

ПОТЕНЦІЙНІ ПРОДУЦЕНТИ БІОГЕННИХ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК СЕРЕД ПАТОГЕННИХ І УМОВНО-ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

С.В. Горобець, О.Ю. Горобець*, К.О. Бутенко

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: gorobets.oksana@gmail.com

Received 5 March 2018; Accepted 2 April 2018

Проблематика. Ускладнені форми інфекції при запальних процесах характеризуються зростанням резистентності мікрофлори до антибіотиків, що змушує шукати нові способи лікування, які б запобігали розвитку патогенних мікроорганізмів, підвищували місцевий імунітет і тим самим прискорювали регенеративні процеси.

Мета. Метою роботи є класифікація патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, які можуть бути потенційними продуцентами біогенних магнітних наночастинок (БМН), на предмет локалізації та властивостей БМН за допомогою методів порівняльної геноміки з перспективою їх подальшого використання як магнітокерованих векторів для цільової доставки лікарських препаратів. Це дасть змогу використовувати методи гіпертермії для знешкодження патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, які здатні до біомінералізації БМН, застосовуючи для нагріву клітин безпосередньо внутрішньоклітинні БМН цих мікроорганізмів.

Методика реалізації. У роботі застосовано методи попарного та множинного вирівнювання з використанням вільної в доступі програми “BLAST” Національного центру біотехнологічної інформації.

Результати. Виявлено, що такі штами, як *E. coli* (541-15), *K. pneumoniae* 342, *C. perfringens* str. 13, *P. fluorescens*, є потенційними продуцентами саме кристалічного магнетиту, а мікроорганізми *S. aureus* RF122, *S. suis* BM407, *E. aerogenes* KCTC 2190, *K. pneumoniae* RYC492, *P. aeruginosa* M18 можуть бути продуцентами внутрішньоклітинних аморфних БМН. Сила магнітодипольної взаємодії між БМН бактерій і БМН пухлин становить 10^{-7} – 10^{-8} Н.

Висновки. Пояснюється ефект знешкодження патогенних мікроорганізмів за допомогою методу магнітної гіпертермії за рахунок наявності БМН. Запропоновано використовувати для лікування гнійно-запальних процесів не тільки антибіотичні препарати, але й електромагнітні поля для тих мікроорганізмів, які є продуцентами БМН. Показано, що як вектори для цільової доставки лікарських препаратів доцільно використовувати мікроорганізми з природними магнітними властивостями, що зробить метод цільової доставки препаратів надійнішим та більш ефективним і зменшить його вартість.

Ключові слова: магнітне поле; біогенні магнітні наночастинок; запальні процеси; патогенні мікроорганізми; магнітна гіпертермія; цільова доставка.

Вступ

Ускладнені форми інфекції при запальних процесах (пневмонія, бактеріальні захворювання сечостатевої системи, артрит, інфікування ран та опіків, післяопераційні інфекції) характеризуються зростанням резистентності мікрофлори до антибіотиків, що змушує шукати нові способи лікування, які б запобігали розвитку патогенних мікроорганізмів, підвищували місцевий імунітет і тим самим прискорювали регенеративні процеси.

Одним із потенційних способів лікування запальних процесів є магнітна гіпертермія. Магнітні наночастинок реагують на зовнішнє змінне магнітне поле визначених частоти й амплітуди, при цьому ефективно поглинаючи зовнішню електромагнітну енергію і передаючи її у

вигляді тепла біологічним об'єктам. Наприклад, у зовнішньому електромагнітному полі магнітна наночастинок може бути використана як агент гіпертермії, що постачає достатні для руйнування дози теплової енергії джерелам запалення та пухлинним клітинам. Крім того, магнітні поля, на відміну від інших фізіотерапевтичних впливів, легко проникають через м'які тканини, не виділяючи при цьому тепла [1, 2].

Експериментально доведено ефективність застосування магнітної гіпертермії як методу знешкодження бактерій *Pseudomonas fluorescens*, що призводять до псування продуктів. Але механізм дії магнітної гіпертермії на ці бактерії залишається нез'ясованим [3].

У [4] відзначається, що імпульсні електромагнітні поля (ЕМП) здатні змінювати структуру клітинних мембран і, таким чином, змі-

нювати проникність різних іонних каналів і потенціал клітинних мембран, що важливо для клітинних функцій, наприклад для перетворення хімічної енергії на АТФ. ЕМП також можуть зберігати нормальний електрохімічний потенціал клітин, що є необхідним для продукції АТФ, яка може бути знижена унаслідок ішемії або травми. Крім того, за даними праці [4], ЕМП можуть забезпечити високу продуктивність і підвищений синтез білка (анаболічні реакції) клітин, сприяти синтезу вільних радикалів у клітинах, що можуть функціонувати як молекули-посередники в системах внутрішньоклітинної сигнальної системи [4]. При цьому механізми цих явищ не пояснюються. В роботах [5, 6] досліджено механізми впливу постійних та градієнтних магнітних полів на метаболичні процеси в клітинах, які є продуцентами біогенних магнітних наночастинок (БМН).

Гнійно-запальні захворювання мають інфекційну природу, викликаються різними видами збудників [7, 8]: грампозитивними і грамнегативними, аеробними й анаеробними мікроорганізмами, а також патогенними грибами. Найбільш поширені збудники гнійно-запальних захворювань – стафілококи (*Staphylococcus aureus*), стрептококи (*Streptococcus pneumoniae*), пневмококи (*Streptococcus pneumoniae*), гонококи (*Neisseria gonorrhoeae*), кишкова паличка (*Escherichia coli*), сизьогнійна паличка (*Pseudomonas aeruginosa*), клостридії (*Clostridium perfringens*, *Clostridium oedematis*, *Clostridium septicus*, *Clostridium histolyticum*), бацили (*Bacillus anthracis*) тощо.

За певних сприятливих для розвитку мікроорганізмів умов запальний процес (ревматоїдний артрит, пневмонія) може бути викликаний умовно-патогенними мікроорганізмами (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*) і сапрофітами (*Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*) тощо [8].

За даними праць [9, 10, 11], низка мікроорганізмів є продуцентами БМН, а в [12, 13, 14] методами порівняльної геноміки показано, що більшість досліджених у цих роботах мікроорганізмів, у т.ч. патогенні, умовно-патогенні та симбіотичні, можуть бути продуцентами БМН. Найкраще процес біомінералізації БМН вивчено у магнітотаксисних бактерій (МТБ), зокрема в *Magnetospirillum gryphiswaldense*, хоча магнітні наночастинок були знайдені в усіх трьох царствах, включаючи усі типи бактерій [15],

грибів [16], молюсків, членистоногих, риб, ссавців [17, 18], в т.ч. у людини в здоровому стані в тканинах мозку [19], серці, печінці, селезінці, надниркових залозах [20], та при патологіях, таких як злоякісні пухлини (молочна залоза, яєчники, яєчка, меланома, менінгіома, гліобластома, астроцитоз, гліома, карцинома Ерліха) [21, 22], в атеросклеротичних бляшках [23], при нейродегенеративних захворюваннях [24] тощо. При цьому механізм біомінералізації БМН є єдиним для організмів усіх трьох царств [5, 6].

Класифікація мікроорганізмів, які біомінералізують БМН, запропонована в роботі [25]. В цій роботі умовно виділено 4 групи мікроорганізмів залежно від локалізації та магнітних характеристик БМН. Група 1 включає мікроорганізми, які формують позаклітинні аморфні БМН. Група 2 представлена мікроорганізмами, які утворюють позаклітинні кристалічні БМН. Група 3 містить мікроорганізми, які синтезують внутрішньоклітинні аморфні БМН. Групу 4 становлять мікроорганізми, у клітинах яких виявлено кристалічні БМН, у т.ч. магнетитовмісні [25].

Серед патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів також можливо виділити такі 4 ігрупи, що підтверджується біоінформаційним аналізом [25] та експериментальними даними [9, 10, 11]. Для подальшого використання як магнітокерowanego вектора для цільової доставки протипухлинних препаратів і магнітної гіпертермії для терапії запальних процесів краще використовувати мікроорганізми 4 групи, що містять кристалічний магнетит, оскільки він має найбільшу магнітну сприйнятливості.

У [14] показано, що низка симбіотичних мікроорганізмів при їх введенні в кровоток локалізуються тільки на пухлинних тканинах, але механізм цієї взаємодії не розкрито. На думку авторів цієї роботи, таку взаємодію можна пояснити наявністю БМН на мембранах мікроорганізмів і на зовнішніх мембранах пухлинних клітин [13], що викликає диполь-дипольну взаємодію між цими частинками [26]. Тому запропоновано можливість цільової доставки лікарських препаратів з використанням магнітокерowanych векторів, які самі синтезують БМН.

Постановка задачі

Мета роботи – класифікувати патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми – збудники гнійно-запальних процесів, які можуть бути потенційними продуцентами БМН, на предмет

локалізації та властивостей БМН за допомогою методів порівняльної геноміки з перспективою їх подальшого використання як магнітокеро-ваних векторів для цільової доставки лікарських препаратів. Це дасть змогу використовувати методи гіпертермії для знешкодження патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, які здатні до біомінералізації БМН, застосовуючи для нагріву клітин безпосередньо внутрішньоклітинні БМН цих мікроорганізмів.

Матеріали і методи

У дослідженні використано методи попарного та множинного вирівнювання з використанням вільної в доступі програми “BLAST” Національного центру біотехнологічної інформації [27]. Проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mam, без яких неможлива біомінералізація БМН у *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, з протеомами бактерій *Staphylococcus aureus* RF122, *Streptococcus suis* BM407, *Escherichia coli* 541-15, *Pseudomonas aeruginosa* M18, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Clostridium perfringens* str. 13, *Klebsiella pneumoniae* RYC492.

Результати і їх обговорення

Вирівнювання білків МО МТБ MamA, MamB, MamM, MamE, MamO, без яких неможлива біомінералізація БМН, та білків факультативно-анаеробних мікроорганізмів, які викликають гнійно-запальні процеси і можуть бути потенційними продуцентами внутрішньоклітинних кристалічних БМН, наведені в табл. 1. Вирівнювання цих же білків МО МТБ та білків умовно-патогенних факультативно-анаеробних мікроорганізмів, які викликають гнійно-запальні процеси і можуть бути потенційними продуцентами внутрішньоклітинних аморфних БМН, наведені в табл. 2. Вирівнювання послідовностей показали, що практично всі досліджені мікроорганізми можуть бути потенційними продуцентами кристалічних БМН, оскільки гомологію підтверджують не тільки E-число та кількість ідентичних амінокислотних залишків білків (I), а й спільні функції гомологічних білків.

Проведений біоінформаційний аналіз ступеня гомології білків МО МТБ з білками патогенних організмів людини показав, що такі представники, як *Staphylococcus aureus* RF122, *Pseudomonas aeruginosa* M18, можуть бути потен-

ційними продуцентами аморфних БМН, оскільки функції гомологів білка MamA цих мікроорганізмів відрізняються від функцій цього ж білка у МТБ [11, 13]. Аналіз експериментальних даних [9, 10] та біоінформаційний аналіз цієї роботи та низки попередніх робіт [12, 13] показав, що білок MamA відповідає за формування кристалічної структури магнетиту. За відсутності у досліджуваних мікроорганізмів білків-гомологів білка MamA у клітинах формуються аморфні магнітні наночастинки, так звані магніточутливі структури (МчС) [9, 10, 12].

Біоінформаційні дослідження роботи [12] та експериментальні дослідження [9, 10] показали, що для біомінералізації мікроорганізмами внутрішньоклітинних кристалічних магнетних наночастинок, які локалізуються в клітині у вигляді ланцюжків, обов'язкова наявність усіх перерахованих вище гомологів білків МО МТБ та гомологів білка MamK, який відповідає за формування ланцюжків БМН.

При цьому функції гомологів білка MamK таких організмів, як *Staphylococcus aureus* RF122, *Streptococcus suis* BM407, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 відрізняються від функцій цього ж білка у МТБ, що свідчить про відсутність формування ланцюжків БМН у цих мікроорганізмах. У табл. 1, 2 жирним шрифтом виділено значення E-чисел гомологів білків МТБ, де їх функції не збігаються з функціями цих білків у МТБ.

Цільова доставка протипухлинних препаратів. Експериментально доведено, що деякі види мікроорганізмів з анаеробним типом метаболізму (представники родів *Streptococcus suis*, *Bifidobacterium breve*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Listeria* та ін.) при їх внутрішньовенному введенні здатні накопичуватися та проліферувати в гіпоксичних ділянках пухлин, однак не у нормальних тканинах [14, 28, 29]; це може бути використано для цілеспрямованої доставки протипухлинних препаратів, терапевтичних генів та білків у пухлинні клітини, а також ферментів для онколітичної та імуноад'ювантної терапії [30].

Проте механізми, за рахунок яких відбувається накопичення бактерій-анаеробів у мікрооточенні пухлини, залишаються нез'ясованими. Як одне з припущень стосовно можливості природи первинного контакту, наслідком якого є проникнення, а в подальшому і накопичення бактеріальних клітин у пухлинній тканині, можна розглядати магнітний характер взаємодій бактеріальних і пухлинних клітин [13].

Таблиця 1: Порівняння білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків потенційних продуцентів кристалічних БМН, що є збудниками запальних процесів

Штам мікроорганізмів	E-число (I, %)					
	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	MamM	MamO	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 %)

Примітка. ● – продуцент кристалічних БМН [11]; ■ – потенційний продуцент кристалічних БМН.

Таблиця 2: Порівняння білків МО МТБ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та білків потенційних продуцентів аморфних БМН, що є збудниками запальних процесів

Штам мікроорганізмів	E-число (I, %)					
	Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
	MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
<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 %)

Примітка. ● – продуцент аморфних БМН [9, 10]; ■ – потенційний продуцент аморфних БМН.

Присутність у протеомі мікроорганізмів, які використовуються при створенні засобів біотерапії онкозахворювань, білків, гомологічних до білків біомінералізації магнетиту *M. gryphiswaldense* MSR-1, свідчить про можливість синтезу в цих мікроорганізмах залізовмісних мінералів. У той же час доведеним є синтез наночастинок магнетиту в клітинах пухлин [22]. Враховуючи сказане вище, можна припускати, що надходження та накопичення цих мікроорганізмів у пухлині відбувається за рахунок сили магнітодипольної взаємодії, що виникає між ендогенними частинками магнетиту пухлинних клітин та ендогенними частинками магнетиту мікроорганізмів, яка має близький порядок величини до сил специфічного зв'язування антиген-антитіло, і тому її важливо враховувати та використовувати при проектуванні систем для доставки лікарських форм [13].

Розрахунок сили, що виникає між частинками. У роботі проведений розрахунок сили магнітодипольної взаємодії, що виникає між БМН пухлинної клітини та БМН мікроорганізмів.

Оскільки ендогенні магнітні наночастинок в пухлинних клітинах локалізовані у вигляді довгих ланцюгів [22] і оскільки в більшості випадків магнітні наночастинок бактерій локалізовані теж у вигляді ланцюгів [11, 15], то можливо розрахувати силу взаємодії між ними. Для спрощення розрахунку було вибрано модель однакових частинок.

На рис. 1 [26] зображено 2 ланцюги, що містять магнітні наночастинок пухлинної тканини та бактерії. Частинок в обох ланцюгах розміщені на відстані l_0 один від одного і мають радіус r_0 . Частинок другого ланцюга зміщені на відстань Δ відносно частинок першого ланцюга.

Векторна сума сил, з якими частинка першого ланцюга діє на всі частинки 2-го ланцюга, має вигляд

$$\mathbf{F}_{\text{sum}} = \sum_{n=-N_2}^{M_2} \mathbf{F},$$

де M_2 та N_2 – кількість найближчих сусідів праворуч та ліворуч для першої лівої частинки 1-го ланцюга у 2-му ланцюгу.

В результаті отримуємо

$$F_{x\text{sum}} = \sum_{n=-N_2}^{M_2} F_x,$$

$$F_{y\text{sum}} = \sum_{n=-N_2}^{M_2} F_y, \quad F_{z\text{sum}} = \sum_{n=-N_2}^{M_2} F_z.$$

Z-компонента сили взаємодії самої лівої частинки 1-го ланцюга з $(M_2 + N_2 + 1)$ частинками – сусідами з 2-го ланцюга дорівнює

$$\begin{aligned} F_{z\text{sum}} &= C_1 \sum_{n=-N}^M = -N \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{2x^2 - y^2 - z^2}{(x^2 + y^2 + z^2)^{\frac{5}{2}}} \right) = \\ &= C_1 \sum_{n=-N}^M = -N \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{2 \left(\frac{\Delta}{r_0} + I_0 n \right)^2 - y^2 - z^2}{\left[\left(\frac{\Delta}{r_0} + I_0 n \right)^2 + y^2 + z^2 \right]^{\frac{5}{2}}} \right). \end{aligned}$$

Z-компонента сили, з якою всі частинки 1-го ланцюга діють на всі частинки 2-го ланцюга, має вигляд

$$\begin{aligned} F_{z\text{total}} &= \\ &= C_1 \sum_{k=1}^{N_1 \text{particle}} \sum_{n=N_2+k-1}^{M_2-k+1} \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{2 \left(\frac{\Delta}{r_0} + I_0 n \right)^2 - y^2 - z^2}{\left[\left(\frac{\Delta}{r_0} + I_0 n \right)^2 + y^2 + z^2 \right]^{\frac{5}{2}}} \right). \end{aligned}$$

У результаті розрахунку отримано силу, яка становить 10^{-7} – 10^{-8} Н, що має близький порядок величини із силами специфічного зв'язування, наведеними у працях [31], і навіть де-що їх перевищує.

Далі наводяться графіки залежності розрахованої сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів від розміру та кількості БМН (рис. 2).

Використання у біотерапії онкологічних захворювань бактерій має перевагу з точки зору їх здатності одночасно експресувати кілька терапевтичних білків і знищуватися антибіотиками, при цьому накопичуючись у пухлинній тканині. Як можливі складові існуючих та потенційних методів протипухлинної терапії використовують живі, ослаблені або генетично модифіковані бактерії для доставки до пухлинної клітини лікарських хімотерапевтичних або імунотерапевтичних засобів або для досягнення прямого протипухлинного ефекту, що може реалізуватися завдяки посиленню реакції місцевого імунітету [28, 30].

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.

Магнітна гіпертермія. Наночастинок, які мають магнітні властивості, становлять значний інтерес для медицини, що пов'язано з можливістю дистанційного керування ними та конструкціями на їх основі при накладенні зовнішнього магнітного поля [1].

Магнітні наночастинок реагують на зовнішнє змінне магнітне поле визначених частоти й амплітуди, при цьому ефективно поглинаючи зовнішню електромагнітну енергію і передаючи її у вигляді тепла біологічним об'єктам. Наприклад, у зовнішньому електромагнітному полі магнітна наночастинок може бути використана як агент гіпертермії, що постачає достатні для руйнування дози теплової енергії пухлинним клітинам. Відомо, що ракові клітини гинуть при 40–42 °С [1].

У клінічній практиці використовується метод локального нагрівання пухлинних тканин високочастотними магнітними полями при частотах до 14 МГц [2]. Також для лікування використовується метод магнітно-рідинної гіпертермії, при якому нагрівання пухлинної тканини до 45 °С призводить до її руйнування [1].

У праці [3] показана ефективність магнітної гіпертермії як потенційного методу дезинфекції проти патогенного мікроорганізму – *Pseudomonas fluorescens*, який призводить до псування продуктів. З точки зору авторів цієї роботи, знешкодження *P. fluorescens* може відбуватися не так за рахунок штучних магнітних наночастинок, які використовували для процесу гіпертермії автори [3], як за рахунок БМН, продуцентами яких, як показав біоінформаційний аналіз, є названий мікроорганізм (див. табл. 1).

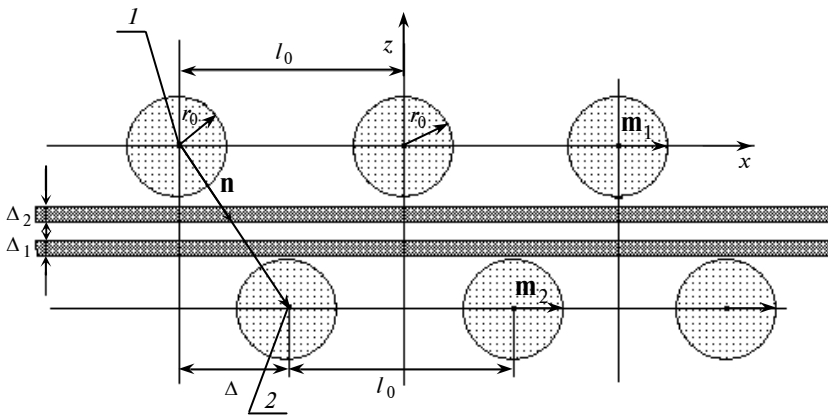


Рисунок 1: Схематичне зображення взаємодії наночастинок бактерії та ендогенних частинок пухлини: 1 – ендогенна магнітна наночастинка в пухлинних клітинах, 2 – магнітна наночастинка бактерії, Δ_1 – товщина мембрани бактерії, Δ_2 – товщина мембрани пухлинної клітини, $\Delta = \Delta_1 + \Delta_2$

Важливо відзначити, що властивості кристалічних БМН (розмір, магнітна сприйнятливість) практично збігаються з властивостями штучних магнітних наночастинок, які використовуються при гіпертермії (як правило, це магнетит Fe_3O_4).

Проведені в роботі дослідження показують, що окремі штами всіх розглянутих патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів можуть бути потенційними продуцентами наночастинок магнетиту, що підтверджується біоінформаційним аналізом цієї роботи та експериментальними роботами [9, 10]. Впливаючи на них зовнішнім магнітним полем, можна викликати гіпертермію, що приведе до загибелі патогенних мікроорганізмів і прискорення регенеративних процесів при запальних процесах.

При лікуванні гнійних ран також можливо використовувати для знешкодження патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів не тільки гіпертермію, але й вилучення цих патогенів із рани. Для цього можна використовувати мазі, змішані з магнітною рідиною, що дасть змогу більш ефективно вилучати мікроорганізми-продуцен-

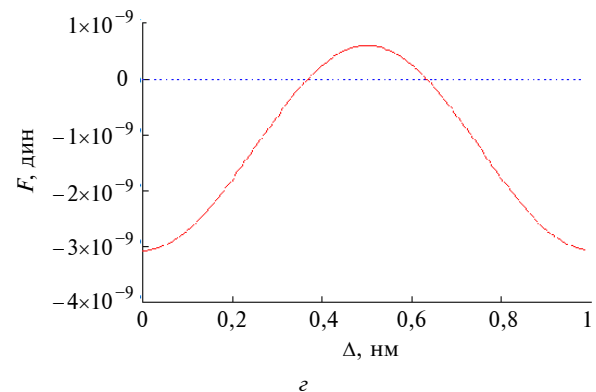
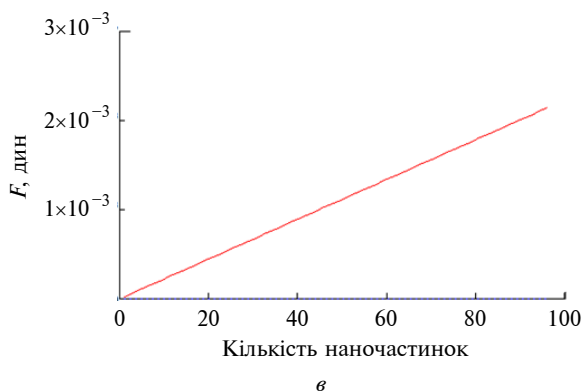
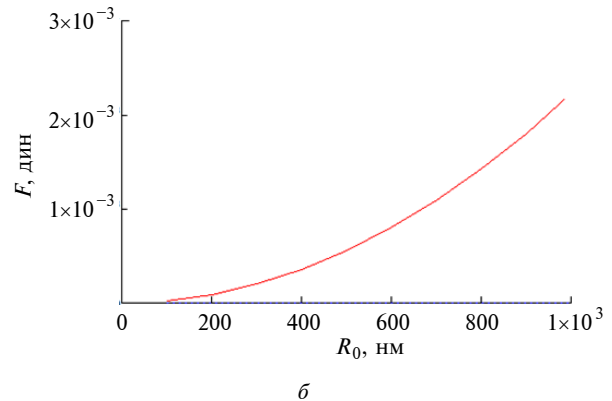
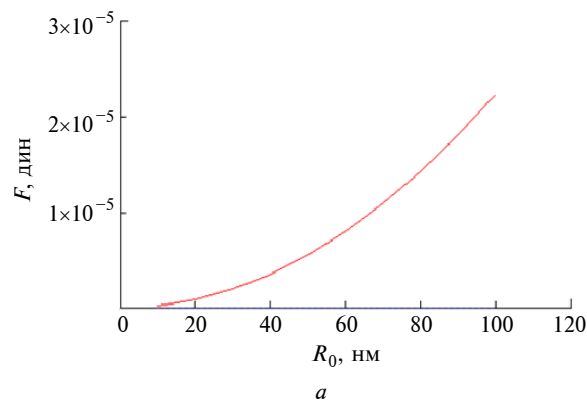


Рисунок 2: Графіки залежності сили магнітодипольної взаємодії між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів від: а – радіуса наночастинок 10–100 нм; б – радіуса наночастинок 100–1000 нм; в – кількості наночастинок; г – відстані зсуву наночастинок 2-го ланцюга відносно 1-го 1 дин. = 10^{-5} Н

ти БМН за допомогою високоградієнтного зовнішнього магнітного поля. При цьому взаємодія між магнітними наночастинками (магнітною рідиною) та БМН бактерій відбувається за рахунок сил магнітодипольної взаємодії між магнітною рідиною та БМН бактерій [26]. Ця сила має близький порядок величини до сил специфічного зв'язування антиген–антитіло [26].

Висновки

Методами порівняльної геноміки проведено вирівнювання білків МО МТБ з білками патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, збудників запальних процесів у людини. Показано, що такі штами, як *Escherichia coli* (541-15), *Klebsiella pneumoniae* 342, *Clostridium perfringens* str. 13, *Pseudomonas fluorescens*, є потенційними продуцентами саме кристалічного магнетиту і належать до 4-ї групи, оскільки мають гомологи всіх білків, без яких неможлива біомінералізація магнітних наночастинок, включаючи білок МамаА, що відповідає за синтез кристалічних наночастинок. А мікроорганізми *Escherichia coli* 541-15 є продуцентами БМН.

Виявлено, що досліджувані мікроорганізми: *Staphylococcus aureus* RF122, *Streptococcus suis* BM407, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella pneumoniae* RYC492 можуть бути продуцентами внутрішньоклітинних аморфних БМН і належать до 3-ї групи, а мікроорганізми *Pseudomonas aeruginosa* M18 є продуцентами БМН.

Відомо, що пухлинні клітини містять біогенні наночастинки магнетиту, а деякі види бактерій накопичуються в пухлинах [28, 29]. По-

яснюється накопичення мікроорганізмів на поверхні пухлин, що відбувається за рахунок сили магнітодипольної взаємодії [26] між БМН пухлинних клітин та БМН мікроорганізмів, яка має близький порядок величини до сил специфічного зв'язування антиген–антитіло, і тому її важливо враховувати та використовувати при проектуванні систем для доставки лікарських форм.

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

Показано, що патогенні мікроорганізми, які накопичуються при запальному процесі, при дії зовнішнього магнітного поля можуть знищуватися завдяки гіпертермії, що дасть змогу швидко очистити джерело запалення, підвищити місцевий імунітет і тим самим прискорити регенеративні процеси в рані.

Запропоновано вилучення патогенних мікроорганізмів із гнійних ран під дією зовнішнього магнітного поля при взаємодії магнітних наночастинок (магнітної рідини) та БМН бактерій, що відбувається за рахунок сил магнітодипольної взаємодії між наночастинками.

Важливим аспектом у подальшому вивченні розглянутої проблеми є культивування та дослідження впливу магнітного поля на визначені мікроорганізми-продуценти БМН.

References

- [1] Nikiforov VN. Medical applications of magnetic nanoparticles. *Izvestija Akademii Inzhenernyh Nauk im. A.M. Prohorova*. 2013;1:23-34.
- [2] Nikiforov VN, Brusentsov NA. Magnetic hyperthermia in oncology. *Medicinskaja Fizika*. 2007;2:51-9.
- [3] Banobre-Lopez M, Rodrigues D, Espina B, Azeredo J, Rivas J. Control of bacterial cells growths by magnetic hyperthermia. *IEEE Trans Magn*. 2013;49(7):3508-11. DOI: 10.1109/tmag.2013.2247384
- [4] Ikehara T, Park K, Yamaguchi H, Hosokawa K, Houchi H, Azuma M, et al. Effects of a time varying strong magnetic field on release of cytosolic free Ca^{2+} from intracellular stores in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Bioelectromagnetics*. 2002;23(7):505-15. DOI: 10.1002/bem.10043
- [5] Gorobets SV, Gorobets OYu. Function of biogenic magnetic nanoparticles in organisms. *Functional Mater*. 2012;19(1):18-26. DOI: 10.1002/adfm.v22.24
- [6] Gorobets SV, Gorobets OYu. Biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles and their possible functions in cells of prokaryotes and eukaryotes. In: *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. 3rd ed. Taylor&Francis; 2014. p. 300-6.
- [7] Petrov SV. *General Surgery*. Saint Petersburg: Lan; 1999. 672 p.
- [8] Zilina SV, Mironov AYU, Polikarpova SV. Enterobacteriaceae in the chronic inflammatory diseases of the skin and soft tissues. *Chelovek i Ego Zdorov'e*. 2008;1:58-63.

- [9] Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:277-83.
- [10] Haikarainen T, Paturi P, Lindén J, Haataja S, Meyer-Klaucke W, Finne J, et al. Magnetic properties and structural characterization of iron oxide nanoparticles formed by *Streptococcus suis* Dpr and four mutants. *J Biol Inorganic Chem*. 2011; 16(5):799-807. DOI: 10.1007/s00775-011-0781-z
- [11] Vainshtein M, Suzina N, Kudryashova E, Ariskina E. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells. *Biol Cell*. 2002;94(1):29-35. DOI: 10.1016/s0248-4900(02)01179-6
- [12] Gorobets SV, Gorobets OYu, Chyzh YuM, Demianenko IV. The genetic basis of a fundamental mechanism in the biosynthesis nanomagnetite magnetotactic and an aerobic microorganisms. *Visnyk Natsional'noho Chernivets'koho Universytetu. Biologichni Systemy*. 2013;5(2):274-80.
- [13] Gorobets SV, Gorobets OYu, Butenko KO, Chyzh YuM. Biomineralization of magnet nanoparticles with bacterial symbionts of man. *Medychni Perspektyvy*. 2014;19(2):4-12.
- [14] Cronin M, Akin A, Collins S, Meganck J, Kim J, Baban C, et al. High resolution *in vivo* bioluminescent imaging for the study of bacterial tumour targeting. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e30940. DOI: 10.1371/journal.pone.0030940
- [15] Sakaguchi T, Arakaki A, Matsunaga T. *Desulfovibrio magneticus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. *Int J System Evolution Microbiol*. 2002;52(1):215-21. DOI: 10.1099/00207713-52-1-215
- [16] Bharde A, Parikh R, Baidakova M, Jouen S, Hannover B, Enoki T, et al. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24(11):5787-94. DOI: 10.1021/la704019p
- [17] Heywood B, Bazylinski D, Garratt-Reed A, Mann S, Frankel R. Controlled biosynthesis of Greigite (Fe₃S₄) in magnetotactic bacteria. *Naturwissenschaften*. 1990;77(11):536-8. DOI: 10.1007/bf01139266
- [18] Mann S, Sparks NH, Walker MM, Kirschvink JL. Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: implications for magnetoreception. *J Exp Biol*. 1988;40:35.
- [19] Dobson JP, Fuller M, Moser S. Magnetic field sand iron biomineralization in the human brain. *Fund Res Applications*. 1995;5:16.
- [20] Schultheiss-Grassi P, Heller F, Dobson J. Analysis of magnetic material in the human heart, spleen and liver. *Biometals*. 1997;10:351.
- [21] Brem F, Hirt A, Winklhofer M, Frei K, Yonekawa Y, Wieser H, et al. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue. *J Royal Soc Interface*. 2006;3(11):833-41. DOI: 10.1098/rsif.2006.0133
- [22] Chehun VF, Gorobets SV, Gorobets OYu, Demianenko IV. Magnetic nanostructures in tumor cells application of scanning probemicroscopy to study the structural organization magnetosensitive phase in tumor cells. *Visnyk NAN Ukrayiny*. 2011;11:13-20.
- [23] Alexeeva TA, Gorobets SV, Gorobets OYu, Demianenko IV, Lazarenko OM. Magnetic force microscopy atherosclerotic plaques. *Medychni Perspektyvy*. 2014;19(1):4-10.
- [24] Dobson J. Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease. *FEBS Letters*. 2001;496(1):1-5. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02386-9
- [25] Gorobets OYu, Gorobets SV, Sorokina LV. Biomineralization and syntesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi. *Functional Mater*. 2014;4:15-21.
- [26] Gorobets SV, Gorobets OYu, Chizh IuM, Siveniuk DV. Magnetic dipole interaction of endogenous magnetic nanoparticles with magnetic liposomes in the targeted drug delivery. *Biofizika*. 2013;58(3):488-94.
- [27] BLAST: Basic local alignment search tool [Internet]. Blast.ncbi.nlm.nih.gov. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- [28] Patyar S, Joshi R, Byrav D, Prakash A, Medhi B, Das B. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci*. 2010;17(1):21. DOI: 10.1186/1423-0127-17-21
- [29] Kitagawa M, Koh T, Nakagawa N, Kondo Y, Nishio M, Oguro A, et al. Gastrointestinal stromal tumor in a patient with neurofibromatosis: Abscess formation in the tumor leading to bacteremia and seizure. *Case Rep Gastroenterol*. 2010;4(3):435-42. DOI: 10.1159/000321523
- [30] Wei M, Ellem K, Dunn P, West M, Bai C, Vogelstein B. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. *Eur J Cancer*. 2007;43(3):490-6. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.10.005
- [31] Berzofsky J, Berkover A. Antigen-antibody interaction. In: Paul W, Ed. *Immunology*. Moscow: Mir; 1989. p. 87.

С.В. Горобец, О.Ю. Горобец, Е.А. Бутенко

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ БИОГЕННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ СРЕДИ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Проблематика. Осложненные формы инфекции при воспалительных процессах характеризуются ростом резистентности микрофлоры к антибиотикам, что заставляет искать новые способы лечения, которые бы предотвращали развитие патогенных микроорганизмов, повышали местный иммунитет и тем самым ускоряли регенеративные процессы.

Цель. Целью работы является классификация патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые могут быть потенциальными продуцентами биогенных магнитных наночастиц (БМН) на предмет локализации и свойств БМН с помощью методов сравнительной геномики с перспективой их дальнейшего использования в качестве магнитоуправляемых векторов для целевой доставки лекарственных препаратов. Это позволит использовать методы гипертермии для обезвреживания патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые способны к биоминерализации БМН, применяя для нагрева клеток непосредственно внутриклеточные БМН этих микроорганизмов.

Методика реализации. В работе применялись методы парного и множественного выравнивания с использованием свободной в доступе программы "BLAST" Национального центра биотехнологической информации.

Результаты. Выявлено, что такие штаммы, как *E. coli* (541-15), *K. pneumoniae* 342, *C. perfringens* str. 13, *P. fluorescens*, являются потенциальными продуцентами именно кристаллического магнетита, а микроорганизмы *S. aureus* RF122, *S. suis* BM407, *E. aerogenes* KCTC 2190, *K. pneumoniae* RYC492, *P. aeruginosa* M18 могут быть продуцентами внутриклеточных аморфных БМН. Сила магнитодипольного взаимодействия между БМН бактерий и БМН опухолей составляет 10^{-7} – 10^{-8} Н.

Выводы. Объясняется эффект обезвреживания патогенных микроорганизмов с помощью метода магнитной гипертермии за счет наличия БМН. Предложено использовать для лечения гнойно-воспалительных процессов не только антибиотические препараты, но и электромагнитные поля для тех микроорганизмов, которые являются продуцентами БМН. Показано, что в качестве векторов для целевой доставки лекарственных препаратов целесообразно использовать микроорганизмы с естественными магнитными свойствами, что сделает метод целевой доставки препаратов надежным и более эффективным и уменьшит его стоимость.

Ключевые слова: магнитное поле; биогенные магнитные наночастицы; воспалительные процессы; патогенные микроорганизмы; магнитная гипертермия; целевая доставка.

S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, K.O. Butenko

POTENTIAL PRODUCERS OF BIOGENIC MAGNETIC NANOPARTICLES AMONG PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

Background. The complicated forms of infection in inflammatory processes characterized by rising resistance of microorganisms to antibiotics, are forcing to find new treatments that would prevent development of pathogenic microorganisms, increased local immunity, and thus accelerated regenerative processes.

Objective. Classification of pathogenic and opportunistic microorganisms that may be potential producers of BMN, in terms of the location and properties of BMN using the methods of comparative genomics with the prospect of their subsequent use as the vectors for magnetically targeted delivery of drugs. This will make possible the use of the hyperthermia techniques for removal of pathogenic and opportunistic microorganisms that are capable of biomineralization BMN using for heating the cells directly intracellular BMN of these microorganisms.

Methods. The methods of paired and multiple sequence alignment were applied using a free access program "BLAST" of National Center for Biotechnology Information.

Results. It was revealed that strains such as *E. coli* (541-15), *K. pneumoniae* 342, *C. perfringens* str. 13, *P. fluorescens* are potential producers of crystalline magnetite and bacteria: *S. aureus* RF122, *S. suis* BM407, *E. aerogenes* KCTC 2190, *K. pneumoniae* RYC492, *P. aeruginosa* M18 can be producers of intracellular amorphous BMN. The power of magnetic dipole interaction between BMN of the bacteria and BMN of the tumors is in the range between 10^{-7} – 10^{-8} N.

Conclusions. It is explained the neutralization effect of pathogens by the method of magnetic hyperthermia due to the presence BMN, and it was proposed the use for the treatment of inflammatory processes not only antibiotic drugs, but also electromagnetic fields for those microorganisms which are producers of BMN. It is shown that as vectors for targeted delivery of drugs should be used microorganisms with natural magnetic properties, making method targeted delivery of drugs safer and more efficient, and reduced its cost.

Keywords: magnetic field; biogenic magnetic nanoparticles; inflammation; pathogenic microorganisms; magnetic hyperthermia; targeted delivery.

Reprinted from: *Naukovi Visti NTUU KPI*. 2015;3:23-32