

УДК 577.29

*Н.Ф. Кігель, головний науковий співробітник*  
Інститут продовольчих ресурсів НААН  
*С.В. Горобець, д.т.н., проф.*  
НТУУ "Київський політехнічний інститут"  
*М.О. Булаєвська*  
Національний авіаційний університет  
*А.О. Гнатюк*  
*О.В. Голуб*

### МЕТОД ДЕТЕКЦІЇ БІОГЕННИХ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

*Зі застосуванням спектрометра електронного парамагнітного резонансу ELEXSYS E500 Bruker BioSpin розроблено метод, який дозволяє диференційне визначення феритину, штучних та біогенних магнітних наночастинок прокариот та еукариот.*

*N.F. Kigel, senior research fellow*  
The Institute of Food Resources of NAAS  
*S.V. Gorogets, D. Sc. Technics, prof.*  
NTUU Kiev Polytechnic Institute  
*M.O. Bulayevska*  
National Aviation University  
*A.O. Gnatiuk*  
*O.V. Golub*

### METHOD FOR DETECTION OF BIOGENOUS MAGNETIC NANOPARTICLES IN BIOMATERIAL OF DIFFERENT ORIGIN

*With using spectrometer electron paramagnetic resonance ELEXSYS E500 Bruker BioSpin developed a Method that allows differential determining the ferritin, artificial and biogenic magnetic nanoparticles in prokaryotes and eukaryotes.*

*Н.Ф. Кизель, главный научный сотрудник*  
Институт продовольственных ресурсов НААН  
*С.В. Горобец, д.т.н., проф.*  
НТУУ "Киевский политехнический институт"  
*М.О. Булаевская*  
Национальный Авиационный Университет  
*А.О. Гнатюк*  
*О.В. Голуб*

### МЕТОД ДЕТЕКЦИИ БИОГЕННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ

*С применением спектрометра электронного парамагнитного резонанса ELEXSYS E500 Bruker BioSpin разработан метод, который позволяет дифференциальное определение ферритина, искусственных и биогенных магнитных наночастиц прокариот и эукариот.*

Сучасним напрямом молекулярної біотехнології та медицини є застосування штучних магнітних наночастинок у діагностиці та лікуванні захворювань [1]. Це пов'язано

з можливістю дистанційного управління ним і конструкціями на їх основі в зовнішніх магнітних полях [2, 3].

На сьогодні найширше застосування в медицині та біотехнології отримали частинки нанорозмірного оксиду заліза, а саме магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), що зумовлено їх низькою токсичністю та стабільністю магнітних характеристик [3 - 5].

У 1962 році Ловенстам вперше виявив біохімічно осаджений магнетит у радулі хітонів. Ловенстам продемонстрував біологічне походження цього матеріалу шляхом різних радіоізотопних досліджень і детального вивчення ультраструктури радули [1].

У 1975 році Блекмор відкрив магнітотаксисні бактерії (МТБ), які на сьогодні розглядають, як найбільш вивчену біомагнітну систему [1, 6]. Було встановлено, що ці бактерії містять ланцюжки кристалоподібних включень, багатих на залізо, завдяки яким магнітотаксисні бактерії реагують на магнітні поля [6].

Варто зауважити, що наразі біогенні магнітні наночастинки (БМН) виявлено у представників трьох доменів живих організмів, а саме, у бактерій, у архей та у еукаріотів [7]. Ряд організмів, таких як медоносні бджоли, риби, терміти, голуби, здатні утворювати магнетит і зв'язувати оксиди заліза. Частинки магнетиту також було знайдено у багатьох органах людини. Крім того відомо, що підвищений рівень БМН в організмі людини тісно пов'язаний з низькою захворюваністю, включаючи нейродегенеративні та онкологічні захворювання [6]. Саме тому, дуже важливим є вміння правильно ідентифікувати природу магнітних наночастинок у живих організмах (штучні магнітні наночастинки або БМН). Зручними і ефективними методами вивчення магнітних властивостей є методи магнітних резонансів (МР): феромагнітний резонанс (ФМР) і електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) [8, 9, 10].

ЕПР (електронний парамагнітний резонанс) – метод, суть якого полягає у резонансному поглинанні електромагнітного випромінювання неспареними електронами. Особливою формою методів МР є феромагнітний резонанс (ФМР), який проявляється у вибіркового поглинанні феромагнетиком енергії електромагнітного поля при частотах, що збігаються з власними частотами прецесії магнітних моментів електронної системи феромагнітного зразка у внутрішньому ефективному магнітному полі. Метод ФМР може надати інформацію про магнітні властивості (сприйнятливості або кристалографічну анізотропію), форму магнітних наночастинок і їх розташування [11].

### **Постановка задачі**

Метою роботи є диференційована ідентифікація феритину, штучних та біогенних магнітних наночастинок у прокариот та еукаріот за допомогою спектрометра електронного парамагнітного резонансу ELEXSYS E500 Bruker BioSpin.

### **Матеріали і методи**

Об'єктами дослідження були бактерії *E. coli* K13, *E. coli* 0111, *E. coli* БТ1, біологічний матеріал решітчастої кістки лосося, а також дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, що застосовуються в харчовій промисловості.

Вибір даного біологічного матеріалу було здійснено за результатами аналізу літературних даних про наявність в ньому БМН, та залізовмісних білків, зокрема феритину. А саме: відомо, що *E.coli* має щонайменше два білки для зберігання заліза: гемвмісний бактеріоферитин і феритин [12], проте не містить БМН. Натомість у решітчастій кістці лосося присутній як феритин, так і БМН, а клітини *S. cerevisiae* не містять ні феритину, ні БМН. Клітини *S. cerevisiae* слугували контролем, а також використовувались для мічення штучними магнітними наночастинками.

Біомасу бактерій вирощували на м'ясопептонному агарі в матрацах (*E. coli* БТ1 і *E. coli* 0111) та методом глибинного культивування у середовищі Кесслер (*E. coli* K13).

Після культивування у матрацах клітини бактерій змивали з поверхні агару фізіологічним розчином та вилучали центрифугуванням (2500 об/хв., 15 хв), повторюючи таку процедуру двічі. З рідкої культури клітини *E. coli* K13 відділяли від культуральної

рідини центрифугуванням за означеного вище режиму, осад двічі промивали для вилучення залишків компонентів культуральної рідини. Отриману у такий спосіб біомасу сушили у сушильній шафі при 105 °С до постійної маси.

У зразках сухого біологічного матеріалу масою 0,01 г досліджували парамагнітний та феромагнітний резонанс на приладі ELEXSYS E500 Bruker BioSpin (Інституту магнетизму НАН України).

Отримані результати порівнювали з аналогічними для зразків *S. cerevisiae* зі штучними магнітними мітками та зразку решітчастої кістки лосося.

Для графічної інтерпретації результатів застосовували прикладний пакет Mathcad.

### Результати і їх обговорення

У результаті проведених МР-досліджень встановлено, що залежності першої похідної енергії адсорбції електромагнітного випромінювання від індукції магнітного поля (В [Гс]) відрізняються для зразків біологічного матеріалу з різними магнітними властивостями. Результати МР-вимірювання зразків *E. coli*, усереднені за даними аналізування трьох штамів (*E. coli* K13, *E. coli* 0111, *E. coli* БТ1), результати МР-вимірювання біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося, а також результати МР-вимірювання зразків *S. cerevisiae*, що використовуються в харчовій промисловості, представлено на рисунку 1. Зокрема, спектр МР клітин *S. cerevisiae* характеризується значно меншою амплітудою піків, ніж МР-спектри інших зразків, незалежно від величини прикладеного поля, при цьому дріжджі не містять магнітних наночастинок, що повністю узгоджується з літературними даними.

МР-спектр біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося демонструє вузький пік при 3,5 кГс, тоді як ширина піку спектру МР для *E. coli* K13 є значно більшою. Така закономірність, очевидно, спричинена зростанням магнітодипольної взаємодії між частинками. Крім того, слід зауважити, що амплітуда зміни першої похідної енергії адсорбції електромагнітного випромінювання від індукції магнітного поля зразків *E. coli* K13 є на порядок меншою, ніж для аналогічних зразків біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося. Такий ефект, очевидно, є результатом наявності у біологічному матеріалі решітчастої кістки лосося як феритину, так і БМН.

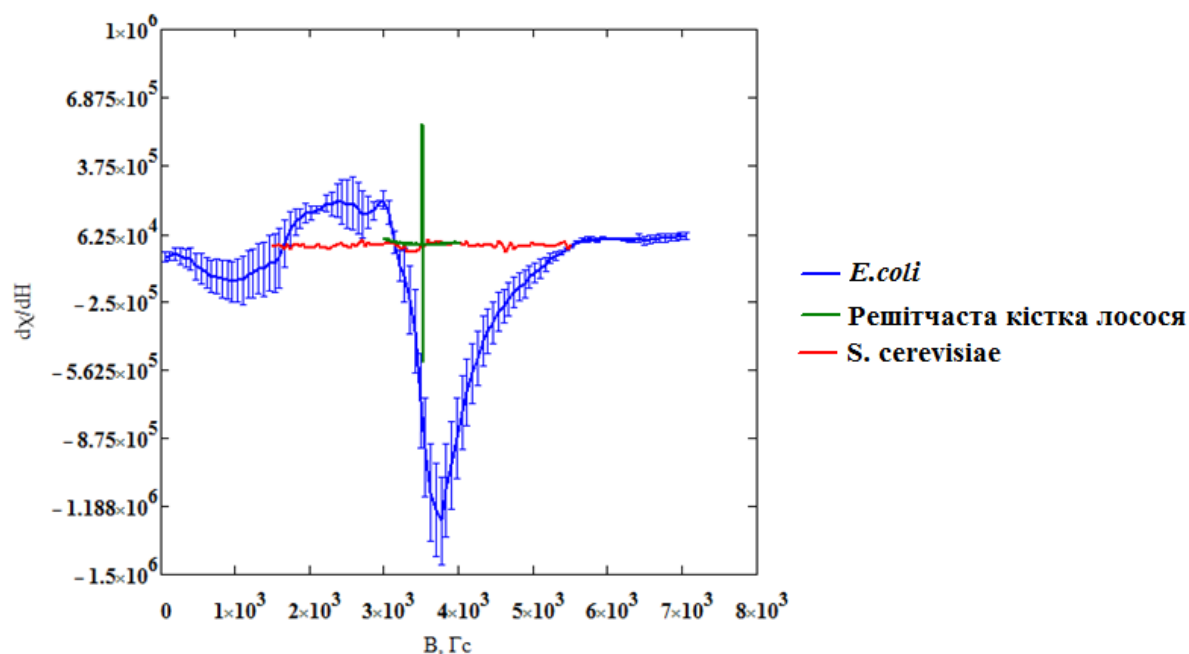


Рис.1 Залежність першої похідної енергії адсорбції електро-магнітного випромінювання від індукції магнітного поля зразків *E. coli*, решітчастої кістки лосося та *S.cerevisiae*.

Дещо інші закономірності, порівняно з БМН, встановлено для уведених штучно в клітини дріжджів магнітних наночастинок в концентрації 0,0001%, 0,001%, 0,01%, 1%. Результати цих досліджень зображено на рис. 2 і рис. 3.

Зі збільшенням концентрації магнетиту чітко простежується збільшення амплітуди піків спектру МР. Водночас збільшується ширина характерного піку. Максимум сигналу поглинання за кімнатної температури спостерігається за величини магнітного поля 2,8 кГс. При збільшенні концентрації магнетиту положення максимуму зміщується в більш низькі магнітні поля. Ширина піку магнітомічених *S. cerevisiae* набагато більша за ширину піку біологічного матеріалу з решітчастої кістки лосося, що свідчить про утворення агломератів штучних магнітних наночастинок при магнітоміченні дріжджів.

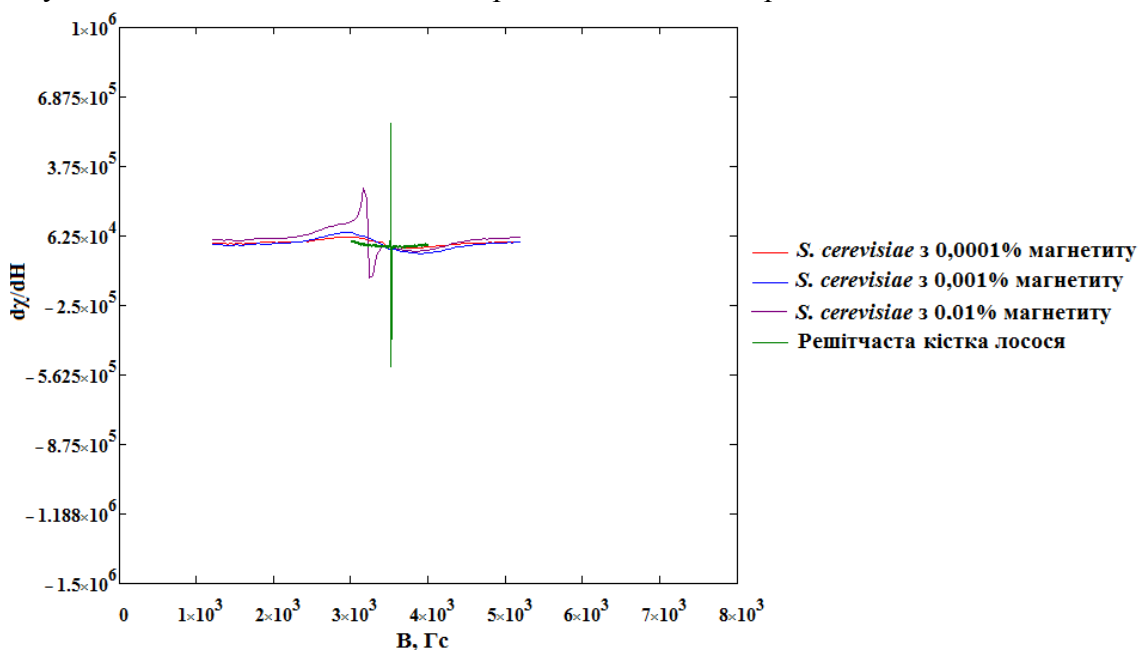


Рис. 2. Залежність першої похідної енергії адсорбції електро-магнітного випромінювання від індукції магнітного поля зразків *S.cerevisiae* з магнітними мітками і решітчастої кістки лосося

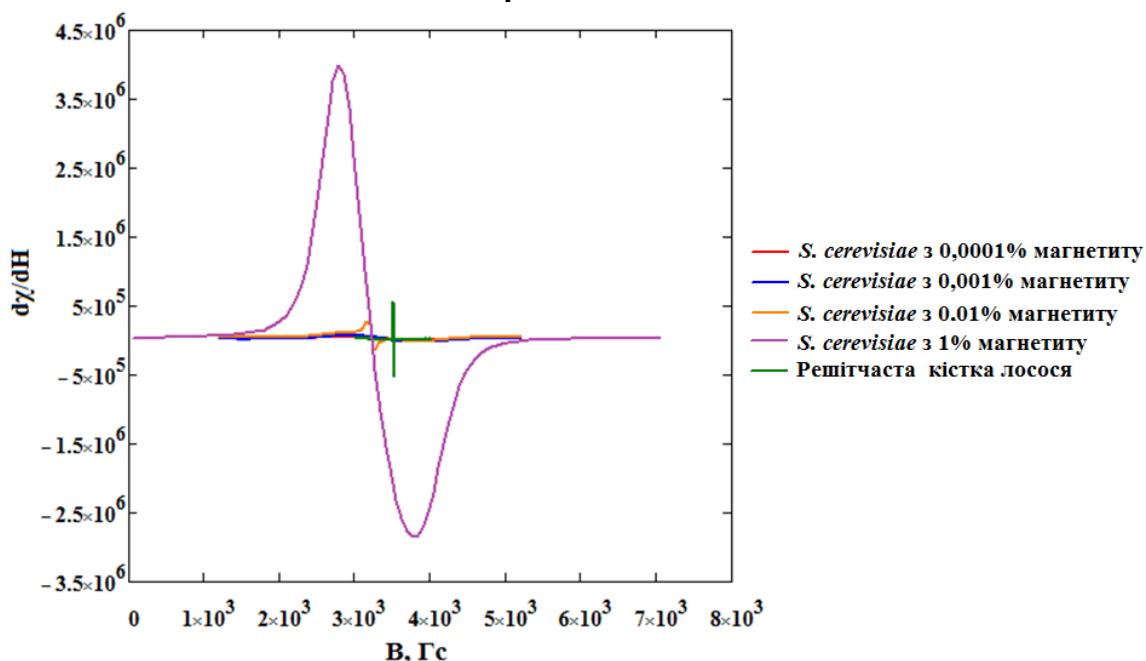


Рис.3. Залежність першої похідної енергії адсорбції електро-магнітного випромінювання від індукції магнітного поля ( $H$  [Гс]) зразків *S.cerevisiae* з магнітними мітками і решітчастої кістки лосося

**Висновки**

Встановлено, що методи МР-спектроскопії дозволяють чітко ідентифікувати феритин, біогенні та штучні магнітні наночастинки в біологічному матеріалі, що підтверджується відповідними МР-спектрами біологічного матеріалу різного походження. А саме: МР-спектр біологічного матеріалу з решітчастої кістки лосося демонструє вузький пік, що вірогідно, відповідає біогенним магнітним наночастинкам (БМН), крива МР-спектру клітин *E.coli*, що містять ферити, не є монотонною та демонструє значно ширший пік. МР-спектр штучних магнітних наночастинок є однорідним, ширшим за пік біологічного матеріалу решітчастої кістки лосося, що може свідчити про наявність агрегатів магнітних наночастинок при магнітоміченні дріжджів.

**Література**

1. Šafařík Ivo, Šafaříková Mirka Magnetic Nanoparticles and Biosciences // Special Edition of "Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly". – 2002. – Vol.133, No.6. – P. 1–23.
2. Lu A.-H., Salabas E. L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46. – P. 1222–1244.
3. Першина А.Г., Сазонов А.Э., Мильто И.В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2008. – № 2. – С. 70 – 78.
4. Liao M.-H., Chen D.-H. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability // *Biotechnology Letters.* – 2001. – Vol. 23. – P. 1723–1727.
5. Bodzionya T., Guskosa N., Roslaniec Z., Narkiewicz U., Kwiatkowska M., Maryniaka M. Low Concentration Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>C Magnetic Nanoparticles in Non-Magnetic Matrix on the FMR Spectra // *Acta physica polonica A.* – 2005. – Vol. 108, No. 2. – P. 297 – 302.
6. Komeili Arash Molecular mechanisms of compartmentalization and biomineralization in magnetotactic bacteria // *FEMS Microbiol Rev.* – 2012. – Vol. 36, No. 1. – P. 232–255.
7. Горобець О.Ю. Біомагнетизм і біогенні магнітні наночастинки // *Вісн. НАН України.* – 2015. – № 7. – С. 53–64.
8. Maxim M.Noginov, N. Noginova, O. Amponsah, R. Bah, R. Rakhimov, V. A. Atsarkin Magnetic resonance in iron oxide nanoparticles: quantum features and effect of size // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* – 2008. – Vol. 320, No. 18. – P. 2228-2232.
9. Воронин Д.В., Садовников А.В., Бегинин Е.Н., Щукин Д.Г., Горин Д.А. Магнитные композиты с наночастицами магнетита: получение, управление физическими свойствами, применение // *Известия Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика.* – 2013. – Т. 13, № 2. – С. 50 -54.
10. Sorokina O. N., Bychkova A. V., Kovarskii A. L. Analysis of the ferromagnetic resonance spectra of aggregates of magnetite nanoparticles formed by a magnetic field // *Russ. J. Phys. Chem. B.* – 2009. – Vol. 3, No. 2. – P. 257–261.
11. Håkon F. Magnetic and spectroscopic investigations of mineral transformations in mixed-valence oxides and magnesium silicates. – Zürich: ETH, 2008. – 137 p.
12. Hudson A.J., Andrews S.C., Hawkins C., Williams J.M., Izuhara M., Meldrum F.C., Mann S., Harrison P.M., Guest J.R. Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin // *Eur J Biochem* – 1993. – Vol.15, No. 218(3). – P.: 985-95.