УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-90-91

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *E.COLI* С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ПРИСУТСТВИИ НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

А.Д. Усвалиев[1], А. Моськин, Н.Д. Дагаев[1], С.Л. Грибановский[3], А.О. Жигачев[3], Д.Ю. Головин[3], С.А. Легоцкий[1], М.М. Веселов[1], К.Ю. Власова[1], А.В. Лапанькова[1], К.А. Мирошников[4], Н.Г. Белогурова[1], Е.А. Зайцева[1], А.В. Кабанов[1,5], А.Г. Мажуга[6,2,1], Ю.И. Головин[1,3], Н.Л. Клячко[1,3,5]

[1] Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1-11Б, Россия
[2] Национальный технологический университет «МИСиС», Москва, Россия
[3] Наноцентр, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия
[4] Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия
[5] University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
[6] Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
119234 Москва, Ленинские Горы д. 1, стр. 3, e-mail: azximik@gmail.com

Ключевые слова: магнитные наночастицы, низкочастотное магнитное поле, эндолизин

В настоящее время большое число инфекционных заболеваний имеют бактериальную этиологию и являются проблемой здравоохранения мирового масштаба. Большинство из них вызываются грамотрицательными патогенными микроорганизмами. Традиционным способом лечения инфекционных заболеваний является терапия с применением антибиотиков, однако быстрое развитие устойчивости патогенных микроорганизмов к существующим препаратам заставляет искать новые способы борьбы против них.

В качестве одной из таких альтернатив является терапия эндолизинами бактериофагов - бактериолитическими ферментами, способными разрушать стенку бактериальной клетки путем гидролиза пептидогликана. Эндолизины очень специфичны по отношению к определенным патогенам. Основным ограничением их применения по отношению к грамотрицательным бактериям является наличие у последних внешней мембраны, препятствующей проникновению литического фермента к его субстрату. Эффективность проникновения эндолизина можно повысить за счет дестабилизации внешней мембраны грамотрицательных бактерий с помощью механического воздействия посредством магнитных наночастиц под воздействием низкочастотного негреющего поля.

В этом исследовании использовались эндолизин Lys394 и стержневидные (40 x 10 нм) функционализированные дофамином магнитные наночастицы (МНЧ). Было показано, что применение ультранизкочастотного (50 Гц) переменного магнитного поля (ПМП) в присутствии МНЧ приводит к дестабилизации внешней мембраны клеток *E.coli.* МНЧ, модифицированные дофамином, притягиваются к внешней мембране клеток за счёт электростатического взаимодействия аминогрупп дофамина с фосфолипидами. При применении ПМП в сочетании с МНЧ в мембране возникают сложные осциллирующие движения, приводящие к деформации мембраны с нормальной и латеральной составляющими. Такие деформации приводят к увеличению проницаемости мембраны, что облегчает проникновение фермента к своему субстрату (пептидогликану), что увеличивает скорость лизиса клеток *E.coli*.

Было показано, что при действии ПМП в присутствии МНЧ происходит высвобождение β-лактамазы из периплазмы клеток *E.coli.* Также с помощью гидрофобного красителя Nile Red было показано, что действие ПМП приводит к его высвобождению из встроенных участков в мембране клеток.

В ходе работы по оптимизации методики синтеза МНЧ было выявлено, что одновременное уменьшение времени синтеза частиц и увеличение концентрации дофамина позволяет получить более стабильные частицы с узким распределением по размерам.

Работа была частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027 and 18-29-09154, темой с гос регистрацией АААА-А16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-90-91

INCREASING PERMEABILITY OF OUTER MEMBRANE OF *E.COLI* UNDER ULTRA-LOW FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD IN THE PRESENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES

A.D. Usvaliev[1], A.V. Nikitin [2], N.D. Dagaev [1], S.L. Gribanovsky[3], A.O. Ghigachev[3], D.Y. Golovin[3], S.A. Legotsky[1], M.M. Veselov[1], K.Yu. Vlasova[1], A.V. Lapankova[1], K.A. Miroshnikov[4], N.G. Belogurova [1], E.A. Zaitseva[1], A.V. KabanovЙ, A.G. Majouga[6,2,1], Yu. I. Golovin[1,3], N.L. Klyachko[1,3,5]

[1] M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11B, Russia
[2] National University of Science and Technology "MISIS" (MISIS), Moscow, Russia
[3] G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia
[4] M.M. Shemyakin, Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia
[5] University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
[6] D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
e-mail: azximik@gmail.com

Key words: magnetic nanoparticles, low-frequency magnetic field, endolysin

Currently, the bacterial etiology infectious diseases still remain a global health problem. Most of them are caused by gram-negative pathogenic microorganisms. The traditional method of infectious diseases treatment is based on the use of antibiotics. However, the rapid development of the resistance of pathogenic microorganisms to existing antibiotics forces to seek alternatives to traditional therapy. One of such alternatives is the therapy with bacteriophage endolysins - bacteriolytic enzymes capable of destroying the bacterial cell wall by hydrolyzing the peptidoglycan. Endolysins are highly specific for certain pathogens. The main limitation of their use towards gram-negative bacteria is the presence of an outer membrane in the latter preventing the penetration of lytic enzyme to its substrate. The effectiveness of endolysin penetration can be increased by destabilizing the outer membrane of gram-negative bacteria.

In this study, endolysin Lys394 and rod-like (40 x 10 nm) dopamine functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) were used. It was shown that application of ultra-low frequency (50 Hz) alternating magnetic field (AMF) in the presence of MNPs leads to the destabilization of the outer membrane of *E.coli* cells. Electrostatic interactions take place between positively charged amino groups of dopamine and negatively charged phosphate groups of membrane phospholipids. Complex oscillating motions and membrane deformations with normal and lateral components occur under AMF application. Such deformations lead to the increase of the enzyme penetration to its substrate (peptidoglycan) enhancing the rate of *E.coli* cells lysis.

AMF membrane destabilizing effect was confirmed by β-lactamase release from *E.coli* cell periplasm as well as significant decrease of the hydrophobic dye Nile Red fluorescence intensity.

In the course of work on the optimization of the method for the synthesis of magnetic nanoparticles, it was revealed that a simultaneous decrease in the time of the particle synthesis and an increase in the concentration of dopamine makes it possible to obtain more stable particles with narrow distribution in size.

The work was supported by RFBR grants 17-54-33027 and 18-29-09154, State Topic AAAA-A16-116052010081-5, MSU Program of Development.