

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

На правах рукопису

ЧИЖ ЮЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 57.05; 577.32 :537.662; 616-004.6

**БІОТЕХНОЛОГІЇ НА ОСНОВІ МАГНІТОМІЧЕННЯ
МІКРООРГАНІЗМІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата технічних наук

Науковий керівник
Горобець Світлана Василівна,
д.т.н., проф.

Київ - 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
Вступ.....	7
РОЗДІЛ 1 МЕТОДИ МАГНІТНОГО МІЧЕННЯ БІООБ'ЄКТІВ.....	13
1.1 Біогенні магнітні наночастинки в живих організмах.....	13
1.1.1 Біогенні магнітні наночастинки у магнітотаксисних бактерій (МТБ)	14
1.1.2 Біогенні магнітні наночастинки у немагнітотаксисних мікроорганізмів	16
1.1.2 Біогенні магнітні наночастинки у людини.....	21
1.2 Методи штучного магнітомічення клітин.....	22
1.2.1 Магнітне мічення клітин за допомогою дендримерів.....	23
1.2.2 Магнітне мічення клітин за допомогою ендоцитозу.....	25
1.2.3 Магнітне мічення клітин за допомогою сонопорації.....	27
1.2.4 Магнітофекція.....	29
1.2.5 Електропорація.....	31
1.3 Методи мігнітного мічення біосорбентів.....	32
1.3.1 Перемішування.....	33
1.3.2 Трансформація дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> методом електропорації.....	35
Висновки до розділу 1.....	36
Розділ 2. матеріали ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	38
2.1 Метод біоінформатики для пошуку гомологів білків що порівнюються ..	38
2.2 Характеристика досліджуваних біологічних об'єктів та використаних реактивів.....	40
2.3 Метод виготовлення наномагнетиту в магнітному полі.....	40
2.4 Отримання магнітоміченого біосорбенту на основі дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при механічному перемішуванні.....	41
2.5 Отримання магнітоміченого біосорбенту на основі <i>Saccharomyces cerevisiae</i> при магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещених електричному і магнітному полях.....	42

2.5.1	Методика отримання ММБС при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях	45
2.6	Метод імітації біосорбції для дослідження стабільності магнітної сприйнятливості ММБС	47
2.7	Метод вимірювання магнітної сприйнятливості	47
2.8	Метод проведення біосорбції для дослідження ефективності вилучення Cu^{2+} ММБС	48
2.9	Метод вимірювання сорбційної здатності ММБС методом спектрофотометрії.....	48
2.10	Аналіз біологічних об'єктів за допомогою оптичної мікроскопії	48
2.11	Аналіз біологічних об'єктів за допомогою растрової електронної мікроскопії	48
2.12	Процес отримання алюмінієвого покриття та підготовка зразків для растрової електронної мікроскопії	49
2.13	Аналіз біологічних об'єктів за допомогою феромагнітного резонансу	50
РОЗДІЛ 3. ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМУВАННЯ БМН У РІЗНИХ		
МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ЛЮДИНИ		
		51
3.1	Білки магнітосомного острівця та їх функціональна класифікація.....	52
3.2	Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей БМН у магнітотаксисних бактерій і людини	54
3.2.1	Аналіз фенотипового прояву регуляції синтезу БМН у МТБ та людини	55
3.2.2	Аналіз функціональної класифікації статистично значимих вирівнювань білків магнітосомного острівця МТБ і людини	56
3.3	Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу БМН у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмів	60
3.3.1	Аналіз фенотипового прояву синтезу БМН в анаеробних мікроорганізмах.....	60

3.3.2 Аналіз функціональної класифікації статистично значимих вирівнювань білків магнітосомного острівця МТБ і анаеробних мікроорганізмів	62
3.4 Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей БМН у грибів.	74
3.4.1 Гриби, як продуценти БМН	74
3.4.2 Філогенетичний та біоінформаційний аналіз	75
Висновки до розділу 3	81
РОЗДІЛ 4. БАКТЕРІЇ З ПРИРОДНИМИ МАГНІТНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ЯК ВЕКТОРИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ.....	83
4.1 Визначення потенційних продуцентів БМН серед бактерій, які використовуються як вектори для доставки лікарських засобів.....	83
4.2 Класифікація мікроорганізмів - продуцентів БМН	90
4.2.1 Продуценти внутрішньоклітинного магнетиту кристалічної природи	90
4.2.2 Продуценти внутрішньоклітинних аморфних БМН	91
4.3 Філогенетичний аналіз	94
Висновки до розділу 4	96
РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК СИЛИ МАГНІТОДИПОЛЬНОЇ ВЗАЄМОДІЇ МІЖ БМН В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ТА ШТУЧНИМИ МАГНІТОКЕРОВАНИМИ НОСІЯМИ.....	97
5.1 Взаємодія наночастинок магнетиту та магніточутливих наноструктур з магнітними наночастинками пухлинних клітин	98
5.2 Використання магнітоліпосом для доставки лікарської форми.....	99
5.3 Використання бактеріальних векторів для доставки лікарської форми ..	100
5.4 Розрахунок сили магнітодипольної взаємодії, що виникає між БМН в пухлинних клітинах та штучними магнітокерованими носіями.....	101
5.5 Сила, що виникає між наночастинками та біооб'єктом	107
Висновки до розділу 5	109
6 ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ МАГНІТОМІЧЕНОГО БІОСОРБЕНТУ ПРИ МГДП У ЗОВНІШНІХ ЕЛЕКТРИЧНОМУ І МАГНІТНОМУ ПОЛЯХ...	111

6.1	Виготовлення магнітоміченого біосорбенту при його модифікації у зовнішніх електричному і магнітному полях.....	111
6.2	Визначення оптимального часу перемішування сорбенту	115
6.3	Дослідження сорбційної здатності магнітоміченого біосорбенту залежно від рН та величини електричного поля.....	123
6.4	Дослідження сорбційної ємності магнітоміченого біосорбенту залежно від співвідношення маси магнітних наночастинок до маси біосорбенту	125
6.5	Визначення магнітної сприйнятливості біосорбенту на основі дріжджів <i>S.cerevisiae</i> , отриманого при механічному перемішуванні та при МГДП в схрещеному електричному та магнітному полях	126
6.6	Дослідження сорбційної ємності магнітоміченого біосорбенту отриманого при механічному та магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещених магнітному та електричному полях.	128
6.7	Визначення активної та пасивної сорбції дріжджів, магнітної рідини та ММБС, отриманого при МГДП в схрещених магнітному та електричному полях	131
	Висновки до розділу 6	134
	ВИСНОВКИ.....	136
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	138

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ

БМН – біогенні магнітні наночастинки

МТБ – магнітотаксисні бактерії

МО – магнітосомний острівець

МГДП – магнітогідродинамічне переміщення

ММБС – магнітомічений біосорбент

ВСТУП

Актуальність теми. В останні десятиліття зростає інтерес до мікроорганізмів з природними феримагнітними властивостями. Тому на даний момент є актуальною задача вивчення їх властивостей та розробка нових методів магнітного мічення, через різноманітне технологічне та медичне застосування, включаючи магнетизм в живих організмах.

Мікроорганізми, які володіють феримагнітними властивостями можуть використовуватися як:

- Вектори для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та біологічно активних речовин.
- Біосорбенти, виготовлені на основі різноманітних мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей) для вилучення з водних розчинів іонів важких металів, барвників тощо, яким при використанні в сучасних біотехнологіях водоочистки штучно надаються магнітні властивості [1], що обмежує їх ефективне використання [2].
- Продуценти для отримання магнітних наночастинок з визначеними магнітними та морфологічними параметрами. Біогенні магнітні наночастинок (БМН) у низці організмів демонструють унікальні властивості і функції (монодисперсність; мультидоменність, однодоменність або суперпарамагнітні властивості, генетично запрограмовані розмір та форму і т.п.) [3].

Вивчення природних магнітних властивостей мікроорганізмів, що містять БМН, а також розробка нових технологій створення синтетичних аналогів БМН *in vitro*, з використанням білків біомінералізації, дозволить отримати магнітні наночастинок з контрольованими параметрами, що є надзвичайно важливою задачею для багатьох технологій: *медицини* – для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів [4], для магнітної сепарації та очищення біологічних середовищ [5]; *наноелектроніки* – для створення нових пристроїв обробки та зберігання інформації та ін.

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

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біоінформатики:

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

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

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

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

- Провести теоретичний аналіз та виявити мікроорганізми з природним магнітоміченням серед патогенних, умовно-патогенних, бактеріальних симбіонтів людини та грибів із застосуванням методів порівняльної геноміки.

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

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

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

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

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

- Методами порівняльної геноміки визначено потенційні продуценти БМН у сукупностях патогенних, умовно-патогенних мікроорганізмів,

бактеріальних симбіонтів людини та грибів, що дозволило підтвердити єдиний механізм біомінералізації БМН для представників трьох надцарств живих організмів.

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

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

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

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

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

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

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

Дослідження сорбційної здатності магнітоміченого біосорбенту було проведено спільно з начальником лабораторії хіміко-аналітичного контролю Ковальовим О.В. на базі комунального підприємства «Управління житлово-комунального господарства» м. Славутич.

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

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації доповідались та обговорювались на: VI Всеукраїнській науково-практичній конференції

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

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

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

РОЗДІЛ 1 МЕТОДИ МАГНІТНОГО МІЧЕННЯ БІООб'ЄКТІВ

1.1 Біогенні магнітні наночастинки в живих організмах

До складу живих організмів (бактерії, дріжджі, гриби та ін.), входять сполуки, що відносяться до різних магнітних класів: діа-, пара-, феро-, антиферо- та феромагнетиків (феритів). Мікроорганізми з біогенними магнітними наночастинками володіють феримагнітними властивостями, які залежать від кількості, розміру, структури (формування ланцюжків або кластерів) БМН. Прийнято розрізняти парамагнітні та діамагнітні види мікроорганізмів [6, 7].

Встановлено єдиний механізм біомінералізації БМН для представників усіх царств живих організмів (рис.1.1) – бактерій [8, 9, 10, 11], архей [12], еукаріот [13], заснований на генах, які походять від спільного предка на зорі еволюції, ще до появи багатоклітинних організмів [14, 15], тому він належить до ключових механізмів, що становлять основу функціонування всього живого.

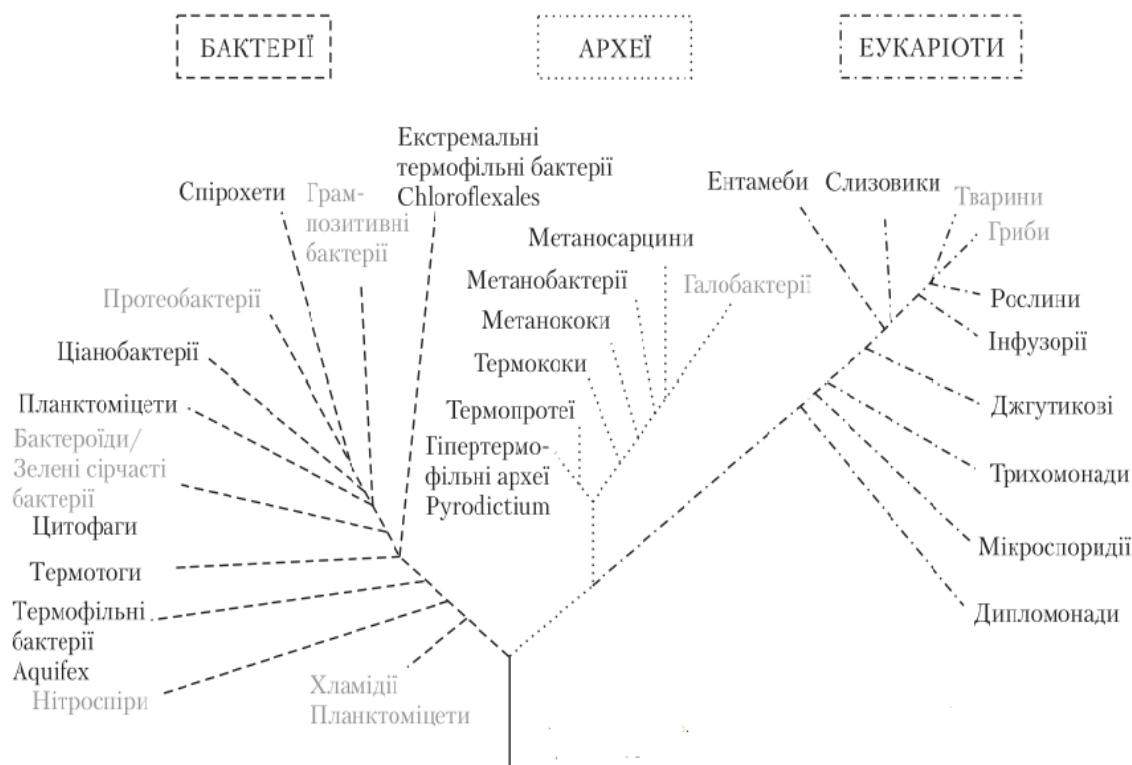


Рисунок 1.1 – Біомінералізація біогенних магнітних наночастинок у представників різних філогенетичних груп у всіх царствах живих організмів

БМН виявлено у залишках організмів, що датуються, починаючи з Прекамбійської ери, біомінералізація БМН поширена починаючи з протист (*Protista*) – гетерогенної групи найпростіших живих організмів, які складаються з однієї клітини, і до молюсків, тварин, хордових і ще у багатьох групах тварин. У мікроорганізмів і риб, формуються ланцюги кристалів БМН, які спрямовуються уздовж цитоплазматичної мембрани клітини.

Більшість філогенетичних груп тварин, які належать до надцарства багатоклітинних еукаріотичних організмів, здатні до біомінералізації БМН [16, 17], зокрема гриби [18], комахи [19], черв'яки [20], молюски [21], риби [13], птахи [22], ссавці [23, 24].

1.1.1 Біогенні магнітні наночастинки у магнітотаксисних бактерій (МТБ)

У 1975 році в складі деяких прокариот [11, 25] було виявлено БМН у вигляді кристалів, що складаються з ланцюжків окремих гранул, кожна з яких вкрита оболонкою - магнітосою. Магнітосома – це внутрішня органела клітини, яка містить необхідний набір білків для синтезу нанорозмірних магнітних кристалів. Кількість гранул і їх розмір - від 10 до 40 нм [26], та від 35 до 120 нм [27]) залежить від виду бактерій та контролюються на генетичному рівні [27, 28]. Кожен кристал магнетиту (рис. 1.1) має гексагональну або кубооктаедричну форму, в межах магнітосоми оточений подвійним ліпідним шаром (фосфоліпідною везикулою) [26]. БМН з'єднані в довгі ланцюжки (рис. 1.2), які містять від десятків до сотень частинок [9, 10, 11, 29] і міцно прикріплені до мембрани клітини [11, 30].

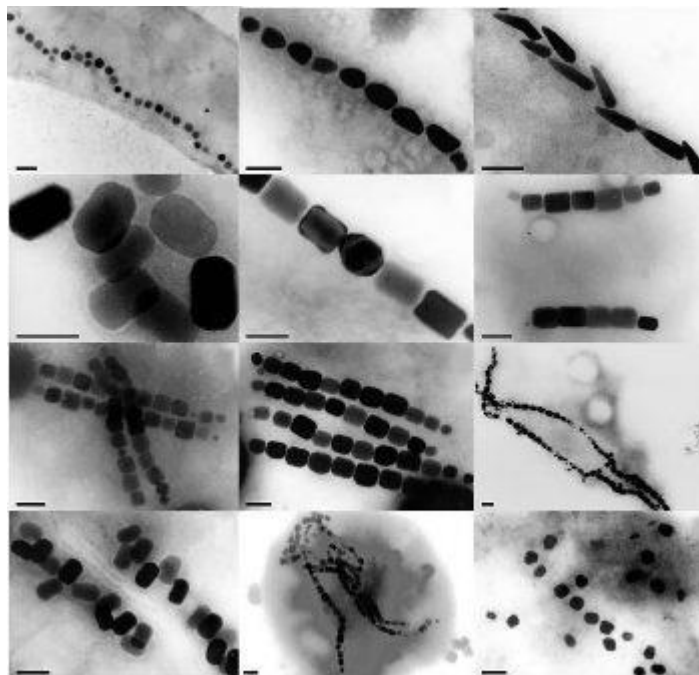


Рисунок 1.2 – Електронне зображення магнітосом [28]

Кристали характеризуються морфологічним та складовим різноманіттям, що залежить від генетичного контролю. Механізм синтезу магнітосом включає в себе декілька процесів: формування везикули, накопичення заліза та кристалізація оксиду заліза (Fe_3O_4) [28].

Додатково, ці везикули містять унікальний набір трансмембранних та регуляторних білків, які контролюють біомінералізацію кристалів магнетиту. Це передбачає, що для формування магнітосоми, бактерія має бути в змозі сформувати спочатку везикулу та мати відповідний набір білків до цих везикул, а потім управляти їх числом і положенням в межах клітини [28].

Кристаличні БМН формуються в процесі біомінералізації та представлені у вигляді магеміту, грейгіту та ін. [8, 31]. З точки зору магнітних властивостей БМН існують в двох формах: без залишкової намагніченості (антиферомагнітні БМН і феритові БМН в суперпарамагнітному стані (SP)) і з залишковою намагніченістю (феритові БМН в однодоменному (SD) і мультидоменному (MD) стані). Як правило феритові БМН характеризуються не лише дуже чутливою відповіддю до прикладеного магнітного поля, а й є постійними мікро- та наномагнітами, оскільки вони мають залишкову намагніченість в широкому діапазоні температур і створюють поблизу себе неоднорідне

магнітне поле величиною приблизно на 4 порядки більше ніж магнітне поле Землі [32, 14]. Формування БМН у МТБ відбувається при мікроаеробних умовах оточуючого середовища (1 – 5% кисню) та при наявності заліза в середовищі.

Внутрішньоклітинні кристали БМН, що продукуються МТБ, показали деякі відмінні властивості [28, 11]:

- вузький діапазон розміру (тобто, однакові магнітні властивості та намагніченість);
- вузький діапазон форм (обмежене відношення ширини до довжини (W/L));
- хімічна чистота;
- незначні кристалографічні дефекти;
- усічена шести- або восьмигранна морфологія;
- формування ланцюга з кристалів у межах клітини.

Поширена гіпотеза, що біологічна функція БМН це магнітонавігація – здатність клітин МТБ та інших бактерій, які синтезують БМН, орієнтуватися уздовж силових ліній магнітного поля Землі завдяки ендогенним наночастинкам.

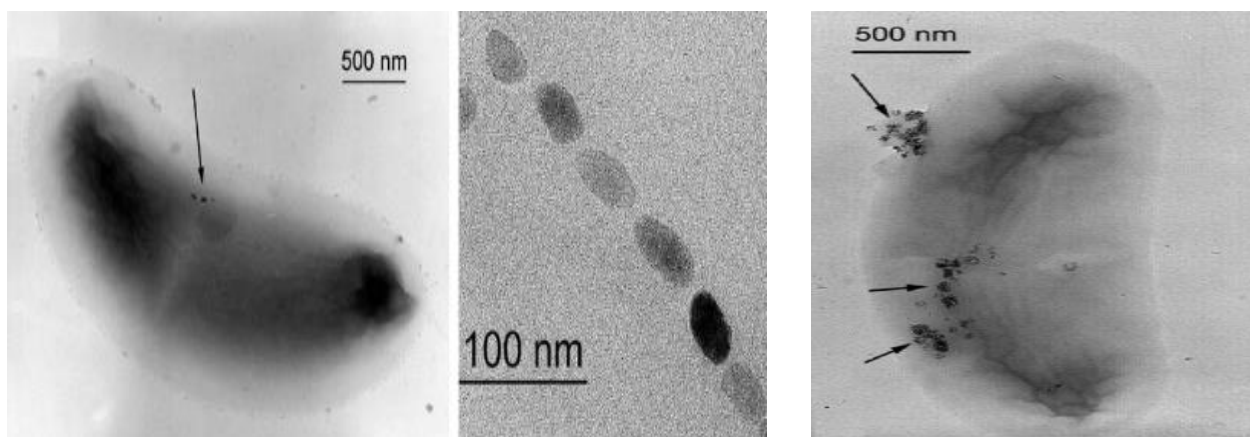
Після того, як БМН було виявлено в багатоклітинних організмах, ідею про магнітотаксис, як основну їх функцію було трансформовано в ідею про важливу роль БМН у магніторецепції (відчутті організмами магнітних полів, у тому числі магнітного поля Землі). Ідею магніторецепції глибоко вивчали і продовжують вивчати, але експериментальні дослідження показали, що підтвердження знайдено не було, навіть у перелітних птахів БМН не пов'язані з орієнтацією у геомагнітному полі [22].

1.1.2 Біогенні магнітні наночастинки у немагнітотаксисних мікроорганізмів

Поряд з МТБ здатність до біомінералізації БМН виявлено у низки мікроорганізмів. Вони не належать до МТБ, оскільки не орієнтуються в

магнітному полі Землі. Серед них залізоредукуючі, сульфатредуючі, денітрифікуючі бактерії, зелені і пурпурні фотосинтетичні бактерії, симбіотичні і патогенні форми мікроорганізмів, а також представники царства Архей [12, 33]. Фізико-хімічні властивості БМН таких бактерій можуть відрізнятися від властивостей БМН в МТБ, адже в останніх формування БМН відбувається як у клітині, так і на поверхні клітинної стінки, а структура БМН може бути як кристалічною (у вигляді магнетиту, грейгиту, гоетиту, лепідокрокіту, феригідриту), так і аморфною [12].

Явище біомінералізації добре вивчене в бактерій, що є факультативними анаеробами (*Desulfovibrio magneticus*) [34, 35]. Останні мікроорганізми є сульфат-редуючими, тобто мають сульфатний тип дихання, та здатні продукувати внутрішньоклітинні кристали БМН (рис. 1.3 а) та гематит на поверхні клітини (рис. 1.3 б). Внутрішньоклітинні БМН мають розмір близько 30 нм.



А)

Б)

Рисунок 1.3 – А) БМН у клітинах *Desulfovibrio magneticus*; Б) частинки гематиту на поверхні клітини

На сьогоднішній день знайдено й інші мікроорганізми продуценти БМН (табл. 1.1). Серед них присутні пробіотичні мікроорганізми, умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми та археї [Vainshtein M., Biology of the Cell. 2002]

Таблиця 1.1. Перелік штамів мікроорганізмів та архей, які містять магнітну фазу в своєму складі [12]

Бактеріальні штами	<i>Штами архей</i>
<i>Bacillus cereus VKM B-504 T</i>	<i>Haloarcula vallismortis VKM B-1791 T</i>
<i>B.thuringiensis VKM B-439</i>	<i>Halococcus morrhuae VKM B-1772</i>
<i>Caulobacter maris VKM B-1510 T</i>	<i>H.salifodinae VKM B-2108 T</i>
<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii VKM B-1525 T</i>	<i>Halococcus sp. strain DeLim</i>
<i>Escherichia coli VKM B-126</i>	<i>Haloferax mediteranei VKM B-1748 T</i>
<i>Lactobacillus plantarum VKM B-2209</i>	<i>H. volcanii VKM B-1768 T</i>
<i>Lactococcus lactis VKM B-978</i>	<i>Halorubrum sodomense VKM B-1771 T</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa VKM B-552</i>	
<i>P. aeruginosa VKM B-588 T</i>	
<i>Rhodopseudomonas palustris VKM B-1620 T</i>	
<i>R. rutilis ATCC 17001 T</i>	
<i>Rhodopseudomonas sp. strain Elf</i>	
<i>Staphylococcus sp. strain MA</i>	

Проведені в роботі [12] дослідження показали, що виявлені в клітинах мікроорганізмів структури мають вигляд ланцюжків розташованих паралельно довгої осі клітини з розміром від 10 до 150 нм. В клітинах фотосинтезуючих бактерій, гаулробактерій, стафілококах, кисломолочних паличок та галофільних архей магнітні структури зазвичай мають сферичну або яйцеподібну форму (рис. 1.4). Дослідження проведені методом електронної мікроскопії виявили, що БМН складаються з зон різних за прозорістю для електронного пучка.

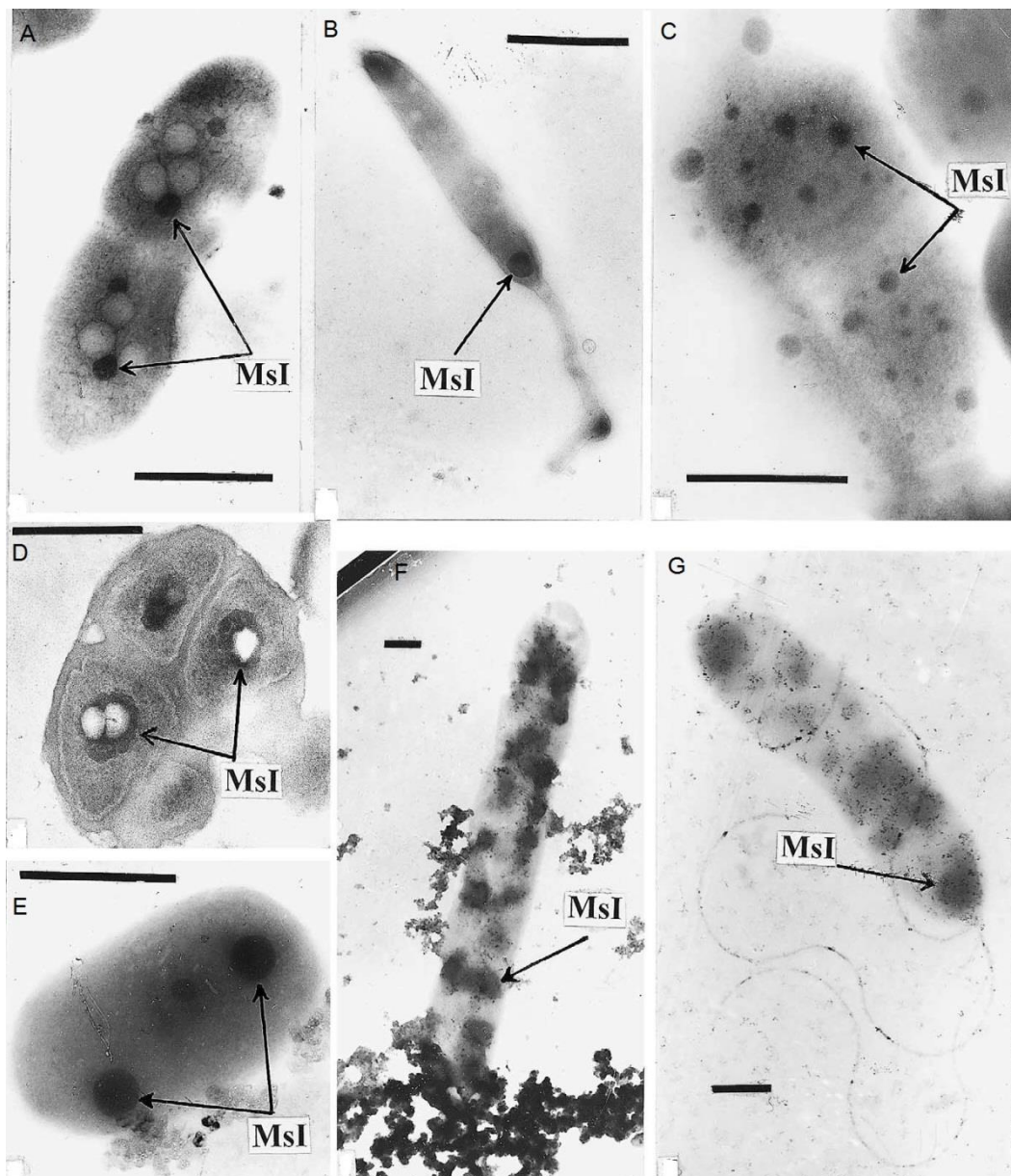


Рисунок 1.4 – Електронні мікрофотографії [12]:

A) *Rhodospseudomonas palustris* VKM B-1620, B) *Caulobacter maris* VKM B-1510, C) *Staphylococcus sp.* strain MA, D) *Halococcus morrhuae* VKM B-1772 T, E) *Halorubrum sp.* strain DeLim, F) *Escherichia coli* VKM B-126, G) *Pseudomonas aeruginosa* VKM B-552. Ваг до 0.5 мкм

Дані структури суттєво відрізняються від БМН у МТБ наявністю лише однієї органічної оболонки (у МТБ наночастинки мають три оболонки – внутрішню (1,7 нм), зовнішню (2,2 нм) та мембрану клітинної стінки [36]).

В клітинах бацил БМН мають розмір близько 10 нм та розташовані під мембранною оболонкою клітини. Більш великі структури були знайдені на пізніх стадіях росту клітин або під час клітинного лізису [36].

В клітинах *Escherichia coli* VKM B-126 та *Pseudomonas aeruginosa* VKM B-552, B-558 виявлені БМН, які мають вигляд звичайних сфер розташованих вздовж довгої осі клітини при культивуванні на кров'яному агарі та мають неправильну форму і пов'язані з мембраною при культивуванні на синтетичному середовищі з додаванням хелатного заліза [12]. X-ray мікроаналіз виділених БМН показав, що вони не є повністю неорганічними, як класичні БМН в МТБ. Вони сформовані з певного матеріалу збагаченого залізом, також не знайдено домішок інших неорганічних елементів типових для БМН (фосфору, сірки) [12].

Магніточутливі системи молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* VKM B-978, *Lactobacillus plantarum* VKM B-2209 мають маленькі розміри різні форми та оболонки та розташовані в цитоплазмі по всьому периметру клітини [12].

Дослідження робіт [37, 38, 39] показали, що біогенні магнітні наночастинки можуть накопичуватись в мікроорганізмах в інших формах. Фе-окислюючі бактерії формують навколо клітини шар оксигідроксиду заліза [37, 39]. Дані роботи [40] показали, що бактерії виробляють позаклітинний матрикс, і саме в цьому матриксі осаджується оксид заліза. Хемогетеротрофні нітрат-редуючі бактерії накопичують аморфний $\text{Fe}(\text{OH})_3$ гідроксид заліза, утворений за межами зовнішньої оболонки клітини [41]. Представники γ -proteobacteria, β -proteobacterial (*Thiomonas* sp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*) здатні накопичувати тривалентне залізо на поверхні клітин [42]. Бактерії *Chlorobium ferrooxidans* та *Thiodictyon* sp. strain F4 здатні утворювати гетит зовнішньоклітинно (залізна руда α - FeOOH) і лепідокрокіт (мінеральний гідроксид заліза, γ - FeOOH) [43]. Зображення *P. ferrooxidans* SW2 показують, що спочатку утворюється низькокристалічна або аморфна Fe (III)-фаза.. Fe (III) мінерали осідають виключно позаклітинно на полімерних волокнах клітин, які

покриті Fe (III) концентрацією, яка зменшується з відстанню від клітини. Ці мінерали перетворюються з часом в кристалічні мінерали гетиту і лепідокрокіту.

За локалізацією і феримагнітними властивостями БМН можна умовно розділити на 4 групи [44, 45, 12, 43]:

Група 1 – включає мікроорганізми, у клітинах яких виявлено кристалічні внутрішньоклітинні БМН.

Група 2 - представлена мікроорганізмами, які утворюють позаклітинні кристалічні БМН.

Група 3 - містить мікроорганізми, які синтезують внутрішньоклітинні аморфні БМН.

Група 4 - включає мікроорганізми, які формують позаклітинні аморфні БМН.

1.1.2 Біогенні магнітні наночастинки у людини

Ендогенні БМН були знайдені в організмі людини в таких органах як серце, печінка, селезінка [46], мозок (рис. 1.4) [47], надниркові залози, решіткова кістка [48], легенях, у пухлинних тканинах [49], при нейродегенеративних захворюваннях [50], і в атеросклеротичних бляшках людини [51]. Підвищений рівень БМН супроводжує неврологічні та нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона [50], епілепсія та нейроферінопатія [52]. Крім того, підвищений рівень БМН спостерігається при канцерогенезі - молочна залоза, яєчники, яєчка, меланома, менінгіома, гліобластома, астроцитома, гліома [53], карцинома Ерліха [54, 55] і при метастазуванні пухлин [53].

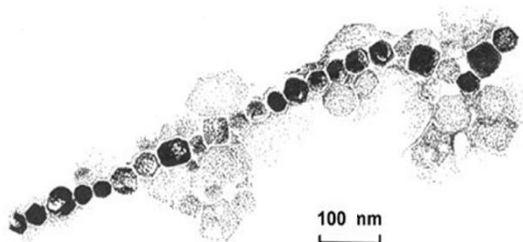


Рисунок 1.5 – Ендогенні магнітні наночастинки в мозку людини [47]

Зразки тканин мозку людини виділені з: кори головного мозку (рис. 1.5), мізочку, твердої і м'якої оболонки мозку (мембран, що оточують головний і спинний мозок) включають кристали магнетиту (магеміту). Було виявлено, що ці кристали організовані в лінійні мембранно-зв'язані ланцюги довжиною в декілька мікрометрів, до 80 кристалів в кожному ланцюзі [46, 47, 49].

Вимірювання за допомогою електронної мікроскопії показали наявність мінімум 5 мільйонів однодомених кристалів на грам більшості тканин мозку і більш ніж 100 мільйонів кристалів на грам м'якої й твердої оболонок мозку (рис. 1.6) [47, 49]. Данні про магнітні властивості показують, що кристали зібрані в кластери від 50 до 100 наночастинок [47, 49].

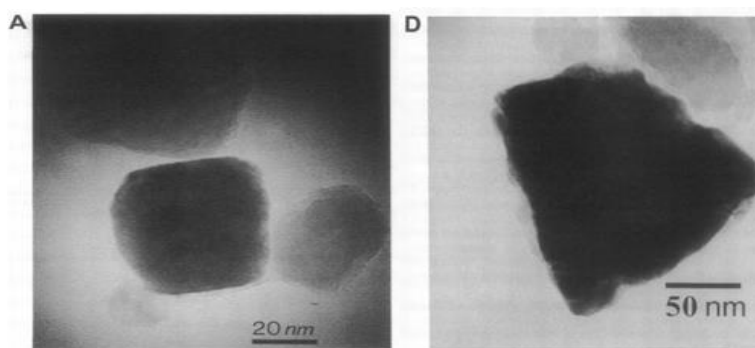


Рисунок 1.6 – TEM зображення зразків кристалів магнетиту і магеміту з мізочку людини. (A) - скупчення малих частинок (D) – одна з більших частинок магнетиту [47].

У переважній більшості організмів, зокрема й у людини, БМН з'єднані в довгі ланцюжки, які містять від десятків до сотень частинок і міцно прикріплені до мембрани клітини [9, 10, 11].

1.2 Методи штучного магнітомічення клітин

Методи магнітомічення клітин з використанням магнітних наночастинок [56, 57], попри численні переваги мають низку недоліків.

Вперше магнітне мічення клітин для їх маркування було використано на початку 90-х років минулого століття [58]. Спочатку були спроби маркувати

лейкоцити, лімфоцити та моноцити суперпарамагнітними частинками оксиду заліза. Стратегії підготовки магнітомічених клітин включали інкубацію з наночастинками оксиду заліза, що покриті декстраном [58, 59, 60, 61], інкубацію з ліпосом-інкапсульованими частинками оксиду заліза [62], і лектин-опосередковане поглинання [62]. Але при використанні цих методів поглинання наночастинок було не достатнім для їх виявлення [63], тому методи не застосовується для магнітного мічення.

На теперішній час розроблено низку методів для виявлення та цільової доставки магнітомічених клітин та мікроорганізмів. У більшості випадків для магнітного мічення клітин використовуються такі фізичні засоби:

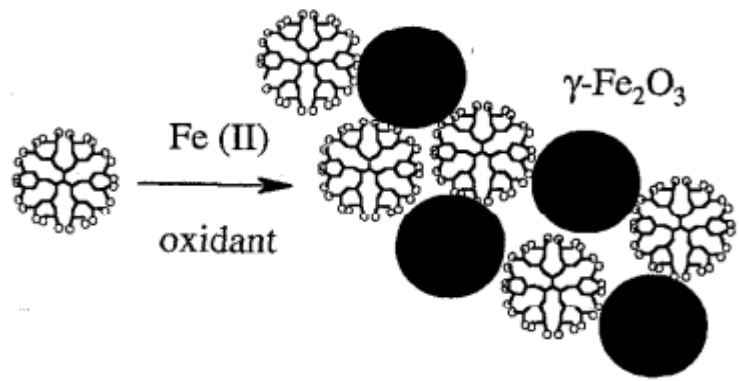
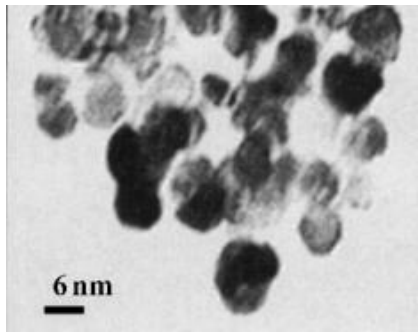
- магнітофекція (метод трансфекції, з використанням магнітного поля, поєднує в собі хімічні методи та електропорацію) [64]
- електропорація [65]
- сонопорація (метод дії ультразвуку на клітини, при якому відбувається відкриття пор клітинної мембрани) [66, 67]

Але використання цих методів значно підвищує вартість процесу магнітомічення, та має ряд недоліків.

1.2.1 Магнітне мічення клітин за допомогою дендримерів

Магнітний метод маркування заснований на використанні дендримерів в якості агентів трансфекції [68]. Дендримери – це заряджені полімери, які зв'язуються з клітинами неспецифічно і локалізуються на мембрані. Дендримери мають чітко визначену тривимірну структуру і використовуються для модифікації магнітних наночастинок заліза. Накопичення функціональних груп, досконалість симетрії, нанорозмір роблять їх придатними для застосування в генній терапії та терапії раку.

Найбільш ефективними мітками молекул - мішеней стовбурових клітин є магнітодендримери (magnetodendrimers), зокрема MD – 100 (рис. 1.7), що являють собою комплекси наночастинок оксиду заліза, приєднані до карбоксильованих дендримерів.

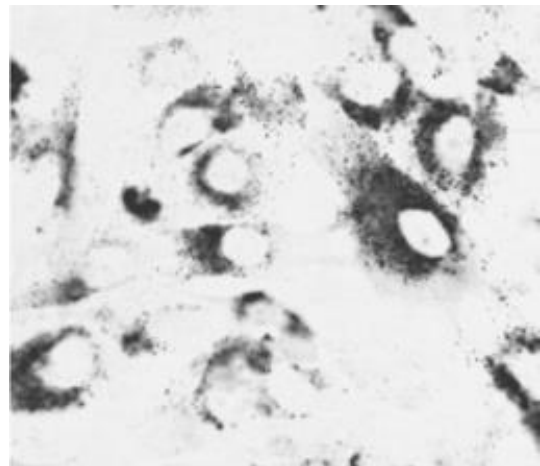
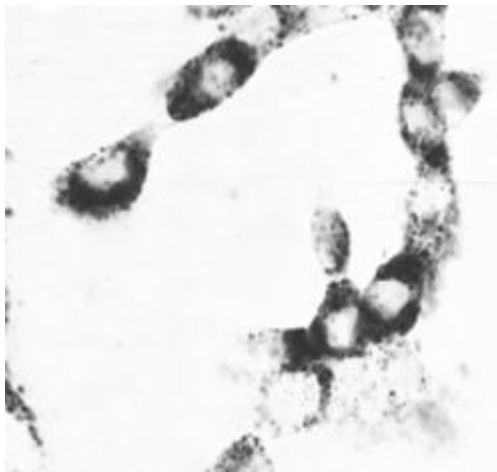


А)

Б)

Рисунок 1.7– А) ТЕМ-зображення магнітодендримеру (MD- 100);
 Б) Схематичне зображення стабілізації наночастинок маггеміту дендримером амідоаміну.

Відома здатність дендримерів забезпечувати надійну трансфекцію олігонуклеотиду в клітину шляхом ендоцитозу. Виявилось, що стовбурові клітини, взяті від миші, щура та людини, можуть порівняно просто бути позначені простим додаванням до середовища цих модифікованих магнітних наночастинок з концентрацією окису заліза 10-25 мг Fe / мл при інкубуванні 1-2 дні (рис. 1.8).



А)

Б)

Рисунок 1.8 – Магнітне мічення клітин за допомогою дендримеру (MD-100). А) Клітини 3Т3 фібробластів миші Б) Клітини раку шийки мати людини [69]

Отже магнітодендримери представляють новий клас контрастних агентів, які можуть використовуватися для ефективного магнітного мічення клітин стовбурових клітин [70].

1.2.2 Магнітне мічення клітин за допомогою ендоцитозу

Одним з найбільш швидких та простих способів інкубації клітин з магнітними наночастинками є ендоцитоз [57].

Ендоцитоз - основний механізм надходження в клітину наноліків і терапевтичних генів. Він може бути використаний також для спрямованої доставки наночастинок в клітини.

Магнітомічення клітин *in vitro* дає можливість контролювати взаємодію клітин з магнітними наночастинками. Спочатку наночастинки адсорбуються у вигляді кластерів на плазматичній мембрані (рис. 1.8), яка піддається інвагінації. Потім проводиться інкубація при 37°C, при якій магніто-навантажені бульбашки від'єднуються від мембрани, і зливаються з ендосомами і лізосомами в цитоплазмі клітини [57]. Таким чином наночастинки потрапляють всередину клітини шляхом ендоцитозу.

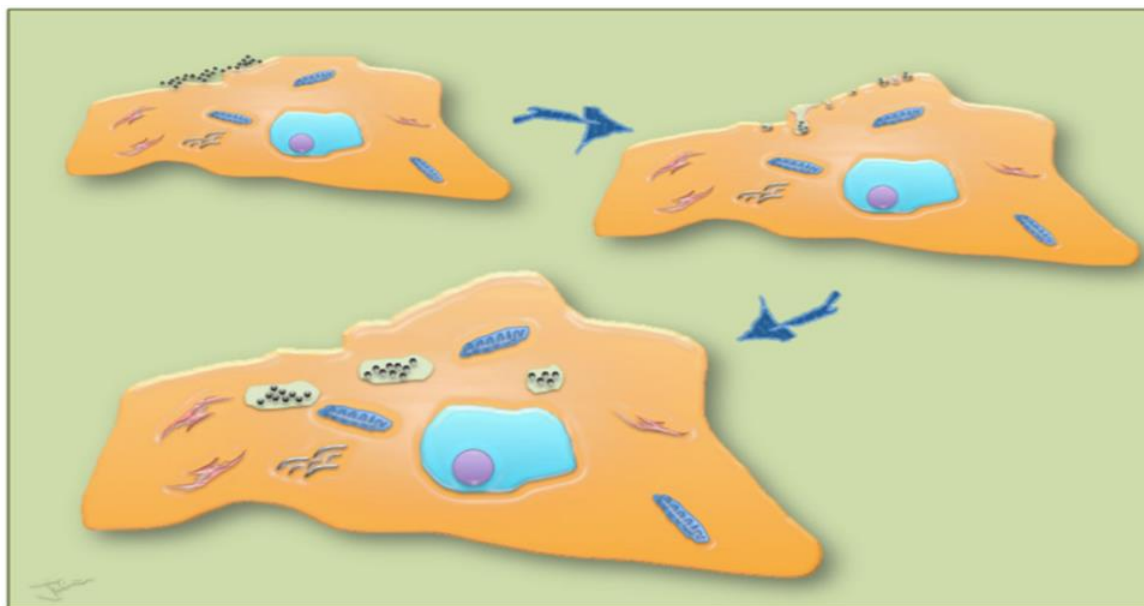


Рис. 1.9 – Схематичне зображення взаємодії клітини з магнітними наночастинками шляхом ендоцитозу [57].

При цьому магнітні наночастинки в ендосомах і лізосомах кластеризуються, між ендосомами відбувається диполь-дипольна взаємодія і ендосоми і лізосоми групуються у ланцюжки (кожна ендосома має значний магнітний момент $5 \times 10^{-15} \text{ Am}^2$) [57].

Практично всі типи клітин можна магнітомітити таким методом в швидкий спосіб [Pawelczyk E, 2006], в тому числі бактеріальні магнітокеровані вектори для цілеспрямованої доставки в пухлинні клітини [71]. В роботі [71] описано метод мічення анаеробних бактерій *Clostridium novyi-NT* (*C.novyi-NT*) магнітними наночастинками оксиду заліза. Виявлено, що кількість *C.novyi-NT* зростає в пухлинних тканинах, які характеризуються гіпоксією. Для магнітного мічення клітини *C.novyi-NT* суспендують з монодисперсними сферичними наночастинками оксиду заліза і інкубують при 37°C протягом 48 годин. Результат магнітомічення показано на рис. 1.9 [71]. Встановлено, що ефективність мічення становить 100% [71].

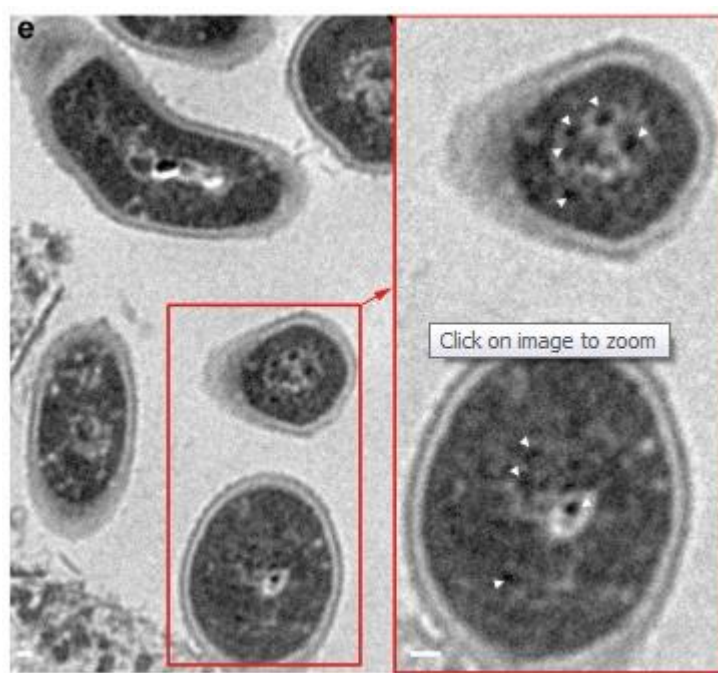


Рисунок 1.10 – TEM зображення мічення *C.novyi-NT* наночастинками оксиду заліза. Спостерігається велика кількість залізовмісних гранул (вказано білими стрілками) в клітині. Бар – 60 нм [71].

Цей метод маркування, що призводить до ендосомної інтерналізації частинок, дуже простий (без модифікації поверхні наночастинок, без додавання агента трансфекції), застосовується для різного типу клітин. Але кластеризація магнітних наночастинок та нерівномірність магнітомічення (рис. 1.11) є основним недоліком цього методу.

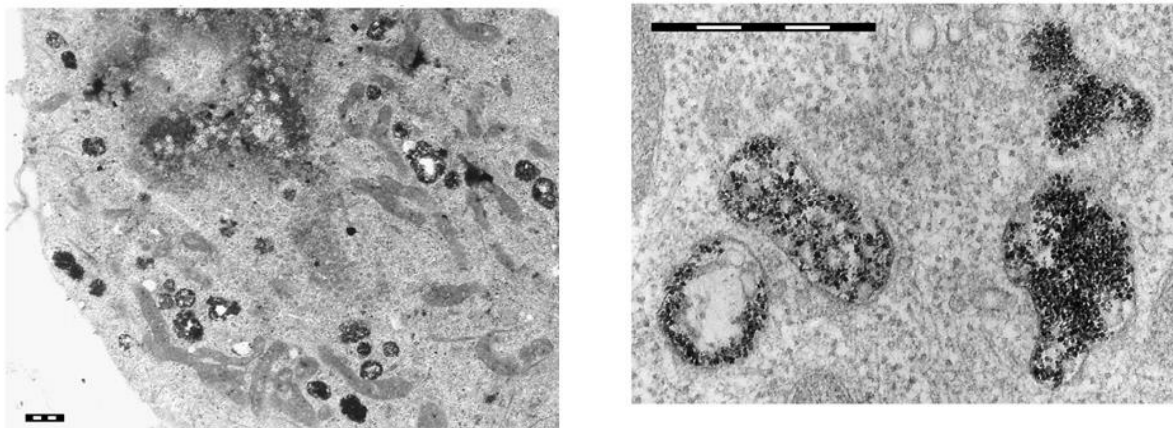


Рисунок 1.11 – Зображення трансмісійного електронного мікроскопу ендоцитозу магнітних наночастинок, інкубованих при 37°C. Бар - 1µм [56].

1.2.3 Магнітне мічення клітин за допомогою сонопорації

Сонопорація – це метод штучного переносу чужорідної ДНК (генів), лікарських препаратів у клітини за допомогою впливу на них ультразвуку, що викликає відкриття пор в клітинній мембрані, через які екзогенна ДНК та лікарський препарат проникають в клітини [72]. Сонопорація використовує акустичну кавітацію для підвищеної поставки молекул ДНК до клітини [73]. Відомо, що вібрація за допомогою ультразвукових хвиль може змінити структуру клітинної мембрани і підвищити її проникність [74].

Використання сонопорації при доставці лікарських препаратів та ДНК в уражені хворобою тканини дозволяє істотно підвищити ефективність лікування серцево-судинних і онкологічних захворювань [67].

Ефект сонопорації заснований на переміщенні необхідної дози ліків саме в уражені ділянки органів за допомогою мікропухирців, заповнених газом. Розмір мікропухирців - від 10 до 2000 мікрон - дозволяє переносити ліки (вони

можуть бути всередині такої частинки або прикріплені до її поверхні) самою кровоносною системою людини, і по капілярах судин проникати в уражені органи. Доставка ліків у складі магнітомічених мікропухирців до ураженого органу спостерігається в режимі реального часу за допомогою магнітно-резонансної томографії [66].

Один із способів реалізація методу сонопорації описано в роботі [66]. Клітини суспендують у фосфатному буфері (при щільності 5×10^6 кл/мл). Далі розливають клітини в трубки, куди додають магнітні наночастинки з концентрацією 22 мг/мл. При цьому використовують наступні параметри процесу: частота – 1-2 МГц; інтенсивність – $3 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$. Час інкубації становить від 1 до 10 хвилин (в залежності від частоти, та розміру установки).

Схема експериментальної установки наведена на (рис. 1.12). Вона являє собою генератор ультразвуку, який поміщають на дно пластикового контейнера, заповненого дегазованою водою. Після цього зразки інкубуються при температурі 37°C .

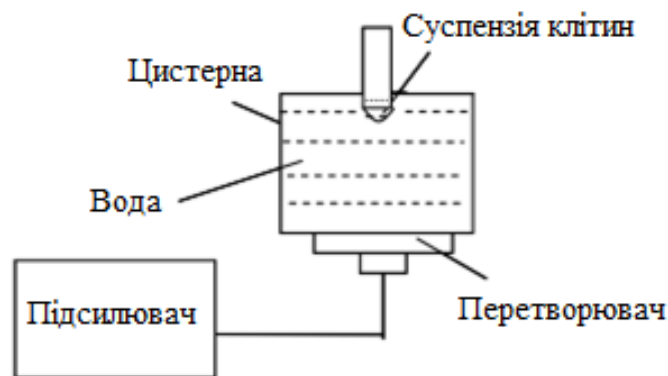
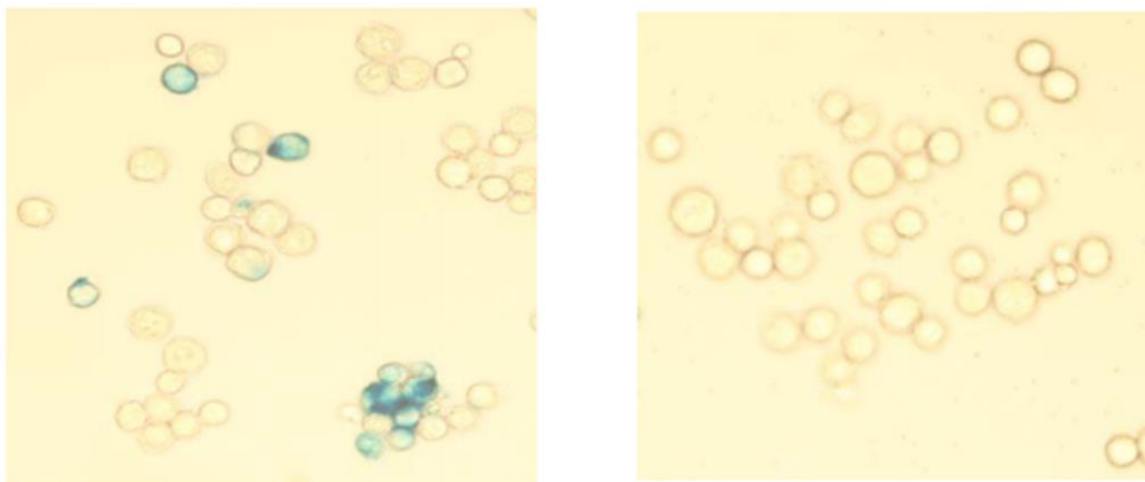


Рисунок 1.12 – Схема експериментальної установки для сонопорації [66].

Клітини, до яких приєдналися магнітні наночастинки в результаті використання методу сонопорації забарвлюються берлінською блакиттю (рис. 1.12) [66] для демонстрації поглинання парамагнітних частинок оксидів заліза.

Результати дослідження роботи [66] показали, що сонопорація є одним з найбільш швидких методів магнітомічення клітин (середня тривалість процесу становить близько 15 хвилин).



А)

Б)

Рисунок 1.12 – Маркування клітин методом сонопорації: а марковні (забарвлені клітини), б - контроль Збільшення – х40 [66].

Проте, ряд питань, таких як оптимальна концентрація магнітних наночастинок, їх кластеризація, умови впливу ультразвуку на клітини, концентрація наночастинок та нерівномірне магнітомічення клітин, складність безпосереднього спостереження та ін. , залишаються невирішеними і потребують дослідження в майбутньому [74]

1.2.4 Магнітофекція

Магнітофекція – це простий і достатньо ефективний спосіб трансфекції, який використовує магнітні поля, для доставки магнітних наночастинок в клітини-мішені [75]. Цей метод об'єднує біохімічні і фізичні (електропорацію, ген пістолет (gene gun)) методи трансфекції [75].

Принцип магнітофекції полягає у зв'язуванні нуклеїнових кислот з позитивно зарядженими в середовищі магнітними наночастинок: ці молекулярні комплекси потім концентруються і транспортуються в клітини, під дією зовнішнього градієнтного магнітного поля, що створюється постійними магнітами або електромагнітами розміщеними під культурою клітин [76].

Магнітофекція була адаптована для всіх типів нуклеїнових кислот (ДНК, іРНК, мРНК) [75]. При цьому в магнітному полі збільшується швидкість седиментації комплексу частинки/ ДНК. (рис 1.13). На рис 1.13 F_{mag} – це вектор магнітної сили, що діє на наночастинки [76].

При магнітофекції магнітні наночастинки потрапляють в клітини через 10-15 хвилин, градієнт магнітного поля при цьому становить 40 Т/м. Після цього клітини інкубують при 37°C протягом 24 год [76].

Використання магнітних мікрочастинок для трансфекції було вперше продемонстровано в роботі [77] у мишей за допомогою аденоасоційованого вірусу зв'язаного з магнітними мікросферами за допомогою гепарину.

In vivo магнітні поля не тільки підвищують трансфекцію, але також забезпечують цільову доставку терапевтичного гену до конкретного органу. Як правило, магнітні наночастинки, що несуть терапевтичний ген, вводять внутрішньовенно і сильні високоградієнтні зовнішні магнітні поля використовуються для концентрації цих наночастинок в органі-мішені, коли вони проходять через кровотік.

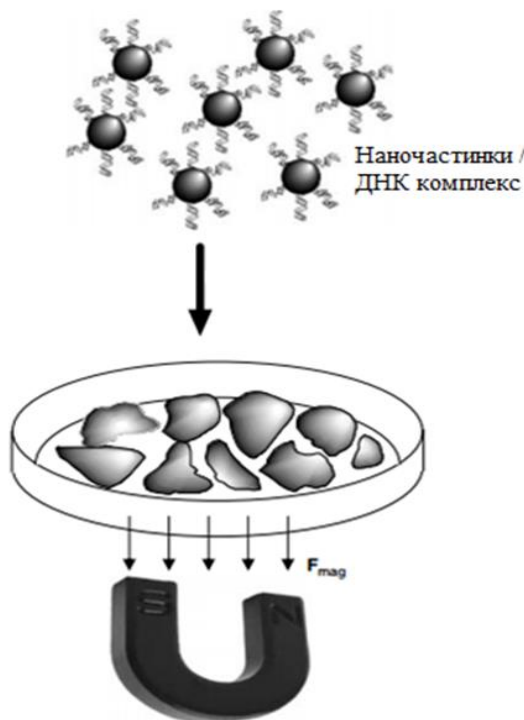


Рисунок 1.13 – Схематичне зображення комплексу магнітні наночастинки-ДНК *in vitro* при використанні методу магнітофекції [76].

Однак даний метод має недоліки, які полягають в низькій концентрації комплексів магнітні наночастинки-ДНК в цільовому органі мішені.

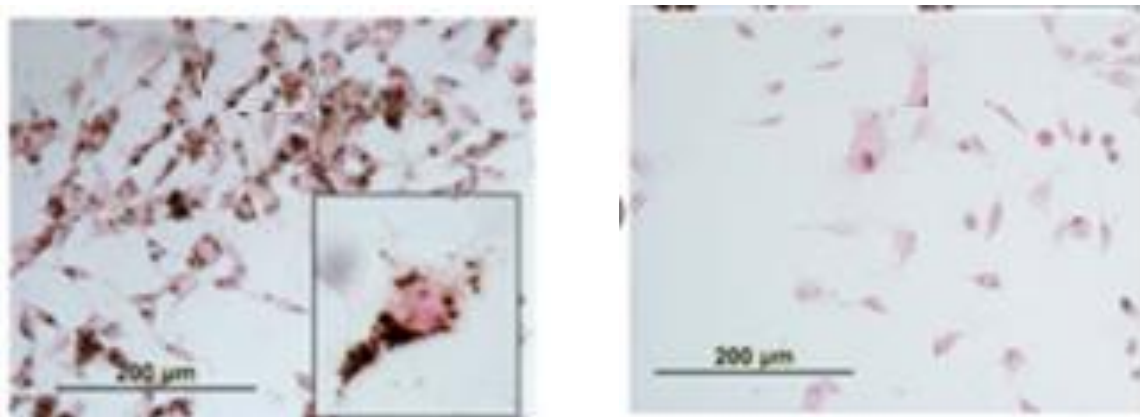
1.2.5 Електропорація

Електропорація – метод створення пор в бішарових ліпідних мембранах під дією електричного пульсу. Цей метод використовується в біотехнології для доставки макромолекул (ДНК чи РНК) в клітини ссавців, бактерій або рослин [78].

Електропорація широко використовується для цілеспрямованої доставки ДНК у клітини. В роботах [79, 80] продемонстровано процес магнітного мічення ДНК-плазмиди, лейкоцитів, моноцитів суперпарамагнітними наночастинками оксиду заліза, під впливом сильних магнітних полів, та доставку магнітоміченої плазмиди у клітину за допомогою електропорації.

Метод електропорації проводять в кюветі при наступних параметрах: напруга – 100 – 130 В; число імпульсів - 5; тривалість імпульсу – 5 - 20 мілісекунд. Після цього клітини поміщають в лід на 5 хвилин і промивають в фосфатному буфері.

За допомогою магнітоелектропорації відбувається мічення гемопоетичних клітин, лімфоцитів і ембріональних стовбурових клітини (рис. 1.14).



А)

Б)

Рисунок 1.14 – А) Магнітомічення стовбурових клітин мишей методом електропорації, Б) Контроль [80].

Багато зусиль було спрямовано для розробки відповідних процедур для ефективного внутрішньоклітинного магнітного маркування непатогенних клітин (макрофагів і деяких гемопоетичних клітин, що легко захоплюють немодифіковані частинки оксиду заліза). Також широко використовують комерційно доступні полікатіонні агенти трансфекції, включаючи ліпофектамін, полі-L-лізин, протамін сульфат, які дозволяють неспецифічне внутрішньоклітинне мічення оксидом заліза.

Однак даний метод має недоліки, які пов'язані з використанням сильних магнітних полів, високій кластеризації магнітних наночастинок та нерівномірного магнітомічення.

1.3 Методи мігнітного мічення біосорбентів

На сьогоднішній день однією з основних проблем довкілля є перевищення кількості важких металів, радіонуклідів, а також їх сполук у ґрунтах, стоках промислових підприємств, природних водоймах [81, 82].

За останні роки у зв'язку з різким збільшенням забруднення довкілля важкими металами та радіонуклідами, на перший план виходить пошук нових конкурентноспроможних технологій очистки робочих середовищ. Однією з таких технологій є біосорбція – фізико-хімічна взаємодія, яка відбувається між іонами металів та клітинними компонентами біологічних видів. В останні роки процес біосорбції став економічною та екологічною альтернативою технології очистки питної води і промислових стічних вод [83].

Особливий інтерес в якості біосорбенту представляють дріжджі. Аналіз даних літератури показав [84], що біомасу дріжджів можна успішно використовувати для сорбції іонів таких металів, як Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Zn, Sr [85].

Значне поширення одержали біологічні методи вилучення іонів важких металів, що ґрунтуються на властивостях мікроорганізмів акумулювати або сорбувати іони важких металів [86]. Серед перспективних біосорбентів, що застосовуються для видалення важких металів, які були досліджені в минулому

десятилітті, дріжджам *Saccharomyces cerevisiae* приділяється підвищена увага [87].

Дріжджам надаються магнітні властивості шляхом приєднання магнітних наночастинок (магнітних наноміток) для забезпечення можливості видалення такого сорбенту в швидкісному режимі за допомогою магнітної сепарації [Dauer R. Biotechnol Bioeng. – 1991].

1.3.1 Перемішування

Одним із важливих чинників інтенсифікації процесу сорбції іонів важких металів мікроорганізмами є перемішування. До найуживаніших способів перемішування відносять механічне, пневматичне, циркуляційне, ультразвукове та інші [88, 89].

На даний момент досліджуються різноманітні методи перемішування нанорозмірних частинок магнетиту з клітинами дріжджів з метою отримання магнітоміченого сорбенту. Перемішування значно прискорює технологічні процеси, але потребує додаткових витрат енергії та дорогого обладнання, особливо складно організувати перемішування на мікрорівні, тобто таке перемішування, за якого є рухомими шари робочого розчину в безпосередній близькості до поверхні біосорбенту. Так, наприклад, ультразвукове перемішування, яке використовують при вилученні іонів металів із розчинів електролітичним методом, забезпечує перемішування на мікрорівні, але не забезпечує рівномірність перемішування у всьому об'ємі і має високу вартість [89].

Добре відомо [90, 91], що перемішування електролітів, як правило, призводить до прискорення або зміни перебігу хімічних і електрохімічних процесів, які в них відбуваються. З огляду на це, перемішування електролітів у електричному і магнітному полях стало базою для створення магнітогідродинамічного перемішування (МГДП) електролітів. Однак виявилось, що ефект складного (багатовихрового) МГДП електроліту навколо окремого електроду в магнітному полі спостерігається навіть без прикладення зовнішнього електричного поля [91]. Тому для перемішування рідин можна

використовувати спосіб, який базується на ефекті багатовихрового МГДП, що спостерігається у зовнішньому магнітному полі після введення в розчин феромагнітних елементів. Наявність магнітного поля приводить до переміщення водних розчинів у дифузійному шарі навколо феромагнітних елементів. Перемішування здійснюється не окремими елементами пристрою, а феромагнітними елементами, які одночасно на макрорівні здійснюють перемішування електроліту в околі своєї поверхні, а також є центрами зв'язування металів на своїй поверхні та центрами осадження дріжджів, що сорбували на своїй поверхні іони металів із водних розчинів.

В роботі [92] було показано, що:

- наночастинки магнетиту, що прикріплюється до дріжджових клітин при механічному перемішуванні, зменшують поверхню масообміну, але дають можливість вилучати дріжджі в швидкісному режимі з використанням високоградієнтних магнітних сепараторів;
- багатовихрове МГДП значно інтенсифікує процес біосорбції в порівнянні з механічним перемішуванням;
- при використанні багатовихрового МГДП сорбент є більш стабільним, практично відсутній процес десорбції.

Лабораторні дослідження сорбції іонів заліза магнітоміченими дріжджами також показали, що сорбційна здатність магнітоміченого біосорбенту, виготовленого за допомогою багатовихрового МГДП, не знижується порівняно з нативними дріжджами [93], так як переважна більшість магнітних наночастинок при отриманні магнітоміченого біосорбенту при багатовихровому МГДП [94] потрапляє в периплазматичний простір та не заповнює сайти зв'язування на поверхні біосорбенту. Але метод багатовихрового МГДП [95] є нетехнологічним, адже потребує частоті зміни високоградієнтних феромагнітних насадок в перемішуючому пристрої для надання магнітних властивостей біосорбенту.

Тому доцільно шукати нові методи магнітомічення біосорбентів, в тому числі на основі дріжджів *S. cerevisiae* та розробляти більш ефективні пристрої для магнітомічення біосорбентів.

1.3.2 Трансформація дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* методом електропорації

На сьогодні активно проводяться дослідження впливу полів різної природи на біологічні об'єкти. Показано, що електричні та магнітні поля можуть впливати на різні рівні організації живої матерії [96]. Великий науковий і практичний інтерес для біотехнології являють методи впливу магнітних та електричних полів на біологічні об'єкти. Одним із таких методів впливу електричного поля на проникність іонних каналів є електропорація.

Дослідження Рімана [97], Циммермана [98], Vienken [99], Неймана [100] та ін. сприяли розробці електропорації в якості простого і швидкого способу введення макромолекул, в тому числі білків [100], в клітини ссавців. Пізніше, спеціалізоване обладнання стало комерційно доступним, що призвело до застосування цього методу до багатьох типів клітин ссавців, бактерій, рослин і клітин дріжджів. Трансформація дріжджових клітин є складним процесом, адже клітина оточена клітинною стінкою, що складається в основному з мананів і глюканів [101]. Протоколи для ДНК трансформації дріжджових клітин завжди включають або ферментативне видалення клітинної стінки з глюкозою [102, 103] або хімічні види попередньої обробки, наприклад, поліетиленгліколем, хлоридом літію, або тіоловими сполуками, які підвищують проникненість клітинної стінки [103]. Автори роботи [104] розробили метод електропорації, що дозволяє швидко і ефективно провести трансформацію дріжджової клітини з чужорідною ДНК, без видалення та попередньої обробки клітинної стінки.

Прикладене електричне поле діє на мембрану дріжджової клітини, що призводить до утворення тимчасових пор. Генератор сигналу створює напруженість електричного поля в проміжку між електродами, достатню для

електропорації. Кожна клітина має власну критичну напруженість електричного поля для оптимальної електропорації. Це обумовлено розміром клітини, будовою мембрани та індивідуальними характеристиками самої клітинної стінки [105].

Оптимізація напруженості електричного поля є важливим кроком в розробці процедури трансформації клітин шляхом електропорації. Напруженість електричного поля має бути оптимальною, щоб створити пори в клітинній мембрані і уникнути надмірного руйнування клітинної стінки.

Для визначення впливу електропорації на проникність клітинних мембран використовують флюоресцентний барвник В - флуоресцентний барвник [104]. Встановлено, що пори в клітинній мембрані, утворені під дією оптимальної напруженості електричного поля від 2,0 до 2,25 кВ/см в ємності 25 мкФ, при тривалості електропорації від 6 до 7 хвилин, закриваються [104].

В роботі [106] також встановлено, що оптимальна електропорація суспензії дріжджів при 0,5 кВ/см до 12,5 кВ/см з ємністю від 10 до 50 мкФ.

Висновки до розділу 1

В огляді літератури показано, що біомінералізація БМН відбувається у більшості живих організмів. Природні штами мікроорганізмів (гриби, бактерії, мікроводорості), що здатні до біомінералізації БМН можна використовувати в якості магнітокерованих біосорбентів, в якості векторів для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів та біологічно активних речовин та ін.

Розглянуто методи штучного магнітомічення клітин та мікроорганізмів, при використанні яких відбувається висока кластеризація магнітних наночастинок та спостерігається нерівномірність магнітного мічення біооб'єктів.

В розділі показано, що як для магнітомічення біооб'єктів, які використовуються для доставки лікарських препаратів, так і для біооб'єктів, які використовуються в якості сорбентів, для вилучення іонів важких металів з розчинів, методи магнітного мічення та недоліки однакові.

Отже актуальними задачами подальших досліджень є дослідження і виявлення потенційних продуцентів БМН, що володіють природними феримагнітними властивостями, серед різних класів мікроорганізмів, в першу чергу для тих, що вже використовуються в якості носія для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів. Для мікроорганізмів, що не володіють природними феримагнітними властивостями, необхідно нові способи магнітного мічення, позбавлені вище перерахованих недоліків.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Метод біоінформатики для пошуку гомологів білків що порівнюються

В дисертаційній роботі здійснено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків МО МТБ з геномами людини, грибів, патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів та симбіонтів людини з метою знаходження потенційних продуцентів БМН, підтвердження єдиного механізму біомінералізації, визначення потенційних продуцентів БМН в мікроорганізмах, які використовуються в якості векторів лікарських препаратів та магнітних характеристик БМН в тканинах та органах людини. Для цього використовували програму «BLAST on-line» ресурсу Національного центру Біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm>). Були встановлені стандартні параметри BLAST для виявлення гомологів та стандартні для цієї програми методи оцінки статистичної значимості вирівнювань білкових послідовностей. Враховувалися тільки ті вирівнювання, для яких значення E числа менше 0,05 що вказує на можливість гомології і наявності спільних функцій цих білків в різних організмах.

Для знаходження довгих співпадинь білків досліджуваних організмів та білків магнітотаксисних бактерій, проводилось вирівнювання кожного білку з використанням команди Run BLAST за стандартних параметрів алгоритму (Algorithm parameters) вирівнювання для довгих послідовностей: розмір слова (Word size) дорівнює 3, матриця (Matrix) BLOSUM 62, (62% - співпадаючі ділянки) та порогове значення E числа (Expect threshold) дорівнює 10.

В Run BLAST використовується pBLAST, для порівняння білкових послідовностей. У вікні Database обирається тип бази даних (БД), в відбувається пошук білків, що анотуються – (Reference proteins). Це дозволяє виключити з результату невідомі білки та білки з мало вивченими або

невідомими функціями, тобто гіпотетичні (hipotetical protein) та залишити білки з відомими функціями. У вікні Organism вписується той організм, з яким проводиться порівняння.

Для порівняння обиралися білки представника одного з видів магнітотаксисних бактерій - *Magnetospirillum gryphiswaldense*.

Результати вирівнювання довгих співпадінь (біля 100 а.к.) представлені у таблицях, де наведено гомологи білків магнітосомного острівця досліджуваних організмів та їх функції, а також значення характеристичних параметрів вирівнювання для кожного білку - E -числа та I , що необхідні для того, щоб виявити на скільки порівнювані послідовності ідентичні та зробити висновок щодо ступеню їх гомології.

Для параметру I використовуються так звані «правила великого пальця», що виражаються у відсотках ідентичності залишків в оптимальному вирівнюванні [107]

- Якщо два білки мають більш, ніж 45% ідентичних залишків в їх оптимальному вирівнюванні, то білки будуть мати дуже схожі структури та з великою ймовірністю мають однакові функції.

- Якщо в них є більше 25% ідентичних залишків, то, ймовірно, вони мають споріднений фолдинг. З іншого боку, зниження ступеня спорідненості послідовностей не виключає гомології.

- Області з 18-25% послідовностей визначають як «twilight zone» («сумнівна зона»), в якій допускається гомологія, але це необхідно ще перевіряти.

- Нижче цієї зони розташована область, в якій мало ймовірна гомологія білків. Проте, відсутність значущих послідовностей не виключає структурної спорідненості білків.

«E-value» – очікуване число послідовностей, які можна випадково знайти в базі даних з заданим об'ємом бази даних. E залежить від значення P та розміру досліджень у базі даних.

- Якщо E-число має значення $\leq 10^{-10}$, то можна стверджувати, що послідовності повністю гомологічні.
- Якщо в межах від 10^{-10} – 0,05 – гомологія не може бути виключена.
- $\geq 0,05$ – співпадіння випадкове.

Також проведено порівняння відомих функцій білків МО МТБ та вирівняних з ними білками досліджуваних організмів. Для такого порівняння використовувалась інформація про білки, яка міститься в базі даних NCBI за посиланням <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>.

2.2 Характеристика досліджуваних біологічних об'єктів та використаних реактивів

В процесі роботи було досліджено біологічний об'єкт -магнітомічений біосорбент на основі хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, отриманий різними методами перемішування, що буде описано нижче. *Saccharomyces cerevisiae* – один з видів дріжджів, має клітини овальної форми, 5 – 10 мкм в діаметрі. Дріжджі відтворюються за допомогою брунькування. *S.cerevisiae* відноситься до роду *Saccharomyces*, родини *Saccharomycetaceae*, порядку *Saccharomycetales*, класу *Saccharomycetes*, підтип *Saccharomycotina*, тип Аскоміцети (*Ascomycota*), підцарство Вищі гриби (*Dikarya*), царство Гриби (*Fungi*), домен Еукаріоти (*Eukaryota*).

Для дослідження були використані пресовані хлібопекарські дріжджі Львівського хлібокомбінату компанії «Ензим»

В роботі використано такі реактиви: кристалогідрат FeSO_4 , кристалогідрат FeCl_3 , розчин NH_4OH , розчин HClO_4 , розчин HNO_3 , розчин NaOH , кристалогідрат CuSO_4 дистильована вода.

2.3 Метод виготовлення наномагнетиту в магнітному полі

Для приготування магнітної рідини використовували метод співосадження солей заліза II та III валентного концентрованим розчином аміаку [Дудченко Н. О. Мінералогічний журнал. – 2011].



Для цього згідно методу [Дудченко Н. О. Мінералогічний журнал. – 2011] 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 воді (25 см³), при цьому розчин $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ підігрівали у полум'ї горілки для кращого розчинення. В колбу місткістю 80 см³ додавали 15 см³ (25%-го) розчину аміаку та поміщали у зазор між магнітами. Напруженість поля 2000 Е. В розчин аміаку тонкою цівкою при постійному перемішуванні вливали суміш солей. Суміш тримали в постійному магнітному полі протягом 15 хв при постійному перемішуванні. В результаті даної реакції утворюється осад чорного кольору (Fe_3O_4).

Осад відділяли за допомогою постійного магніта, та промивали дистильованою водою для зниження рН колоїдного розчину магнетиту до 7. Після промивання до осаду додавали 25 см³ 2 М розчину перхлорної кислоти (HClO_4) та механічно перемішували протягом 50 хв, після чого виділяли осад за допомогою постійного магніту. Осад заливали 50 см³ води при постійному перемішуванні протягом 30 хв.

2.4 Отримання магнітоміченого біосорбенту на основі дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* при механічному перемішуванні

Для приготування магнітоміченого біосорбенту зважували 4 г. дріжджів *S. cerevisiae* на електронних вагах точністю $\pm 0,01$ г, висипали в хімічний стакан, доводили до 100 см³ та додавали 0,67 мл магнітної рідини і перемішували за допомогою механічної мішалки (частота обертів мішалки – 180 об/хв, тривалість – 10 хв) для отримання однорідної системи. Таким чином отримували суспензію дріжджів з концентрацією 100 мг/дм³.

2.5 Отримання магнітоміченого біосорбенту на основі *Saccharomyces cerevisiae* при магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещених електричному і магнітному полях.

Розроблено експериментальну установку [108] для модифікації біосорбенту у зовнішніх електричному і магнітному полях (рис. 2.1). Установка складається з комірки (1) з електродами (2, 3), джерела живлення постійного струму (4), універсального вимірювального приладу (5), перемикача полярності електродів (6) і магнітної системи (7).

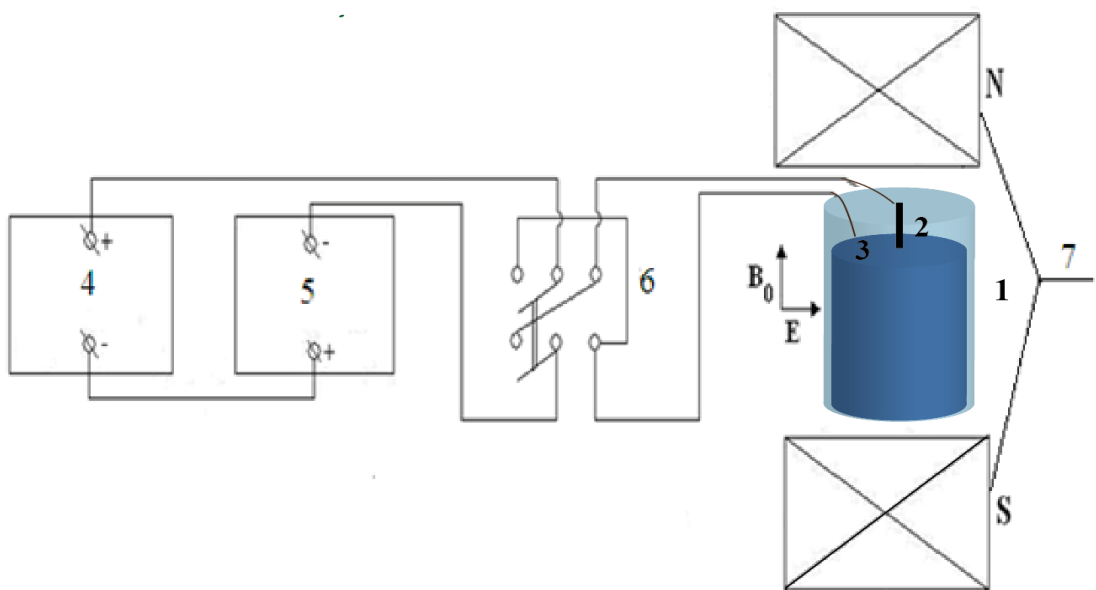


Рис. 2.1 – Схема експериментальної установки для отримання ММБС при МГДП у зовнішніх електричному і магнітному полях.

Комірка являє собою скляний циліндр, діаметром 65 мм. В якості матеріалів для електродів була обрана низьковуглецева феромагнітна сталь. Один з електродів має вигляд полого циліндру зі сталевієї пластини товщиною $h = 0,3$ мм. Другий виготовлено зі сталевих стрижня діаметром 3 мм. Довжина циліндру і стрижня становила 36 мм. Електроди закріплювались в комірці таким чином, що стрижень знаходиться всередині полого циліндру. Обрана форма електродів і спосіб кріплення при прикладенні зовнішніх електричного поля напруженості E і магнітного поля напруженістю H_0 у

взаємно перпендикулярних напрямках забезпечували обертальний рух електроліту у комірці.

Електрохімічну комірку (1) з встановленими електродами (2, 3) вносили у повітряний простір електромагніту ЕМ-3, який дозволяє створювати напруженість постійного магнітного поля H_0 в діапазоні 0-0,3 Тл. Струм між електродами (2, 3) подавали за допомогою джерела живлення постійного струму Б5-47 (6). Вимірювання величини струму проводили універсальним вимірювальним приладом Ц434 (7). Перемикачем (5) здійснювали зміну полярності електродів (2, 3).

Швидкість потоку рідини можна змінювати в залежності від величини електричної напруги (інтервал зміни електричної напруги від 0 до 29,9 В) та величини зовнішнього магнітного поля (інтервал зміни напруженості зовнішнього магнітного поля від 0 до 0,3 Тл).

Електромагнітна система установки (рис. 2.2) призначена для створення однорідного магнітного поля в зазорі між його полюсними наконечниками 1. У даній установці застосовується малогабаритний електромагніт, що має литий магнітопровід 2. Полюсні наконечники 1 електромагніту в перерізі квадратної форми зі стороною 120 мм. Дві електромагнітні котушки 3 з'єднані паралельно таким чином, щоб магнітне поле, що створюється кожною з них, було спрямовано в одну сторону. Основа установки 4 має спеціальні пази для переміщення двох електромагнітних котушок 3 для встановлення потрібної ширини зазору між полюсними наконечниками 1 для зміни величини зовнішнього магнітного поля. Конструкція електромагніту дозволяє регулювати робочий зазор у діапазоні 10...150 мм. Для процесу спостереження створена система освітлення, що складається з електролампи 5 на 15 Вт і дзеркала 6. До установки кріпиться мікроскоп 10 на двох немагнітних металевих стрижнях 7. При нерухомо закріпленому мікроскопі процес фокусування відбувається за рахунок зміни довжини тубуса 8 або положення столика за допомогою спеціального механізму – крокового двигуна 9.

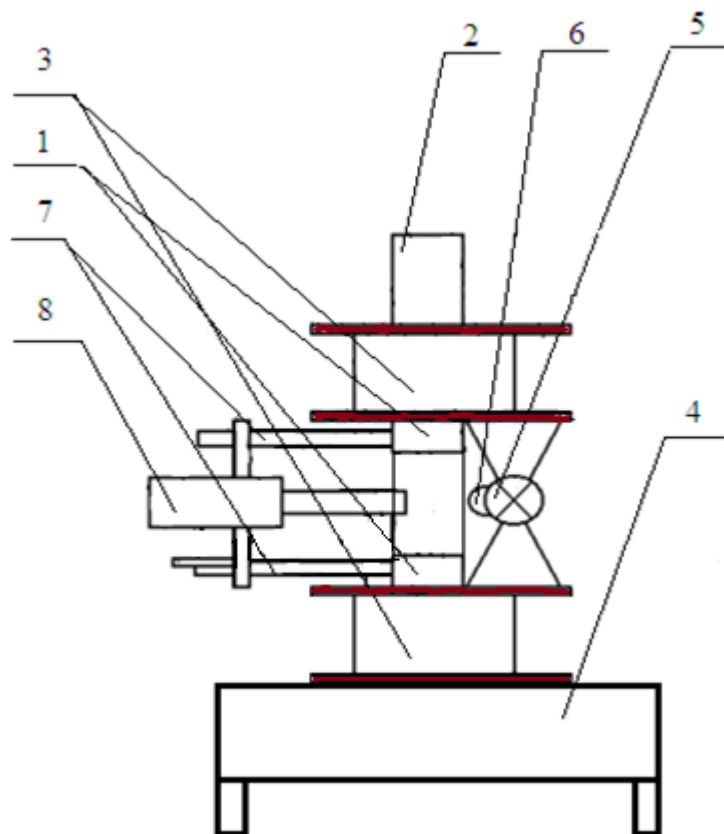


Рис. 2.2 – Схема електромагнітної системи

1 – полюсні наконечники; 2 – литий магнітопровід електромагніту; 3 – електромагнітні котушки; 4 – основа установки; 5 – електролампа; 6 – дзеркало; 7 – немагнітні металеві стрижні, 8 – відеокамера.

Для проведення процесу фракціонування магнітоміченого біосорбенту отриманого методом МГДП використовувався лабораторний зразок магнітного фракціонатора з високоградієнтними феромагнітними насадками (ВГФН) [109]. Тип ВГФН (сітка, сталеві стрижні, сітка з дендритами, стержні з дендритами) підбирається в залежності від параметрів магнітоміченого біосорбенту, параметрів очищеного середовища, величини зовнішнього магнітного поля [110, 111, 112]

Класифікацію магнітоміченого біосорбенту здійснювали через фракціонатор з використанням проточної системи.

2.5.1 Методика отримання ММБС при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях

Біосорбент отримували шляхом змішування дріжджової біомаси *S. cerevisiae* з концентрацією 8×10^9 кл/л з водним розчином необхідної кислотності (біосорбент готували при рН=2,5; 3; 4).

Біомасу дріжджів змішували з розчином нанорозмірного магнетиту так, щоб відношення маси біосорбенту до маси наночастинок магнетиту складало 100:1, при цьому концентрація дріжджових клітин дорівнювала 8×10^9 кл/л (100 мг сухих дріжджів на 1 л), а концентрація наночастинок магнетиту у вихідному розчині становила 1 мг/л. Водний розчин наномагнетиту (Fe_3O_4), стабілізований перхлорною кислотою, був одержаний за допомогою стандартної методу, описаного в підрозділі 2.3. Діапазон дисперсності отриманих наночастинок становить від 1 до 22 нм (рис. 2.3).

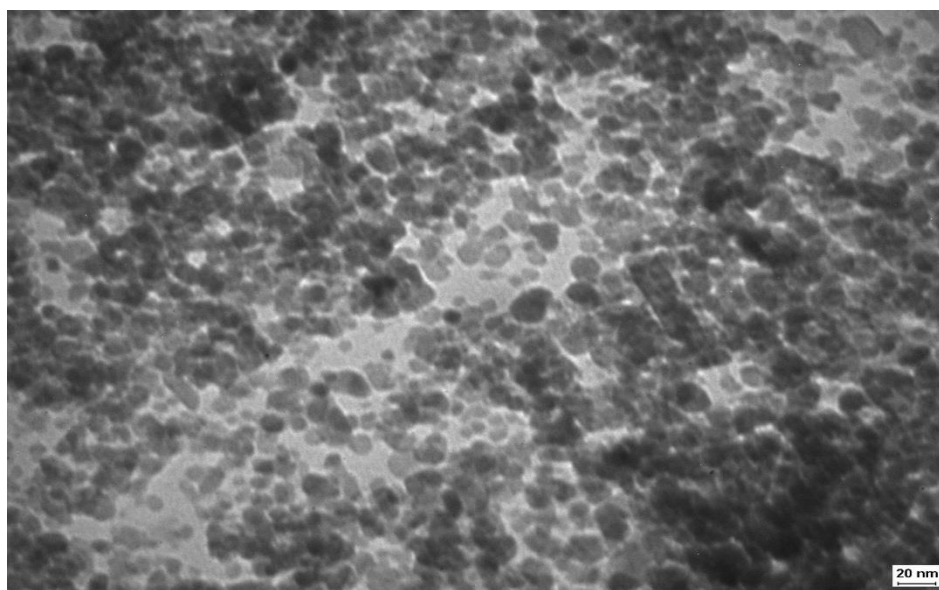


Рис. 2.3 – Зображення магнітних наночастинок, отримане на трансмісійному електронному мікроскопі, отриманих в МП напруженістю 240 кА/м

З метою оптимізації сорбційної ємності біосорбенту до іонів Cu^{2+} досліджували параметри, за яких сорбційна здатність отриманого біосорбенту при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях була б

максимальною. Для цього проводили дослідження залежності концентрації іонів міді від часу сорбції за різного рН розчину та величини електричного поля. Отримання ММБС проводили в зовнішньому магнітному полі, напруженістю 240 кА/м [113], так як подальше збільшення напруженості зовнішнього магнітного поля при багатовихровому МГДП практично не впливало на ступінь вилучення катіонів міді.

Досліджували сорбційну здатність ММБС, виготовленого при рН = 2,5; 3; 4, оскільки при таких значеннях рН було встановлено таку ж швидкість перемішування біомаси дріжджів з магнітною рідиною при отриманні ММБС, як і при багатовихровому МГДП [113].

На відміну від МГДП у схрещених зовнішніх електричному та магнітному полях багатовихрове МГДП характеризується тим, що електричний струм в робочому розчині (а відповідно і електричне поле) створюються спонтанно при перебігу електрохімічних реакцій на поверхні феромагнітних елементів (наприклад, сталевих стрижнів), як це було показано в роботі [114]. Але для обох видів МГДП: багатовихрового і в схрещених зовнішніх електричному і магнітному полях спостерігається збільшення швидкості робочого розчину при збільшенні напруженості зовнішнього магнітного поля. Дійсно, при збільшенні напруженості зовнішнього магнітного поля зростає сила Лоренца, яка діє на одиницю об'єму робочого розчину при протіканні у ньому електричного струму напрямку не колінеарного до напрямку прикладеного зовнішнього магнітного поля. Тобто обидва види МГДП мають однакову фізичну природу. Отже електричне поле було підібрано в діапазоні, при якому сила Лоренца має близьке значення до сили Лоренца при багатовихровому МГДП, що забезпечує таку ж швидкість перемішування, за допомогою даного методу, як і при багатовихровому МГДП.

Після процесу створення комплексів магнітних наноміток з дріжджовими клітинами, ММБС піддавався фракціонуванню [115]. В якості феромагнітних насадок для вилучення немагнітної фракції магнітним сепаратором використовувались сталеві нікельовані сітки з розміром комірок 0,5 мм [115].

2.6 Метод імітації біосорбції для дослідження стабільності магнітної сприйнятливості ММБС

Після отримання ММБС методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях перевіряли стабільність магнітної сприйнятливості для встановлення оптимального часу перемішування при отриманні ММБС. Для цього здійснювали процес механічного перемішування отриманого ММБС при параметрах системи, які відтворюють (імітують) процес біосорбції іонів важких металів без додавання іонів міді: рН=5,5; концентрація біомаси дріжджів – 4г/л; швидкість перемішування – 180 об/хв., максимальний час перемішування 50 хв [113]. Кожні 10 хвилин відбирали пробу та центрифугували (центрифуга ЦЛМН-Р10-01 «Елекон», частота обертання ротора – 1500 об/хв) протягом 10 хвилин. Магнетит, який був десорбований з поверхні ММБС в процесі перемішування (тобто в процесі імітації сорбції іонів міді [116]), залишався у надосадовій рідині, яку досліджували на магнітну сприйнятливість.

2.7 Метод вимірювання магнітної сприйнятливості

Магнітну сприйнятливість вимірювали на експериментальній установці для вимірювання магнітної сприйнятливості зразків, методом, що ґрунтується на використанні радіотехнічного резонансного методу дослідження магнітної сприйнятливості зразків.

Установка містить осцилограф, електронний частотомір обчислювальний, вимірювач добротності та *LC*-контур. *LC*-контур складається з конденсатора і соленоїда, виготовленого з мідного проводу. Всередину соленоїду вноситься циліндричний контейнер для зразка. Сигнал від генератора вимірювача добротності подається на *LC*-контур. За допомогою осцилографа здійснюється візуальне спостереження за сигналом. Частотоміром визначається величина резонансної частоти контуру. Визначення магнітної сприйнятливості проводили на частотах 12-20 МГц з похибкою, що не перевищує 0,2 %.

2.8 Метод проведення біосорбції для дослідження ефективності вилучення Cu^{2+} ММБС

Біосорбцію ММБС проводили при механічному перемішуванні розчину протягом 60 хвилин. Параметри системи описані вище. Початкова концентрація іонів Cu^{2+} – 50 мг/л. Кожні 10 хвилин відбирали пробу та пропускали через фільтрувальний папір (діаметр пор – 10 нм) для видалення магнітомічених дріжджових клітин.

2.9 Метод вимірювання сорбційної здатності ММБС методом спектрофотометрії

Визначення концентрації іонів міді проведено за допомогою спектрофотометра ULAB 102 (Китай). Розчин міді концентрацією до 100 мг/л представляє собою безбарвну рідину. Методика визначення присутності іонів Cu^{2+} в розчині основана на реакції цього металу з водним розчином аміаку: $\text{Cu}^{2+} + 4\text{NH}_3 = [\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, в результаті якої розчин отримує синій відтінок. Довжина хвилі, на якій проводились вимірювання оптичної густини, дорівнювала 590 нм.

2.10 Аналіз біологічних об'єктів за допомогою оптичної мікроскопії

Визначення ступеню кластеризації біосорбенту, виготовленого різними методами, що описані вище, проводилось за допомогою оптичного мікроскопу “MICKMED-5” зі збільшенням в 1000 разів. Готовий сорбент, концентрацією 0,4 г/л, капали на предметне скельце, висушували та спостерігали в окуляр.

2.11 Аналіз біологічних об'єктів за допомогою растрової електронної мікроскопії

Для визначення оптимального часу перемішування ММБС, виготовленого методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях, вивчалася морфологія поверхні біосорбенту на растровому електронному мікроскопі REM-100. Для приготування зразків отримана суспензія ММБС розводилась в

100 разів, та наносилась на попередньо приготоване – знежирене предметне скло, після чого необхідне висушування. Далі проводили напилення шаром алюмінію товщиною 40 нм, методом, що описаний нище.

На растровому електронному мікроскопі досліджувані зразки в умовах вакууму скануються сфокусованим електронним пучком середніх енергій. Зображення будується синхронно з розвертанням зонду на зразку таким чином, що кожному положенню пучка на поверхні зразку відповідає точка (піксель) на моніторі мікроскопу.

2.12 Процес отримання алюмінієвого покриття та підготовка зразків для растрової електронної мікроскопії

Процес отримання алюмінієвого покриття проводився в робочому об'ємі вакуумної установки ВУП-5М в якій вакуум створювався пароструменевим насосом з попередньою відкачкою механічним форвакуумним насосом. Робочий об'єм має поверхню, на якій розміщено струмоводи для нагрівання підкладок та електричних вимірювань. На відстані 70-80 мм від випаровувача розміщується підкладкотримач. Блоки живлення забезпечують як функціонування установки, так і режими відпалювання, напилення, вимірювання параметрів процесів в робочому об'ємі при залишковому тиску газів $\sim 10^{-3}$ Па.

Отримання зразків здійснювалося за допомогою термічного випаровування при температурі підкладки (T_p) в 300 К.

При вимірюванні електричного опору використовувався універсальний мультиметр, і показання знімались за двохточковою схемою з точністю $\pm 0,01$ Ом.

В якості датчиків товщини використовувались кварцові пластини РГ-08 з резонансною частотою 10 МГц, які були введені в схему генератора. Частота вихідного сигналу вимірювалась приладом ЧЗ-54. Частотомір ЧЗ-54 фіксував зміну частоти коливань, що дозволяло контролювати товщину плівки з точністю до 10%. Товщина алюмінієвого покриття становила біля 40 нм.

2.13 Аналіз біологічних об'єктів за допомогою феромагнітного резонансу

Феромагнітний резонанс (ФМР) – це один із видів магнітного резонансу, який є універсальним методом вивчення властивостей магнітних матеріалів. ФМР дає структурну та динамічну інформацію про протікаючі фізичні процеси, не впливаючи на самі ці процеси. Основні характеристики ФМР – резонансна частота, резонансне магнітне поле, форма і ширина ліній поглинання – визначаються колективною багатоелектронною природою феромагнетику. Експериментальне дослідження ФМР полягає у поглинанні електромагнітної енергії магнетиком, який розміщений у зовнішньому постійному магнітному полі, за виконання умов резонансу. Явище резонансу зумовлене переходами між різними енергетичними рівнями, які відповідають станам магнітних моментів електронів. Спіни електронів у магнітовпорядкованих речовинах зв'язані сильною обмінною взаємодією, яка зумовлює когерентність взаємодії магнітних моментів окремих атомів з магнітним полем. Така когерентність дає підстави розглядати цей вид магнітного резонансу як результат взаємодії вектора намагніченості M з високочастотним електромагнітним полем.

Експериментальне дослідження ФМР було проведено на спектрометрі ELEXIS E500 EPR (Bruker BioSpin GmbH, Germany). Зразок поміщується у резонатор, який розміщено між двома магнітами. Резонатор представляє собою металеву ємкість, яка підсилює сигнали від зразка. До складу спектрометра також входить консоль, яка містить електронну систему обробки сигналу і комп'ютер для спостереження за роботою усіх блоків спектрометра при реєстрації спектра та для аналізу даних.

РОЗДІЛ 3. ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМУВАННЯ БМН У РІЗНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ЛЮДИНИ

В розділі 1 показано, що на сьогоднішній день здатність до біомінералізації БМН експериментально виявлено у представників всіх трьох надцарств живих організмів. Відомо, що БМН мають унікальну природну властивість – як природний магніт створюють в своєму оточенні магнітні поля, на 3-4 порядки більші, ніж магнітне поле Землі [14, 32]. Маючи такі природні магнітні властивості, мікроорганізми можуть використовуватися в якості векторів для доставки лікарських препаратів, як біосорбенти для вилучення йонів важких металів, без додаткового їх магнітомічення.

Крім того, як було зазначено вище, в нормі і при патологіях існує природне магнітомічення клітин в організмі людини, тому необхідно при виборі магнітомічених векторів (як штучного так і природного походження) враховувати сили магнітної взаємодії між магнітними наночастинками мікроорганізмів з природними феримагнітними властивостями, та БМН в клітинах як цільового органу, так і здорового органу людини. При цьому, взаємодія між магнітними наночастинками мікроорганізмів або магнітоміченими лікарськими формами буде максимальною, якщо магнітні наночастинки будуть розташовуватися на мембрані клітин та відноситися до магнетиту, який має найкращі магнітні властивості серед природніх БМН. В розділі 1 описано, що ланцюжки магнетиту в організмі людини, формуються на мембранах клітин, як в нормі і при патологіях, тому важливо провести класифікацію БМН у мікроорганізмів, потенційних векторів та продуцентів БМН та у мікроорганізмів та грибів – потенційних продуцентів БМН для штучного мічення магнітокерованих біосистем та клітин. Така класифікація дозволить виявити, ті мікроорганізми, які біомінералізують БМН у вигляді ланцюжків кристалічних БМН на мембрані клітини, що забезпечить максимальну силу диполь-дипольної взаємодії [117]

3.1 Білки магнітосомного острівця та їх функціональна класифікація

Можна виділити два функціональних класи білків МО МТБ: білки, без яких неможливий процес біомінералізації магнетиту та регуляторні білки, які здійснюють генетичний контроль розмірів, форми та розміщення кристалів в МТБ.

До першого класу білків, без яких неможливий процес біомінералізації магнетиту відносяться білки *mamA*, *mamB*, *mamM*, *mamE*, *mamO*, *mamN*.

MamA є одним з найбільш вивчених та консервативних магнітосом-асоційованих білків. Він також відомий, як *Mms24* та *Mam22*. *MamA* важливий для магнітосомної активації, а, отже, для всього процесу біомінералізації. Властивості білку *MamA* передбачають, що функціональність індивідуальних магнітосомних везикул може бути відрегульована. Так, при видаленні білку *MamA* проникнення везикул не змінюється, але процес біомінералізації окису заліза не відбувається у МТБ [118]. Мутація *MamA* призводить до зміни клітинної локалізації білку під час фази росту у МТБ [118]. Інша гіпотеза полягає в тому, що *MamA* може використовуватись магнітотаксисними бактеріями для регулювання довжини магнітосомних ланцюгів у відповідь на присутність заліза або інших умов оточуючого середовища [119].

На сьогодні в численних даних літератури існує підтвердження можливої транспортної ролі білка *MamA*, а саме кількісними дослідженнями ступеня поглинання заліза з культурального середовища клітинами МТБ показано, що клітини з делецією гену *mamA* поглинали з середовища менше заліза, ніж клітини МТБ дикого типу [120]. Окрім того, з використанням методу флуоресцентних міток показано локалізацію білка *MamA* поблизу мембрани магнітосом, а також у складі клітинної мембрани МТБ.

MamB, *mamM* – функціональні білки, що беруть участь в біомінералізації та формуванні кристалів, транспортери катіонів Fe, Co, Zn, Cd [121].

MamE, *mamO* кодують серинові протеази, які потенційно залучені в Fe²⁺-залежне окислення.

Показано, що мутанти з відсутніми MamO та MamM білками в змозі формувати лише порожні ланцюги везикул і не можуть синтезувати магнетит внутрішньоклітинно в межах магнітосомних мембран. Тобто, це означає, що MamO та MamM потенційно важливі для біомінералізації та залучені до формування ядра магнетиту чи у формуванні середовища, сприятливого хімічного оточення для внутрішньоклітинного синтезу магнетиту в магнітосомах.

До регуляторного класу білків магнітосомного острівця відносяться наступні білки: MamQ, MamL, MamI, MamK, MamJ, MamD, MamF, MamC, MamG, MamY, MamX, MamZ, mamP, mamT, MamR та MamS [121]

Формування обмеженої мембраною структури відбувається при участі магнітосом-асоційованих білків MamQ та MamL. Локалізація MamI передбачає, що цей білок зв'язується з магнітосомами та може бути використаний як маркер присутності та розташування магнітосомних везикул.

MamK и MamJ залучені до формування лінійних ланцюгів магнітосом.

Гідрофобні MamD и MamF знайдені виключно в магнітосомній мембрані, вони залучені в регулювання розміру кристалу магнетиту [122].

Дослідження показали, що ні MamC, ні MamG, які разом складають приблизно 15 % усіх МАБ, не є суттєвими для біомінералізації магнетиту. З'ясувалось, що втрата найголовнішого серед них – MamC, мала незначний вплив на розміри зрілих кристалів. Навіть відсутність усіх чотирьох білків повністю не відміняло формування магнітосом [120].

MamY був нещодавно включений в біогенетику МТБ, MamX подібний до серинової протеази MamE, а MamZ подібний до суперродини пермеаз [123].

Видалення MamP, MamT, MamR та MamS по-різному впливає на процес біомінералізації в цілому. Так, при відсутності MamP мутант синтезує менше включень магнетиту (до чотирьох на одну клітину, тоді як у дикому типі – 15-25 кристалів), але які нагадують кристали дикого типу по формі. Крім того, як показано у роботі [121], MamP може грати роль в управлінні розмірами

кристалів. По експериментальним даним цієї ж роботи, фенотип mamT відповідає за формування кристалів магнетиту.

При відсутності mamR ніякого очевидного дефекту у магнітосомному ланцюгу не відбувається, клітини зберігають здатність формувати магнітосоми. Крім того, MamR грає роль в управлінні кількістю та розміром частинок, і не бере участі в контролі кристалічної морфології.

MamS грає роль в управлінні морфологією та розміром кристалів магнетиту. Однак, припускається, що MamS та MamT беруть участь на різних етапах синтезу кристалів магнетиту.

Отже, всі проведені спостереження та дослідження в області біомінералізації демонструють, що весь процес, починаючи від формування везикули до утворення магнітосомних ланцюгів знаходяться під суворим генетичним контролем у МТБ. При цьому кожен білок магнітосомного острівця має чітко визначені функції. Тому з огляду на функціональне призначення, білки МО можна розділити на два класи [124]: білки без яких не відбувається процес біомінералізації магнетиту та регуляторні білки, які задіяні в контролі форми, розмірів та структурної організації БМН в МТБ.

3.2 Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей БМН у магнітотаксисних бактерій і людини

У дисертаційній роботі здійснено порівняльний аналіз [125] амінокислотних послідовностей білків магнітосомного острівця (МО) МТБ з білками людини, враховуючи їх функціональну класифікацію: білки, без яких неможливий процес біомінералізації магнетиту та регуляторні білки. Паралельно з порівнянням генетичної інформації проведено порівняння наявних розмірних та структурних характеристик БМН магнітотаксисних бактерій та людини з метою виявлення взаємозв'язку між приналежністю знайдених статистично значимих співпадінь білкових послідовностей МТБ та людини до конкретного функціонального класу та їх фенотипових проявів.

3.2.1 Аналіз фенотипового прояву регуляції синтезу БМН у МТБ та людини

Як зазначалося вище, фенотиповий прояв генетичної регуляції синтезу БМН в МТБ має всі ознаки суворого генетичного контролю їх властивостей та структурної організації. Так, магнітосоми в бактеріях представляють собою десятки окремих БМН в складі ланцюжків [10, 11]. Також відомо, що ланцюжки БМН розташовані вздовж довгої осі бактерії. Кожна магнітна наночастинка покрита мембраною (так званою магнітосомною везикулою) [124, 126]. Також спостерігається чітко визначена форма та розміри зрілих БМН для кожного штаму МТБ, що також є проявом експресії регуляторних генів магнітосомного острівця [124, 126]. Кількість БМН також є чітко визначеною за нормальних (мікроаеробних) умов культивування МТБ і її зміна під впливом зовнішніх факторів (зовнішнє магнітне поле, зміна концентрації кисню або заліза) корелює з відповідною зміною експресії генів магнітосомного острівця [126].

В тканинах людини, як зазначалося у вступі даного розділу, БМН організовані в лінійні, пов'язані з мембраною ланцюжки, кілька мікрометрів у довжину, до 80 кристалів у ланцюжку (рис. 3.1) [47].

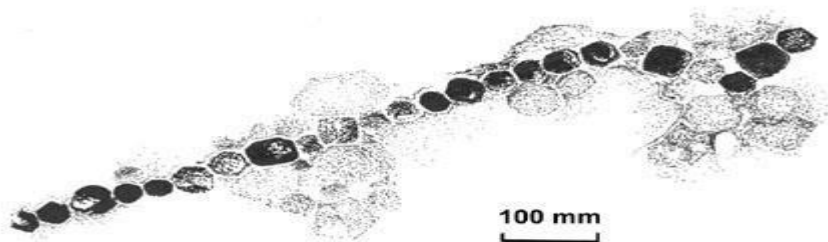


Рисунок 3.1 – Ланцюжок кристалів БМН в тканинах мозку людини [47]

При цьому фенотиповий прояв БМН у людини відрізняється за низкою ознак від МТБ. Тобто, на відміну від МТБ, у людини спостерігається широкий діапазон розмірів і відповідно всі фази росту БМН, внаслідок цього в тканинах людини присутня як суперпарамагнітна, так і однодоменна фази [49]. БМН у людини з'єднано в кластери у ланцюжку достатньо неправильної форми, останні розташовані в вигляді довгих ланцюжків [49]. Відповідно до

вищезазначеного у фенотиповому прояві БМН у людини не спостерігається регуляції його форми, розмірів та інших властивостей. Кількість БМН також варіюється в широкому діапазоні в нормальних тканинах людини, наприклад, від 5 до 100 мільйонів нанорозмірних кристалів на грам тканин м'якої і твердої мозкової оболонки [49].

Тому навіть, якщо існує генетична регуляція біомінералізації магнетиту у людини, то найбільш ймовірно відсутній клас регуляторних білків і відповідно немає суворого генетичного контролю щодо розмірних та структурних характеристик БМН.

3.2.2 Аналіз функціональної класифікації статистично значимих вирівнювань білків магнітосомного острівця МТБ і людини

Здійснено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків МО МТБ і людини з точки зору вищезазначеної функціональної класифікації знайдених гомологів.

В таблиці 3.1 проаналізовано значимі вирівнювання між білками МО бактерії *M. gryphiswaldense* і людини. Видно, що значимі вирівнювання знайдені в основному серед білків першого функціонального класу, без яких не можливий процес біомінералізації магнетиту в МТБ (табл. 3.1). В обведеної жирними лініями рамці знаходяться білки МО МТБ, без яких не відбувається біомінералізація магнетиту, та їх гомологи у людини.

Таблиця 3.1 Таблиця статистично значимих вирівнювань між білками МО бактерії *M. gryphiswaldense* і людини

Назва білку МО МТБ	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	Mam N	MamK
Блок-гомолог людини	PEX5- білки	ZnT-9 ZnT10	ZnT-9 ZnT-4	HtrA1 HtrA2	HtrA1 HtrA2 HtrA3 HtrA4	перме -аза P	Actin- related protein ACTR- 2

<i>E</i> -число вирівнювання	$1 \cdot 10^{-09}$	$2 \cdot 10^{-18}$	$1 \cdot 10^{-09}$	$3 \cdot 10^{-10}$	$4 \cdot 10^{-30}$	$6 \cdot 10^{-20}$	$1 \cdot 10^{-07}$
ВІАЗ у вирівнюванні	26%	24%	24%	26%	42%	33%	21%

За результатами таблиці 3.1 можна сказати, що всі білки генів магнітосомного острівця, без яких не можлива біомінералізація Fe_3O_4 , а саме MamA, MamB, MamM, MamO, MamE, MamN мають високий ступінь гомології з білками людини, що характеризується спільним фолдингом за значенням *E*-числа відповідних вирівнювань [107]. Проте, згідно значення відсотку ідентичних амінокислотних залишків, для білків MamB та MamM можливо лише припущення гомології існування подібних функцій для відповідних білків людини, адже відсоток ідентичності цих білків з білками людини потрапляє в так звану «сумнівну зону» [107].

Аналіз гомологів регуляторних білків (які регулюють форму, розмір та кількість частинок Fe_3O_4 , а також регулюють утворення ланцюга та магнітосомних везикул) показав, що із 17 регуляторних білків MO (таких як MamQ, MamI, MamL, MamJ, MamK, MamF, MamD, MamT, MamP, MamR та MamS) лише один білок MamK може бути гіпотетичним гомологом з білками людини.

Для підтвердження гомології білків MamA, MamB, MamM, MamO, MamE, MamN з відповідними білками людини здійснено порівняння відомих функцій білків магнітосомного острівця та вирівняних з ними білків людини. Нижче в таблиці 3.2. описано порівняння функцій білків магнітосомного острівця MamA, MamB, MamM, MamO, MamE, MamN та вирівняних із ними білків людини.

Таблиця 3.2 – Порівняння відомих функцій білків МО МТБ MamA, MamB, MamM, MamE, MamN, MamO, та вирівняних із ними білків людини.

Назва та функції білку МО МТБ	Назва та функції гомологічного білку людини
<p>MamA містить домен TPR, який є консенсусною послідовністю, знайденою у широкому різноманітті організмів, включаючи бактерії, ціанобактерії, дріжджі, гриби. TPR домен залучений в різноманіття функцій, включаючи білок-білкові взаємодії, функції шаперонів, клітинний цикл, транскрипцію, транспорт білків.</p>	<p>Pex5 – пероксисома – розповсюджений, оточений мембраною органоїд клітини з великим різноманіттям метаболічних функцій – руйнування токсичних сполук, побудова мієлінової оболонки нервових волокон та ін. Ферменти органели використовують молекулярний кисень для відщеплення атомів водню від n/o субстратів з утворенням перекису. Pex5 містить домен TPR [127].</p>
<p>MamB – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe.</p>	<p>ZnT-9, ZnT-10 – транспортери катіонів Zn. Зміни в цих білках в мозкових областях пов'язані з хворобою Альцгеймера, порушення гомеостазу цинку грає роль в патогенезі цієї хвороби [128, 129]. Відіграє роль у транспорті Fe²⁺ як в магнітосомні везикули, так і в клітину МТБ [130].</p>
<p>MamM – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe.</p>	<p>ZnT-4, ZnT-9 – транспортери катіонів Zn, Zn, Cd, Fe [128, 129].</p>

<p>MamE – серинова протеаза.</p> <p>PDZ – домен трипсино-подібної серинової протеази залучений до відгуку на тепловий шок, функції шаперонів, апоптозу, може бути відповідальним за впізнавання субстрату і/або зв'язування.</p>	<p>HtrA – серинові протеази залучені до важливих фізіологічних процесів, включаючи регулювання мітохондріального гомеостазу, апоптозу та передачу клітинних сигналів, залучені до розвитку патологічних процесів таких як рак, нейродегенеративні хвороби, хвороби Альцгеймера [131, 132].</p>
<p>MamN – пермеаза Р. Точна функція білку Р невідома, допускають, що він необхідний для регулювання рН, разом з АТФ-керованим протонним насосом.</p>	<p>Пермеаза Р людини. Мутація у меланосомному Р гені відповідальна за класичний фенотип альбінізму типу 2 (OCA2). Хоча точна функція білку Р невідома, допускають, що він необхідний для регулювання рН, разом з АТФ-керованим протонним насосом [133].</p>
<p>MamO – серинова протеаза</p>	<p>HtrA 2 – серинова протеаза</p>

Аналіз відомих функцій гомологів білків магнітосомного острівця MamA, MamB, MamM, MamE, MamO, MamN та у людини показав, що гомологи білків MamB, MamM, MamE та MamN у людини мають спільні функції з відповідними білками магнітосомного острівця, а функції білків людини, які є гомологами білків MamA та MamO, мають однакові функції в порівнянні з функціями білків MO, та гомологи MamO у людини належать до того ж самого сімейства білків (сімейство HtrA), що і білок MamO МТБ. Аналіз функцій гомологів MamB та MamN у людини додатково підтверджують гіпотезу про гомологію.

З регуляторних білків біомінералізації БМН лише для білка MamK показано наявність гомологічного білка у людини. Відсутність гомологів регуляторних білків MO МТБ у людини корелює з експериментальними даними

різних досліджень [47, 53] про відсутність монорозмірності, контрольованої форми та строго визначеної кількості магнітних наночастинок, а також з відсутністю везикул навколо кожної частинки магнетиту в клітинах організму людини.

3.3 Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу БМН у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмів

Явище біомінералізації добре вивчене в МТБ, що відносяться до класу α -протеобактерій і є мікроаерофілами (*Magnetospirillum magnetotacticus*, *Magnetospirillum gryphiswaldense*, та ін.) [119], та до класу δ -протеобактерій, і є факультативними анаеробами (*Desulfovibrio magneticus*) [34, 35]. Останні мікроорганізми є сульфат-редуючими, тобто мають сульфатний тип дихання.

Відомо, що гени магнітосомного острівця МТБ пов'язані з метаболічними шляхами анаеробного дихання [36]. При цьому методами радіоактивних міток доведено, що до складу БМН входить кисень, який походить виключно з води, а не з розчиненого повітря [134]. Це додатково підтверджує древнє походження єдиного генетичного механізму біомінералізації БМН, оскільки, найімовірніше, виникнення життя відбувалося за відсутності кисню в атмосфері Землі [135].

Отже наступним кроком для з'ясування можливості існування фундаментального механізму синтезу Fe_3O_4 є порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків МО МТБ без яких неможливий процес біомінералізації в МТБ, з білками немагнітотаксисних анаеробів.

3.3.1 Аналіз фенотипового прояву синтезу БМН в анаеробних мікроорганізмах

Окрім мікроаерофільних мікроорганізмів, кристали магнетиту були знайдені і в анаеробних, зокрема в *Desulfovibrio magneticus*. Як виявилось, за морфологічними характеристиками *Desulfovibrio magneticus* штам RS-1 дещо відрізняється від уже вивчених культур МТБ тим, що не лише проявляє явище

магнітотаксису, але також демонструє явище анаеротаксису, скупчуючись в найбільш анаеробних зонах [8].

Культура RS-1 є сульфатредуючим облигатним анаеробом, здатним до створення як внутрішньоклітинного магнетиту так і позаклітинного магнітного сульфідіду заліза [136]. Незважаючи на те, що RS-1 реагує на напрям магнітного поля, їх орієнтація та міграція не ідентичні. Клітини мігрують випадково при зміні напрямку магнітного поля. БМН у *Desulfovibrio magneticus* з'єднано в кластери достатньо неправильної форми (рис. 3.2) [130].

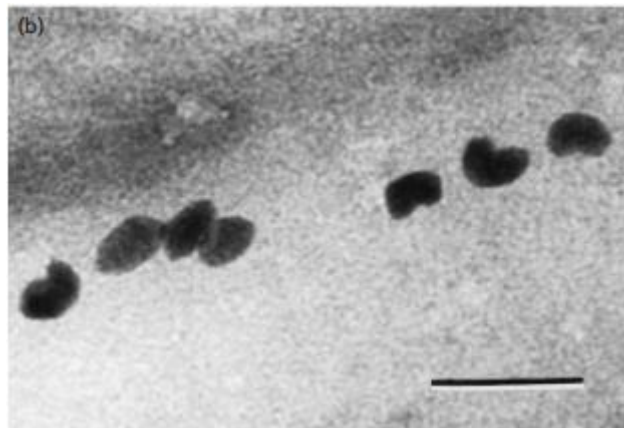


Рис. 3.2 – ТЕМ зображення БМН *Desulfovibrio magneticus* RS-1 (бар 100 нм) [35]

Відповідно до вищезазначеного, у фенотиповому прояві біомінералізованого магнетиту у *Desulfovibrio magneticus* немає чітко визначеного ланцюга, як і у людини не спостерігається регуляції його форми, розмірів та інших властивостей, тобто кристали магнетиту розташовані хаотично в клітині. Тому *Desulfovibrio magneticus* RS-1 представляє собою бактерію з новими метаболічними особливостями серед магнітотаксисних бактерій, так як відсутній чітко сформований ланцюг з кристалами БМН, які не можуть відповідати за навігацію.

Існують також Fe(III)-редуючі бактерії, які залучаються до утворення магнетиту унаслідок катаболізму заліза при анаеробному диханні, такі як: *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Pelobacter carbinolicus*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfuromonas palmitatis* та ін. [137].

3.3.2 Аналіз функціональної класифікації статистично значимих вирівнювань білків магнітосомного острівця МТБ і анаеробних мікроорганізмів

Відомо, що акцепторами електронів в процесі дихання МТБ може бути не лише кисень, а й нітрат, тобто може відбуватись «нітратне дихання». Отже можна припустити, що й при інших типах анаеробного дихання може відбуватися формування БМН.

Анаеробне дихання – біохімічний процес окислення органічних субстратів або молекулярного водню з використанням в якості кінцевого акцептора електронів замість O_2 , інших окислювачів неорганічної або органічної природи. Як і в разі аеробного дихання, вільна енергія, що виділяється в ході реакції, запасається у вигляді трансмембранного протонного потенціалу АТФ-синтазою, що використовується для синтезу АТФ [138].

Анаеробами є прокаріоти, при цьому факультативні анаероби використовують акцептори електронів з високим окислювально-відновним потенціалом (NO_3^- , NO_2^- , Fe^{3+} , фумарат, диметилсульфоксид і т. д.), у них це дихання конкурує з енергетично вигіднішим аеробним і пригнічується киснем. Акцептори з низьким окислювально-відновним потенціалом (сірка, SO_4^{2-} , CO_2) застосовуються лише строгими анаеробами, що гинуть при появі в середовищі кисню [139].

Залежно від природи кінцевого акцептора розрізняють нітратне, сульфатне, карбонатне, фумаратне та інші типи дихання і ін. (табл. 3.3) [140, 139].

Таблиця 3.3 – Типи дихання анаеробних мікроорганізмів

Тип дихання	Рівняння реакції
«Нітратне дихання», або денітрифікація. Здійснюється денітрифікуючими бактеріями, які володіють здатністю відновлювати нітрат через нітрит до азоту	$10[H] + 2H^+ + 2NO_3^- \rightarrow N_2 + 6H_2O$

<p>«Сірчане дихання». Здійснюється бактеріями, які здатні рости в присутності елементарної сірки, використовуючи її в якості акцептора водню при анаеробному переносі електронів, сірка відновлюється при цьому до сірководню.</p>	$S_8 + HS^- \rightarrow S^{2-} + S_8 + H^+$
<p>«Сульфатне дихання». Здійснюється сульфатредуючими бактеріями, головним продуктом такого процесу є сірководень.</p>	$8[H] + SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + 2H_2O + 2OH^-$
<p>«Карбонатне дихання». Здійснюється метанутворюючими мікроорганізмами, що використовують в якості акцептора водню вуглекислий газ, що веде до утворення метану.</p>	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
<p>«Фумаратне дихання» (сукциногенні бактерії) - це процес фосфорилування з фумаратом в якості кінцевого акцептора електронів.</p>	$2[H] + \text{Фумарат} \rightarrow \text{Сукцинат}$
<p>«Залізне дихання», пов'язане з відновленням заліза трьохвалентного до двохвалентного.</p>	$\text{Ацетат}^- + 8Fe^{3+} + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 8Fe^{2+} + 7H^+$

Отже, в дисертаційній роботі було здійснено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків МО бактерії *M. Gryphiswaldense* і анаеробів, що відрізняються за типом дихання [141], методом оцінки статистичної значимості вирівнювань білкових послідовностей. Результати представлені в таблицях та 3.4

Таблиця 3.4. Значимі вирівнювання між білками MO МТБ: MamA, MamB, Mam B, MamO, MamE, MamN бактерії *M. Gryphiswaldense* та анаеробними організмами.

Тип дихання та вид мікроорганізму	MamA		MamB		MamE		MamM		MamN		MamO	
	Е-число	К-сть а.к.	Е-число	К-сть а.к.	Е-число	К-сть а.к.	Е-число	К-сть а.к.	Е-число	К-сть а.к.	Е-число	К-сть а.к.
Нітратне (факультативні анаероби)												
<i>Alcaligenes</i>	8e-11	121	7e-38	268	3e-33	164	2e-31	263	4e-04	269	7e-11	199
<i>Bacillus licheniformis</i>	5e-09	122	3e-31	261	2e-30	206	6e-32	274	0.004	<u>61</u>	5e-06	226
<i>Hyphomicrobium</i>	6e-08	132	4e-18	258	7e-40	188	2e-19	294	0.026	<u>81</u>	8e-14	166
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9e-04	<u>88</u>	4e-14	261	6e-35	197	5e-12	280	0.007	202	1e-11	174
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	1e-04	121	3e-19	265	4e-36	171	4e-16	264	0.14	<u>47</u>	4e-13	217
Сульфатне (факультативні анаероби)												
<i>Desulfobacter</i>	6e-12	116	5e-21	293	2e-36	267	1e-12	289	5e-05	136	4e-10	179
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	7e-09	163	7e-36	286	1e-42	215	6e-17	264	4e-56	432	3e-16	171
<i>Dm. orientis</i>	2e-07	<u>84</u>	6e-26	281	5e-31	166	4e-15	262	2e-51	448	3e-11	209
<i>Dm. ruminis</i>	5e-10	187	5e-36	278	1e-43	172	3e-16	272	8e-54	430	8e-16	182
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	5e-10	163	1e-19	291	5e-40	213	9e-19	227	1e-05	169	2e-13	172
<i>D. vulgaris</i>	4e-10	116	8e-23	283	3e-39	166	6e-20	260	0.066	<u>31</u>	1e-12	225

Сірчане (факультативні анаероби)												
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	2e-05	95	6e-32	286	1e-42	257	2e-17	318	1e-49	423	8e-15	169
<i>Wolinella succinogenes</i>	2e-06	<u>47</u>	2e-22	256	1e-35	178	1e-19	256	3e-04	132	2e-12	162
Карбонатне (метаноутворюючі бактерії) строгі анаероби												
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	3e-14	200	3e-30	269	0.002	88	2e-26	275	9e-05	291	8e-04	92
<i>Methanosarcina</i>	6e-19	136	6e-43	280	0.012	<u>60</u>	4e-34	257	7e-05	166	0.004	94
<i>Methanospirillum hundatii</i>	3e-12	172	5e-15	278	0.055	142	8e-06	270	8e-04	261	0.005	67
Карбонатне (ацетогенні бактерії) строгі анаероби												
<i>Acetobacterium woodii</i> +	0.002	114	1e-15	195	8e-30	197	7e-15	154	0.030	<u>62</u>	3e-11	212
<i>Peptostreptococcus</i> +	0.002	95	3e-15	220	9e-28	174	2e-14	157	0.075	104	4e-08	172
Фумаратне (строгі анаероби)												
<i>Bacteroides</i>	3e-10	157	1e-42	277	5e-38	162	8e-33	269	1e-14	343	7e-18	174
<i>Escherichia</i>	1e-06	176	1e-37	276	6e-39	208	3e-29	268	1e-10	450	6e-14	173
<i>Klebsiella</i>	4e-06	<u>67</u>	2e-42	258	2e-37	208	3e-34	271	9e-10	446	9e-15	173
<i>Propionibacterium</i>	4e-05	<u>59</u>	2e-19	201	1e-24	239	5e-21	282	0.011	275	2e-08	202
<i>Proteus</i> +	3e-07	<u>71</u>	2e-36	275	5e-38	205	3e-30	252	3e-04	106	7e-10	175
<i>Salmonella</i> +	2e-05	62	3e-21	204	7e-36	188	2e-16	260	4e-13	444	1e-13	173

Залізне												
<i>Bacillus</i>	2e-11	146	8e-48	288	1e-31	212	8e-38	278	2e-44	441	2e-09	173
<i>Clostridium</i> +	8e-15	153	5e-46	263	1e-34	176	3e-40	257	2e-56	431	2e-15	205
<i>Geobacter metallireducens</i>	3e-15	166	5e-47	276	1e-36	256	2e-42	257	0.061	<u>50</u>	4e-15	172
<i>Pseudomonas</i> +	5e-12	201	5e-20	271	2e-36	178	4e-28	270	5e-08	424	2e-11	183
<i>Serratia</i> +	5e-06	174	2e-25	253	3e-39	248	9e-21	267	8e-07	282	7e-14	169

В таблиці 3.4 проаналізовано значимі вирівнювання між білками МО МТБ, без яких неможливий процес біомінералізації, бактерії *M.gryphiswaldense* і анаеробними мікроорганізмами. Виявилось, що в деяких організмів відсутня впевнена гомологія білків MamA та MamN МО МТБ з білками немагнітотаксисних анаеробних мікроорганізмів. З таблиці 3.3 видно, що у *Geobacter metallireducens* (значення E-чисел виділено жирним) не виявлено MamN, але кристали магнетиту були знайдені, тобто генетичний аналіз дисертаційної роботи [141] підтверджує гіпотезу роботи [142] про можливість біомінералізації БМН за відсутності цього білку. Ступінь гомології між білками вказує на можливість формування БМН у анаеробних організмів, що підтверджується значеннями E-чисел, наведеними в таблиці 3.5, де наведені вирівнювання між білками бактерії *M. Gryphiswaldense* та організмами, в яких виявлено БМН.

Таблиця 3.5 – Значимі вирівнювання між білками бактерії *M.Gryphiswaldense* та організмами, в яких БМН виявлено експериментально.

Назва мікроорганізму	E-число					
	mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamN
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> AMB-1	3e-150	3e-63	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Desulfovibrio magneticus</i> RS-1	3e-16	1e-47	5e-46	2e-19	3e-40	9e-29
<i>Candidatus Magnetoglobus multicellularis</i>	2e-08	6e-59	6e-39	7e-20	4e-46	1.4

<i>Bacillus cereus</i> *	4e-08	3e-38	9e-35	5e-09	9e-28	3e-44
<i>B. thuringiensis</i> *	7e-08	1e-37	1e-34	9e-08	2e-30	2e-44
<i>Escherichia coli</i> *	1e-06	7e-38	3e-29	1e-13	5e-39	2e-05
<i>Haloferax mediterranei</i> *	0.016	9e-27	5e-27	0.050	0.027	0.001
<i>H. volcanii</i> *	-	1e-27	2e-26	0.035	0.015	7e-04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	9e-04	4e-14	5e-12	1e-11	5e-35	0.007
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> *	9e-13	5e-22	1e-21	8e-14	2e-34	8e-06

Для мікроорганізмів, помічених * магнітними штамами серед мікроорганізмів, геноми яких відомі є: *Bacillus cereus* B-504, *B. thuringiensis* B-439, *Escherichia coli* B-126, *Haloferax mediterranei* B-1791, *H. volcanii* B-1768, *Pseudomonas aeruginosa* B-552, *Rhodopseudomonas palustris* B-1620. Проте в базі даних Національного центру Біотехнологічної інформації не вказано який саме штам секвеновано – магнітотаксисний чи немагнітотаксисний. Тому відсутність гомології білку mamA у бактерії *M. Gryphiswaldense* з деякими з відповідних білків бактерій помічених * можна пояснити наступним чином: гомологи MamA відіграють транспортну роль, виступаючи переносниками іонів Fe²⁺ або хелатів через клітинну мембрану у мікроорганізмів, тому відсутність гомологу білку мамА може свідчити про формування БМН на поверхні клітинної стінки, при відсутності мамА і мамЕ утворюються зовнішньоклітинні аморфні БМН [143].

Таким чином, навіть при відсутності гомологів білків MamA, MamE мікроорганізми здатні формувати аморфні БМН на поверхні клітини [143]. Це підтверджується експериментальними дослідженнями робіт [39, 144] для мікроорганізму *Leptothrix ochracea* L12, у якого не виявлено гомологів білків MamA, MamO, MamE, але якому притаманна наявність аморфних частинок ферригідриту, скупчення яких формуються навколо клітин та характеризуються феримагнітними властивостями, подібними до спінового скла [39, 144].

Для підтвердження гомології білків MamA, MamB, MamM, MamO, MamE, MamN, з відповідними білками анаеробів здійснено також порівняння відомих функцій білків МО МТБ та вирівняних з ними білків анаеробів. Результати вирівнювання наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 – Порівняння відомих функцій білків МО МТБ MamB, MamE, MamA, MamN, MamO, MamM та вирівняних із ними білків анаеробів.

Назва та функції білку МО МТБ	Гомологи білків МО МТБ анаеробних організмів та їхні функції
<p>MamA містить домен TPR, який є консенсусною послідовністю, знайденою у широкому різноманіттю організмів, включаючи бактерії, ціанобактерії, дріжджі, гриби. TPR домен залучений в різноманіття функцій, включаючи білок-білкові взаємодії, функції шаперонів, клітинний цикл, транскрипцію, транспорт білків.</p>	<p>Тетратрикопептид (TPR) бере участь в в білок-білкових взаємодіях, транспорті білків.</p>

<p>MamM – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe</p>	<p>Cation efflux family. Це складові мембранні білки, які підвищують чутливість до двохвалентних йонів металів, таких як Co, Zn, Cd. Ці білки є насосами викачки, що видаляють ці йони з клітини.</p>
<p>MamB – транспортер катіонів Co, Zn, Cd., Fe.</p>	<p>Помічниками катіонної дифузії є родина транспортних білків. На відміну від інших родин білків, усі білки характеризуються транспортом металів, переважно цинку. Одним з перших двох ідентифікованих білків був CzcD. Цей транспортер є частиною кобальт-цинк-кадмій резистентної системи та зменшує внутрішньоклітинну концентрацію цинку.</p>
<p>MamE – серинова протеаза. PDZ домен трипсиноподібної серинової протеази залучений до відгуку на тепловий шок, функції шаперонів, апоптозу, може бути відповідальним за впізнавання субстрату і/або зв'язування.</p>	<p>Трипсин-подібна серинова протеаза Прокаріотичні серинові протеази беруть участь у фізіологічних процесах, пов'язаних з сигнальною та захисною системою і розвитком клітини. Родина трипсин-подібних серинових протеаз, залучена до відповіді на тепловий шок, системи захисту від деяких бактерій та в процес росту бактеріальної клітини.</p>
<p>MamO – серинова протеаза</p>	
<p>MamN – пермеаза Р. Точна функція білку Р невідома, допускають, що він необхідний для регулювання рН, разом з</p>	<p>ArsB_NhaD_permease superfamily. Ці пермеази виконують транспорт арсенату і антимоніату в бактеріях. Типова permease ArsB містить 8-13</p>

АТФ-керованим насосом.	протонним	трансмембранні спіралі і може функціонувати самостійно, як осмотичний транспортер. Комплекс ArsAB багато в чому схожий на АТФ-зв'язуючий комплекс транспортер. ArsB білки транспортують натрій, арсенат, сульфати і органічні аніони через біологічні мембрани.
------------------------	-----------	---

Аналіз відомих функцій гомологів білків магнітосомного острівця МТБ MamA, MamB, MamM, MamE, MamO, MamN, та у анаеробів показав, що їх гомологи мають спільні функції з відповідними білками МО МТБ. Водночас білки анаеробів, які є гомологами білку MamN, відносяться до одного суперсімейства, але мають дещо інші функції в порівнянні з функціями білку магнітосомного острівця. Додатково виявилось, що деякі представники анаеробних бактерій (табл. 3.3) з нітратним, карбонатним та залізним типами дихання мають гомологи білків МО МТБ (MamA, MamB, MamM, MamO та MamE), але не мають гомологу білку MamN, що підтверджує гіпотезу роботи [142] про можливість процесу біомінералізації за відсутності білка MamN.

Аналіз гомологів регуляторних білків (які регулюють форму, розмір та кількість БМН, а також регулюють утворення ланцюга та везикул) показав, що з 17 регуляторних білків МО МТБ (таких як, MamQ, MamI, MamL, MamJ, MamK, MamF, MamD, MamT, MamP, MamR та MamS) анаеробні мікроорганізми мають гомологи з трьома регуляторними білками МО МТБ, такими як, білки MamK, MamH та MamQ. Це підтверджує гіпотезу роботи [145], що білки MamK, MamH та MamQ походять від спільного предка в корені філогенетичного дерева всіх організмів. Ці білки містять весь набір білків, без яких не може здійснюватися біомінералізація БМН і властиві всім організмам, в тому числі і людині. Таким чином, в дисертаційній роботі підтверджується

гіпотеза про загальну древню генетичну основу біомінералізації БМН у різних організмах.

Всі інші білки МО МТБ з точки зору статистичної оцінки значущості вирівнювань не мають гомології з білками немагнітотаксисних анаеробних організмів. Можна припустити, що у бактерій ці багатофункціональні білки беруть участь не лише у синтезі магнітосом, а й у інших біологічних процесах.

Набір білків анаеробних мікроорганізмів, які є гомологами білків МО МТБ є ближчим до людини, ніж до МТБ, тому можна сказати, що функції БМН у анаеробних організмів співпадають з функціями БМН у людини, а це свідчить про те, що МТБ мають додаткові білки, які беруть участь в процесі біомінералізації, які набуті в ході еволюційних змін.

У роботі [29] було проведено порівняльний аналіз геному *Desulfovibrio magneticus sp.* та *Candidatus Magnetococcus sp. strain MC-1*, *Magnetospirillum magneticum strain AMB-1*, та *Magnetospirillum gryphiswaldense strain MSR-1*, в результаті чого було встановлено гомологію між білками магнітосомного острівця. Виявилось, що в геномі *Desulfovibrio magneticus sp.* є специфічний оперон, який є гомологічним оперону *mamAB*, але основною відмінністю є відсутність гомологу білку *mamN*. Хоча спостерігались БМН різної форми та розміру. Єдиною відмінністю між цими двома бактеріями є їх тип дихання. Тобто ця робота [Mann S. J. Exp. Biol. 1988.] підтверджує дослідження дисертаційної роботи, що при анаеробному диханні бактерії для синтезу БМН не завжди потрібен білок *mamN*. Його необхідність може бути пов'язана з метаболічними шляхами самої бактерії та типом її анаеробного дихання. Але однозначно це не пов'язано з її відношенням до кисню, оскільки, *mamN* не було знайдено в організмів з нітратним та карбонатним типом дихання.

Також в результаті проведених досліджень було виявлено, що не всі представники одного типу анаеробного дихання чи навіть одного роду мають гомологію з білками МО МТБ і це може бути пов'язано з умовами існування мікроорганізмів [141].

3.4 Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей БМН у грибів

Для підтвердження єдиного механізму біомінералізації в усіх трьох царствах живих організмів методами біоінформатики виявлено продуцентів БМН серед грибів.

У роботі [146] вперше експериментально показано процес синтезу магнітних наночастинок оксиду заліза ензиматичним шляхом, які володіють суперпарамагнітною поведінкою, в аеробних умовах у грибів *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.*

3.4.1 Гриби, як продуценти БМН

Гриби роду *F. oxysporum* та *Verticillium spp.* є збудниками трахеомікозу рослин. Фітопатогенні гриби вражають близько 350 видів дводольних рослин. Від ураження сильніше страждає бавовник, дещо менше кунжут, канатник, льон, томат, картопля, диня, кавун, персик, абрикос та ін.

Збудник розвивається в ґрунті, через коріння проникає в рослину і поширюється в системі ксилеми (в тканині наземних рослин, що служить для проведення води і мінеральних солей від коріння вгору по рослині до листя), викликаючи в'янення надземних органів. Частіше гине вся рослина, рідше - окремі його частини. Хвороба передається через ґрунт з рослинними залишками, з посадковим матеріалом, поливною водою. Уражені рослини або не дають урожаю, або якість його різко знижується [147, 148].

При цьому різні штами *F. oxysporum* використовуються з метою виробництва наноматеріалів (особливо наночастинок срібла) [149].

Гриби *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.* утворюють БМН неправильної форми (рис. 3.3), представляють загальну квазі-сферичну морфологію. Розмір частинок варіюється в діапазоні 20-50 нм. В роботі показано [146], що наночастинки добре відокремлені одна від одної та вкладені в схожу на матрицю структуру в якій присутні білки. На відміну від МТБ, у грибів кристали синтезуються зовнішньоклітинно, що свідчить про участь в

біомінералізації БМН у грибів *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.* іншого набору білків біомінералізації ніж в МТБ.

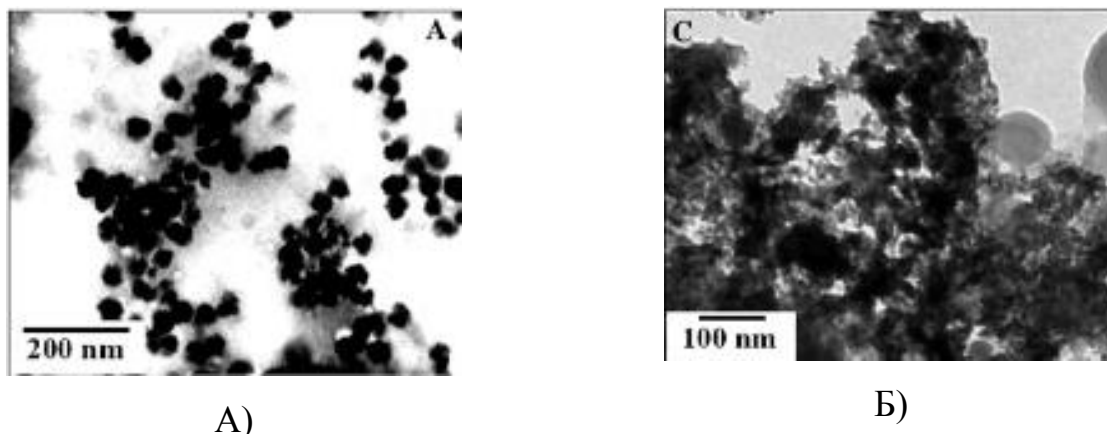


Рисунок 3.3 – TEM зображення наночастинок оксиду заліза синтезованих *Verticillium spp.*(а) та *Fusarium oxysporum* (б) [146]

Отже метою дослідження є вивчення механізму біосинтезу БМН грибами, визначення білків, що відповідають за утворення кристалів наномагнетиту, при порівнянні амінокислотних послідовностей білків МО, без яких неможливий процес біомінералізації магнетиту МТБ, з відповідними білками грибів та встановлення функцій БМН в грибів.

3.4.2 Філогенетичний та біоінформаційний аналіз

При аналізі еволюційного походження гомологів білків МО МТБ було проведено вирівнювання всіх білків МО МТБ з геномами грибів, які є в базі даних NCBI з використанням програми BLAST за стандартних параметрів.

Виходячи з вище наведеного, було здійснено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей білків МО магнітотаксисної бактерії *M. Gryphiswaldense* і грибів *Fusarium oxysporum* та *Verticillium spp.*, методом оцінки статистичної значимості вирівнювань білкових послідовностей. Результати представлені в таблицях 3.7 та 3.8

Таблиця 3.7 – Значимі вирівнювання між білками МО МТБ: MamA, MamB, MamM, MamN, MamO, MamE бактерії *M. Gryphiswaldense* та грибами.

	<i>Fusarium oxysporum</i>				
Назва білку МО МТБ	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE
Е-число	$1 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-10}$	$8 \cdot 10^{-11}$	0.16	0.56
віАЗ	23%	22%	25%	-	27%
Назва подібного білку грибів	TPR	Cation efflux family	Cation efflux family	Cytochrome P450	Trypsin-like peptidase domain
Організм	<i>Verticillium dahliae</i>				
Назва білку МО МТБ	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE
Е-число	$4 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-18}$	$4 \cdot 10^{-14}$	2.2	1.2
віАЗ	24%	25%	27%	-	-
Назва подібного білку грибів	TPR	Cation efflux family	Cation efflux family	dihydroli poamide succinyl transferase -	Trypsin-like peptidase domain

В таблиці 3.7 проаналізовано значимі вирівнювання між білками МО МТБ, без яких неможливий процес біомінералізації, бактерії *M. gryphiswaldense* і вказаними грибами. Виявилось, що в грибах відсутня гомологія білків MamO, MamE та MamN з білками МО МТБ. Як вже зазначалося, за відсутності MamN, біомінералізація кристалів магнетиту може відбуватися [142, 143]. При цьому мікроорганізми, в яких відсутні білки mamE, mamO здатні формувати кристалічні БМН на поверхні клітини [143], що підтверджується

експериментальними дослідженнями [146] та біоінформаційним аналізом дисертаційної роботи.

При порівнянні регуляторних білків МО МТБ та білків грибів, що контролюють форму, розміри та розташування кристалів у клітині (MamQ, MamL, MamI, MamK, MamJ, MamD, MamF, MamC, MamG, MamY, MamX, MamZ, mamP, mamT, MamR та MamS) гомологія була відсутня, що підтверджується фенотиповим проявом в роботі [146], де показано, що кристали БМН у грибів *Fusarium oxysporum* та *Verticillium* неправильної форми та хаотично розміщуються, не формуючи ланцюгів. Тому ймовірно, що для біосинтезу БМН зовнішньоклітинно в цих грибах беруть участь тільки білки mamA, mamB та mamM, що підтверджується експериментальними даними, так і теоритичними дослідженнями дисертаційної роботи.

При порівнянні всіх білків МО МТБ з білками грибів, виявилось, що значимі вирівнювання були знайдені лише у представників вищих грибів (*Dikarya*): аскомікотових і базидіомікотових грибів, до яких і відносяться досліджувані гриби (рис 3.4). В результаті було виявлено, що лише білки mamA, mamB та mamM МО МТБ мають гомологічні білки у грибів, що характеризуються спільними відомими функціями.

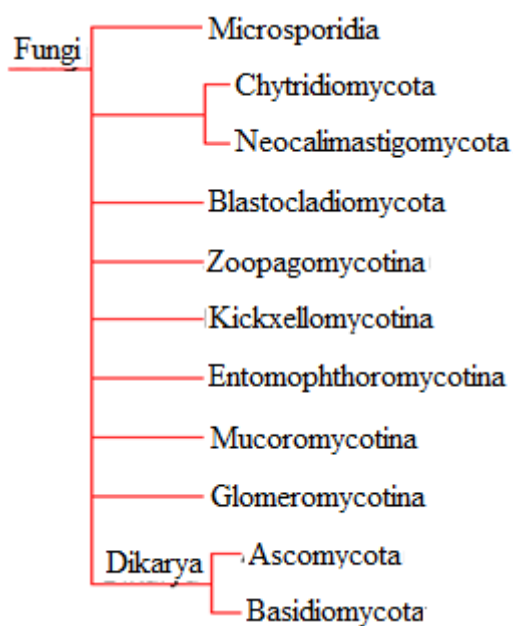


Рис. 3.4 – Кладограма основних представників філогенетичного дерева Царства Грибів [150].

Таким чином, генетичний механізм синтезу БМН в грибах дещо відрізняється від механізму в МТБ, так як гриби синтезують кристали з суперпарамагнітними властивостями зовнішньоклітинно [146]. Крім того, показана можливість наявності БМН в інших грибах, що важливо для з'ясування функцій БМН та виявлення потенційних продуцентів магнітних наночастинок для біомедичних застосувань.

Отже проведені дослідження вказують на можливість існування спільної генетичної основи механізму синтезу БМН для грибів та МТБ (різниця між наборами білків біомінералізації пояснюється). Так як для пошуку продуцентів кристалів БМН простіше перевірити на генетичному рівні наявність білків, що відповідають за біомінералізацію магнетиту, було проведено порівняння основних білків МО МТБ, без яких неможлива біомінералізація наномагнетиту: mamB, mamE, mamA, mamO, mamM, mamN бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* з наступними грибами: шампіньйонами, сиріжки, печерицями, опеньками, білим грибом, масляками, груздями, вішанками. Значимі вирівнювання були знайдені лише в одного роду шампіньйонів. Результати представлені в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8 – Значимі вирівнювання між білками МО МТБ: MamA, MamB, MamM, MamN, MamO, MamE бактерії *M. Gryphiswaldense* та шампіньйонами.

Організм	<i>Agaricus bisporus var. bisporus</i>					
	MamA	MamB	MamM	MamE	MamO	MamN
Е-число	$1 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-20}$	$3 \cdot 10^{-22}$	0.59	4.5	6.8
ВІАЗ	23%	26%	27%	25%	31%	24%
Назва подібного білку грибів	TPR	Predicted Co/Zn/Cd cation transporters	Cation efflux family	activation loop (A-loop)	hypothetical protein	Permease SLC13 (solute carrier 13)

Для встановлення еволюційного взаємозв'язку між вказаними білками, побудовано філогенетичне дерево для грибів (рис. 3.5), яке показує, яким саме організмам передались гени, відповідальні за біосинтез БМН.

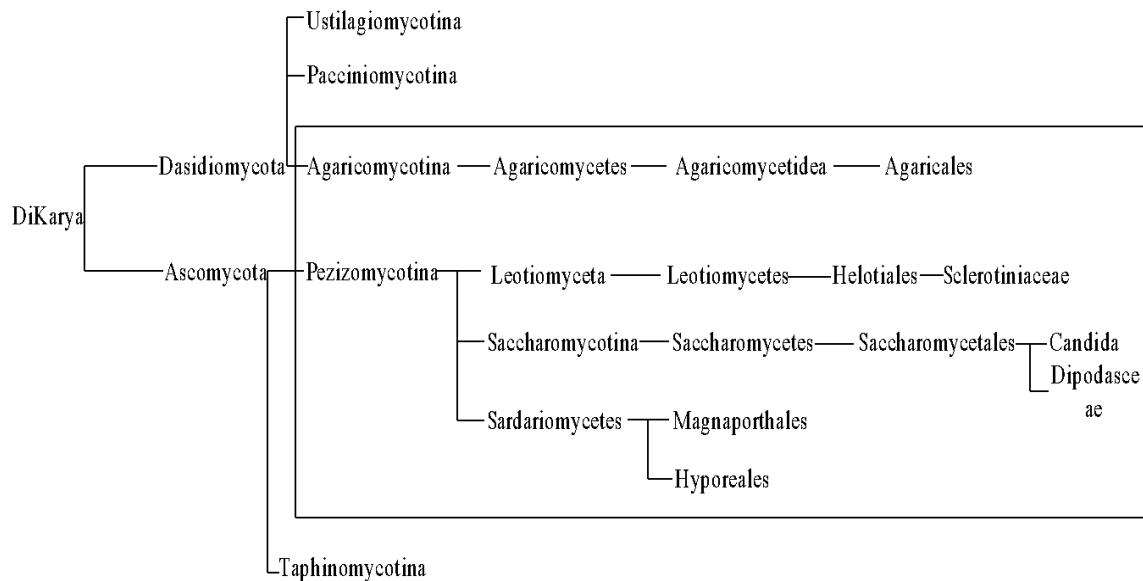


Рис. 3.5 – Теоретичне вкорінене дерево білків mamA, mamB, mamM. Рамкою обведені представники грибів, в яких виявлено гени, відповідальні за біосинтез наночастинок.

Для підтвердження гомології білків МТБ, з відповідними білками грибів, здійснено порівняння відомих функцій білків МО та вирівняних з ними білків грибів. Результати вирівнювання наведені в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9 – Порівняння відомих функцій білків магнітосомного острівця MamB, MamE, MamA та вирівняних із ними білків грибів.

Назва та функції білку МО МТБ	Гомологи білків МО МТБ грибів та їхні функції
MamM – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe.	Cation efflux family. Це складові мембранні білки, які підвищують чутливість до двохвалентних іонів металів, таких як Co, Zn, Cd, Fe. Ці білки

<p>MamB – транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe.</p>	<p>є насосами викачки, що видаляють ці іони з клітини.</p> <p>Помічниками катіонної дифузії є родина транспортних білків. На відміну від інших родин білків, усі білки характеризуються транспортом металів, переважно цинку. Одним з перших двох ідентифікованих білків був CzcD. Цей транспортер є частиною кобальт-цинк-кадмій резистентної системи та зменшує внутрішньоклітинну концентрацію цинку.</p>
<p>MamA містить домен TPR, який є консенсусною послідовністю, знайденою у широкому різноманіттю організмів, включаючи бактерії, ціанобактерії, дріжджі, гриби. TPR домен залучений в білок-білкові взаємодії, функції шаперонів, клітинний цикл, транскрипцію, транспорт білків.</p>	<p>Тетратрикопептид (TPR) бере участь в білок-білкових взаємодіях, транспорті білків.</p>

Аналіз відомих функцій гомологів білків магнітосомного острівця MamB, MamE, MamA, показав, що гомологи цих у грибів мають спільні функції з відповідними білками магнітосомного острівця. Відсутність гомології білків MamO, MamE та MamN підтверджує дослідження роботи [143] та вказує на здатність формувати кристалічні БМН на поверхні клітини [143]

Набір регуляторних білків у досліджених грибів, так як і анаеробних мікроорганізмів, які є гомологами білків MO МТБ, є ближчим до людини, ніж

до МТБ, тому можна сказати, що функції БМН у грибів співпадають з функціями БМН у людини.

Висновки до розділу 3

В дисертаційній роботі продовжено систематизацію БМН по властивостям, для уточнення та класифікації їх функцій, адаптації та зміни організмів, що містять БМН, до умов існування, бо це найдревніший механізм.

Методами біоінформатики для всіх білків МО МТБ – MamA, MamB, MamM, MamE, MamO та MamN, без яких не може відбуватися синтез БМН, виявлено можливих гомологів у людини, бактерій та грибів. Гіпотезу про можливу гомологію підтверджено на основі оцінки статистичної значимості відповідних вирівнювань по діапазону значень *E*-числа та відсотку ідентичних амінокислотних залишків. Генетичний аналіз дисертаційної роботи підтверджує гіпотезу роботи [142] про можливість біомінералізації за відсутності білку mamN. З проведених досліджень встановлено, що гомологи білку MamA відіграють транспортну роль, виступаючи переносниками іонів Fe²⁺ або хелатів через клітинну мембрану у МО, що формують внутрішньоклітинні кристалічні БМН. А за відсутності цього білку відбувається формування кристалічних БМН на поверхні клітини

Серед регуляторних білків МО МТБ, які регулюють властивості БМН, але без яких в принципі може відбуватися його біомінералізація, лише MamK, MamH та MamQ мають гомологію з білками досліджених організмів. Це підтверджує гіпотезу роботи [145], що білки MamK, MamH та MamQ походять від спільного предка в корені філогенетичного дерева всіх організмів. Ці білки містять весь набір білків, без яких не може здійснюватися біомінералізація БМН і властиві всім організмам, в тому числі і людині. В дисертаційній роботі підтверджується гіпотеза про загальну древню генетичну основу біомінералізації БМН у різних організмах.

Отже підтверджується наявність єдиного генетичного механізму біомінералізації БМН у прокариотів та еукаріотів, заснованого на наборі

гомологів білків МО МТБ, без яких біомінералізація БМН у цих бактеріях є неможливою. Цей основний набір містить такі білки МТБ, як *mamA*, *mamB*, *mamM*, *mamE*, *mamO*, *mamN*, серед яких *mamB* і *mamM* є транспортерами (переносниками) іонів двовалентних металів Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} та ін.

Проведений аналіз показав, що у людини синтезовані БМН мають найкращі магнітні властивості, бо присутні всі шість необхідних білків біомінералізації БМН, формуються кристалічні внутрішньоклітинні БМН зв'язані з мембраною, так як присутній гомолог *mamK*, який відповідальний за зв'язування БМН з мембраною, що є важливим фактором, адже це забезпечує їх взаємодію з іншими клітинами.

Дослідження БМН в різних організмах має важливий прикладний аспект для створення рекомбінантних мікроорганізмів і для вибору магніточутливих мікроорганізмів як потенційних векторів для спрямованої доставки лікарських препаратів [117], як біосорбентів для очищення стічних вод і для застосування у біометалургії [87], як продуцентів наночастинок для нанобіотехнології [151] тощо. Дослідження механізмів синтезу МТБ в різних організмах має важливе фундаментальне значення для пошуку як метаболічних функцій БМН, так і їх ролі в патогенезі захворювань людини, які супроводжуються підвищенням вмісту БМН [14].

РОЗДІЛ 4. БАКТЕРІЇ З ПРИРОДНИМИ ФЕРИМАГНІТНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ЯК ВЕКТОРИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

На сьогоднішній день в медицині та біотехнології широко використовуються магніточутливі носії, нанокомпозити [152] та магнітокеровані вектори: бактеріальні, вірусні, ліпосомальні та інші магнітомічені біооб'єкти, що використовуються для цільової доставки лікарських препаратів в орган-мішень. Адже відомо, що терапія при використанні магнітокерованих носіїв для транспортування лікарських препаратів здійснюється в локалізованій ділянці організму, загальна доза препарату при цьому може бути мінімальною. Зовнішнє статичне магнітне поле впливає на рух магнітокерованих носіїв і запобігає їх вимиванню з органа-мішені, що пов'язано з необхідністю мінімізації небажаних токсико-алергічних ефектів.

Значний науковий інтерес представляють дослідження з магнітокерованої доставки лікарських препаратів, інкапсульованих в біосумісне середовище разом зі штучними магнітними наночастинками. У випадку магнітокерованих ліпосом наночастинки використовуються для забезпечення магнітодипольної взаємодії БМН ліпосом та клітин органу мішені, наприклад пухлини [153]. Останні дозволяють за допомогою зовнішнього магнітного поля дистанційно концентрувати магнітні носії в локальних біологічних структурах при створенні векторних систем доставки ліків в пухлинні клітини [154].

4.1 Визначення потенційних продуцентів БМН серед бактерій, які використовуються як вектори для доставки лікарських засобів

В даний час широкий спектр мікроорганізмів – патогенних, умовно-патогенних та бактеріальних симбіонтів людини використовуються як вектори для цільової доставки лікарських препаратів в орган-мішень [71, 155]. Отже мета роботи - показати, що в якості векторів для цільової доставки лікарських

препаратів більш ефективно використовувати мікроорганізми, які здатні до біомінералізації БМН, адже простіше використовувати природні магнітні властивості мікроорганізмів, ніж штучно їх магнітомітити. В роботах [71] показано, що низка мікроорганізмів, при попаданні в організм людини з онкологічними новоутворюваннями накопичуються тільки в пухлинних тканинах.

Перспективним в цьому напрямку є використання модифікованих мікроорганізмів, таких як біфідобактерії, кишкові палички та інші, які вже застосовуються в якості векторів для доставки лікарських препаратів, серед яких патогенні, умовно-патогенні, та симбіонти людини [155]:

- *Salmonella enterica*
- *Clostridium novyi*
- *Escherichia coli*
- *Bifidobacterium breve*

Крім притаманних симбіонтам людини властивостей, таких як рухливість, здатність знищуватися антибіотиками, модифіковані бактеріальні симбіонти здатні експресувати терапевтичні білки, що знищують пухлинні клітини [157]. Таким чином використання патогенних, умовно-патогенних та бактеріальних симбіонтів відкриває нові перспективні стратегії лікування онкологічних захворювань, прискорення регенерації при запальних процесах, лікування гнійних ран [158].

Так, деякі види анаеробних патогенних бактерій, наприклад ті, що належать до роду *Clostridium*, розвиваються і споживають збіднені киснем ракові тканини, тобто вони безпечні для інших клітин організму [71]. В якості потенційних векторів протипухлинних засобів використовують живі, ослаблені або генетично модифіковані, непатогенні бактерії для надання прямого протипухлинного ефекту або для доставки пухлинній клітині лікарських препаратів.

Здатність деяких видів бактерій та їх спор селективно акумулюватися в оточенні пухлин може бути використана для цілеспрямованої доставки

протипухлинних препаратів, а також терапевтичних генів та білків у пухлинні клітини, а також ферментів для онколітичної терапії, для імуноад'ювантної терапії [159]

В роботі [160] показано, що ряд симбіонтів людини таких як, *Bifidobacterium breve* і *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* та інші накопичуються в злоякісних пухлинах, що можна пояснити наявністю в них наночастинок БМН [12]. Зображення клітин стрептококів на пухлинній тканині наведено на (рис. 4.1).

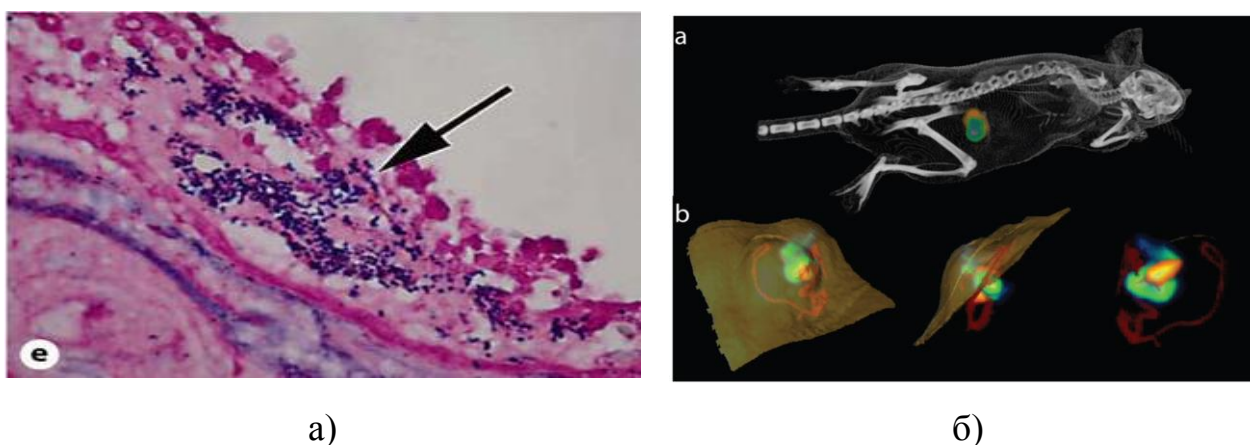


Рисунок 4.1 – Зображення бактеріальних клітин на пухлинній тканині.
а) зображення стрептококів на пухлинній тканині; б) 3D-зображення пухлини з мікробними клітинами. Зелений колір – пухлинна тканина, жовтий колір – бактерії [160].

Проте механізми, за рахунок яких відбувається накопичення бактерій-анаеробів у мікрооточенні пухлини, залишаються нез'ясованими. Стосовно природи первинного контакту, наслідком якого є проникнення, а в подальшому і накопичення бактеріальних клітин в пухлинній тканині можна розглядати магнітний характер взаємодій бактеріальних та пухлинних клітин [117], адже у клітинах низки пухлин людини та тварин ідентифіковано частинки ендogenous наномангнетиту [53].

Протипухлинний ефект бактерій ще не повністю розуміють, але автори роботи [155] частково пояснюють цей ефект. Бактерії виділяють гідролітичні ферменти в тому числі протеази і ліпази, які руйнують сусідні ракові клітини, що страждають від гіпоксії, щоб застатись киснем на зовнішній стороні пухлини. Автори відмічають імуноопосередкований ефект при використанні *Clostridium novyi*, в результаті чого ліки в даній бактерії генерують імунну відповідь по відношенню до ракових клітин. Результати досліджень ясно показують, що *Clostridium novyi* виконує функції ад'юванта, і значною мірою відповідальні за тривалу системну імунну відповідь проти специфічних пухлинних клітин.

В процесі дослідження клітин *P. aeruginosa* було висунуто гіпотезу [12], що БМН відповідають не тільки за магнітотаксис палички, а й ще за взаємодію між нею та залізовмісними компонентами крові людини. В роботі [12] механізм цієї взаємодії не пояснюється, отже в дисертаційній роботі показано, що накопичення мікроорганізмів в пухлинних тканинах та їх взаємодія з залізовмісними компонентами крові відбувається за рахунок сил магнітодипольної взаємодії між БМН цих мікроорганізмів та БМН пухлинних клітин або залізовмісних компонентів.

Для виявлення генетичної основи механізму біомінералізації БМН в патогенних, умовно-патогенних та бактеріальних симбіонтах людини, геноми яких повністю секвеновано, для виявлення нових потенційних продуцентів БМН, які мають природні магнітні властивості, для застосування в якості векторів для доставки лікарських препаратів здійснено вирівнювання послідовностей амінокислотних залишків білків біомінералізації БМН МТБ, та білків вказаних організмів. Для підтвердження гомології застосовано стандартні методи оцінки статистичної значимості відповідних вирівнювань та проведено порівняння відомих функцій білків МО МТБ: MamA, MamB, MamM, MamE, MamO з відомими функціями вирівняних з ними білків патогенних, умовно-патогенних та бактеріальних симбіонтах людини людини. Показано переваги використання магніточутливих штамів патогенних, умовно-

патогенних та бактеріальних симбіонтах людини на прикладі вектрів для протипухлинної терапії.

В біоінформаційному аналізі процесу біомінералізації БМН були використані дані з бази даних NCBI про повні геноми наступних мікроорганізмів: бактерії, що викликають гнійно-запальні процеси (табл 4.1) патогенних та умовно-патогенних (табл. 4.2) та бактеріальних симбіонтів людини (табл. 4.3).

Таблиця 4.1 – Порівняння білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків факультативно-анаеробних мікроорганізмів гнійно-запальних процесів ран

Штам мікроорганізмів	E-число (I, %)					
	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	Mam M	Mam O	MamE	MamK
<i>Escherichia coli</i> (541-15)	3e-06 (25%)	1e-37 (31%)	1e-25 (28%)	9e-11 (29%)	3e-36 (39%)	2e-04 (25%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	5e-04 (34%)	6e-39 (32%)	7e-32 (30%)	4e-13 (29%)	1e-34 (41%)	0.006 (30%)
<i>Clostridium perfringens</i> str. 13	2e-06 (24%)	1e-19 (28%)	9e-17 (27%)	7e-10 (26%)	5e-32 (43%)	7e-13 (28%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4e-05 (22%)	1e-10 (24%)	3e-16 (27%)	3e-10 (29%)	2e-32 (37%)	0.002 (24%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18	0.037 (32%)	1e-11 (23%)	2e-10 (25%)	1e-07 (24%)	6e-34 (40%)	2e-04 (24%)
<i>Streptococcus suis</i> BM407	0.61 (29%)	4e-23 (27%)	3e-23 (26%)	4e-04 (23%)	1e-20 (39%)	0.33 (24%)
<i>Staphylococcus aureus</i> RF122	0,19 (27%)	7e-22 (24%)	5e-27 (30%)	1e-09 (28%)	4e-12 (29%)	0.27 (28%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RYC492	0.002 (23%)	5e-18 (27%)	3e-13 (25%)	1e-13 (29%)	3e-35 (44%)	3e-06 (25%)
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	0.003 (34%)	1e-17 (28%)	5e-31 (31%)	1e-13 (29%)	4e-35 (40%)	0.009 (29%)

*Жирним шрифтом виділено мікроорганізми, в яких експериментально знайдено БМН
Підкреслено мікроорганізми, які вже використовуються як вектори

Таблиця 4.2 – Порівняння білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів – векторів для доставки лікарських препаратів

Штам мікроорганізмів	Е-число (I, %)					
	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	Mam M	Mam K	Mam O	MamE
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	2e-05 (24 %)	1e-33 (27 %)	9e-31 (28 %)	3e-14 (28 %)	4e-31 (37 %)	4e-10 (25 %)
<i>Vibrio cholerae</i> O1	1e-05 (26 %)	6e-17 (25 %)	8e-14 (23 %)	0,001 (24 %)	2e-37 (46 %)	5e-11 (28 %)
<i>Vibrio cholerae</i> LMA3984-4	2e-06 (26 %)	3e-16 (24 %)	1e-14 (22 %)	6e-04 (24 %)	2e-22 (39 %)	3e-05 (28 %)
<i>Listeria monocytogenes</i> serotype 4b str. F2365	1e-06 (23 %)	5e-31 (28 %)	2e-30 (32 %)	4e-13 (27 %)	4e-21 (39 %)	5e-05 (32 %)
<i>Serratia marcescens</i> WW4	2e-04 (27 %)	4e-22 (30 %)	8e-15 (25 %)	8e-06 (25 %)	6e-36 (41 %)	1e-09 (27 %)
<i>Serratia marcescens</i> FGI94	3e-05 (36 %)	5e-19 (25 %)	4e-16 (25 %)	4e-05 (25 %)	4e-36 (39 %)	5e-13 (28 %)
<i>Clostridium novyi</i> NT	9e-05 (23 %)	4e-36 (27 %)	9e-29 (31 %)	2e-14 (28 %)	3e-30 (38 %)	2e-08 (27 %)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	2e-10 (31 %)	2e-31 (24 %)	2e-28 (24 %)	8e-14 (26 %)	4e-32 (46 %)	4e-09 (27 %)
<i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131	0,46 (28 %)	1e-21 (23 %)	1e-23 (25 %)	0,65 (24 %)	2e-26 (25 %)	3e-04 (24 %)
<i>Escherichia coli</i> MS69-1	0,001 (25 %)	7e-18 (28 %)	2e-13 (23 %)	7e-06 (25 %)	1e-36 (39 %)	2e-12 (29 %)
<i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	0,004 (28 %)	2e-42 (28 %)	5e-39 (31 %)	1e-15 (28 %)	3e-22 (42 %)	2e-05 (26 %)

<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> str. LT2	0,007 (34 %)	5e-19 (28 %)	1e-14 (23 %)	8e-06 (25 %)	3e-34 (44 %)	1e-12 (29 %)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Korea 1168P	0,56 (34 %)	6e-27 (28 %)	6e-15 (27 %)	0,37 (24 %)	1e-28 (43 %)	9e-10 (26 %)

*Жирним шрифтом виділено мікроорганізми, в яких експериментально знайдено БМН
Підкреслено мікроорганізми, які вже використовуються як вектори

Таблиця 4.3 – Порівняння білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків бактеріальних симбіонтів людини

Штам мікроорганізмів	Е-число (I, %)					
	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	Mam M	Mam O	MamE	MamK
<i>Lactobacillus fermentum</i> (IFO 3956)	6-04 (28%)	2e-05 25%	6e-10 27%	1e-09 29%	1e-25 41%	5e-11 24%
<i>Bacteroides</i> (sp. 3_1_19)	1e-07 27%	2e-39 29%	7e-33 30%	6e-15 29%	2e-35 46%	2e-07 26%
<i>Clostridium perfringens</i> (E88)	5e-12 33%	3e-43 32%	2e-37 31%	4e-14 29%	2e-35 45%	6e-14 28%
<i>B. subtilis</i> (BSn5)	1e-07 25%	4e-45 33%	8e-32 31%	6e-06 25%	5e-33 39%	6e-11 25%
<i>B. cereus</i> (VD131)	2e-05 27%	5e-40 31%	8e-32 31%	3e-06 25%	2e-25 39%	1e-11 25%
<i>L. plantarum</i> (JDM1)	0,035 28%	6e-05 37%	4e-07 25%	7e-06 26%	7e-26 40%	5e-12 26%
<i>L. acidophilus</i> (30SC)	0,002 23%	2e-11 24%	4e-12 24%	3e-06 25%	3e-23 39%	1e-13 28%
<i>Propionibacterium</i> (F0230a)	0.086 39%	5e-17 27%	6e-21 25%	1e-06 25%	6e-18 37%	0,003 27%
<i>Peptostreptococcus</i> (VPI 4330)	0.056 31%	7e-14 27%	1e-12 30%	2e-06 24%	5e-26 41%	2e-07 25%
<i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> ATCC 15703	4,0 (29 %)	1e-07 (23 %)	1e-08 (21 %)	0,017 (26 %)	2e-25 (26 %)	8e-07 (26 %)

*Жирним шрифтом виділено мікроорганізми, в яких експериментально знайдено БМН
Підкреслено мікроорганізми, які вже використовуються як вектори

Проведені в дисертаційній роботі дослідження показують, що окремі штами всіх розглянутих патогенних, умовно патогенних та симбіотичних мікроорганізмів можуть бути потенційними продуцентами БМН, що підтверджується біоінформаційним аналізом даної роботи та експериментальними роботами [155, 161].

4.2 Класифікація мікроорганізмів - продуцентів БМН

В попередньому розділі показано, що БМН можуть бути різної природи – аморфної та кристалічної, формуватися назовні або всередині мембрани. Тому, перераховані мікроорганізми, що вже використовуються та можуть потенційно використовуватися як вектори для доставки лікарських препаратів, були досліджені з точки зору такої класифікації. Мікроорганізми, що утворюють наночастинки кристалічної природи виділено жирним шрифтом в таблицях 4.1, 4.2 та 4.3.

4.2.1 Продуценти внутрішньоклітинного магнетиту кристалічної природи

Проведений біоінформаційний аналіз ступеню гомології білків МО МТБ з білками патогенних, умовно-патогенних та бактеріальних симбіонтів людини показав, що мікроорганізми, виділені жирним шрифтом в таблицях 4.1, 4.2 та 4.3.

можуть синтезувати кристалічні БМН об'єднані в ланцюжки. Про це свідчать гомологія та спільні функції білків досліджуваних мікроорганізмів з білками МО МТБ, без яких неможлива біомінералізація кристалічного БМН, гомологія та спільні функції білку MamK, який відповідає за формування ланцюжків БМН. Також такий висновок підтверджується біоінформаційним аналізом ступеню гомології білків МО МТБ з іншими анаеробними мікроорганізмами в дисертаційній роботі [45].

Проведений біоінформаційний аналіз показав, що наступні мікроорганізми можуть синтезувати кристалічний наномінерал: *Escherichia*

coli 541-15, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Clostridium perfringens* str. 13, *Pseudomonas fluorescens*, (табл. 4.1), *Clostridium perfringens* SM10, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* LMA3984-4, *Listeria monocytogenes* serotype 4b str. F2365, *Serratia marcescens* WW4, *Serratia marcescens* FGI94, *Clostridium novyi* NT, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (табл. 4.2), *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Clostridium perfringens* E88, *Bacteroides* sp. 3_1_19, *Bacillus subtilis* BSn5, *Bacillus cereus* VD131, *Peptostreptococcus anaerobius* VPI 4330 (табл. 4.3).

Про це свідчать значення статистичних чисел, які знаходяться в тому діапазоні, де можлива гомологія та спільні функції білків БС з білками МО МТБ, без яких неможлива біомінералізація магнітних наночастинок.

Біоінформаційні дослідження роботи [141] та експериментальні дослідження [161] показали, що для біомінералізації мікроорганізмами внутрішньоклітинних кристалічних магнетних наночастинок, які локалізуються в клітині у вигляді ланцюжків, обов'язкова наявність всіх вищеперерахованих гомологів білків МО МТБ та гомологів білку MamK, який відповідає за формування ланцюжків БМН.

При цьому функції гомологів білку MamK таких організмів як *Staphylococcus aureus* RF122, *Streptococcus suis* BM407, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 відрізняються від функцій цього ж білку у МТБ, що говорить про відсутність формування ланцюжків БМН в цих мікроорганізмах.

4.2.2 Продуценти внутрішньоклітинних аморфних БМН

Проведений біоінформаційний аналіз ступеню гомології білків МО МТБ з білками патогенних, умовно-патогенних та симбіотичних мікроорганізмів людини показав, що такі представники як *Staphylococcus aureus* RF122, *Pseudomonas aeruginosa* M18, *Streptococcus suis* BM407, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella pneumoniae* RYC492 (табл.4.1), *Escherichia coli* MS69-1, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Clostridium sporogenes* PA 3679, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* str. LT2, *Mycobacterium bovis* BCG

str. Korea 1168P (табл.4.2), *Lactobacillus. plantarum JDM1*, *Lactobacillus. acidophilus 30SC*, *Propionibacterium propionicum F0230a*, *Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703* (табл.4.3), можуть бути потенційними продуцентами аморфних БМН, так як функції гомологів білку MamA цих мікроорганізмів відрізняються від функцій цього ж білку у МТБ. Аналіз експериментальних даних [162, 161] та біоінформаційний аналіз дисертаційної роботи [45, 163], показав, що білок MamA відповідає за формування кристалічної структури магнетиту. За відсутності у досліджуваних мікроорганізмів білків гомологів білку MamA в клітинах формуються аморфні магнітні наночастинки, так звані магніточутливі структури (МчС) [161].

Вирінювання приведені в таблиці 4.2, біоінформаційні дослідження дисертаційної роботи [45, 125] та експериментальні дослідження [12, 35, 164] показують, що для біомінералізації аморфних внутрішньоклітинних БМН у бактеріальних симбіонтів людини обов'язкова наявність близьких гомологів білків МО МТБ: MamB, MamE, MamO, MamM, а для формування ними ланцюгів наявність гомологів білку MamK.

В попередньому розділі показано, аморфні БМН не завжди формують ланцюжки [12, 45]. В роботі [12] показано, що в досліджуваних бактеріальних клітинах *Lactobacillus plantarum* VKM B-2209 аморфні БМН були представлені сферичною формою (іноді утворюючи ланцюжки вздовж довгої осі клітини) при вирощуванні клітин на кров'яному агарі, а при вирощуванні бактерій на синтетичному середовищі з додаванням хелатного заліза, утворювались мембрано-асоційовані включення неправильної форми (рис. 4.1) [12]. Аморфні БМН мають інші магнітні властивості, отже є сенс досліджувати їх у мікроорганізмів, якщо останні є продуцентами лікарських препаратів, то такі МО буде легко мітити штучно, і не буде відбуватися десорбція магнетиту.

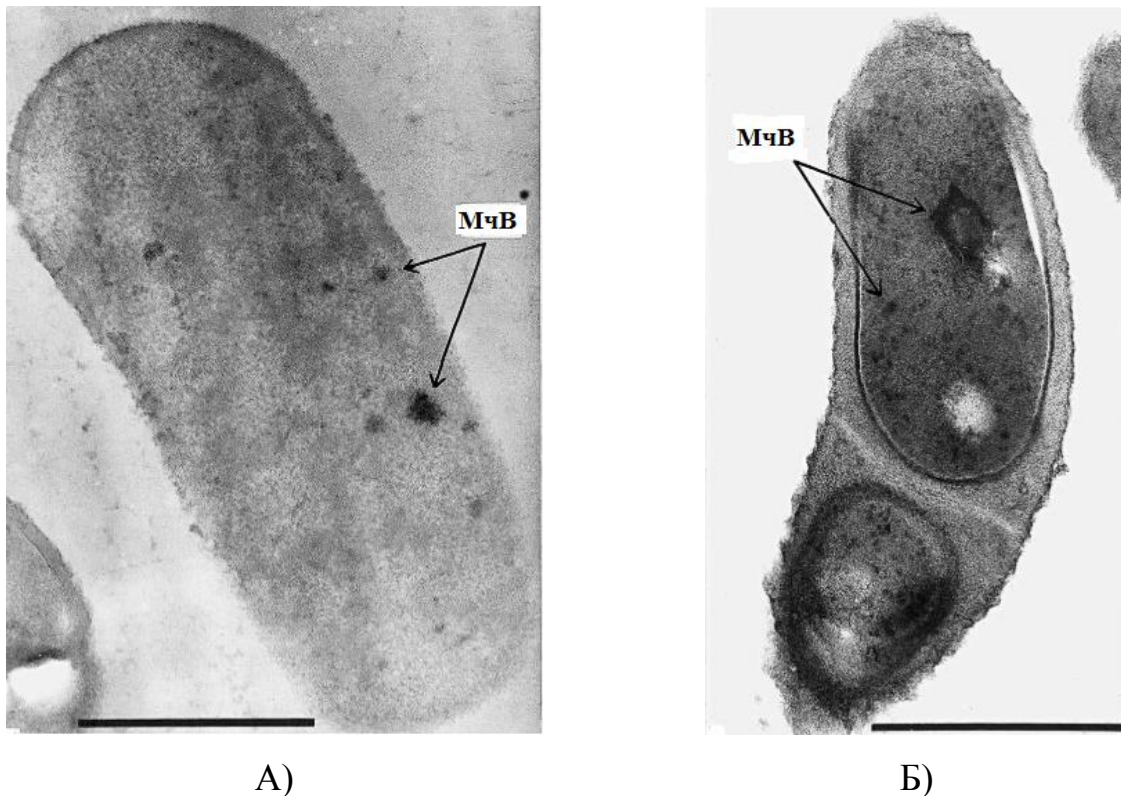


Рис. 4.2 – БМН в клітинах *Lactobacillus plantarum* VKM В-2209. А) – клітини вирощені на синтетичному середовищі з додаванням хелатного заліза, Б) - клітини вирощені на кров'яному агарі: БМН не мають визначеної форми. Бар 0,5 нм. [12]

Проведені в даній роботі дослідження показують, що окремі штами всіх розглянутих мікроорганізмів можуть бути потенційними продуцентами БМН або магніточутливих наноструктур. Адже всі білки генів МО МТБ, без яких не можлива біомінералізація кристалічних та аморфних БМН, а саме MamB, MamE, MamA, MamK, MamO, MamM, мають високий ступінь гомології з білками БС людини, що характеризується спільним фолдингом за значенням *E*-числа відповідних вирівнювань [107].

Аналіз експериментальних даних [35, 164, 12] та біоінформаційний аналіз дисертаційної роботи [45, 125], показав, що білок MamA відповідає за формування кристалічної структури магнетиту. В разі відсутності близьких гомологів цього білку у бактеріальних симбіонтів людини можливе формування аморфних БМН.

Дослідження роботи показали, що функції білків, що відповідають за мінералізацію БМН в усіх представлених мікроорганізмів співпадають з функціями відповідних білків МТБ.

4.3 Філогенетичний аналіз

Для встановлення еволюційного взаємозв'язку між вищезазначеними близькими гомологами білків МО МТБ та бактеріальних симбіонтів людини, побудовано філогенетичне дерево (рис 4.3), яке показує, яким саме штамом бактеріальних симбіонтів людини передались гени, відповідальні за біосинтез кристалічних або аморфних БМН.

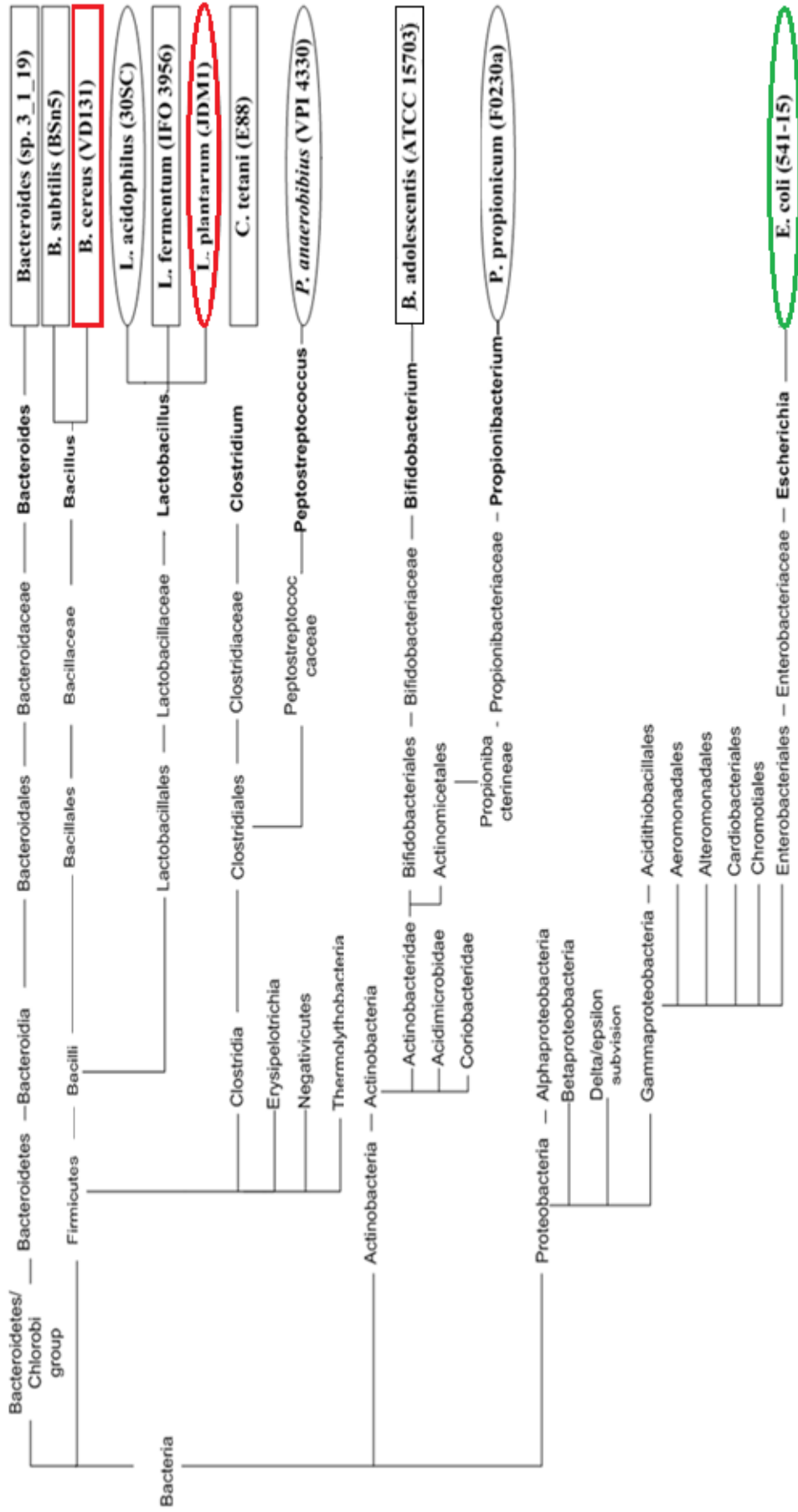


Рис. 4.3 Вкорінене дерево БС людини (потенційні продуценти виділено жирним)

○ — штами БС, що здатні до синтезу кристалічних наночастинок; □ — штами БС, що здатні до синтезу магніточувливих включень аморфної природи; ○ — штами БС, в яких біоінформаційний аналіз підтверджується експериментальними даними про біомінералізацію магнітних наночастинок [8]; ○ — штами БС, повні геноми яких відсутні у БД, але є експериментальні

Висновки до розділу 4

Методами порівняльної геноміки вперше проведено вирівнювання білків МО МТБ з білками патогенних та умовно патогенних, симбіотичних мікроорганізмів, збудників запальних процесів у людини. Показано, які саме штами можуть бути продуцентами кристалічних та аморфних БМН або магніточутливих структур.

Вперше в дисертаційній роботі пояснюється накопичення мікроорганізмів на поверхні пухлин та їх взаємодія з залізовмісними компонентами крові у кровотоці, що відбувається за рахунок сили магнітодипольної взаємодії між ендогенними частинками магнетиту пухлинних клітин та ендогенними частинками магнетиту мікроорганізмів [117], що має близький порядок величини до сил специфічного зв'язування антиген-антитіло, тому її важливо враховувати та використовувати при проектуванні систем для доставки лікарських форм.

Вперше показано, що як вектори для цільової доставки протипухлинних препаратів можуть використовуватися не тільки штучно магнітомічені вектори-мікроорганізми, але й мікроорганізми з природніми феримагнітними властивостями, що зробить метод цільової доставки препаратів надійнішим та ефективним і зменшить його дороговизну.

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК СИЛИ МАГНІТОДИПОЛЬНОЇ ВЗАЄМОДІЇ МІЖ БМН В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ТА ШТУЧНИМИ МАГНІТОКЕРОВАНИМИ НОСІЯМИ

В останні роки ведуться інтенсивні пошуки нових методів лікування онкологічних захворювань в області магнітних технологій. Так, зовнішні магнітні поля широкого діапазону частот та індукції застосовуються при протипухлинній терапії, як в процесах доставки магнітокерованої протипухлинної лікарської форми та гіпертермії, так і в якості самостійного протипухлинного агента [165, 166]. За останнє десятиліття виявлено, що ракові клітини містять у своєму складі значно більшу кількість магнітних наночастинок ендogenous походження, представлених у вигляді магнетиту (Fe_3O_4) або магеміту, ніж здорові клітини [49, 54]. І тому розкриття таких нових властивостей біосистеми, як структурні та магнітні властивості магнітовпорядкованої фази, є актуальною задачею нанобіомедицини і може бути використано для ранньої діагностики та лікування раку.

Одним з перспективних методів цільової доставки лікарських засобів є використання в якості «транспортів» - ліпосом, що являють собою ліпідні везикули і складаються з природних фосфоліпідів. Для магнітного керування доставки ліків перспективними є ліпосоми, що містять наночастки, тобто магнітоліпосоми дозволяють комбінувати діагностику і лікування, інкапсулюючи контрасні агенти для магнітно-резонансної томографії (МРТ) разом з ліками. Це новий клас наноконструкцій для цілеспрямованої доставки лікарських препаратів – цитостатиків [167]. Крім того, застосування магнітоліпосом також вирішує проблему розчинності і колоїдної стабільності наночастинок, які в іншому випадку коагулюють і формують агрегати в кровотоці [167].

5.1 Взаємодія наночастинок магнетиту та магніточутливих наноструктур з магнітними наночастинками пухлинних клітин

В розділі 1 показано, що у здорових і змінених патогенних клітин є магнітні наночастинки, що важливо враховувати при магнітоміченні. Відомо, що підвищений рівень БМН спостерігається при канцерогенезі молочної залози, яєчників, яєчка, меланоми, менінгіоми, гліобластоми, астроцитоми, гліоми, карциноми Ерліха (рис. 5.1) та при метастазуванні пухлин [49, 55].

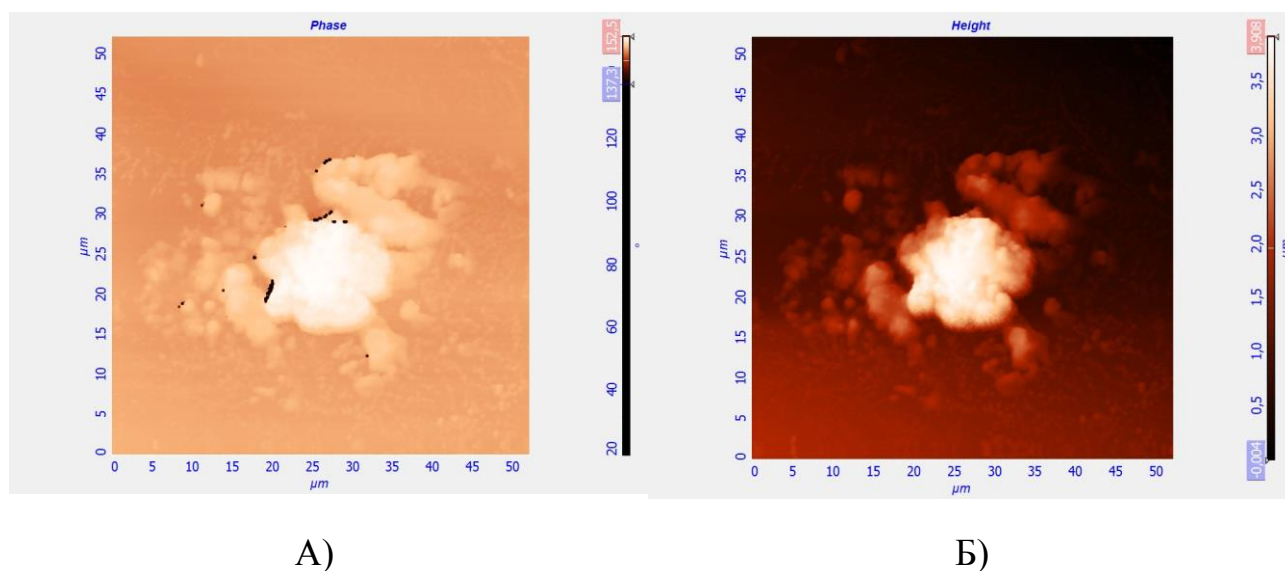


Рисунок 5.1 – АСМ та МСМ зображення клітин карциноми Ерліха, піддані впливу магнітного поля: а) АСМ – зображення, б) МСМ – зображення [168].

Отже мета розділу – показати, що сила магнітодипольної взаємодії між БМН в пухлинних клітинах та штучними магнітокерованими носіями перевищує або близька до типових сил зв'язування антиген-антитіло. Показано, що БМН локалізовані на мембрані [168]. Тому важливо розрахувати взаємодію між БМН в пухлинних клітинах та штучними магнітокерованими носіями і показати що вона буде близькою до типових сил специфічного зв'язування. Крім того, в дисертаційній роботі показано можливість взаємодії між бактеріальними векторами і пухлинними клітинами. Отже метою роботи є пояснення механізму захвату бактеріальних симбіонтів людини пухлинними клітинами, так як модифіковані бактерії використовуються для створення векторних систем.

В дисертаційній роботі проведена оцінка впливу сили магнітодипольної взаємодії ендогенних БМН в пухлинних клітинах з магнітоліпосомами при цільовій доставці ліків. Для цього розраховано силу магнітодипольної взаємодії ланцюжка ендогенних БМН в пухлинній клітині з ланцюжком штучних магнітних наночастинок в складі магнітоліпосом або природніх БМН у бактерій, також проведено порівняння з типовими силами специфічного і неспецифічного зв'язування пухлинних клітин та магнітокерованих лікарських форм.

5.2 Використання магнітоліпосом для доставки лікарської форми

Як вже зазначалося, ліпосоми – це везикули, що сформовані молекулами фосфоліпиду у воді та добре відомі своєю властивістю цілеспрямованої доставки лікарських препаратів – цитостатиків, до пухлинних тканин. Такі препарати доставляються або у внутрішньоліпосомній водній фазі, або у подвійному ліпідному шарі, залежно від співвідношення їх гідрофобності / гідрофільності [169].

В перше десятиліття XXI століття досягнуто успіх у розвитку нових напрямів, що основані на доставці лікарських засобів до пухлинних тканин за допомогою біоматеріалів та наночасток [170].

Як правило, для магнітокерованої доставки ліків в складі ліпосом, застосовуються суперпарамагнітні наночастинок оксиду заліза (СПНОЗ) [169, 171]. Перевагою використання СПНОЗ в складі лікарського носія є те, що вони проходять через судинну систему та можуть бути сконцентровані в будь-якому специфічному місці організму людини за допомогою магнітного поля. Наночастинок діаметром менше 100 нм можуть дифундувати через клітинну мембрану. Розмір, морфологія і зовнішнє навантаження – це три важливі параметри при виборі наноносія ЛФ, зокрема магнітоліпосоми, також враховують його поведінку в кровотоці, якщо препарат введено внутрішньовенно [169].

Співвідношення діаметра пор капілярів та розмірів ліпосоми — основа для зменшення накопичення їх у здорових тканинах, що зумовлює зниження токсичності ліпосомальних форм препаратів та підвищення їх концентрації у пухлинній тканині. Розмір ліпосоми більший, ніж пори в капілярах, тому вони менш накопичуються у здорових тканинах. Капіляри, що входять до пухлинної тканини, сильно перфоровані та розгалужені, тому, відбувається направлений транспорт хіміопрепаратів у пухлини з високим внутрішньопухлинним тиском. Це явище отримало назву «пасивне прицілювання» [169].

Підвищене накопичення ліпосом у пухлині є результатом тривалої циркуляції їх у крові, підвищеної проникності через капіляри пухлини та транспорту через клітинну мембрану шляхом ендоцитозу [172].

5.3 Використання бактеріальних векторів для доставки лікарської форми

В роботах [173] показано, що бактеріальні симбіонти людини локалізуються в пухлинних клітинах, які характеризуються гіпоксією, і виділяють гідролітичні ферменти в тому числі протеази і ліпази, для руйнування та споживання ракових клітин. При цьому механізм захвату бактеріальних симбіонтів не є повністю зрозумілим [173]. Розуміння механізму захвату бактеріальних симбіонтів людини пухлинними клітинами є дуже актуальною проблемою, так як модифіковані бактеріальні симбіонти використовуються для створення векторних систем доставки ліків в пухлинні клітини [174].

Відомо, що магніточутливі штами анаеробних бактерій (тобто такі, що здатні до біосинтезу БМН), наприклад *Clostridium novyi-NT*, використовуються як вектори проти специфічних пухлинних клітин, то цілком зрозуміло, що взаємодія між ними відбувається в тому числі за рахунок сили магнітодипольної взаємодії, що виникає між БМН пухлинних клітин, та ендogenousними БМН бактерій [117].

Застосування мікроорганізмів, здатних до синтезу БМН, є перспективним при розробці засобів біотерапії пухлин з високою інтенсивністю гліколітичного метаболізму та більшою кількістю гіпоксичних ділянок, притаманною властивістю яких є вищий вміст наночастинок магнетиту.

5.4 Розрахунок сили магнітодипольної взаємодії, що виникає між БМН в пухлинних клітинах та штучними магнітокерованими носіями

Так як ендогенні БМН в пухлинних клітинах локалізовані у вигляді довгих ланцюгів [55, 134, 175], і так як в більшості випадків екзогенні магнітні наночастки локалізовані теж у вигляді ланцюгів [176, 177] у складі лікарської форми, було розраховано силу взаємодії між ними. Незважаючи на те, що ендогенні та екзогенні наночастинки можуть мати дещо різні характерні розміри, для спрощення розрахунку було обрано модель однакових частинок.

Вихідні дані для розрахунку:

- Намагніченість магнетиту - $M_0 = 477$ од;
- Діаметр БМН в пухлині - 4×10^{-8} - 1×10^{-7} м;
- Діаметр БМН бактеріальних векторів - 1×10^{-8} - 5×10^{-8} м;
- Ширина мембрани - 1×10^{-8} м.

На рис. 5.2 зображено 2 ланцюга, що містять магнітні частинки пухлинної тканини та магнітоліпосоми. Частинки знаходяться на відстані l_0 один від одного та зміщені на відстань Δ і мають радіус r_0 .

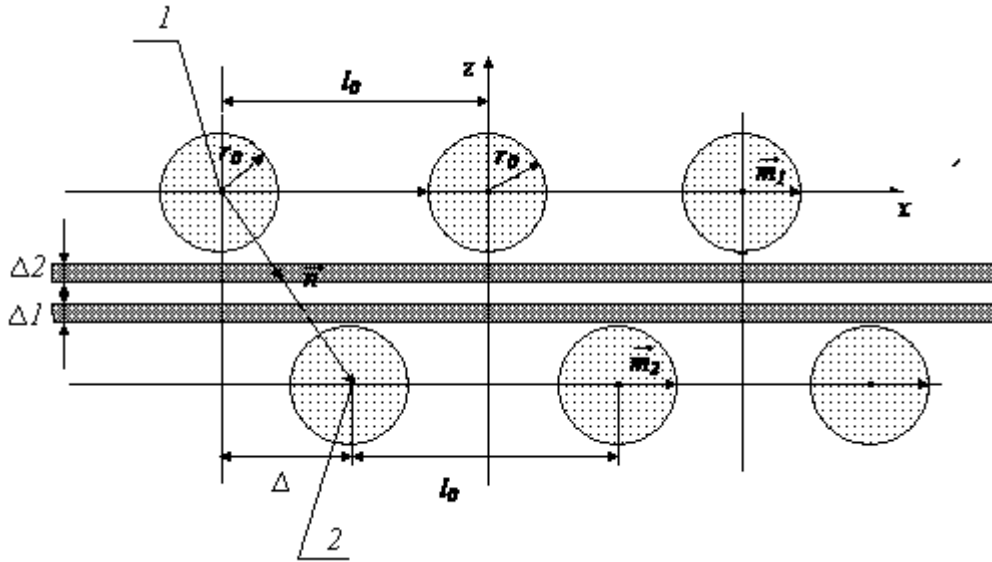


Рисунок 5.2 – Схематичне зображення взаємодії екзогенних частинок магнітоліпосоми та ендогенних частинок пухлини. 1- ендогенна магнітна наночастинка в пухлинних клітинах, 2- екзогенна магнітна наночастка магнітоліпосоми, Δ_1 – товщина мембрани магнітоліпосоми, Δ_2 - товщина мембрани пухлинної клітини, $\Delta = \Delta_1 + \Delta_2$

Введемо позначення згідно рис. 2:

$$x_2 = \Delta + l_0 n \text{ де } n = 0, \mp 1, \mp 2..$$

x_2 - x координата магнітної частинки 2-го ланцюга, y_2 , - y координата магнітної частинки 2-го ланцюга, z_2 - z координата магнітної частинки 2-го ланцюга,

$\vec{M}_1 = \vec{M}_2 = \vec{M}_0$, $\vec{n}_1 = (1,0,0)$, $\vec{n}_2 = (1,0,0)$, де M_0 – намагніченість магнітної частинки.

$$\vec{r} = (\Delta + x_2, y_2, z_2), |\vec{r}| = \sqrt{(\Delta + x_2)^2 + y_2^2 + z_2^2} \quad (1)$$

$$\vec{n} = \frac{\vec{r}}{r} = \left(\frac{\Delta + x_2}{\sqrt{(\Delta + x_2)^2 + y_2^2 + z_2^2}}, \frac{y_2}{\sqrt{(\Delta + x_2)^2 + y_2^2 + z_2^2}}, \frac{z_2}{\sqrt{(\Delta + x_2)^2 + y_2^2 + z_2^2}} \right). \quad (2)$$

Запишемо енергію магнітних частинок в другому ланцюгу з магнітним моментом \vec{m}_2 в магнітному полі, що створене магнітною частинкою першого ланцюга з магнітним моментом \vec{m}_1 :

$$U = -\vec{m}_2 \vec{H}_1 \quad (3)$$

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

З цього слідує:

$$U = - \left\{ \frac{3(\vec{m}_1 \vec{n}) (\vec{m}_2 \vec{n}) - \vec{m}_1 \vec{m}_2}{r^3} \right\} \quad (4)$$

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

$$\vec{F} = grad \left\{ \frac{3(\vec{m}_1 \vec{n}) (\vec{m}_2 \vec{n}) - \vec{m}_1 \vec{m}_2}{r^3} \right\}, \quad (5)$$

$$\text{де } |m_1| = |m_2| = M_0 \left(\frac{4}{3} \pi \cdot r_0^3 \right) \quad (6)$$

З формули (5) слідує:

$$\vec{F} = \left(\frac{4}{3} \pi \right)^2 r_0^6 M_0^2 grad \left\{ \frac{3(\vec{n}_1 \vec{n}) (\vec{n}_2 \vec{n}) - \vec{n}_1 \vec{n}_2}{r^3} \right\} \quad (7)$$

Звідки

$$\vec{F} = \left(\frac{4}{3} \pi \right)^2 r_0^6 M_0^2 grad \left\{ \frac{2x_2^2 - y_2^2 - z_2^2}{(x_2^2 + y_2^2 + z_2^2)^{5/2}} \right\} \quad (8)$$

$$\text{де } grad = \frac{\partial}{\partial x_2} \vec{e}_x + \frac{\partial}{\partial y_2} \vec{e}_y + \frac{\partial}{\partial z_2} \vec{e}_z \quad (9)$$

де $\vec{e}_x, \vec{e}_y, \vec{e}_z$ - орти декартової системи координат,

$$C_0 = \left(\frac{4}{3} \pi \right)^2 r_0^6 M_0^2 \quad (10)$$

$$F_x = C_0 \cdot \frac{\partial}{\partial x_2} \cdot \frac{2x_2^2 - y_2^2 - z_2^2}{(x_2^2 + y_2^2 + z_2^2)^{5/2}}, \quad (11)$$

$$F_y = C_0 \cdot \frac{\partial}{\partial y_2} \cdot \frac{2x_2^2 - y_2^2 - z_2^2}{(x_2^2 + y_2^2 + z_2^2)^{5/2}}, \quad (12)$$

$$F_z = C_0 \cdot \frac{\partial}{\partial z_2} \cdot \frac{2x_2^2 - y_2^2 - z_2^2}{(x_2^2 + y_2^2 + z_2^2)^{5/2}}. \quad (13)$$

Обезрозміримо відстань і введемо наступні позначення:

$$x = \frac{x_2}{r_0}, y = \frac{y_2}{r_0}, z = \frac{z_2}{r_0}, \frac{C_0}{r_0^4} \equiv C_1, C_1 = \frac{\left(\frac{4}{3} \pi \right)^2 r_0^6 \cdot M_0^2}{r_0^4} = \left(\frac{4}{3} \pi \right)^2 r_0^2 \cdot M_0^2, \quad (14)$$

$$\frac{\partial}{\partial x_2} = \frac{\partial}{r_0 \partial x}, \quad \frac{\partial}{\partial y_2} = \frac{\partial}{r_0 \partial y}, \quad \frac{\partial}{\partial z_2} = \frac{\partial}{r_0 \partial z}, \quad (15)$$

$$F_x = \frac{C_0}{r_0^4} \cdot \frac{\partial}{\partial x} \cdot \frac{2x^2 - y^2 - z^2}{(x^2 + y^2 + z^2)^{5/2}}, \quad (16)$$

$$F_y = \frac{C_0}{r_0^4} \cdot \frac{\partial}{\partial y} \cdot \frac{2x^2 - y^2 - z^2}{(x^2 + y^2 + z^2)^{5/2}}, \quad (17)$$

$$F_z = \frac{C_0}{r_0^4} \cdot \frac{\partial}{\partial z} \cdot \frac{2x^2 - y^2 - z^2}{(x^2 + y^2 + z^2)^{5/2}}. \quad (18)$$

Тоді можна записати силу взаємодії ендогенних наночастинок пухлинної тканини з екзогенними наночастинок магнітоліпосоми у вигляді

$$F_x = C_1 \cdot \frac{\partial}{\partial x} \cdot \frac{2x^2 - y^2 - z^2}{(x^2 + y^2 + z^2)^{5/2}}. \quad (21)$$

Векторна сила взаємодії всіх частинок ланцюга має вигляд:

$$\vec{F}_{\text{sum}} = \sum_{n=-N}^N \vec{F}_n, \quad (22)$$

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

В результаті отримуємо:

$$F_{x\text{sum}} = \sum_{n=-N}^N F_{x_n}, \quad (23)$$

$$F_{y\text{sum}} = \sum_{n=-N}^N F_{y_n}, \quad (24)$$

$$F_{z\text{sum}} = \sum_{n=-N}^N F_{z_n}. \quad (25)$$

Сила взаємодії однієї частинки 1-го ланцюга з $(2N+1)$ частинкою сусідом 2-го ланцюга приблизно дорівнює силі взаємодії однієї частинки 1-го ланцюга з 2-м ланцюгом:

$$F_{z\text{sum}} = C_1 \sum_{n=-N}^N \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{2x^2 - y^2 - z^2}{(x^2 + y^2 + z^2)^{5/2}} \right) = C_1 \sum_{n=-N}^N \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{2\left(\frac{\Delta}{r_0} + l_0 n\right)^2 - y^2 - z^2}{\left(\left(\frac{\Delta}{r_0} + l_0 n\right)^2 + y^2 + z^2\right)^{5/2}} \right), \quad (26)$$

$$\text{де } (F_{\text{повне}})_z = N_{\text{часток}} \cdot F_{z\text{sum}} - \text{ сила взаємодії двох ланцюгів}, \quad (27)$$

$N_{\text{часток}}$ – число частинок в 1 – му ланцюзі,

$$(F_{\text{повне}})_z = N_{\text{часток}} C_1, \quad (28)$$

$$(F_{\text{повне}})_z = N_{\text{часток}} C_1 \sum_{n=-N}^N \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{2\left(\frac{\Delta}{r_0} + l_0 n\right)^2 - y^2 - z^2}{\left(\left(\frac{\Delta}{r_0} + l_0 n\right)^2 + y^2 + z^2\right)^{5/2}} \right), \quad (29)$$

$$\text{де } C_1 = \left(\frac{4}{3} \pi r_0 \right)^2 M_0^2, \quad (30)$$

$M_0 = 477$ од. намагніченості для магнетиту.

В результаті розрахунку отримано силу, яка дорівнює приблизно 10^{-9} Н, яка має близький порядок величини з силами специфічного зв'язування, наведених в роботах [47, 175, 176], і навіть дещо перевищує сили специфічного зв'язування.

Далі наводяться графіки залежності розрахованої сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів від розміру та кількості БМН (рис. 5.3).

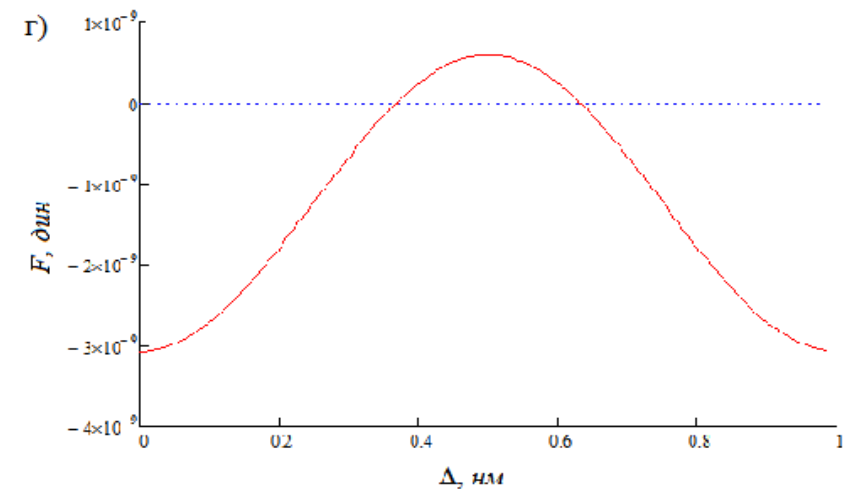
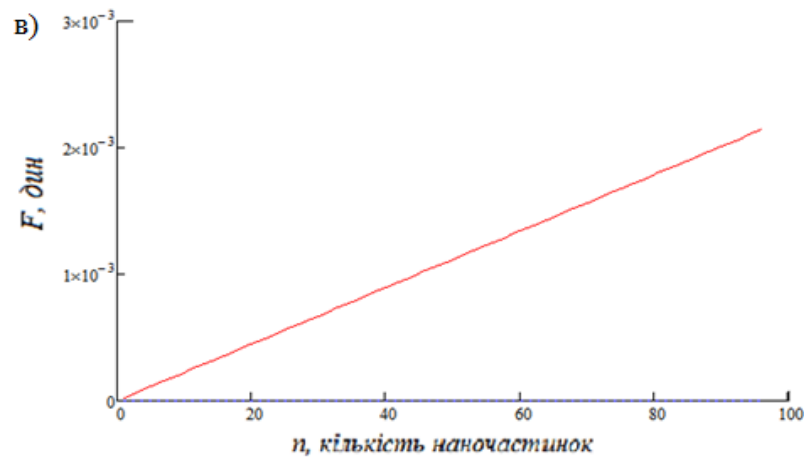
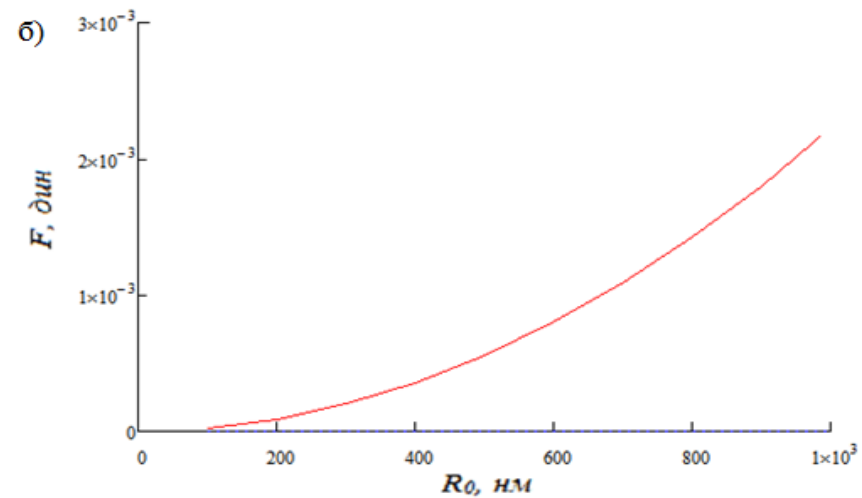
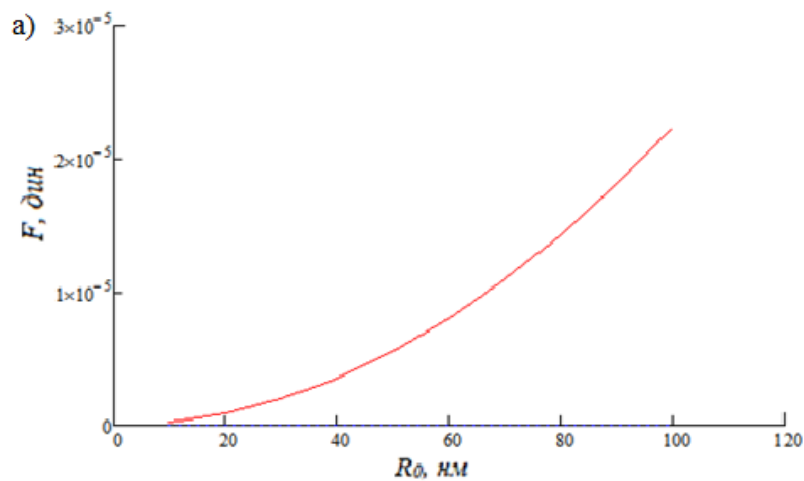


Рисунок 5.3 – Графіки залежності сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів від: а) радіусу наночастинок (10-100 нм); б) (100-1000 нм); в) кількості наночастинок; г) відстані зсуву наночастинок 2-го ланцюга відносно 1-го 1 дин. = 10^{-5} Н.

5.5 Сила, що виникає між наночастинками та біоб'єктом

Сили взаємодії між біологічними молекулами, такими як антигени і антитіла відіграють важливу роль в багатьох біологічних процесах [178, 179]. Як правило, пухлинні тканини мають поверхневі антигени, що відрізняються від антигенів нормальних однотипових клітин. Тому магнітокеровані носії ліків, що функціоналізовані антитілами проти таких антигенів, зв'язуються з пухлинними клітинами, і не зв'язуються з нормальними. Крім того поверхня магнітоліпосоми може бути додатково кон'югована з антитілами, що дає змогу досягати десятикратного підвищення їх афінності до пухлинних клітин.

Динаміка зв'язування магнітоліпосом з пухлинними клітинами та ефективність їх розпізнавання при цільовій доставці ліків багато в чому визначається фізичною силою взаємодії антиген-антитіло [180]. Наприклад, в міжмолекулярній силі адгезії антиген-антитіло для початку імунної відповіді системи відбувається розпізнавання молекул і їх зв'язування одна з одною [179].

В основі взаємодії антиген-антитіло лежать ті ж закони термодинаміки, що і в основі будь-якої зворотньої бімолекулярної реакції зв'язування. Відомо, що і сили, що утримують разом антиген і антитіло є подібними до сил, що беруть участь в неспецифічних взаємодіях між будь-якими макромолекулами [181]. При взаємодії специфічних антитіл з антигеном між амінокислотними залишками антигензв'язуючого центру (паратопа) антитіла і антигенною детермінантою (епітопом) антигену утворюються численні нековалентні зв'язки:

1. **Електростатичні сили**, обумовлені притяганням між двома протилежно зарядженими іонізованими групами. Така сила має порядок величини $8 \cdot 10^{-8} \text{Н}$ [179].

2. **Водневі зв'язки**, утворені між гідрофільними групами. Водневі зв'язки дещо слабкі, оскільки вони мають електростатичну природу.

3. **Гідрофобні взаємодії** між неполярними гідрофобними групами, що забезпечують за деякими оцінками до 50% спорідненості між антитілом і антигеном.

4. **Вандерваальсові сили**, що виникають в результаті взаємодії зовнішніх електронних хмар. До цих сил відноситься взаємодія між диполями. Ці взаємодії в основному визначають силу, що відповідає за формування просторової структури біологічних молекул, яка має порядок величини $10^{-8} - 10^{-9}$ Н [182].

Всі ці сили зростають при зменшенні відстані між молекулами антигену та антитіла, бо сили молекулярної взаємодії залежать від відстані між молекулами [183]. Так, на відстанях, що перевищують 2-3 діаметра молекул, діють сили притягання. По мірі зменшення відстані між молекулами сила притягання спочатку збільшується, а потім починає зменшуватися і досягає нуля, коли відстань між двома молекулами стає рівною сумі двох радіусів молекул. При подальшому зменшенні відстані електронні оболонки атомів починають перекриватися, і між молекулами виникають сили відштовхування (рис. 5.4) [184].

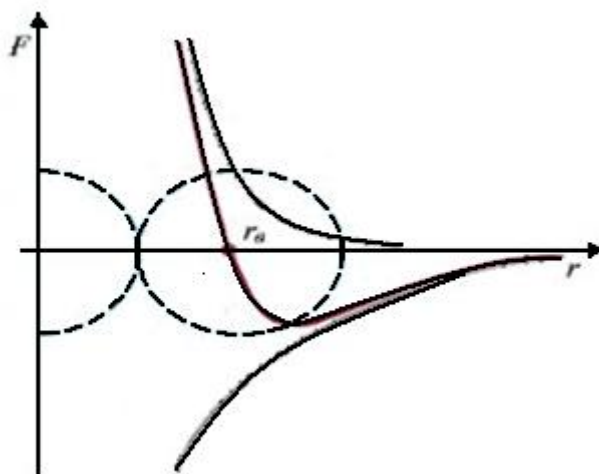


Рисунок 5.4 – Типова залежність сили взаємодії антиген-антитіло від відстані між молекулами, де r_0 - середня відстань між частинками.

Встановлено, що сили взаємодії молекул зворотно пропорційні n-й степені відстані r між центрами мас молекул, де n , як правило, знаходиться в

діапазоні від 7 до 12. Існує така відстань між молекулами, на якому сила притягання дорівнює силі відштовхування, тобто їх результуюча сила дорівнює нулю. Якщо відстань між молекулами $r > r_0$, переважають сили їх взаємного притягання, якщо ж $r < r_0$, переважають сили відштовхування. Таким чином, результуюча сила молекулярної взаємодії на великих відстанях є силою притягання, а на малих - силою відштовхування [183].

Відомо, що сила специфічної взаємодії між молекулами антиген-антитіло становить близько $(1 \div 3) \cdot 10^{-10}$ Н [185, 186].

Висновки до розділу 5

На основі проведених в дисертаційній роботі досліджень можна сказати, що практично серед всіх розглянутих бактеріальних симбіонтів людини є штами, які можуть біомінералізувати кристалічні або аморфні БМН. Підтверджено біоінформаційні дослідження попереднього розділу, що білок *matA* та його близькі гомологи в бактеріальних симбіонтах людини відповідають за синтез (формування) кристалічної структури БМН.

Вперше показано, що для цільової доставки протипухлинних препаратів в якості векторів можуть використовуватися не тільки штучно магнітомічені вектори-мікроорганізми, але й мікроорганізми з природніми феримагнітними властивостями, що зробить метод цільової доставки препаратів надійнішим та ефективним і зменшить його дороговизну.

В дисертаційній роботі пояснюється накопичення мікроорганізмів на поверхні пухлин, що відбувається за рахунок сили магнітодипольної взаємодії між ендогенними частинками магнетиту пухлинних клітин та ендогенними частинками магнетиту мікроорганізмів, що має близький порядок величини до сил специфічного зв'язування антиген-антитіло, тому її важливо враховувати та використовувати при проектуванні систем для доставки лікарських форм. Ця сила є фактично додатковою силою специфічного зв'язування - «пасивного прицілювання» при цільовій доставці ліків. Так як сила магнітодипольної взаємодії є далекодіючою (спадає з

відстанню як $1/R^4$), то на великих відстанях вона буде основною силою взаємодії і при $\Delta = l^2/2$ (рис.2) сила є максимальною в порівнянні зі специфічною взаємодією антиген-антитіло, яка спадає з відстанню як $1/R^7 - 1/R^{12}$.

6 ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ МАГНІТОМІЧЕНОГО БІОСОРБЕНТУ ПРИ МГДП У ЗОВНІШНІХ ЕЛЕКТРИЧНОМУ І МАГНІТНОМУ ПОЛЯХ

В попередніх розділах розглянуто спектр мікроорганізмів, які використовуються як вектори для цільової доставки лікарських препаратів в орган-мішень, які здатні до біомінералізації БМН. Також показано, що природніх магнітних властивостей достатньо для взаємодії БМН таких мікроорганізмів з БМН пухлинних клітин. Але в тому випадку, коли вигідніше використовувати мікроорганізми, які не мають природніх магнітних властивостей, необхідно розробляти новий спосіб магнітного мічення клітин, так як існуючі методи мають ряд недоліків, які були розглянуті в першому розділі.

В дисертаційній роботі розроблено новий спосіб магнітного мічення біооб'єктів та перевірено його ефективність на дріжджах *S. cerevisiae*, які не мають природніх магнітних властивостей, але широко використовуються для вилучення з водних розчинів іонів важких металів, барвників тощо і є ефективним біосорбентом.

В даному розділі пропонується розглянути новий сучасний напрямок використання магнітокерованих носіїв (мікроорганізмів), яким надаються магнітні властивості штучно.

6.1 Виготовлення магнітоміченого біосорбенту при його модифікації у зовнішніх електричному і магнітному полях

В даній роботі використовували метод отримання магнітоміченого біосорбенту на основі дріжджів *S. cerevisiae* та наночастинок магнетиту методом МГДП в схрещених магнітному та електричному полях з визначенням оптимального часу перемішування, при якому не руйнується клітинна стінка дріжджів та не відбувається процес сорбції-десорбції

магнітних наночастинок, які використовуються для надання біосорбенту магнітних властивостей.

Магнітокерований біосорбент готували згідно методики, що описана в розділі 2 дисертаційної роботи.

В цьому методі використовують установку (розділ 2), що дозволяє змінювати швидкість потоку рідини в залежності від величини зовнішнього постійного магнітного поля, величини електричного поля, рН середовища, напрямку електричного поля відносно зовнішнього постійного магнітного поля. Конструкція установки дозволяє змінювати величину зовнішнього магнітного поля в інтервалі від 0 до 320 кА/м, величину електричного струму в інтервалі від 0,01 до 29,9А. МГДП в схрещених електричному і магнітному полях проводили в циліндричній кюветі з поміщеними в неї двома металевими електродами: один – по центру, діаметром 4 мм, що закріплений за допомогою тримача, а другий – біля стінок кювети, довжиною 20 см. Коли силові лінії прикладеного зовнішнього однорідного магнітного поля паралельні осі циліндрів і перпендикулярні до вектору густини струму в розчині, то сила Лоренца діє на струм і рідина в резервуарі починає обертатися, і таким чином відбувається МГДП в схрещених електричному і магнітному полях.

На відміну від вищеописаного МГДП у схрещених зовнішніх електричному та магнітному полях багатовихрове МГДП характеризується тим, що електричний струм в робочому розчині (а відповідно і електричне поле) створюються спонтанно при перебігу електрохімічних реакцій на поверхні феромагнітних елементів (наприклад, сталевих стрижнів), як це було показано в роботі [113]. Але для обох видів МГДП: багатовихрового і в схрещених зовнішніх електричному і магнітному полях спостерігається збільшення швидкості робочого розчину при збільшенні напруженості зовнішнього магнітного поля. Дійсно, при збільшенні напруженості зовнішнього магнітного поля зростає сила Лоренца, яка діє на одиницю об'єму робочого розчину при протіканні у ньому електричного струму

напрямку не колінарного до напрямку прикладеного зовнішнього магнітного поля. Тобто обидва види МГДП мають однакову фізичну природу. При цьому ступінь вилучення катіонів міді в процесі біосорбції магнітокерованим біосорбентом залежить від напруженості магнітного поля, яке прикладалося при МГДП в процесі створення комплексів магнітні мітки-дріжджові клітини.

Розроблено технологічну схему (рис. 6.1) отримання магнітоміченого біосорбенту та визначено основні технологічні параметри.



Рисунок 6.1 – Технологічна схема отримання магнітоміченого біосорбенту

Перемішування дріжджів *S. cerevisiae* з наночастинками магнетиту здійснювали під дією магнітного поля, напруженістю 240 кА/м, так як з подальшим збільшенням напруженості зовнішнього магнітного поля ступінь вилучення катіонів міді збільшується не значно (рис. 6.2). Тому з точки зору сорбційних характеристик, оптимальним значенням напруженості магнітного поля при багатовихровому МГДП дріжджів з магнітними мітками буде $H_0=240$ кА/м.

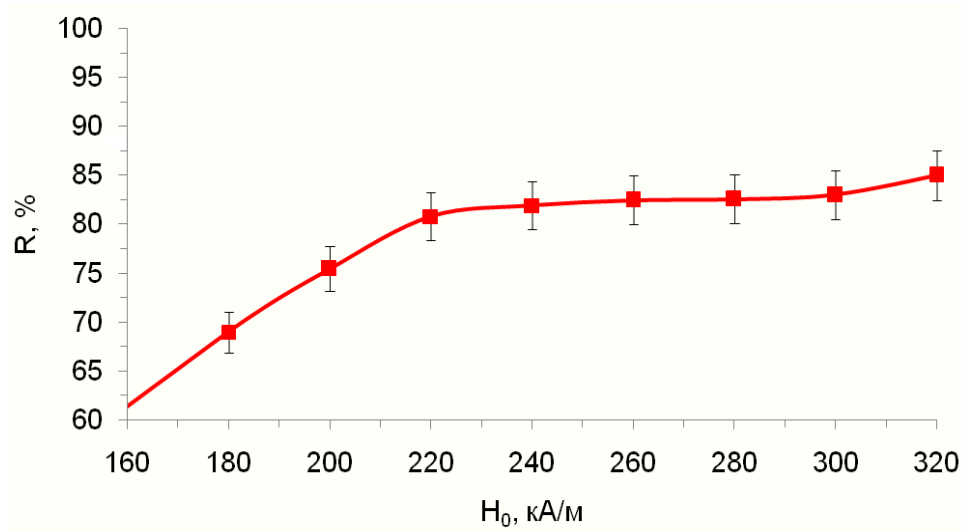


Рисунок 6.2 – Ступінь вилучення (R) катіонів міді магнітоміченими дріжджами в залежності від H_0 багатовихрового МГДП дріжджів і магнітних міток

Силу струму в пристрої для МГДП в схрещених електричному і магнітному полях регулювали в межах 2-3 мА для забезпечення такої швидкості перемішування, яка спостерігалась при багатовихровому МГДП. Перемішування проводили при 2, 4, 6, 8, 10, 30 хвилин, бо при такому часі перемішування змінюється морфологія поверхні дріжджової клітини від гладкої до розгалуженої. Циліндричну кювету поміщали між наконечниками постійного магніту.

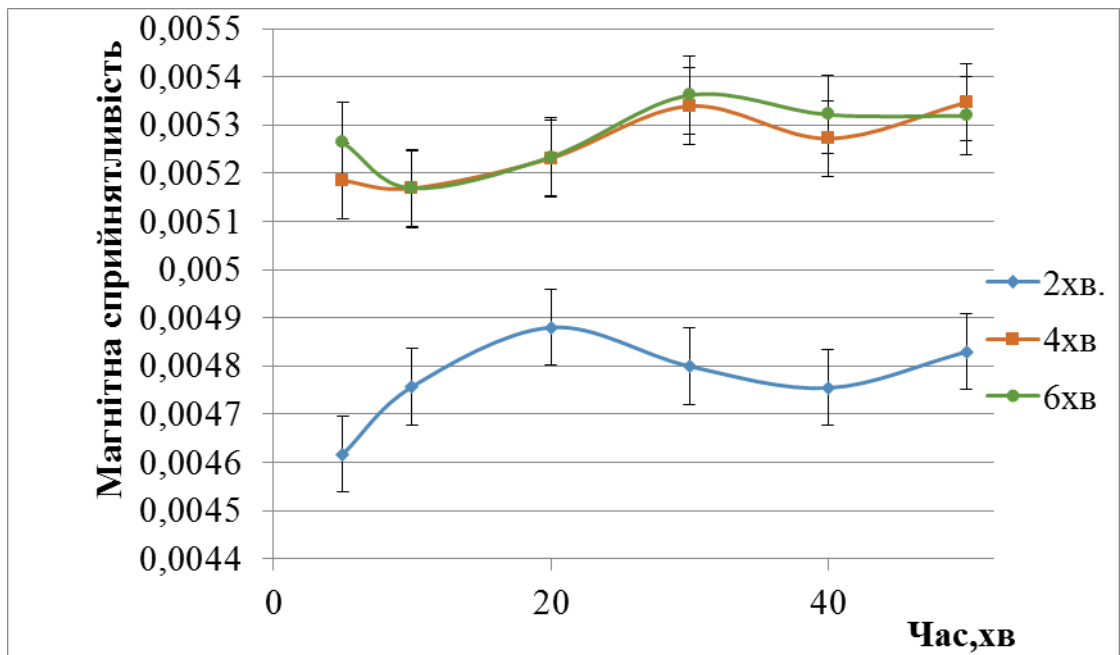
При таких параметрах МГДП в схрещених електричному і магнітному полях відбувався процес створення комплексів – магнітні наномітки-дріжджова клітина. Після цього отриманий біосорбент піддавався фракціонуванню [108]. В якості феромагнітних насадок для вилучення у швидкісному режимі відпрацьованого (тобто по завершенню процесу біосорбції іонів важких металів) магнітоміченого біосорбенту магнітним сепаратором використовувувались сталеві нікельовані сітки з розміром комірок 0,5 мм [5].

6.2 Визначення оптимального часу перемішування сорбенту

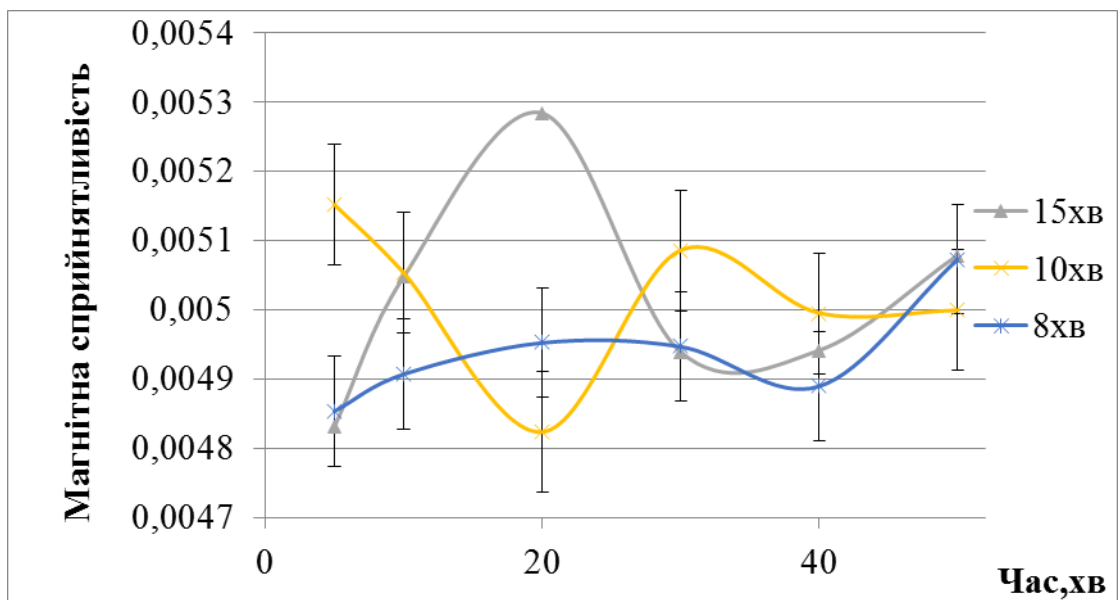
Після отримання магнітоміченого біосорбенту вищеописаним методом перевіряли стійкість магнітної сприйнятливості біосорбенту для встановлення оптимального часу перемішування при отриманні магнітоміченого біосорбенту. Для цього було проведено імітацію біосорбції для дослідження стабільності магнітної сприйнятливості ММБС, що описаний в розділі 2.

Побудовано графік залежності магнітної сприйнятливості розчину після відтворення процесу біосорбції магнітоміченого біосорбенту від часу перемішування в МГДП-мішалці, тобто від часу отримання магнітокерowanego біосорбенту при МГДП (рис. 6.3а, б).

З рис. 6.3 а,б видно, що оптимальний час для отримання магнітоміченого біосорбенту методом МГДП в схрещених електричному та магнітному полях складає 4-6 хвилин, так як такий біосорбент має максимальну магнітну сприйнятливість та є найбільш стабільним, і зміна магнітної сприйнятливості в процесі механічного перемішування при відтворенні процесу біосорбції іонів важких металів знаходиться в межах похибки. Двох хвилин МГДП для приготування магнітоміченого біосорбенту недостатньо для приєднання магнітних міток до клітинної стінки біосорбенту і для проникнення магнітних наночастинок в периплазматичну область клітинної стінки дріжджів.



а)



б)

а) при 2, 4, 6 хвилинах перемішування; б) при 8, 10, 15 хвилинах перемішування

Рисунок 6.3 – Залежність магнітної сприйнятливості відфільтрованого розчину від часу перемішування біосорбенту, виготовленого методом МГДП

А при 8 і 10 хвилинах, відбувається процес руйнування клітинної стінки, при якому наночастинки магнетиту десорбуються в розчин, магнітна сприйнятливості біосорбенту і отриманий біосорбент є нестабільними.

Також для визначення стійкості магнітоміченого біосорбенту, виготовленого методом багатовихрового МГДП дріжджів *S. cerevisiae* з наночастинками магнетиту проводилася імітація сорбція іонів важких металів тобто (без додавання в розчин іонів міді), упродовж 1 години при рН=5,5 при механічному перемішуванні 180 об/хв. Вихідна концентрація іонів міді в розчині - 0 мг/л, концентрація біосорбенту - 2 г/л, кількість магнітної рідини – 0,67 мл на 100мл розчину. Так як попередні дослідження показали, що оптимальний час перемішування для отримання магнітоміченого біосорбенту на основі дріжджів *S. cerevisiae*, виготовленого методом багатовихрового МГДП не може перевищувати 10 хвилин, то виготовлення магнітоміченого біосорбенту методом багатовихрового МГДП відбувалося упродовж 2, 4, 6, 10, 15 хвилин. Час відбору проб – 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 хвилин. Проби пропускалися через фільтр «біла стрічка» та проводилося визначення кількості частинок наночастинок магнетиту за методикою визначення міді в розчині з аміаком.

З рис. 6.4 видно, що оптимальний час для отримання магнітоміченого біосорбенту методом багатовихрового МГДП складає 2-6 хвилин, так як такий біосорбент є найбільш стабільним і десорбція магнітних наноміток в процесі механічного перемішування знаходиться в межах похибки. Але, як показали дослідження даної роботи 2-х хвилин приготування магнітоміченого біосорбенту недостатньо для проникнення магнітних наночастинок в периплазматичну область клітинної стінки дріжджів, а при 8 і 10 хвилинах, відбувається процес руйнування клітинної стінки, при якому відбувається процес десорбції наночастинок магнетиту в розчин, і отриманий біосорбент є нестабільним.

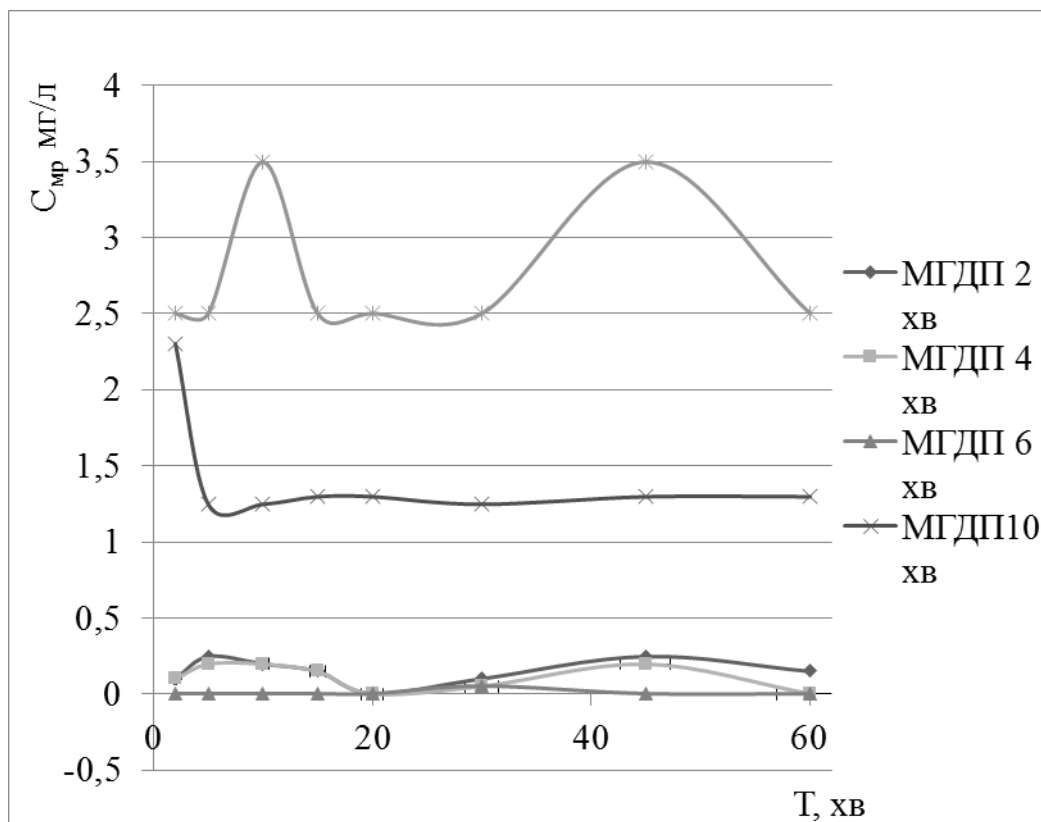
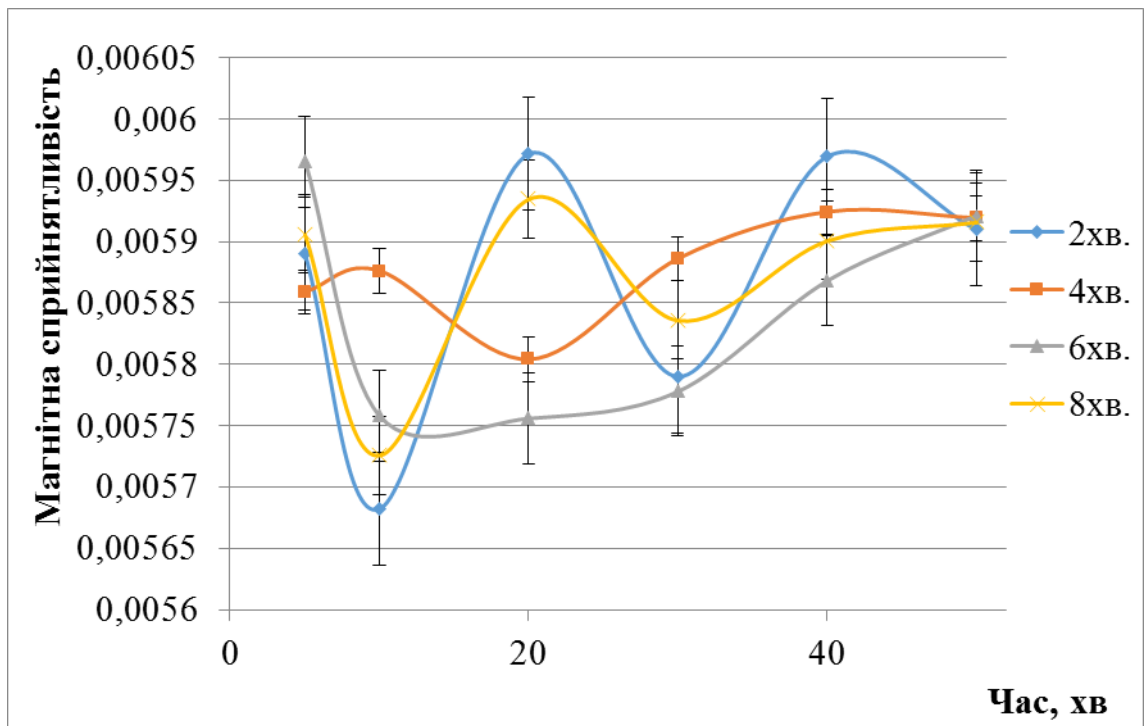
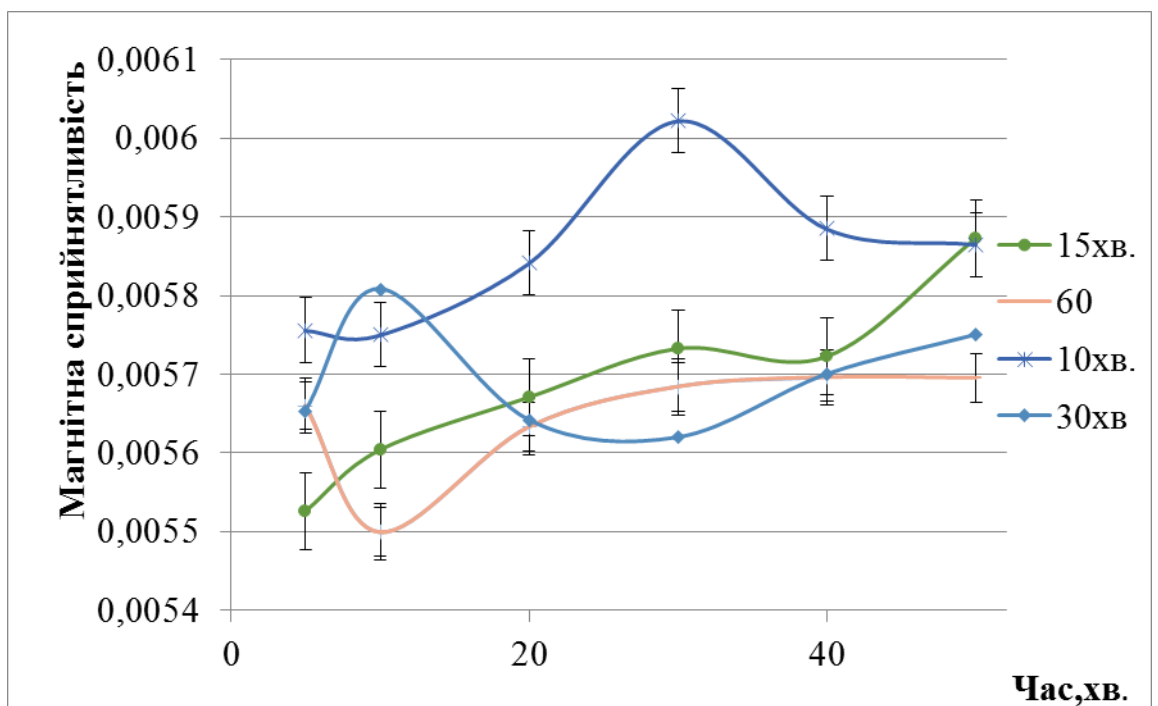


Рисунок 6.4 – Порівняльний графік залежності концентрації ($C_{\text{мр}}$ мг/л) наночастинок магнетиту в розчині від тривалості сорбції (T , хв) біосорбенту приготовленого при МГДП упродовж 2, 4, 6, 10, 15 хвилин.

Також було визначено стабільність біосорбенту, виготовленого при механічному перемішуванні при 2, 4, 6, 8, 10, 30, 60 хвилинах при вищенаведених параметрах. Було побудовано графік залежності магнітної сприйнятливості розчину магнітних міток від часу перемішування (рис. 6.5а та 6.5б).



a)



а) при 2, 4, 6, 8 хвилинах перемішування; б) при 10, 15, 30, 60 хвилинах перемішування.

Рисунок 6.5 – Залежність магнітної сприйнятливості відфільтрованого розчину від часу перемішування магнітоміченого біосорбенту, виготовленого методом механічного перемішування

З рис. 6.5 а та 6.5 б видно, що похибка магнітної сприйнятливості відфільтрованого розчину, виготовленого методом механічного перемішування становить 8%, і не спостерігається ніякої закономірності у зміні магнітної сприйнятливості, а при МГДП ця похибка складає 3% при 4-6 хвилинах перемішування і 8% при 8-10 хвилинах приготування біосорбенту. При виготовленні біосорбенту методом МГДП, магнітна сприйнятливість на 30% більша, ніж при механічному перемішуванні. Отже, можна сказати, що біосорбент виготовлений методом механічного перемішування має меншу магнітну сприйнятливість та є нестабільним.

Як зазначалося вище, локалізація магнітних наночастинок на поверхні клітини призводить до зменшення кількості активних сайтів зв'язування іонів важких металів та можливої десорбції наночастинок з поверхні клітин.

Для підтвердження цих даних була виміряна магнітна сприйнятливість біосорбентів, виготовлених методом МГДП при 2, 4, 6, 8, 10, 30 хвилинах перемішування. Результати наведені на рис. 6.6.

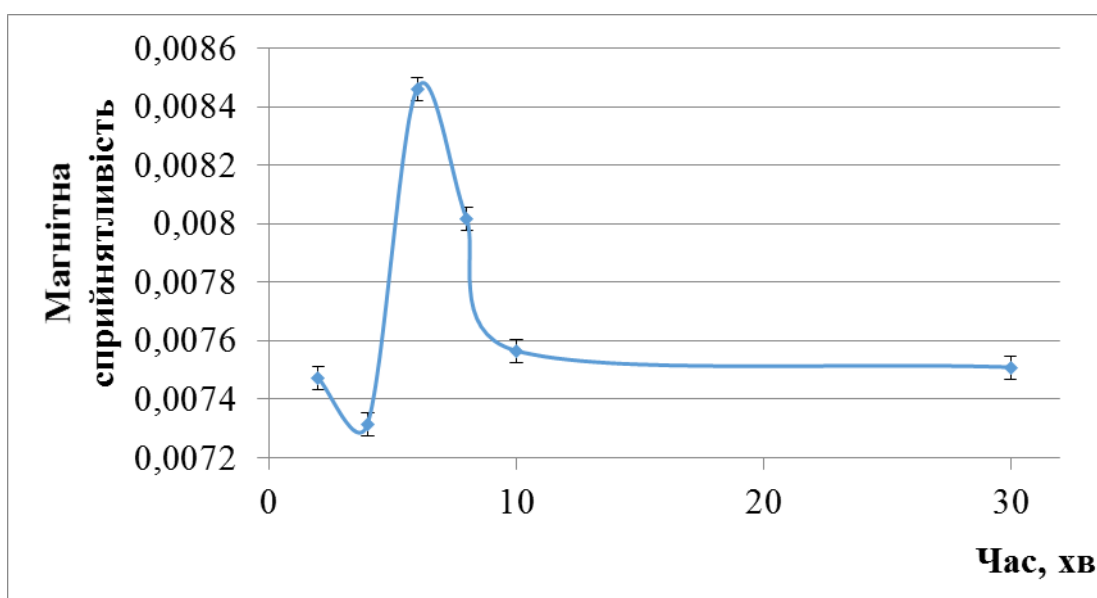
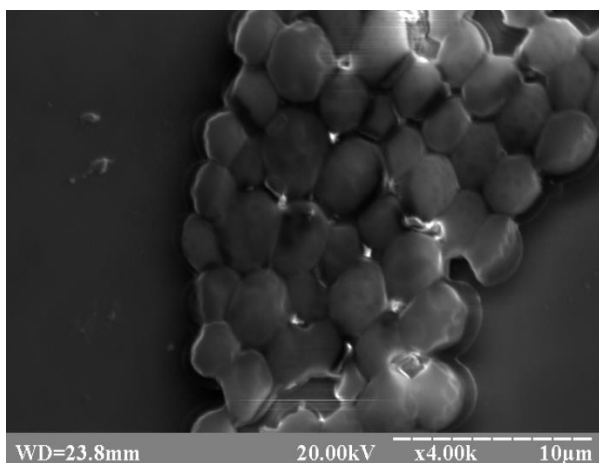
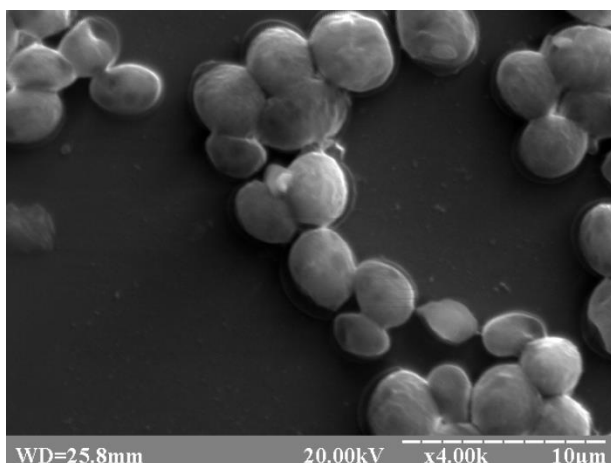


Рисунок 6.6 – Динаміка зміни магнітної сприйнятливості магнітокерованих біосорбентів на основі дріжджів *S. cerevisiae*, виготовлених методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях

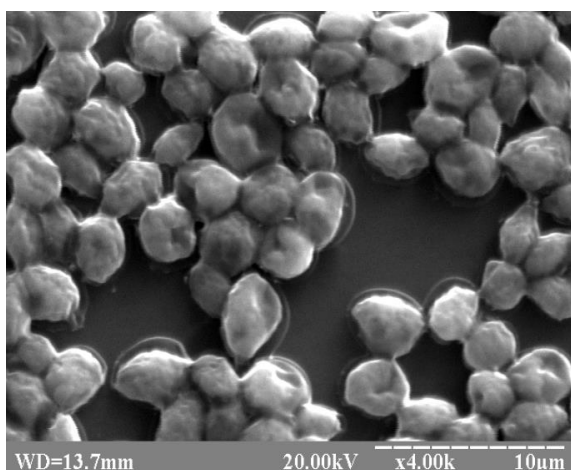
Зниження магнітної сприйнятливості біосорбенту спостерігається на 8 хвилині його перемішування, що говорить про те, що при такому часі приготування біосорбенту при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях втрачається стійкість його магнітних властивостей. Тобто після 6-7 хвилин перемішування біосорбенту змінюється морфологія клітин (рис. 6.7).



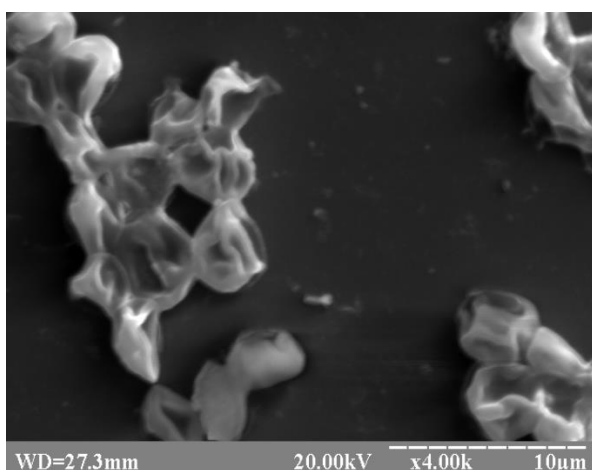
а) нативні



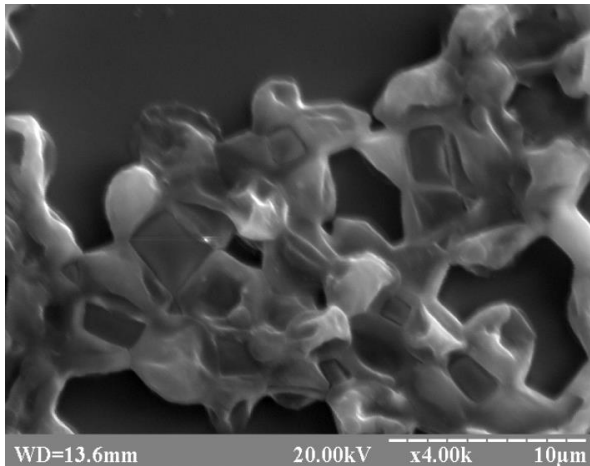
б) 6 хвилин



в) 7 хвилин



г) 8 хвилин



д) 15 хвилин

Рисунок 6.7 – Електронно-мікроскопічне зображення клітини ММБС, отриманих методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях при різному часі перемішування

При виготовленні ММБС методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях, після 8-ї хвилини імітації сорбції методом механічного перемішування відбувається процес руйнування клітинної стінки, так як наночастинки магнетиту не тільки десорбуються в розчин з поверхні біосорбенту, а й потрапляють у розчин з периплазматичної області дріжджів.

З рис. 6.7 видно, що клітини ММБС, отриманого при 6 хвилинах перемішування методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях, мають чітку форму та розміри, і практично не відрізняються від морфології нативних клітин дріжджів, а при 15 хвилинах перемішування морфологія клітин значно змінюється.

Таким чином оптимальний час для отримання магнітоміченого біосорбенту методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях, з точки зору стабільності магнітних властивостей, складає 6 хвилин, так як такий біосорбент є найбільш стабільним і десорбція магнітних наноміток в процесі механічного перемішування (імітації сорбції іонів міді) знаходиться в межах похибки.

6.3 Дослідження сорбційної здатності магнітоміченого біосорбенту залежно від рН та величини електричного поля

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

Модифікація біосорбенту відбувалось під дією МП, напруженістю 240кА/м, так як вже зазначалося в розділі 4, що подальше збільшення напруженості зовнішнього магнітного поля практично не впливає на ступінь вилучення катіонів міді (рис. 6.2). Готували магнітокерований біосорбент на основі дріжджів та проводили біосорбцію катіонів міді по методиці, що описана в розділі 2.

Досліджували сорбційну здатність магнітоміченого біосорбенту, виготовленого при рН = 2,5 (рис. 6.8); рН = 3 (рис. 6.9); рН = 4 (рис.6.10) та величини електричного поля від 0,3 до 0,7 В.

Проведені дослідження показали, що при рН = 2,5 (рис. 6.8) максимальне вилучення катіонів міді відбувається вже через 10 хвилин, на відміну від рН=3 (рис. 6.9) та рН =4 (рис. 6.10), тобто при збільшенні рН необхідно збільшувати час перемішування магнітоміченого біосорбенту з середовищем, що очищується.

Як видно з рис. 6.8 – 6.10 максимальна сорбційна здатність магнітоміченого біосорбенту спостерігається при $U=0,5$ В та рН = 2,5, що говорить про те, що таке значення рН є оптимальним для виготовлення магнітоміченого біосорбенту.

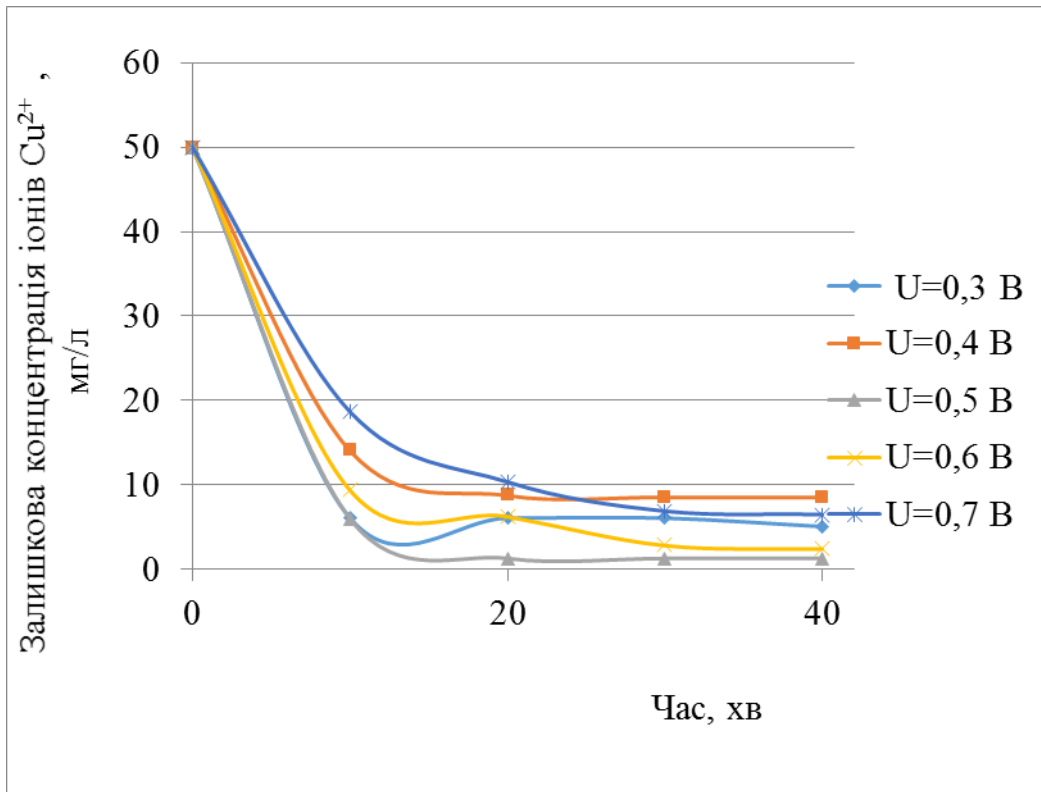


Рисунок 6.8 – Ступінь вилучення іонів купруму модифікованим магнітокерваним біосорбентом, виготовленого методом МГДП в схрещених магнітному та електричному полях при рН=2,5

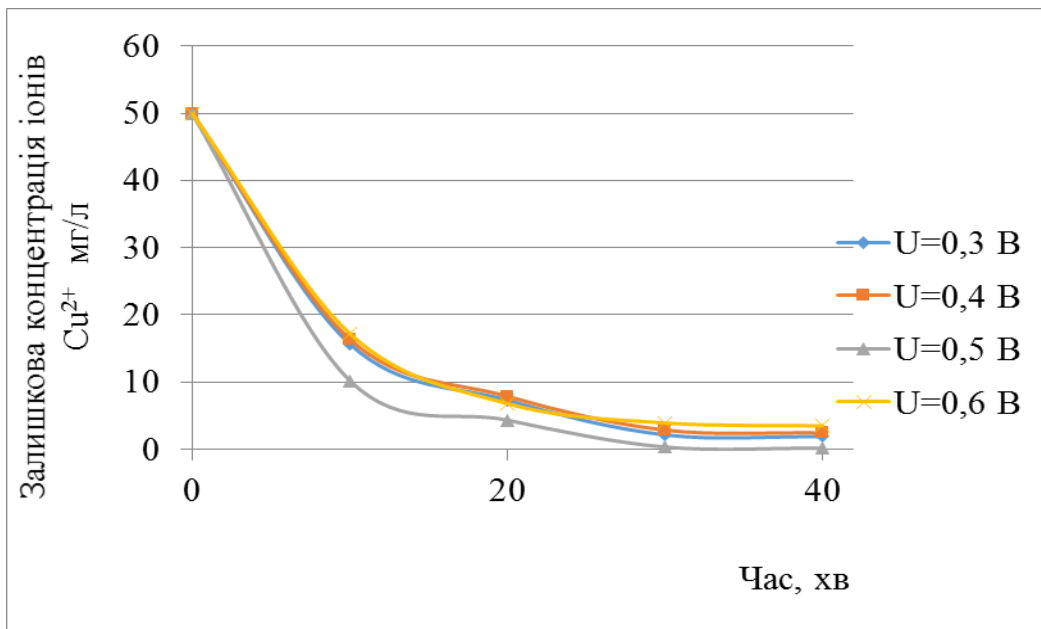


Рисунок 6.9 – Ступінь вилучення іонів купруму модифікованим магнітокерваним біосорбентом, виготовленого методом МГДП в схрещених магнітному та електричному полях при рН=3

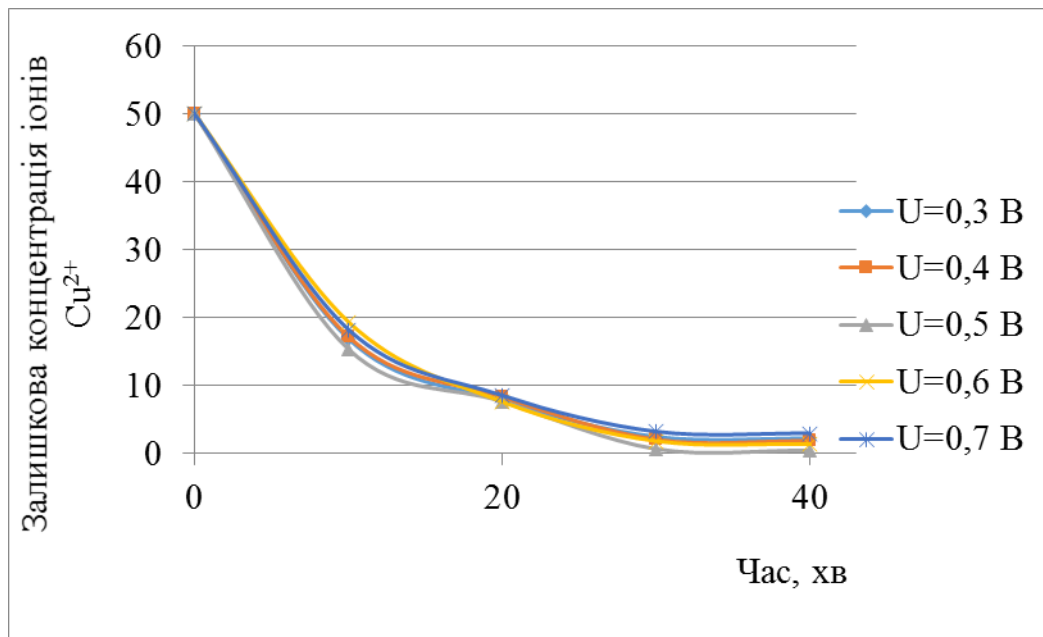


Рисунок 6.10 – Ступінь вилучення іонів купруму модифікованим магнітокерваним біосорбентом, виготовленого методом МГДП в схрещених магнітному та електричному полях при рН=4

6.4 Дослідження сорбційної ємності магнітоміченого біосорбенту залежно від співвідношення маси магнітних наночастинок до маси біосорбенту

Також в даній роботі було досліджено ступінь вилучення катіонів міді магнітокерваним біосорбентом в залежності від співвідношення маси магнітних наночастинок до маси біосорбенту у діапазоні відношення маси магнітних міток до маси біосорбенту на основі дріжджів *S. cerevisiae* $m_m / m_{др} = 1-10\%$ (рис. 6.11).

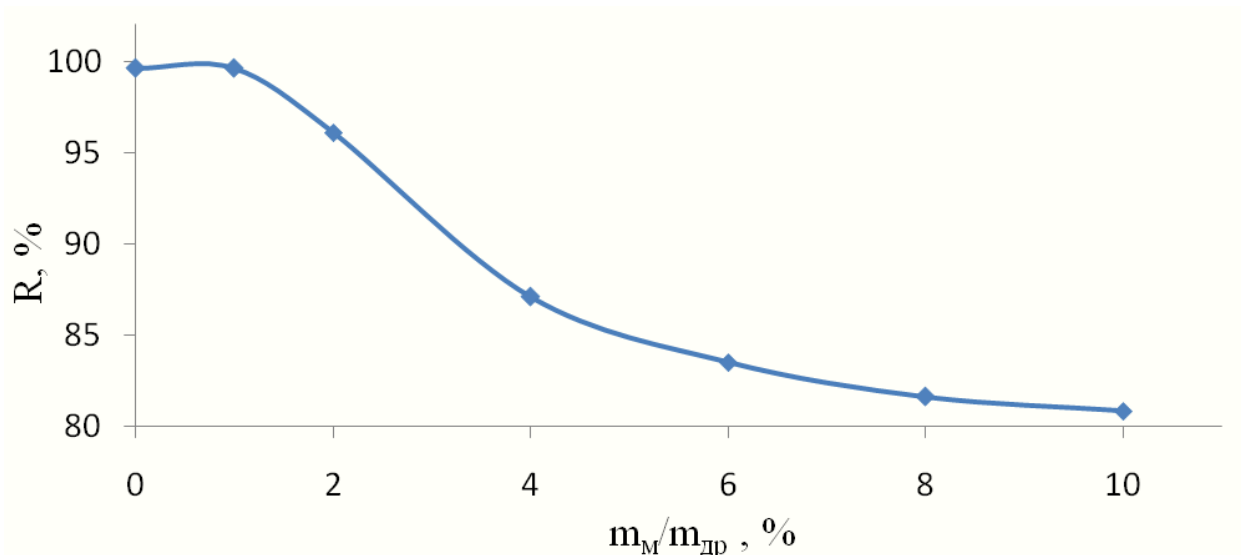


Рис. 6.11 – Ступінь вилучення катіонів міді магнітоміченими дріжджами в залежності від різного відношення маси наноміток до маси дріжджів *S. cerevisiae* (m_M/m_{DP})

Як видно, з рис. 6.11 суспензія магнітомічених дріжджів з відношенням маси магнітних наночастинок до маси дріжджів $m_M/m_{DP} = 10\%$ має найменшу максимальну сорбційну здатність і дорівнює 21,4 мг/г АСР відносно катіонів міді серед усіх відношень мас m_M/m_{DP} . У разі відношення мас 0% і 1% максимальна сорбційна здатність магнітомічених дріжджів складає 25,5 мг/г АСР і є найбільшою серед представлених та практично не відрізняється від сорбційної ємності нативних дріжджів. Це можна пояснити тим, що певна кількість сайтів зв'язування катіонів міді зайнята магнітними наномітками.

6.5 Визначення магнітної сприйнятливості біосорбенту на основі дріжджів *S.cerevisiae*, отриманого при механічному перемішуванні та при МГДП в схрещеному електричному та магнітному полях

Досліджено зразки ММБС, які було отриманого методом механічного перемішування та МГДП в схрещених електричному і магнітному полях з різним відсотковим вмістом магнітних наночастинок (1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%). Отримані значення магнітної сприйнятливості для кожного виду біосорбенту при різних методах перемішування відображено на рис. 6.12

Магнітна сприйнятливість біосорбенту, отриманого методом механічного перемішування вища, ніж у зразків сорбенту, які перемішувались при МГДП і зростає зі збільшенням вмісту наночастинок магнетиту. Магнітна сприйнятливість біосорбенту, отриманого при МГДП в схрещених електричному та магнітному полях, залишається незмінною при різному вмісті магнетиту, що показує недоцільність використання біосорбенту при МГДП в схрещених електричному та магнітному полях з вмістом наночастинок магнетиту більше 1%.

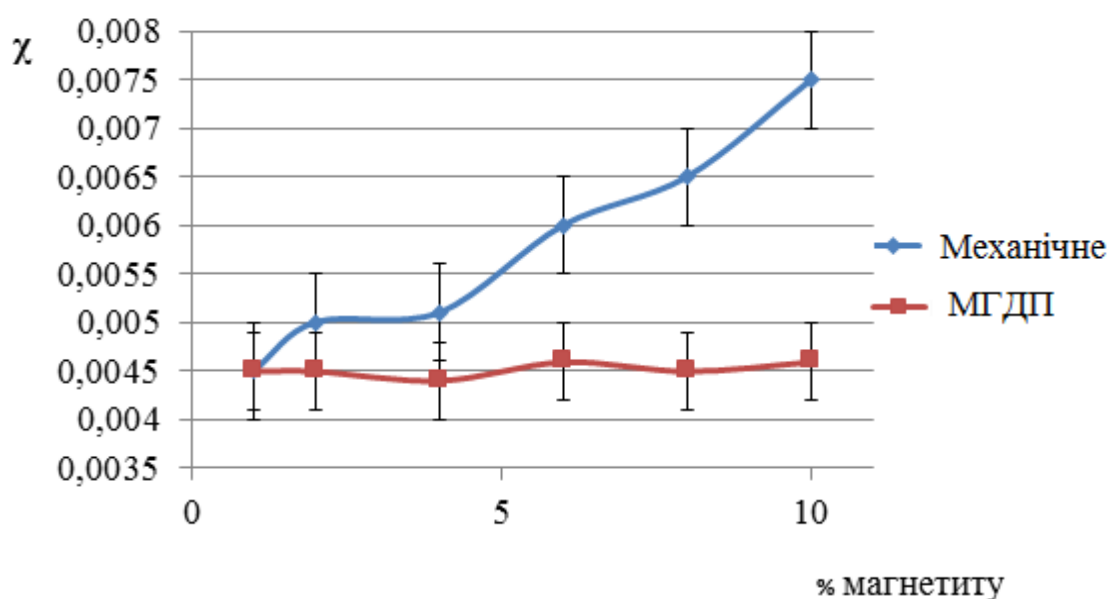


Рисунок 6.12 – Магнітна сприйнятливість ММБС виготовленого різними методами.

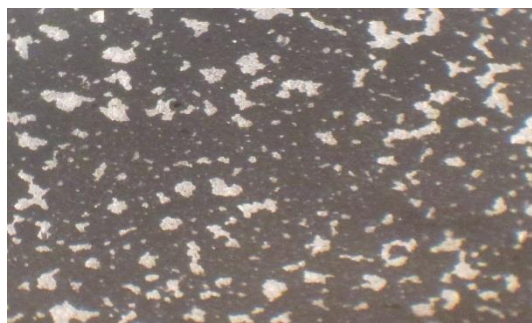
Аналізуючи вищенаведений графік (рис. 6.11), можна зробити висновок, що біосорбент, отриманий методом МГДП в схрещених електричному та магнітному полях є більш стабільним щодо своїх магнітних характеристик. Зі збільшенням вмісту магнітних наночастинок у складі біосорбенту, його магнітна сприйнятливість незмінна, тому подальше використання біосорбенту з підвищеним вмістом магнетиту не є актуальним.

Також з графіку видно, що магнітна сприйнятливість ММБС, отриманого методом механічного перемішування змінюється з підвищенням вмісту магнітних наночастинок у його складі. Такий сорбент не є стабільним,

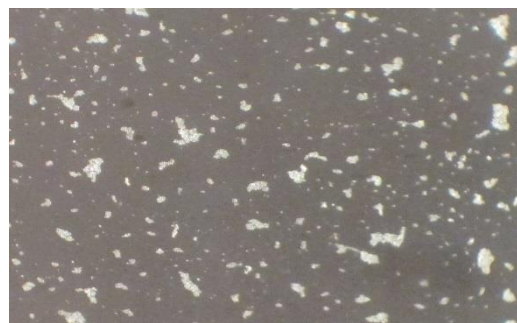
оскільки значення магнітної сприйнятливості коливаються при збільшенні вмісту наномагнетиту (діапазон зміни магнітної сприйнятливості – 0,003).

6.6 Дослідження сорбційної ємності магнітоміченого біосорбенту отриманого при механічному та магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещених магнітному та електричному полях.

ММБС, отриманий при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях майже не схильний до кластеризації, тобто має більшу площу поверхні, де звільняються сайти зв'язування для іонів важких металів, ніж ММБС, отриманий при механічному перемішуванні ММБС, який утворює кластери, що добре видно з рис. 6.13. При механічному перемішуванні кластеризація ММБС значно вища, ніж при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях.



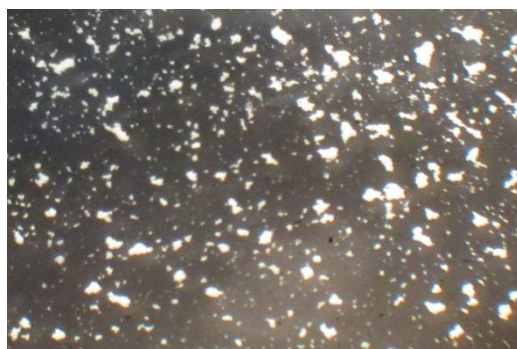
А)



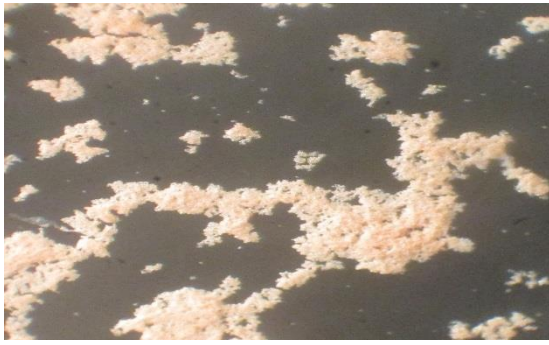
Б)



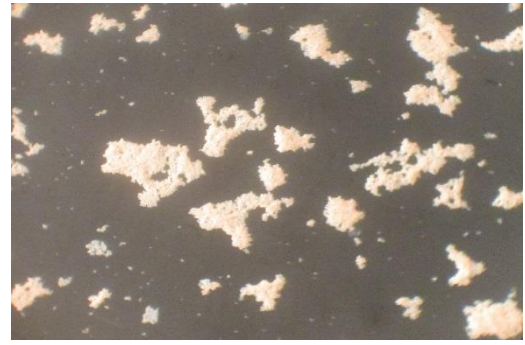
В)



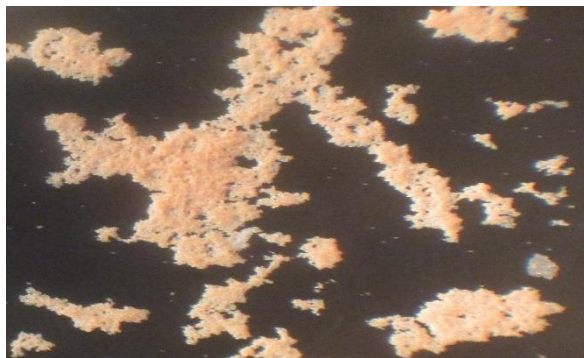
Г)



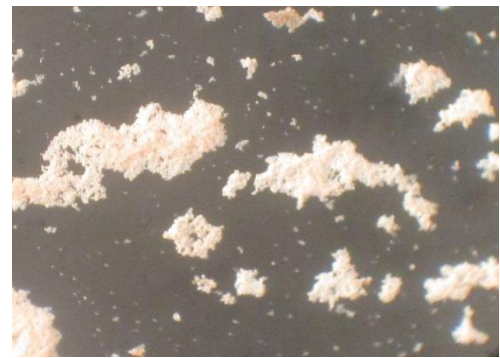
Д)



Е)



Ж)



З)

А) механічне перемішування (1% магнетиту); б) МГДП в схрещених електричному і магнітному полях (1% магнетиту); В) механічне перемішування (3 % магнетиту); Г) МГДП в схрещених електричному і магнітному полях (3 % магнетиту); Д) механічне перемішування (7 % магнетиту); Е) МГДП в схрещених електричному і магнітному полях (7 % магнетиту); Ж) механічне перемішування (10 % магнетиту); З) МГДП в схрещених електричному і магнітному полях (10 % магнетиту)

Рисунок 6.13 – Оптичне зображення ММБС, отриманих при різних методах перемішування з різним вмістом магнетиту (1%, 3%, 7% та 10% відповідно).

Локалізація магнітних наночастинок на поверхні клітини призводить до зменшення кількості активних сайтів зв'язування іонів важких металів та

зменшує ефективність вилучення іонів важких металів з робочих середовищ. Цей висновок підтверджено експериментально (рис. 6.14)

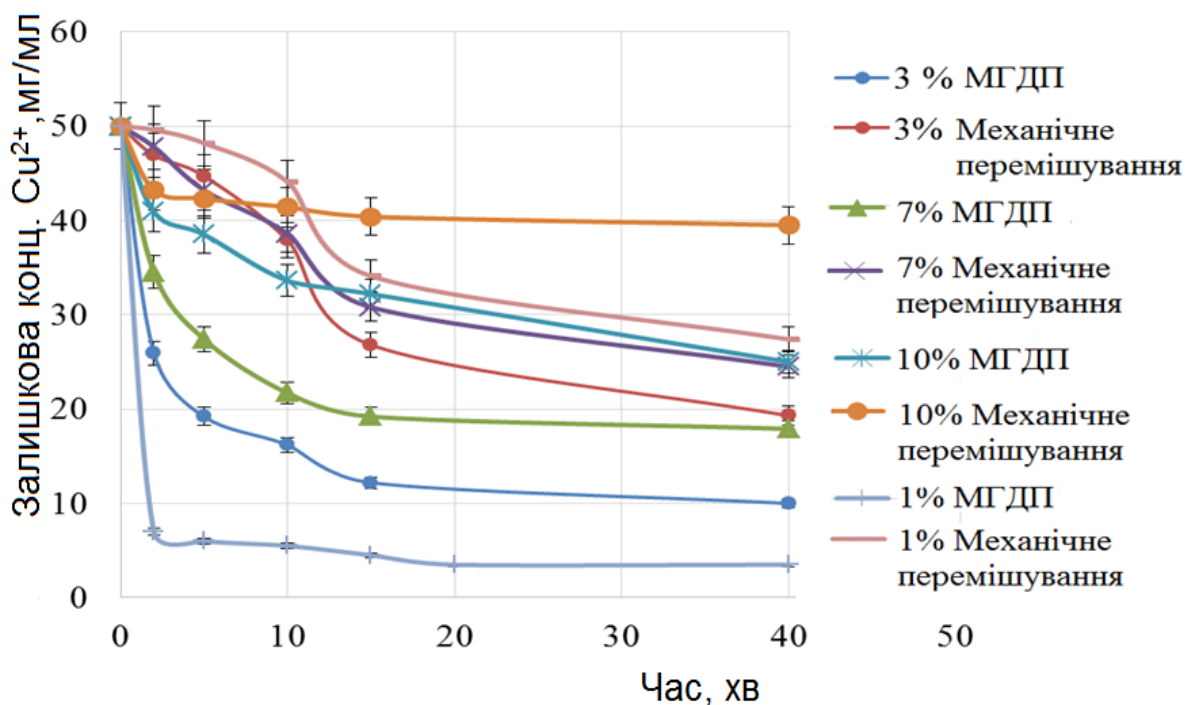


Рисунок 6.14 – Ступінь вилучення катіонів міді ММБС, отриманого при механічному та магнітогідродинамічному перемішуванні в схрещеному магнітному та електричному полях, при 1 та 10% вмісту магнітних наночастинок.

Як видно з рис. 6.14 найкраща сорбційна здатність спостерігається для ММБС, отриманого при МГДП в схрещених магнітному та електричному полях з 1% вмістом магнітних наночастинок. ММБС отриманий методом механічного перемішування має більшу магнітну сприйнятливості та є нестабільним в процесі біосорбції іонів металів. Отже підвищення рівня кластеризації ММБС знижує сорбційну здатність як при механічному, так і при МГДП в схрещених електричному і магнітному полях, але найдоцільніше використовувати ММБС з 1% вмістом магнетиту, адже кластеризація такого біосорбенту мінімальна, а сорбційна здатність максимальна.

Найгірша сорбційна здатність спостерігається для ММБС, отриманого при механічному перемішуванні з 10% вмістом наномагнітних частинок, що підтверджується високим ступенем кластеризації ММБС – рис. 6.13в.

6.7 Визначення активної та пасивної сорбції дріжджів, магнітної рідини та ММБС, отриманого при МГДП в схрещених магнітному та електричному полях

Проведення активної сорбції показало, що частина магнітних наночастинок прикріплюється на поверхню біосорбенту, оскільки після промивання кислотним розчином з $\text{pH}=2$ магнітна сприйнятливість сорбенту зменшилась (рис. 6.15, 6.16). Виходячи з цього, можна зробити висновок, що при взаємодії клітин дріжджів та наночастинок магнетиту відбувається як пасивна, так і активна сорбція.

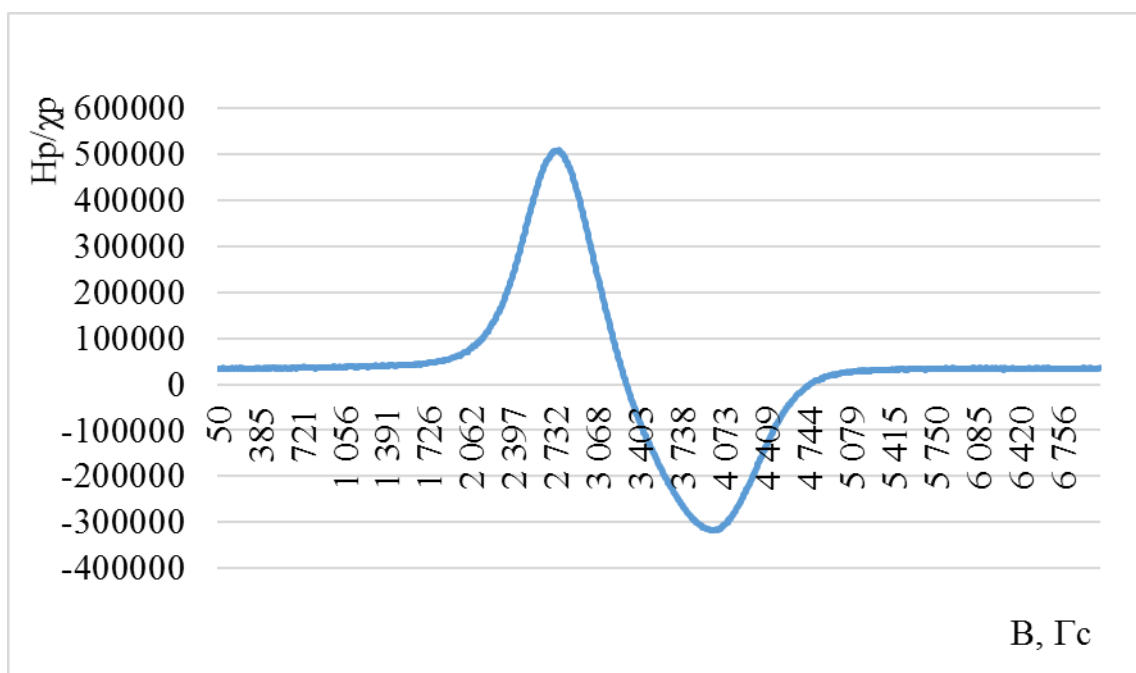


Рисунок 6.15 – Активна сорбція біосорбенту, отриманого методом механічного перемішування з 1 % магнітних наночастинок

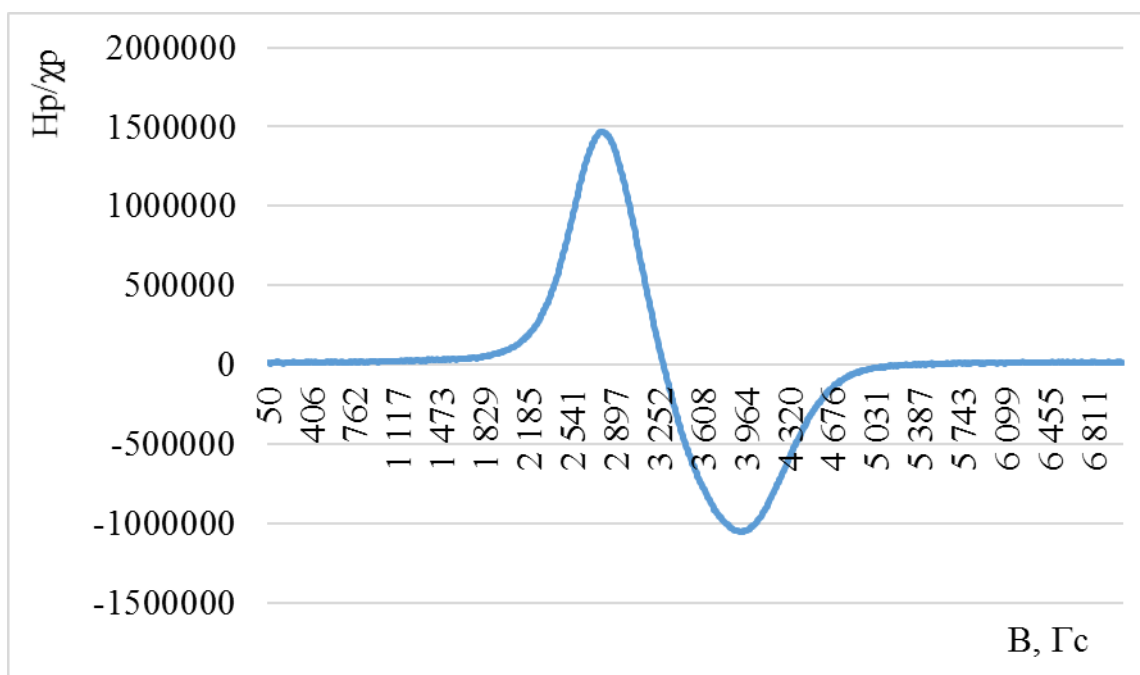


Рисунок 6.16 - Активна сорбція біосорбенту, отриманого методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях з 1 % магнітних наночастинок

Магнітна сприйнятливість магнітоміченого біосорбенту, отриманого методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях знижується після промивання кислотним розчином. Це показує, що частина магнітних наночастинок знаходилась на поверхні біосорбенту.

6.8 Економічний розрахунок вартості ММБС на моделі дріжджів *S. cerevisiae*

Вартість необхідних реактивів, за 1 кг:

FeCl ₃ ·6H ₂ O	57,60 грн.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	25,00 грн
NH ₄ OH	28,90 грн.
HClO ₄	1200 грн.
HNO ₃	56,2 грн.

Для отримання 670 мл магнетиту потрібно:

399 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – $0,399 \cdot 57,6 = 22,98$ грн.

219 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,219 \cdot 25,0 = 5,48$ грн.

1500 кг NH_4OH – $1,5 \cdot 28,90 = 43,35$ грн.

10 г HNO_3 – $0,010 \cdot 56,2 = 0,56$ грн.

502,5 г HClO_4 – $0,5025 \cdot 1200 = 603$ грн.

Всього: 22,98 грн. + 5,48 грн. + 43,35 грн. + 0,56 грн. + 603 грн. = 675,37 грн.

Затрати на електроенергію при висушуванні та подрібненні біосорбенту.

Шафа сушильна – 80 кВт

Установка магнітна – 10

кВт Центрифуга – 30 кВт

Млин – 30 кВт

Всього 150 кВт; 1 кВт коштує 1,67 грн.

$150 \cdot 1,67 = 250,5$ грн

Цієї кількості магнетиту вистачить для змішування з 4 т дріжджів

S. cerevisiae. Ціна за 4 т дріжджів складає $4000 \text{ кг} \cdot 5 \text{ грн} = 20000$ грн.

Отримуємо $4000 \text{ кг} + 0,7 \text{ кг} = 4000,7 \text{ кг}$ нативного ММБС. Після висушування загальна маса біосорбенту зменшиться на 80%, тобто отримуємо: $4000,7 \text{ кг} \cdot 0,2 = 800,14 \text{ кг}$ сухого ММБС.

Витрати на виготовлення 800,14 кг сухого ММБС складають

$675,37 \text{ грн.} + 250,5 \text{ грн.} + 20000 \text{ грн.} = 20925,87 \text{ грн.}$

Ціна 1 кг складає $20925,87 / 800,14 = 26,15$ грн.

Висновки до розділу 6

В розділі описано розроблений спосіб гомогенного магнітомічення біооб'єктів та перевірено його ефективність на дріжджах *S. cerevisiae*, які не мають природніх феримагнітних властивостей, але широко використовуються для вилучення з водних розчинів іонів важких металів, барвників тощо і є ефективним біосорбентом.

В цьому розділі було проведено ефективність сорбції магнітоміченого біосорбенту залежно від величини рН, величини електричного поля та від співвідношення маси магнітних міток до маси біосорбенту. В експериментальних дослідженнях було встановлено, що оптимальне значення рН для виготовлення магнітоміченого біосорбенту методом МГДП в схрещених електричному і магнітному полях становить рН= 2,5.

Показано, при рН = 2,5 відбувається максимальне вилучення катіонів міді вже через 10 хвилин при МГДП, на відміну від рН = 3 та рН = 4, тобто при збільшенні рН необхідно збільшувати час перемішування магнітоміченого біосорбенту з очищуваним середовищем, що є нетехнологічним.

Встановлено оптимальні технологічні параметри: рН=2,5; U = 0,5 В; H = 240 кА/м; t = 6 хв.

ВИСНОВКИ

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

З одержаних результатів можна зробити такі висновки:

1. Із застосуванням методів порівняльної геноміки визначено сукупність мікроорганізмів з природним магнітоміченням у множинах патогенних, умовно-патогенних, симбіотичних бактерій людини, анаеробних мікроорганізмів з різним типом дихання та грибів, що дозволило підтвердити єдиний механізм біомінералізації БМН для представників трьох надцарств живих організмів.
2. Виявлено, що систематизація мікроорганізмів з природним магнітоміченням серед патогенних, умовно-патогенних та симбіотичних бактерій людини може здійснюватись за наявності або відсутності кристалічної структури та локалізацією утворень БМН на такі 4 групи: внутрішньо-клітинні кристалічні, внутрішньо-клітинні аморфні, зовнішньо-клітинні кристалічні та зовнішньо-клітинні аморфні.
3. Теоретичними розрахунками визначено кількість (10-100 наночастинок) та характерні розміри штучних (40-100 нм) та природних магнітних наночастинок (10-50 нм), при яких сила магнітодипольної взаємодії між ланцюжками магнітних наночастинок в магнітомічених біооб'єктах та БМН в пухлинних клітинах становить 10^{-9} Н, і на порядок перевищує сили теплового руйнування комплексів.
4. Експериментально доведено, що розроблена технологія гомогенного магнітомічення за магнітогідродинамічного перемішування у схрещених електричному і магнітному полях, значно переважає за відповідними показниками відомі технології отримання

магнітомічених біосорбентів за рахунок зменшення кластеризації біосорбенту.

5. Встановлено раціональні технологічні параметри: рН 2,5; $U = 0,5$ В; $H = 240$ кА/м; $t = 6$ хв, та розроблено технологічну схему отримання магнітоміченого біосорбенту.
6. Експериментально показано, що сорбційна здатність магнітоміченого біосорбенту відносно катіонів Cu^{2+} , виготовленого за магнітогідродинамічного перемішування в схрещених електричному і магнітному полях, на 30% більше, ніж у магнітоміченого біосорбенту, виготовленого методом механічного перемішування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Safarik I. New magnetically responsive yeast-based biosorbent for the efficient removal of water-soluble dyes / I. Safarik, L. Rego., M. Borovska // *Enzyme Microb Technol.* - 2007. – V. 40. – P. 1551–1556.
2. Safarik I. Microwavesynthesized chitosan microparticles for yeast cells immobilization / I. Safarik, K. Pospiskova, Z. Maderova // *Yeast.* – 2014. – V. 32, №. 1. – P. 239–243.
3. Xie J. Production, Modification and Bio-Applications of Magnetic Nanoparticles Gestated by Magnetotactic Bacteria / J. Xie, K. Chen, C. Xiaoyuan // *ChenNano Res.* – 2009. – V. 2(4). – P. 261–278.
4. Vicky V. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor / V. Vicky, S. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevins, H. Parihar. // *Applied Nanoscience.* – 2014. – V. 4 – №4. – P. 385–392.
5. Горобец С.В. Высокоградиентные ферромагнитные насадки для очистки сточных вод, полученные методом магнитоэлектролиза / С.В. Горобец, Н.А. Михайленко // *Химия и технология воды.* – 2014. – Т.36, №4. – С. 283-296.
6. Павлович С.А. Магниточувствительность и магнитовосприимчивость микроорганизмов. – Минск: ”Беларусь”, 1981. – С. 130.
7. Chervinets V.M. Magnitnaya vospriimchivost' mikroorganizmov / V.M. Chervinets, Yu.V. Novitskiy, S.A. Pavlovich // *Zhurnal gigieny, epidemiologii, mikrobiologii i immunologii.* – 1979. – V.23, N3. – P. 230
8. Sakaguchi T.S. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium / T.S. Sakaguchi, J.G. Burgess, T.V. Matsunaga // *Nature.* –1993. – V. 365. – P. 47–49
9. Blakemore R.P. Magnetotactic bacteria / R.P. Blakemore // *Science.* – 1975. –V. 190. – P. 377 – 379.
10. Frankel R. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria / R.F. Frankel, R.P. Blakemore, R.S. Wolfe // *Science.* – 1979. – V.203. – P. 55 – 56.

11. Bazylinski D.A. Magnetosome formation in prokaryotes / D.A. Bazylinski, R.B. Frankel // *Rev. Microbiol.* – 2004. – V. 2. – P. 7 – 30.
12. Vainshtein M. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells / M. Vainshtein, N. Suzina, E. Kudryashova, E. Ariskina // *Biology of the Cell.* –2002. – V. 94. P. 29 – 35
13. Diebel C.E. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor / C.E. Diebel, R. M. Proksch, C.R. Green // *Nature.* – 2000. – V. 406. – P. 299 – 302.
14. Gorobets O.Yu. Biogenic magnetic nanoparticles: Biomineralization in prokaryotes and eukaryotes / O.Yu. Gorobets, S.V. Gorobets, Yu.I. Gorobets // *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology (3rd Edition).* – New York: CRC Press. – 2014. – P. 300 – 308.
15. Горобець С.В. Біомінералізація внутрішньоклітинних біогенних магнітних наночастинок та їх можливі функції / С.В. Горобець, Ю.І. Горобець // *Наукові вісті НТУУ «КПІ».* – 2013. – № 3. – С. 28 – 33.
16. Zoeger J. Magnetic material in the head of the common Pacific dolphin / J. Zoeger, J. Dunn, M. Fuller // *Science.* –1981. – V. 213. – P. 892 – 894.
17. Kirschvink J.L. Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: a new biomagnetism / J.L. Kirschvink, D.S. Jones., B.J. Macfadden // *Plenum Publishing Corporation.* – 1985. – P. 682 – 685.
18. Bharde A. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi / Bharde A., Rautaray D., Sarkar I., Sastry M. // *Small.* –2006. – V. 2. – P. 135 – 141.
19. Kuterbach D.A. Iron-containing cells in the honey-bee (*Apis mellifera*). I. Adult morphology and physiology / D.A. Kuterbach, B.V. Walcott // *J. Exp. Biol.* –1986. – V. 126. – P. 375 – 387.
20. Cranfield C.G. Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans* / C.G. Cranfield, A.N. Dawe, V.B. Karloukovski, R.E. Dunin-Borkowski // *Proc. R. Soc. Lond. B.* – 2004. – V. 271(6). – P. 436 – 439.
21. Gordon L.M. Nanoscale chemical tomography of buried organic-inorganic interfaces in the chiton tooth / L.M. Gordon, D.S. Joester // *Nature.* – 2011. –V.469. – P. 194 – 97.

22. Ritz T. Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass / T. Ritz, P. Thalau, J. Phillips // *Nature*. – 2004. – V. 429. – P. 177–179.
23. Kirschvink J.L. Magnetite Biomineralization and Geomagnetic Sensitivity in Higher Animals: An Update and Recommendations for Future Study / J.L. Kirschvink // *Bioelectromagnetics*. – 1989. – V.10(3). – P. 239 – 259.
24. Ritz T.B. Shedding Light on Vertebrate Magnetoreception / T.B. Ritz, D.H. Dommer, J.B. Phillips // *Neuron*. – 2002. – V. 34. – P. 503 – 506.
25. Bazylinski D.A. Anaerobic production of magnetite by a marine magnetotactic bacterium / D.A. Bazylinski, R.B. Frankel, H.W. Jannasch // *Nature*. – 1988. – V. 334. – P. 518–519.
26. Schüler D. Formation of Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria / D. Schüler // *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V.1(1). – P. 79 – 86.
27. Komeili A. Molecular Mechanisms of Magnetosome Formation / A. Komeili // *Biochemistry*. – 2007. – V. 76. – P. 351 – 366.
28. Schüler D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria / D. Schüler // *FEMS Microbiol Rev.* – 2008. – V. 32 (4). – P. 654 – 672.
29. Mann S.N. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception / S.N. Mann, N.H. Sparks, M.M. Walker, J.L. Kirschvink // *J. Exp. Biol.* – 1988. – V.40. – P. 35 – 40.
30. Eder S.H. Magnetic characterization of isolated candidate vertebrate magnetoreceptor cells / S.H. Eder, H.V. Cadiou, A.V. Muhamad, P.A. Naughton, J.L. Kirschvink, M.C. Winklhofer // *PNAS*. – 2012. – V.109(30). – P.120 – 127
31. Mann S. Dalton perspectives. Biomineralization: the hard part of bioinorganic chemistry / S. Mann // *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* – 1993. – V.4. – P. 1-9.

32. Gorobets Yu.I., Gorobets S.V. Stationary flows of electrolytes in the vicinity of ferromagnetic particles in a constant magnetic field / Yu.I. Gorobets, S.V. Gorobets // Bulletin of Kherson State Technical University. – 2000. – V. 3(9). – P. 276 – 281.
33. Vainshtein M.B. A new type of magnet-sensitive inclusions in cells of photosynthetic purple bacteria / M.B. Vainshtein, N.E. Suzina, V.V. Sorokin // System. Appl. Microbiol. – 1997. – V. 20. – P. 182 – 186.
34. Hidekazu N. Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria / N. Hidekazu // Genome Res. – 2009. – V.19. – P.101 – 110.
35. Sakaguchi T. *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles / T. Sakaguchi, A. Arakaki, T. Matsunaga // Intern. Jour. of System. And Evolut. Microbiol. – 2002. – V.52. – P.215 – 220.
36. Yan L. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application / L. Yan, S. Zhang, P. Chen, Y. Huanhuan, L. Hongyu // Microbiological Research – 2012. – V. 167. – P. 507–510.
37. Little C.T. Four-hundred and ninety-million-year record of bacteriogenic iron oxide precipitation at sea-floor hydrothermal vents / C.T. Little, S.E. Glynn, R.A. Mills // Geomicrobiol. J. – 2004. – V.21. – P. 415 – 429.
38. Edwards K.J. Neutrophilic iron-oxidizing bacteria in the ocean: their habitats, diversity, and roles in mineral deposition, rock alteration, and biomass production in the deep-sea / K.J. Edwards, W.C. Bach, T.M. Mccollom, D.R. Rogers // Geomicrobiol. J. – 2004. – V.21. – P. 393 – 404.
39. James R. Evidence for microbial-mediated iron oxidation at a neutrophilic groundwater spring / R. James, F. Ferris // Chem. Geol. – 2004 V.212. – P. 301– 311.
40. Emerson D. Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH / D. Emerson, C. Moyer // Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 4784 – 4792.

41. Benz M. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria / M. Benz, A. Brune, B. Schink // Arch. Microbiol. – 2001. – V. 169. – P. 159–165
42. Gabriel M. Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0 / M. Gabriel, T. Vargas // Arch. Microbiol. – 2004. – V. 187. – P. 111–120
43. Kappler A. Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria / A. Kappler, D. Newman // Geochim. Cosmochim. Acta. – 2004. – V. 68. – P. 1217– 1226.
44. Gorobets O.Yu. Biomineralization and syntesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi / O.Yu. Gorobets, S.V. Gorobets, L.V. Sorokina // Journal “Functional Materials”. – 2014. – № 4. – P. 15-21.
45. Горобець С.В. Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу наномагнетиту у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмів / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, І.В. Дем'яненко // Вісник Національного чернівецького університету. Біологічні системи. – 2013. – 5(2). – С.274 – 280
46. Grassi-Schultheiss P.P. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver / P.P. Grassi-Schultheiss, F. Heller, J. Dobson // BioMetals. – 1997. – V.10. – С. 351—355,
47. Kirschvink J.L. Magnetite biomineralization in the human brain / J.L. Kirschvink, A. Kobayashi-Kirschvink, B.J. Woodford // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1992. – V.89. – P. 7683—7687.
48. Baker R.R. Magnetic bones in human sinuses / R.R. Baker, J.G. Mather, J.H. Kennaugh // Nature. – 1983. – V.301. – P. 78 – 80.
49. Brem F. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumor and hippocampal tissue / F. Brem, A.M. Hirt, M. Winklhofer // J. R. Soc. Interface. – 2006. – V.3. – P. 833 – 841.

50. Hautot D. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue / D. Hautot, Q.A. N. Pankhurst, Khan, J. Dobson // *Proc. Biol Sci.* – 2003. – N.7. – P. 62–64.
51. Горобець С.В. Магнітна силова мікроскопія атеросклеротичних бляшок / С.В. Горобець, Т.А.Алексеева, О.Ю. Горобець, І.В. Дем'яненко, О.М. Лазаренко // *Медичні перспективи.* – 2014. – Т.ХІХ. – №1. – С.4–10
52. Hautot D. Preliminary observation of elevated levels of nanocrystalline iron oxide in the basal ganglia of neuroferritinopathy patients / D. Hautot, Q.A. Pankhurst, Ch.M. Morris, A. Curtis // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2007. – 1772(1). – P. 21 – 25.
53. Kobayashi A. Studies of Inorganic Crystals in Biological Tissue: Magnetite in Human Tumor / A. Kobayashi, N. Yamamoto, J. Kirschvink // Reprinted from *Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy.* – 1997. – N 44. – P. 94.
54. Чехун В.Ф. Магнітні наноструктури в пухлинних клітинах. Застосування методів скануючої зондової мікроскопії для дослідження структурної організації магніточутливої фази в пухлинних клітинах карциноми Ерліха / В.Ф. Чехун, С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, І.В. Дем'яненко // *Вісн. НАН України* – 2011. – № 11. – С.13 – 20
55. Чехун В.Ф. Магніточутливі наноструктури ендогенного походження у клітинах карциноми Ерліха / В.Ф. Чехун, С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, І.В. Дем'яненко // *Наноструктурное материаловедение* – 2011. – № 2, P. 102 – 109.
56. Claire W. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles / W. Claire, G. Florence // *Biomaterials.* – 2008. – V.29. – P. 3161–3174
57. Kolosnjaj-Tabi J. Cell labeling with magnetic nanoparticles: Opportunity for magnetic cell imaging and cell manipulation / J. Kolosnjaj-Tabi, C. Wilhelm, O. Clément, F. Gazeau // *Journal of Nanobiotechnology.* – 2013. – V. 11. – P. 11 – 20

58. Moore A. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages // A. Moore, R. Weissleder, A. Bogdanov // J. Magn. Reson. Imaging. – 1997. – V.7. – P. 1140 – 1145.
59. Schoepf U. Magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies / U. Schoepf, E.M. Marecos, R.J. Melder , R.K. Jain, R. Weissleder // Biotechniques. – 1998. – V.24(4). – P. 642 – 648.
60. Sipe J.C. Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents / J.C. Sipe, M. Filippi, G. Martino, R. Furlan, M.A. Rocca, M. Rovaris // Magn. Reson. Imaging. – 1999. – V.10. –P. 1521-1523.
61. Yeh T.C. Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents / T.C. Yeh, W. Zhang, S.T. Ildstad, C. Ho // Magn. Reson. Med. – 1993. – V. 30(5). – P. 617 – 625.
62. Bulte J.W. Tagging of T cells with superparamagnetic iron oxide: uptake kinetics and relaxometry / J.W. Bulte, P.G. Laughlin, E.K. Jordan, V.A. Tran, J. Vymazal, J.A. Frank // Acad. Radiol. – 1996. – V.3. – P. 301-310.
63. Dodd S.J. Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging / S.J. Dodd, M. Williams, J.P. Suhan, D.S. Williams, A.P. Koretsky // Biophys J. – 1999. – V.76. – P. 103–109.
64. Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery / J. Dobson // Gene Therapy. – 2006. – V.13. – P. 283 – 287.
65. Krafčik A. Integrated Microfluidic System for Magnetic Cell Separation, Electroporation, and Transfection: Conceptual Design / A. Krafčik, P. Babinec // Biophys J. – 2004. – V.76. – P. 103–109.
66. Runyang M. Preliminary *In Vitro* Study of Ultrasound Sonoporation Cell Labeling with Superparamagnetic Iron Oxide Particles for MRI / M. Runyang, L. Shuyu, W. Gongzheng, Y. Wang // Cell Tracking 30th Annual International IEEE EMBS Conference Vancouver, Canada. – 2008. – August 20-24

67. Zhenzhen F. Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery / F. Zhenzhen, E. Ronald, C. Deng // The Deliv Author manuscript. – available in PMC 2015.
68. Jeff W. *In Vivo* Magnetic Resonance Tracking of Magnetically Labeled Cells After Transplantation / W. Jeff, M. Bulte, I. Duncan, J. Frank // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2002. – V. 22. – P. 8 – 22.
69. Bultel J.W. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms / J.W. Bultel, T. Douglas, B. Witwer, S.C. Zhang, E. Strable, B.K. Lewis // *Nat. Biotechnol.* – 2001. – V. 19. P. 141
70. Bultel J.M. Magnetodendrimers as a New Class of Cellular Contrast Agents / J.W. Bultel, T. N. Douglas, E.B. Strable, B. M. Moskowitz, J.A. Frankl // *Proc. Intl. Sot. Mag. Reson. Med.* – 2000. – V. 8. – P. 2-36
71. Linfeng Z. MRI-Monitored Intra-Tumoral Injection of Iron-Oxide Labeled *Clostridium novyi-NT*. Anaerobes in Pancreatic Carcinoma Mouse Model / Z. Linfeng, Z. Zhuoli, K. Khashayarsha, S. Saurabh, J. Lewandowski // *PLoS One.* – 2014. – V. 9(12). P. 123 – 140.
72. Yizhi S. Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria / S. Yizhi, H. Thomas, I. Thompson, J. Mason, G. Preston, L. Guanghe, L. Paniwnyk // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V.35(19). – P. 129 – 143.
73. Jelenc J. Low-Frequency Sonoporation in vitro: Experimental System Evaluation / J. Jelenc, D. Miklavčič // *Journal of Mechanical Engineering.* – 2012. – V. 58. – P. 319 – 326.
74. Mo R. Preliminary in vitro study of ultrasound sonoporation cell labeling with superparamagnetic iron oxide particles for MRI cell tracking / R. Mo, S. Lin, G. Wang, Y. Wang // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* – 2008. – V.34. – P. 12 – 34.
75. Scherer F. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo / F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Krüger, B. Gansbacher // *Gene Therapy.* – 2002. – V.9. – P. 102–109

76. Prosen L. Magnetofection: A Reproducible Method for Gene Delivery to Melanoma Cells / L. Prosen, S. Prijic, B. Music, J. Lavrencak // *BioMed Research International Volume*. – 2013. – V. 52. – P.11 – 20.
77. Mah C. Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy / C. Mah, T.J. Fraites, I. Zolotukhin, S. Song, T.R. Flotte, J. Dobson, C. Batich, B.J. Byrne // *Mol. Ther.* – 2002. – V6.(1). – P. 106-112.
78. Weaver J.C. Theory of electroporation: a review / J.C. Weaver, Y.A. Chizmadzhev // *Bioelectrochem. Bioenergy*. – 1996. – V. 41. – P. 135–160.
79. Raoul D. Magnetic Resonance Imaging of Monocytes Labeled with Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide Using Magneto-electroporation in an Animal Model of Multiple Sclerosis / D. Raoul, O. Engberink, M. Susann, P. Walczak // *Decker Inc.* – 2010. – V.12. – P. 34 – 42
80. Walczak P. Magneto-electroporation: improved labeling of neural stem cells and leukocytes for cellular magnetic resonance imaging using a single FDA-approved agent / P. Walczak, M. Ruiz-Cabello, D. Kedziorek // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2006. – V.2. – P. 89 – 94
81. Dobson R.S. Biological Treatment of Precious Metal Refinery Wastewater: A Review / R.S. Dobson, J.E. Burgess // *Mineral Engineering*. – 2007. – V.20. – P. 519 – 532.
82. Akcay H. Study of Heavy Metal Pollution and Speciation in Buyak Menderes and Gediz River Sediments / H. Akcay, A. Orcuz and C. Karapire // *Water Research*. – 2003. – V. 37. – P. 813-822.
83. Volesky B. Hydrometallurgy Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century / B. Volesky // *Nanomedicine*. – 2001. – V.4. – P.203–216.
84. Michalak I. State of the Art for the Biosorption Process – a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* / I. Michalak, K. Chojnacka, A.

- Witek-Krowiak // *Biotechnology Techniques*. – 2013. – V. 170. – P. 1389–1416.
85. Ahalya N. Biosorption of Heavy Metals / Ahalya N., Ramachandra T.V., R.D. Kanamadi // *Res. J. Chem. Environ.* – 2003. – V. 7, № 4. – P. 71 – 79.
86. Singh R. Heavy metals and living systems: An overview / R. Singh, N. Gautam, R. Gupta // *Indian J Pharmacol.* – 2011. – V. 43, № 3. – P. 246-253.
87. Patzak M.P. Development of Magnetic Biosorbents for Metal Uptake / M.P. Patzak, R. Dostalek // *Biotechnology Techniques*. – 1997. – V.1, № 7. P. 483-487.
88. Стабников В.Н. Процессы и аппараты пищевых производств / В.Н. Стабников, В.И. Баранцев // М.: Пищ. Промышленность. – 1974. – 359 с.
89. Яворський В.Т. Електрохімічне нанесення металевих конверсійних та композиційних покриттів / В.Т. Яворський, О.І. Кунтий, М.С. Хома // Навчавчальний посібник. – Л.: Львівська політехніка. – 2000. – 266 с.
90. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media / R. Massart // *IEEE transactions on magnetics*. – 1981. – V. 17. – № 2. – P. 1247-1248
91. Пальтиель Л.Р. Физическая химия, поверхностные явления и дисперсионные системы / Л.Р. Пальтиель, Г.С. Зенин, Н.Ф. Вольнец // Учебное пособие. Санкт-Петербург. – 2004. – 68с.
92. Горобець С.В. Інтенсифікація сорбційної здатності дріжджів *S. cerevisiae* за допомогою багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування / С.В. Горобець, Ю.В. Карпенко // *Биомедицинские приборы и системы*. – 2009. – С.191-195.
93. Горобець С.В. Дослідження сорбції іонів заліза магнітоміченим біосорбентом / С.В. Горобець, Т.З. Нгуен, Ю.В. Карпенко // VI Всеукр. наук.-практ. конф. «Біотехнологія ХХІ століття». – Тези доп. – К.: НТУУ «КПІ». – 5 квітня 2012. – С. 147.

94. Singh R. Heavy metals and living systems: An overview / R. Singh, N. Gautam, R. Gupta // Indian J Pharmacol. – 2011. – V. 43, № 3. – P. 246 – 253.
95. Горобець С.В., Двойненко О.К., Карпенко Ю.В. Спосіб отримання магнітного біосорбенту. Декл.пат. на корисну модель 42448 Україна, МПК C02F1/42. № u200815002; заявл. 25.12.2008; опубл. 10.07.2009, Бюл. № 13.
96. Arthur D.R. Studies on the Effect of Static Magnetic Fields on Biological Systems / D.R. Arthur // PIERS ONLINE. – 2010. – VOL. 6, № 2. – P. 12-25
97. Rieman F. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse / F. Rieman, U. Zimmermann, G. Pilwat // Biochim. Biophys. – 1975. – V.394. – P.449-462.
98. Zimmermann U. Preparation of erythrocyte ghosts by dielectric breakdown of the cell membrane / U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann // Biochim. Biophys. – 1975.– V. 375. – P.209-219.
99. Vienken J. Penetration and entrapment of large particles in erythrocytes by electrical breakdown techniques / J. Vienken, E. Jeltsh, U. Zimmermann // Cytobiology. – 1978. – № 17. – P.182-196.
100. Neumann E. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields / E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y.Wang, and P.H. Hofschneider // EMBO J. – 1982. – № 1. – P.841-845.
101. Uno I. Essential role for phosphatidylinositol 4,5-biphosphate in yeast cell proliferation / I. Uno, K. Fukami, H. Kato, T. Takenawa, T. Ishikawa // Nature. – 1988. – № 333. – P.188-190.
102. Zoltnik H. *Saccharomyces cerevisiace* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity / H. Zoltnik, M.P. Fernandez, B. Bowers, E. Cahib // J. Bacteriol. – 1984. – № 159. – P. 1018-1026.

103. Beggs J.D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid / J.D. Beggs // Nature. – 1978. – № 257. – P.104-108.
104. Hinnen A. Transformation of yeast / A. Hinnen, J.B. Hicks, G.R. Fink // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – № 75. – P.1929-1933.
105. Белк Д., Бенатуил Л., Дженнифер М. Способы трансформации дрожжей (RU 2510418). Патент РФ.
106. Delorme E. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Electroporation / E. Delorme // Applied and Environmental Microbiology. – 1989. – №5 – P. 2242-2246.
107. Lesk A. Introduction to Bioinformatics. – Oxford University Press Inc., 2002. – 255p.
108. Патент України на корисну модель № 101016, МПК (2006.01) C02F 1/48. Спосіб отримання магнітоміченого біосорбенту / Горобець С.В., Горобець О.Ю., Чиж Ю.М., Ковальов О.В.; Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут». – № u201500909; Заявл. 05.02.2015; Опубл. 25.08.2015, бюл. № 16.
109. Горобець С.В. Высокоградиентные ферромагнитные насадки для очистки сточных вод, полученные методом магнитоэлектролиза / С.В. Горобець, Н.А. Михайленко // Химия и технология воды. – 2014. – Т.36, №4. – P. 283-296.
110. Горобець С.В. Вплив магнітостатичних полів ферромагнітної підкладки на електроосадження нікелевих дендритів / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, О.К. Двойненко, Г.Л. Лебеда // Проблеми хімії та хімічної технології. – 2011. - №2. – С.143-147.
111. Горобець С.В. Влияние магнитостатических полей ферромагнитной подложки на электроосаждение никелевых дендритов / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, О.К. Двойненко, Г.Л. Лебеда // Физика металлов и металловедение. – 2012. – Т.113. – № 2. – С.1-6.
112. Горобець С.В. Кореляція між розмірними характеристиками доменної структури та фігур травлення сталевого циліндру / С.В.

- Горобець, О.Ю. Горобець, О.К. Двойненко // *Металлофизика и новейшие технологии.* – 2012. – Т. 34. – № 8. – С. 1027 – 1034.
113. Горобець С.В. Інтенсифікація сорбційної здатності дріжджів *S. cerevisiae* за допомогою багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування / С.В. Горобець, Ю.В. Карпенко // *Электроника и связь.* – 2009. – Ч.1, № 2 – 3. – С. 191 – 195.
114. Горобець С.В. Біосорбція іонів міді Cu^{2+} магнітоміченими клітинами *S.cerevisiae* / С.В. Горобець, Ю.В. Карпенко, Л.В. Маринченко // *Вісн. Донецького нац. ун-ту.* – 2010. – № 1. – С. 230 – 236.
115. Горобець С.В. Очищення стічних вод від іонів купруму (II) магнітокерованим біосорбентом за допомогою високоградієнтних феромагнітних насадок / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, О.К. Двойненко, Н.О. Михайленко // *Наукові вісті НТУУ "КПІ".* – 2010. – №3. – С. 21 – 25
116. Горобець С.В. Ефективність магнітоміченого біосорбенту на основі дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* для очищення стічних вод / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, О.В. Ковальов, В.І. Желева, І.О. Шпетний // *Наукові вісті НТУУ "КПІ".* – 2015. – №3. – Р. 143 – 154.
117. Gorobets S.V. Magnetic dipole interaction of endogenous magnetic nanoparticles with magnetoliposomes for targeted drug delivery / S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, Yu.M. Chyzh, D.V. Sivenok // *Biophysics.* – 2013. – V. 58(3). – P. 379-384.
118. Zeytuni N. Self-recognition mechanism of MamA, a magnetosome-associated TPR-containing protein, promotes complex assembly / N. Zeytuni, E. Ozyamak, K. Ben-Harush, G. Davidov // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108(33). – P.7 – 19
119. Komeili A. Magnetosome vesicles are present before magnetite formation, and MamA is required for their activation / A. Komeili, H. Vali,

- T.J. Beveridge // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V.101(11). – P. 3839 – 3844.
120. Scheffel A. The Major Magnetosome Proteins MamGFDC Are Not Essential for Magnetite Biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* but Regulate the Size of Magnetosome Crystals / A. Scheffel, A. Gärdes, K. Grünberg, G. Wanner // J. Bacteriol. – V. 190(1). – P. 377 – 386.
121. Murat D. Comprehensive genetic dissection of the magnetosome gene island reveals the step-wise assembly of a prokaryotic organelle / D. Murat, A. Quinlan, H. Vali, A. Komeili // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. V. 107(12), P. 5593—5598.
122. Ullrich S. Hypervariable 130-Kilobase Genomic Region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* Comprises a Magnetosome Island Which Undergoes Frequent Rearrangements during Stationary Growth / S. Ullrich, M. Kube, S. Schübbe, R. Reinhardt // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187(21). – P. 7176 – 7184
123. Lohe A. Functional Analysis of the Magnetosome Island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: The mamAB Operon Is Sufficient for Magnetite Biomineralization / A. Lohe, S. Ullrich, E. Katzmann, S. Borg // PLoS One. – 2011. – V. 6(10). – P. 32-45
124. Richter M. Comparative Genome Analysis of Four Magnetotactic Bacteria Reveals a Complex Set of Group-Specific Genes Implicated in Magnetosome Biomineralization and Function / M. Richter, M. Kube, D.A. Bazylinski, T. Lombardot // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189(13). – P. 4899 – 4910
125. Горобець С.В. Генетична регуляція та фенотиповий прояв властивостей біогенних магнітних наночастинок у магнітотаксисних бактерій і людини / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Д.В. Сівенок, Ю.М. Чиж // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2012. – №3 – P. 24 – 31

126. Schübbe S. Transcriptional Organization and Regulation of Magnetosome Operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense* / S. Schübbe, C. Würdemann, J. Peplies, U. Heyen // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72(9). – P. 5757 – 5765
127. Gabaldón T. Origin and evolution of the peroxisomal proteome / T. Gabaldón, B. Snel, F. Zimmeren, W. Hemrika, H. Tabak // *Biology Direct.* – 2006. – V.1(8). – P.23 – 31
128. Lyubartseva G. Alterations of zinc transporter proteins ZnT-1, ZnT-4 and ZnT-6 in preclinical Alzheimer's disease brain / G. Lyubartseva, J.L. Smith, W.R. Markesbery, M.A. Lovell // *Brain Pathol.* – 2010. – V.20(2). – P. 343 – 350
129. Guffanti A.A. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K⁺ and H⁺ / A.A. Guffanti, Y. Wei, S.V. Rood, T.A. Krulwich // *Mol. Microbiol.* – 2002. – V.45. – P.145 – 153
130. Arakaki A. Formation of magnetite by bacteria and its application / A. Arakaki, H. Nakazawa, M. R. Nemoto // *Soc. Interface.* – 2008. – V.5. – P. 977
131. Kieper N. Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor / N. Kieper, K.M. Holmström, D.Ciceri, F.C.Fiesel // *Exp. Cell Res.* – 2010. – V.15. – V.316(7). – P. 1213—1224.
132. Sultana R. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis / R. Sultana, M. Perluigi, D.A. Butterfield // *Acta Neuropathol.* –2009. – V.118. – P.1.
133. López F. Transcriptional activation of the citrate permease P gene of *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis by an insertion sequence-like element present in plasmid pCIT264 / F.López, C.Magni, D.Mendoza, P.López // *Mol Gen Genet.* –1996.– V. 250(4). – P. 428-436.

134. Dobson J.P. Magnetic Properties of Human Hippocampal Tissue - Evaluation of Artefact and Contamination Sources / J.P. Dobson, P. Grassi // *Brain Res. Bull.* –1996. – V.39. – P.255.
135. Biello D. *Scientific American.* – 2009. <http://www.scientificamerican.com/article/origin-of-oxygen-in-atmosphere/>
136. Walcott C. Pigeons have magnets / C. Walcott, J.L. Gould, J.L. Kirschvink // *Science.* – 1979. – V.184. – P.180 – 182
137. Vali H. Formation of tabular single-domain magnetite induced by *Geobacter metallireducens* GS-15 / H. Vali, B. Weiss Yi-Liang, S. Kelly Sears, S. Sam Kim, J.L. Kirschvink // *PNAS.* –v2004. – V.101. – P. 46
138. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т1./ Под ред. Й. Ленглера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. – 342 с
139. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т2. / Под ред. Й. Ленглера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир. – 2005. – 245 с
140. Сергійчук М.Г., Позур В.К., Фурзікова Т.М. Мікробіологія / К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет». – 2008. – 541 с
141. Горобець С.В. Генетична основа фундаментального механізму біосинтезу наномагнетиту у магнітотаксисних та анаеробних мікроорганізмів / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж // Вісник Національного чернівецького університету. Біологічні системи. – 2013. – 5(2). – С.274-280
142. Nakazawa H. Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain rs-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria / H. Nakazawa, A. Arakaki, S. Narita-Yamada // *Genome Research.* – 2009. – №19. – P. 1801-1808
143. Gorobets O.Yu. Biomineralization and syntesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi / O.Yu. Gorobets, S.V. Gorobets, L.V. Sorokina // *Journal “Functional Materials”.* – 2014. – № 4. – P. 15-21.

144. Verkhovceva N.V. The magnetic transformation of iron hydroxides under the action of microorganism / N.V. Verkhovceva, A.V. Glebova // *J. Appl. Phys.* – 1994. – V.75. – P.71
145. Горобець О.Ю., Біомінералізація внутрішньоклітинних біогенних магнітних наночастинок та їх можливі функції / О.Ю. Горобець, С.В. Горобець, Ю.І. Горобець // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2013. – № 3. – С. 28-33.
146. Bharde A. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi / A. Bharde, D. Rautaray, I. Sarkar, M. Sastry // *Small.* – 2006. – V2. – P. 135 – 141.
147. Степанова М. Б. Род Фузарий (*Fusarium*) // Мир растений: в 7 томах. М.: Просвещение. – 1991. – С. 395 – 398.
148. Howard D.H. Pathogenic Fungi in Humans and Animals (2nd ed.). Marcel Dekker. – 2003. – ISBN 0- 8247-0683-8. (Google Books)
149. Guangquan L. Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus* / L. Guangquan, H. Dan, Q. Yongqing, G. Buyuan, G. Song, C. Yan // *Int. J. Mol. Sci.* –2012. – V.13(1). – P.466–476
150. James T.Y. A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota) / T.Y. James, P.M. Letcher, J.E. Longcore, S.E. Mozley-Standridge, D. Porter, M.J. Powell, G.W. Griffith, and R. Vilgalys // *Mycologia.* – 2006. – V.98. V. 860 – 871.
151. Matsunaga T. Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nanobiotechnology / T. Matsunaga, T. Suzuki, M. Tanaka // *Trends Biotechnol.* – 2007. – V.25. – P.182
152. Пилипчук Є.В. Синтез та властивості нанокмпозитів Fe₃O₄ / гідроксоапатит / памідренова кислота / діетилентриамінпентаоцтова

- кислота/Gd³⁺ / Є.В. Пилипчук, П.П. Горбик // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2015. – №44. – С.22
153. Berry C. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / C. Berry, A. Curtis, C. Berry, A. Curtis // *J. Phys. D. Appl. Phys.* – 2003. V.44. – P.36.
154. Curtis A. Biomedical aspects of magnetic nanoparticles // *Europhysics News.* – 2003. – V. 34. [Електронний ресурс]. Режим доступа: <http://www.europhysicsnews.com/full/24/article2/article2.html>
155. Lieve V. Clostridium spores as anti-tumour Agents / V. Lieve, S. Barbe, A. Jozef // *TRENDS in Microbiology.* – 2006. – V.14 – №.4. – P.12-20
156. Bermudes D. *CurrOpinDrugDiscovDevel.* – 2002. – Wei MQ, *EurJCancer* 2007
157. Chwanrow K. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer / K. Chwanrow, B. Michelle Cronin, D. O’Hanlon, O’Sullivan, M. Tangney // *Bioengineered Bugs.* – 2010. – № 1:6. – P. 385-394
158. Patyar S., Joshi R., Byrav D.S., Prakash A., Medhi B., Das B.K. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy / S. Patyar, R. Joshi, D.S. Byrav, A. Prakash, B. Medhi, B.K. Das // *J. Biomed. Sci.* – 2010. – V.17: 21. –P.30.
159. Wei M.Q. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours / M.Q. Wei, K.A. Ellem, P. Dunn, M.J. West, C.X. Bai, B. Vogelstein // *Bioengineered Bugs.* – 2012. – № 1:6. – P. 385-394
160. Kitagawaa M. Gastrointestinal Stromal Tumor in a Patient with Neurofibro-matosis: Abscess Formation in the Tumor Leading to Bacteremia and Seizure / M. Kitagawaa, T. Kohb, N. Nakagawab, Y. Kondoa, M. Nishiob, A. Ogurob, C. Sakakura // *Case Rep Gastroenterol.* – 2010. – № 4. –P. 435–442.

161. Nhiem T. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus* / T. Nhiem // International Journal of Nanomedicine. – 2010. – V.12. – P.44
162. Haikarainen T. Magnetic properties and structural characterization of iron oxide nanoparticles formed by *Streptococcus suis* Dpr and four mutants / T. Haikarainen, P. Paturi, J. Lindén, S. Haataja // J. Biol. Inorg. Chem. – 2011. – V.56. – P.28-43.
163. Горобець С.В. Біомінералізація магнітних наночастинок бактеріальними симбіонтами людини / С.В. Горобець, О.Ю. Горобець, Ю.М. Чиж, К.О. Бутенко. // Медичні перспективи. – 2014. – Т.19. – №2. – С.4 – 12
164. Richard B. Biologically Induced Mineralization by Bacteria / B. Richard P. Frankel // Reviews in Mineralogy and Geochemistry. – 2013. – V. 54. – P. 95-114.
165. Tatarov I. Effect of Magnetic Fields on Tumor Growth and Viability / I. Tatarov, A. Panda // Comparative Medicine. – 2011. – V.61. – P.339-345.
166. Williams C.D. Therapeutic electromagnetic field effects on angiogenesis and tumor growth / C.D. Williams, M.S. Markov, W.E. Hardman, I.L. Cameron // Anticancer Res. – 2001. – V.21. – P. 3887–3892.
167. Михайлов Г.А. Технология будущего: использование магнитных наночастиц в онкологии / Г.А. Михайлов, О.С. Васильева // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – №3(131). – P.22-41
168. Gorobets S.V. Self-organisation of magnetite nanoparticles in providing *Saccharomyces cerevisiae* yeast with magnetic properties / S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, I.V. Demjanenko, R.M. Nikolaenko // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2013. – № 337-338. – P. 53–57

169. Sen T. Magneto-liposomes: Stability of magnetic nanoparticles in suspension for drug delivery / T. Sen, S.J. Sheppard, T. Mercer, A. Elhissi. // *Center for Materials science, School of Forensic and Investigative Sciences, University of Central Lancashire, Preston, United Kingdom, Nanotech.* – 2010. – V.1. – P. 924 – 927.
170. Кулик Г.І. Липосомальні препарати: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину / Г.І. Кулик, В.М. Півнюк, М.М. Носко, И.Н. Тодор, В.Ф. Чехун // *Онкология.* – 2009. – Т.1. – №1. – P. 12 – 18.
171. Cuuper M. Magnetoliposomes. Formation and structural characterization / M. Cuuper, M. Joniau. // *Eur. Biophys. J.* – 1988. –V.22. – P. 311-319.
172. Півнюк В.М. Використання ліпосомальних форм хіміопрепаратів у хворих на резистентний до доксорубіцину рак молочної залози / В.М. Півнюк, Ю.О. Тимовська, О.В. Пономарьова, Г.І. Кулик, Г.П. Олійніченко, М.Ф. Анікусько, Ю.М. Краснопольський, В.Ф. Чехун // *Онкология.* – 2007. – Т9. – №2. – С.120 – 125.
173. Kitagawaa M. Gastrointestinal Stromal Tumor in a Patient with Neurofibromatosis: Abscess Formation in the Tumor Leading to Bacteremia and Seizure / M. Kitagawaa, T. Kohb, N. Nakagawab // *Case Rep Gastroenterol.* – 2010. – N 4. – P. 435-442.
174. Patyar S. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy / S. Patyar, R. Joshi, D. Prasad, Prakash // *Journal of Biomedical Science.* – 2010. – V. 17. – P.21 – 28
175. Dobson J.P. Magnetic Properties of Human Hippocampal Tissue – Evaluation of Artefact and Contamination Sources / J.P. Dobson, P. Grassi // *Brain Res. Bull.* – 1996. – V. 39. –P. 255–259.
176. Drummond D.C. Optimizing Liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors / D.C. Drummond, O. Meyer, K. Hong // *Pharmacological reviews.* – 1999. – V.51(4). – P. 691–743.

177. Haumann B.F. Liposomes offer hope as medical tools / B.F. Haumann // *Inform.* – 1995. – V.6. – P.793–802.
178. Pershina A.G. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine / A.G. Pershina, A.E. Sazonov, I.V. Milto // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2008. – № 2. – P.22 – 30
179. Zhengjian L. Probing Specific Interaction Forces Between Human IgG and Rat Anti-Human IgG by Self-Assembled Monolayer and Atomic Force Microscopy / L. Zhengjian, J. Wang, C. Guoping, D. Linhong // *Res. Lett.* – 2010. – V.5. – P.1032–1038
180. Gonzales M. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia / M. Gonzales, M. Krishnan // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* – 2005. – V.293. – P. 265–270
181. Берзофски Д. Взаимодействие антиген-антитело / Д. Берзофски, А. Берковер // *Иммунология.* – под ред. У. Пола. – Москва, Мир. – 1989. – С. 87.
182. Бараш Ю. С. Силы Ван-дер-Ваальса. – М.: Наука, 1988. – 344 с
183. "Межмолекулярные взаимодействия; от двухатомных молекул до биополимеров" Пюльман Б. (ред.) Пер. с англ., М.: Мир, 1981. – 592с.
184. Каплан И. Г. "Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий М.: Наука. – 1982. – 312с.
185. Dammer U. // Specific Antigen-Antibody Interactions Measured by Force Microscopy / U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber, H.J. Güntherodt // *Biophysical Journal.* – 1996. – V. 70. – P. 2437-2441
186. Davis D.R. Antibody-Antigen Complexes / D.R. Davis, E.A. Padlan. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1990. – V.59. – С. 439-473