tools. *Inform.* 1995. Vol. 6. P. 793–802.
275. Dobson J. P., Grassi P. Magnetic Properties of Human Hippocampal Tissue. Evaluation of Artefact and Contamination Sources. *Brain Res. Bull.* 1996. Vol. 39. P. 255–259.

ДОДАТОК А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
 Національного технічного університету
 України «Київський політехнічний
 інститут імені Ігоря Сікорського»
 академік НАН України, д. т. н., проф.



Юрій ЯКИМЕНКО

«04» лютого 2021 р.

АКТ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

результатів дисертаційної роботи Булаєвської Марини Олександрівни
 «Біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин
 тварин» у навчальному процесі кафедри біоінформатики Національного
 технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря
 Сікорського»

Ми, ті що підписалися, комісія у складі: завідувача кафедри біоінформатики д. т. н., проф. Горобець С. В., доцента кафедри біоінформатики, к. т. н., с. н. с. Маринченко Л. В., асистента кафедри біоінформатики, к. т. н., Дем'яненко І. В. склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Булаєвської Марини Олександрівни «Біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин тварин» у навчальному процесі кафедри біоінформатики, а саме були розроблені та впроваджені нові програми навчальної дисципліни «Основи біоінформатики» для студентів спеціальності 133 – Галузеве машинобудування.

Завідувач кафедри біоінформатики,
 д. т. н., проф.

Світлана ГОРОБЕЦЬ

Доцент кафедри біоінформатики,
 к. т. н., с. н. с.

Лоліта МАРИНЧЕНКО

Асистент кафедри біоінформатики,
 к. т. н.

Ірина ДЕМ'ЯНЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Національного технічного університету

України «Київський політехнічний

інститут імені Ігоря Сікорського»

академік НАН України, д. т. н., проф.

 Юрій ЯКИМЕНКО

« 01 » лютого 2021 р.

АКТ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

результатів дисертаційної роботи Булаєвської Марини Олександрівни «Біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин тварин» у навчальному процесі кафедри біоінформатики Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Ми, ті що підписалися, комісія у складі: завідувача кафедри біоінформатики д. т. н., проф. Горобець С. В., доцента кафедри біоінформатики, к. т. н., с. н. с. Маринченко Л. В., асистента кафедри біоінформатики, к. т. н, Дем'яненко І. В. склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Булаєвської Марини Олександрівни «Біотехнології штучного магнітомічення та природне магнітомічення клітин тварин» у навчальному процесі кафедри біоінформатики, а саме були розроблені та впроваджені нові програми навчальної дисципліни «Науково-практичні основи біоінформатики» для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія.

Завідувач кафедри біоінформатики,
д. т. н., проф.



Світлана ГОРОБЕЦЬ

Доцент кафедри біоінформатики,
к. т. н., с. н. с.



Лоліта МАРИНЧЕНКО

Асистент кафедри біоінформатики,
к. т. н



Ірина ДЕМ'ЯНЕНКО