

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų programos magistrantė

Aida KATKAUSKAITĖ

Magistrinis darbas

**Pneumolizino ir streptolizino O sąveikos su dirbtinėmis lipidinėmis
membranomis tyrimai**

Darbo vadovas:

dr. Tadas Ragaliauskas

Vilnius 2022

Pneumolizino ir streptolizino O sąveikos su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis tyrimai

Darbas atliktas Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje

Aida Katkauskaitė

/parašas/

Darbo vadovas:

Leisti / neleisti gintis:

dr. Tadas RAGALIAUSKAS

/parašas

Įrašo data

TURINYS

Santrumpos	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Biologinės membranos	7
1.1.1 Lipidų ir membranų įvairovė.....	7
1.1.2 Membranos fazinės būsenos.....	10
1.2 Dirbtiniai membranų modeliai.....	11
1.3 Nuo cholesterolio priklausomi citolizinais.....	14
1.3.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> bakterijos ir jų toksinas – pneumolizinas	15
1.3.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> bakterijos ir jų toksinas – streptolizinas O.....	18
1.3.3 <i>S. pneumoniae</i> ir <i>S. pyogenes</i> sukeltų kvėpavimo takų infekcijų diagnostika	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	24
2.1 Medžiagos	24
2.2 Metodai	25
2.2.1 Aukso plėvelių paruošimas	25
2.2.2 Daugiasluoksnių vezikulių paruošimas.....	25
2.2.3 Dirbtinių lipidinių membranų paruošimas	26
2.2.4 Pneumolizino ir streptolizino O naudojimas.....	27
2.2.5 Elektrocheminio impedanso matavimai	27
2.2.6 Paviršiaus plazmonų rezonanso matavimai.....	28
2.2.7 Statistinė duomenų analizė.....	28
2.2.8 Elektrocheminio impedanso spektroskopija.....	29
2.2.9 Paviršiaus plazmonų rezonansas	33
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	35
3.1 Sfingomielino įtaka pneumolizino aktyvumui.....	35
3.2 Pneumolizino aktyvumo priklausomybė nuo lipidų riebalų rūgščių sotumo	40
3.3 Lipidų dvigubųjų ryšių pozicijos riebalų rūgščių grandinėje įtaka pneumolizino aktyvumui.....	44
3.4 Cholesterolio įtaka pneumolizino ir streptolizino O aktyvumui.....	45
3.5 Pneumolizino ir streptolizino O poveikis skirtingos sudėties membranoms	46
3.6 Pneumolizino aktyvumo priklausomybė nuo pH.....	49
3.7 Streptolizino O aktyvumo priklausomybė nuo pH	51
SUMMARY	55
LITERARŪROS SĄRAŠAS.....	56

Santrumpos

CDC	- nuo cholesterolio priklausomi citoliziniai (angl. <i>cholesterol-dependent cytolysins</i>)
Chol	- cholesterolis
DAPC	- 1,2-diarachidonoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas
DOPC	- 1,2-di oleoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas
DOPC6	- 1,2-dipetroselenoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas
DPPC	- 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas
DSPC	- 1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas
EIS	- elektrocheminio impedanso spektroskopija (angl. <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)
GAST	- greitasis A grupės beta hemolizinio streptokoko antigeno nustatymo testas
hBLM	- hibridinė lipidinė membrana (angl. <i>hybrid bilayer lipid membrane</i>)
PLY	- pneumolizinas
POPC	- 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas
PUFA	- polinesočiosios riebalų rūgštys
PFT	- poras formuojantys toksinai (angl. <i>pore-forming toxins</i>)
SAM	- savitvarkis monosluoksnis (angl. <i>self-assembled monolayer</i>)
SLO	- streptolizinas O
SM	- N-(trikosanoil)-sfingo-4-enino-1- fosfocholinas
SPR	- paviršiaus plazmonų rezonansas (angl. <i>surface plasmon resonance</i>)
tBLM	- prikabinta lipidinė membrana (angl. <i>tethered bilayer lipid membrane</i>)
ŪFT	- ūmus faringitas/ūmus tonzilitas
$\Delta\alpha$	- SPR kampo poslinkis, m°
ϕ	- EIS fazės poslinkis, $^\circ$
c	- koncentracija, nM
D	- difuzijos koeficientas, cm^2/s
f_{min}	- EIS dažnis ties fazės minimumu, Hz
n	- „efektyvioji“ masės dalis, %
N_{def}	- defektų tankis, μm^{-2}
S	- SPR jautrumas, $ng/(cm^2 \cdot m^\circ)$

IVADAS

Bakterinės infekcijos kiekvienais metais nusineša milijonus gyvybių. Nors dauguma bakterijų sukeltų infekcijų yra pagydomos antibiotikais, tačiau dėl perteklinio vartojimo nuolat daugėja šiems preparatams atsparių bakterijų. Antibiotikai dažniausiai skiriami gydant kvėpavimo sistemos ligas, nors toks gydymas ne visuomet yra būtinas. Vieni dažniausių bakterinių kvėpavimo takų ligų sukėlėjų: *Streptococcus pneumoniae* bei *Streptococcus pyogenes* bakterijos. Vieni iš pagrindinių jų išskiriamų toksinų yra nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai priklausantys baltymai – pneumolizinas bei streptolizinas O. Ląstelių membranose šie toksinai suformuoja poras, taip sutrikdydami ląstelės homeostazę bei nužudydami ją.

Kelių pastarųjų dešimtmečių tyrimai nustatė pagrindinius nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimos baltymų veikimo principus, tačiau naujausi tyrimai yra sutelkti į šių toksinų sąveikos su membrana tyrinėjimus, bei jų aktyvumo priklausomybę nuo kitų faktorių, tokių kaip pH. Šių baltymų tyrimai gali ne tik padėti išaiškinti detalesnius jų poros susiformavimo mechanizmus, tačiau taip pat leisti sukurti tikslesnius, lengvo naudojimo diagnostinius įrankius, kurie galėtų sumažinti antibiotikų vartojimą išvengiant netikslios diagnozės bei uždelsto gydymo. Todėl, nuo cholesterolio priklausomų citolizinių aptinkamų kvėpavimo takuose: pneumolizino ir streptolizino O, tyrimai yra svarbūs biomedicinos bei medicinos srityse.

Toksinų aktyvumo ir elgsenos tyrimams buvo naudojamos dirbtinės lipidinės membranos, kurios leidžia imituoti ląstelės membraną. Šiame darbe buvo naudojamos prikabintos bei hibridinės lipidinės membranos, o jų tyrimams, atitinkamai, pasitelkti elektrocheminio impedanso spektroskopijos bei paviršiaus plazmonų rezonanso metodai. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodas leidžia, matuojant membranos laidumo pokyčius, nustatyti membranoje susidariusių defektų tankį. Taigi, leidžia įvertinti kokią įtaką pavieniai lipidai, bendra membranos sudėtis ar pH turi poras formuojančių toksinų: pneumolizino bei streptolizino O, aktyvumui. Tačiau elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodas neleidžia nustatyti, kuriame poros formavimosi žingsnyje vyksta pokyčiai, nulemiantys toksinų aktyvumo pokyčius. Tuo tarpu, paviršiaus plazmonų rezonanso metodas suteikia informacijos apie pirmąjį poros formavimosi žingsnį – toksino sąveiką su membrana. Metodas leidžia nustatyti kokią įtaką šiam poros formavimosi žingsniui turi membranos sudėtis bei pH.

Pagrindinis šio **darbo tikslas** – ištirti membranos sudėties bei pH įtaką nuo cholesterolio priklausomų citolizinių: pneumolizino bei streptolizino O, sąveikai su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis.

Darbo uždaviniai:

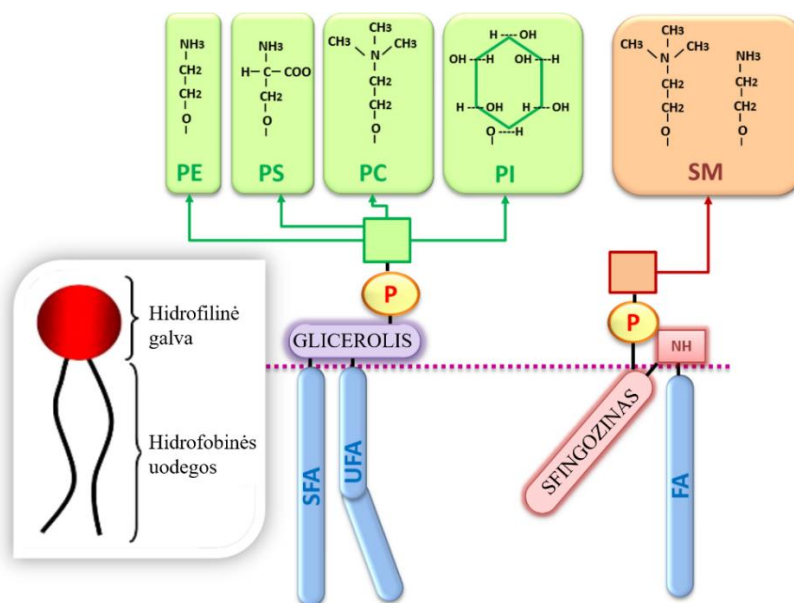
1. Ištirti skirtingų membranos komponentų įtaką pneumolizino aktyvumui: suformuojamų defektų tankiui bei sąveikai su membrana, membranose turinčiose didelį cholesterolio kiekį ($\geq 40\%$).
2. Palyginti skirtingų membranos sudėčių įtaką pneumolizino bei streptolizino O aktyvumui ir sąveikai su membrana.
3. Nustatyti pH įtaką pneumolizino ir streptolizino O sąveikai su membrana, bei membranoje suformuojamų defektų tankiui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biologinės membranos

Pamatinis gyvosios gamtos struktūrinis vienetas yra ląstelė, kurios gyvybingumui išlaikyti būtina biologinė membrana. Membrana sukuria ląstelės atrankų barjerą, apsaugantį ją nuo išorinės aplinkos, atskiria ląstelės kompartmentus bei reguliuoja viduląstelinę medžiagų koncentraciją, atlieka informacinę, energijos transformacijos (chloroplastuose ir mitochondrijose) ir kitas funkcijas (Rothfield, 2014). Membrana yra sudaryta iš trijų pagrindinių komponentų: lipidų, baltymų ir angliavandenių (Watson, 2015). Lipidai yra pagrindiniai membranos komponentai, kurie sudaro membranos karkasą. Jie vandeninėje aplinkoje suformuoja tvarkias dvisluoksnes struktūras. Šią savybę lemia šių molekulių amfifiliškumas – molekulės turi hidrofilinę dalį („galvą“) ir hidrofobinę dalį („uodegas“). Taigi, vandeninėje aplinkoje lipidų galvos yra nukreipiamos į dvisluoksniu išorę, o uodegos į vidų, taip susidaro lipidų dvisluoksnis (Rothfield, 2014).

1.1.1 Lipidų ir membranų įvairovė



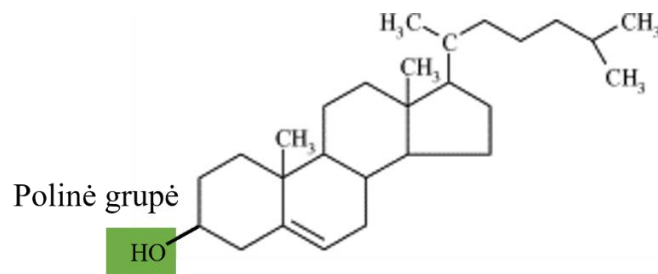
1 pav. Glicerofosfolipidų ir sfingolipidų sudėties palyginimas. PE – fosfatidiletanolaminas, PS – fosfatidilserinas, PC – fosfatidilcholinas, PI – fosfatidilinozitolis, SM – sfingomielinas, SFA – sočiosios riebalų rūgštys, UFA – nesočiosios riebalų rūgštys, FA – riebalų rūgštys. Adaptuota iš: Castro-Gómez et al., 2015.

Pagrindiniai membranos lipidai skirstomi į fosfogliceridus (glicerofosfolipidus), sfingolipidus ir sterolius. Glicerofosfolipidų pagrindas yra glicerolis, prie kurio pirmųjų dviejų anglies atomų esterinėmis jungtimis yra prijungtos angliavandenių grandinės („uodegos“). Lipidų

uodegos tarpusavyje gali skirtis ilgiu ir sotumu (sočiosios – neturinčios dvigubųjų ryšių, nesočiosios – turinčios *cis* konformacijos dvigubuosius ryšius). Prie trečio anglies atomo, taip pat esterine jungtimi yra prijungtas fosfatas, prie kurio gali jungtis įvairūs pakaitalai: cholinas, inozitolis ir kiti (1 pav.) (Harayama ir Riezman, 2018).

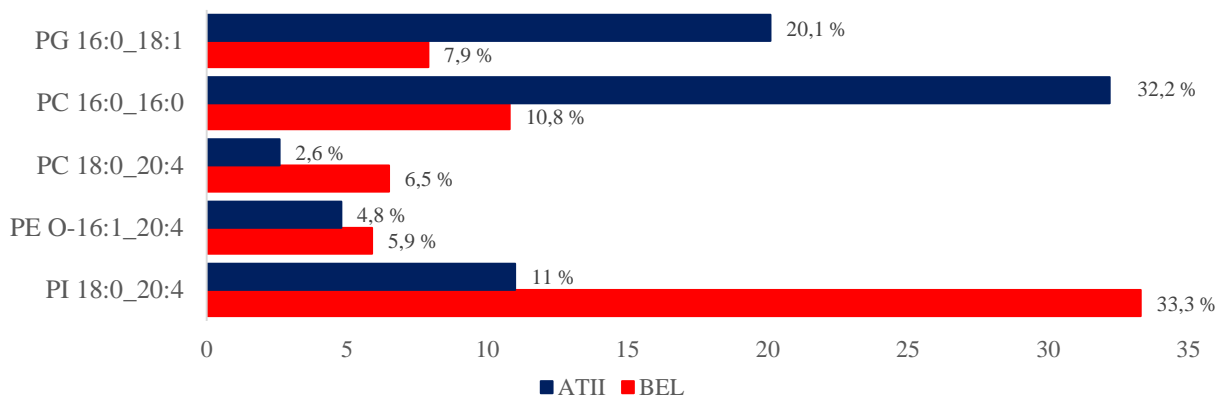
Sfingolipidų pagrindas yra sfingozinas, prie kurio amino grupės prijungta riebalų rūgštis. Kaip ir fosfogliceridai, sfingolipidai, taip pat, turi prijungtą fosfatą, prie kurio jungiasi įvairūs pakaitalai: cholinas, etanolaminas ir kiti (1 pav.) (Sang ir Zhu, 2014).

Kita svarbi lipidų grupė – steroliai. Tai junginiai sudaryti iš keturių angliavandenilių žiedų – hidrofobinė dalis, bei hidrksilo grupės – hidrofilinė dalis (2 pav.) (Dupont, 2005). Taigi, steroliai, kaip ir fosfogliceridai bei sfingolipidai, yra amfifilinės molekulės. Gyvūnų ląstelių membranose dažniausiai sutinkamas cholesterolis (Dutta et al., 2007). Šis sterolis sąveikaudamas su kitais membranos lipidais palaiko tinkamą membranos fazinę būseną, jos standumą ir taip reguliuoja jos pralaidumą vandenyje tirpioms molekulėms. Taip pat, jungdamasis su įvairiais transmembraniniais baltymais padeda palaikyti tinkamą jų struktūrą (Luo et al., 2020).



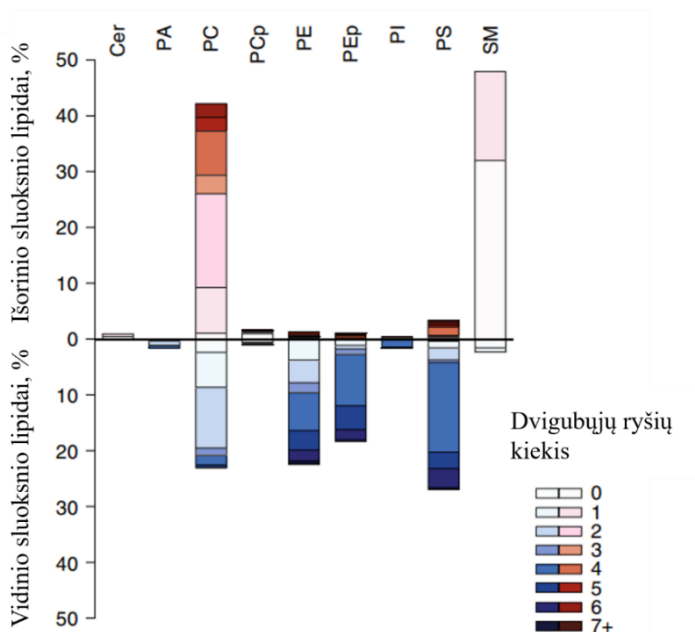
2 pav. Cholesterolio molekulinė struktūra. Adaptuota iš: Raczyński et al., 2006.

Lipidų įvairovė yra labai didelė ir priklauso nuo organizmo, ląstelės tipo, organelės, ar net membranos sluoksnio, lipidinė membranos sudėtis gali skirtis. Pavyzdžiui žinduolių ląstelių membranose aptinkama daug cholesterolio, tačiau šio sterolio bakterijų membranose nėra (Brender et al., 2012). Skiriasi skirtingų organų ląstelių membranos. Neuronų plazminėje membranoje aptinkama daugiau cholesterolio bei polinesočiųias riebalų rūgščių grandines turinčių lipidų, negu „standartinėje“ žinduolių ląstelių plazminėje membranoje (Ingólfsson et al., 2017). Skirtingos gali būti ir to paties organo skirtingų tipų ląstelių membranos. Viršutinius kvėpavimo takus dengiančių bronchų epitelinių ląstelių membranose aptinkama tris kartus daugiau inozitolio polinę grupę turinčių fosfolipidų, negu alveoles dengiančiose alveolių II tipo epitelinių ląstelių membranose. Tačiau alveolių epitelinių ląstelių membranose aptinkama du kartus daugiau fosfatidilcholino ir fosfatidilglicerolio lipidų (3 pav.) (Zemski Berry et al., 2017).



3 pav. Specifinių bronchų epitelinių ląstelių (BEL) membranoje bei alveolių II tipo epitelinių (ATII) ląstelių membranoje esančių lipidų kiekio palyginimas. PG – fosfatidilglicerolis, PC – fosfatidilcholinas, PE – fosfatidiletanolaminas, PI – fosfatidilinozitolis. Skaičiai nurodo riebalų rūgščių ilgius ir jose esančių dvigubųjų ryšių kiekį. Adaptuota iš: Zemski Berry et al., 2017.

Membranos sluoksniai yra asimetriški. Skirtinguose sluoksniuose aptinkami skirtingi baltymai, lipidai, skiriasi ir lipidų sotumas. Membranos išoriniame sluoksnyje yra daugiau fosfatidilcholino ir sfingomielino, kurių anglies atomų grandinės dažniausiai yra sočiosios. Vidiniame sluoksnyje, aptinkama daugiau fosfatidilserino ir fosfatidiletanolamino, turinčių nesočiąsias riebalų rūgščių grandines (4 pav.) (Lorent et al., 2020).

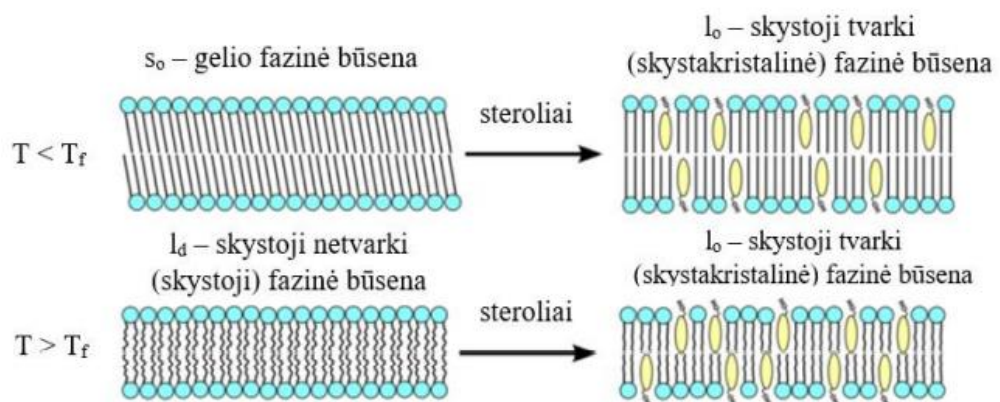


4 pav. Eritrocitų plazminės membranos asimetrija. Ceramidai (Cer), fosfatidinė rūgštis (PA), fosfatidilcholinas (PC), fosfatidilcholino plasmalogenas (PCp), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidiletanolamino plasmalogenas (PEp), fosfatidilinozitolis (PI), fosfatidilserinas (PS), sfingomielinas (SM). Adaptuota iš: Lorent et al., 2020.

Ląstelės plazminė membrana yra lateraliai heterogeniška. Sočiųjų lipidų, sfingomielino ir cholesterolio cheminės ir geometrinės savybės lemia palankesnes jų tarpusavio sąveikas. Todėl membranoje susidaro sočiųjų lipidų, sfingomielino ir cholesterolio turintys mikrodomenai, vadinami lipidų plaustais, bei mažai cholesterolio turintys nesočiųjų lipidų domenai. Lipidų plaustuose, taip pat, būna įsiterpę jiems specifiniai baltymai, dažniausiai receptoriai. Mikrodomenai svarbūs baltymų tarpusavio sąveikoms, kurios reikalingos signalų inicijavimui bei perdavimui (Levental et al., 2020).

1.1.2 Membranos fazinės būsenos

Fosfolipidų dvisluoksnis gali būti kelių fazinių (lamelinių) būsenų: gelio (s_o), skystosios netvarkios (l_d) ir skystosios tvarkios (l_o). Membranos fazinė būsena keičiasi pasiekus tam tikrą temperatūrą, kuri vadinama fazinio virsmo temperatūra (žymima T_f). Membrana pereina į skystąją netvarkią būseną, kai temperatūra yra didesnė negu T_f , o temperatūrai nukritus žemiau T_f – į gelio būseną. Gelio fazėje lipidai yra išsidėstę labai kompaktiškai: lipidų angliavandenilių uodegos yra *trans* konfigūracijos, ištiesusios ir išsidėsto arti viena kitos. Skystosios netvarkios būsenos membranoje lipidų uodegos nėra pilnai išsitempusios ir lipidai išsidėsto mažiau kompaktiškai. Vieno lipido užimamas plotas yra didesnis negu gelio būsenoje (Eeman ir Deleu, 2010). Fazinio virsmo temperatūra priklauso nuo membranos sudėties: fosfatidilcholino ir fosfatidiletanolamino buvimo membranoje bei cholesterolio kiekio. Taip pat, nuo membraną sudarančių lipidų savybių: nesočiųjų riebalų rūgščių kiekio (kuo jų daugiau tuo T_f mažesnė), riebalų rūgščių grandinių ilgio (kuo jos ilgesnės tuo T_f didesnė), bei kitų sąlygų (Cevc, 1991).



5 pav. Membranos fazinės būsenos.

Cholesterolis yra itin svarbus tinkamai biologinių membranų fazinei būsenai palaikyti. Biologinės membranos yra skystosios tvarkios (skystakristalinės) fazinės būsenos, kuri yra optimali

išlaikyti barjerinę, signalinę bei kitas jos funkcijas. Kai membrana yra gelio būsenos, sumažėja lipidų difuzija, kuri reikalinga įvairių baltymų, tarp jų ir signalinių baltymų, įsiterpimui į membraną reguliuoti. Kai membrana yra skystosios netvarkios būsenos, jos pralaidumas padidėja, todėl nebeužtikrinama membranos barjerinė funkcija. Temperatūros intervalas, kuriame membrana išlaiko skystakristalinę būseną, kai membranoje nėra cholesterolio, yra siauras. Tačiau, cholesterolis išplečia šį intervalą. Daugumos biologinių membranų T_f yra 10-40 °C. Esant žemai temperatūrai ($T < T_f$), cholesterolis įsiterpia tarp glaudžiai išsidėsčiusių lipidų uodegų ir taip suardo tvarkingą jų išsidėstymą. Temperatūrai pakilus virš T_f , tarp angliavandenilių uodegų įsiterpęs, cholesterolis neleidžia anglies atomų grandinėms laisvai judėti, todėl sumažėja membranos takumas (5 pav.) (Rubenstein et al., 1979).

1.2 Dirbtiniai membranų modeliai

Biologinės membranos yra kompleksinės struktūros, todėl pavienių membranos komponentų tyrimai yra brangūs, sudėtingi bei užima daug laiko. Todėl sukurti membranų modeliai, leidžiantys pagaminti žinomos sudėties bei tam tikras biologinių membranų savybes imituojančias membranas. Dažniausiai naudojami modeliai: liposomos bei plokščiosios dvisluoksnės lipidinės sistemos, kurios dar skirstomos į juodąsias lipidines membranas (BLM), hibridines membranas (hBLM), suspenduotas (išlietas) membranas (sBLM) ir prikabintas lipidines membranas (tBLM) (Yeagle, 2016).

Liposomos, tai sferinės dalelės sudarytos iš amfifilinių lipidų dvisluoksnio gaubiančio vandeninę terpę. Liposomos gali būti vienasluoksnės ar daugiasluoksnės (sudarytos iš kelių dvisluoksnio sluoksnių), taip pat, gali skirtis dydžiu: mažos (20-100 nm skersmens), didelės (1-0,1 μ m skersmens), gigantiškos (skersmuo didesnis nei 1 μ m) (Daraee et al., 2016). Liposomos dažniausiai gaminamos ištirpinant fosfolipidus organiniame tirpiklyje, pavyzdžiui chloroforme, išdžiovinant šį tirpalą ir gautą lipidų plėvelę hidratuojant vandeniniame buferyje. Tokiu būdu gaunamos daugiasluoksnės įvairaus dydžio liposomos (Yeagle, 2016). Liposomos naudingos membranos dinaminėse procesų tyrimuose. Naudojant liposomas sudėtyje turinčias pirenų pažymėtus fosfatidilcholino analogus nustatytas šio lipido flip-flop difuzijos greitis (Müller et al., 2000). N. Nuytten ir kolegės, naudodami liposomas ištyrė polietilenglikolio prijungimo prie fosfolipidų įtaką baltymų difuzijai membranoje (Nuytten et al., 2010). Daug žada liposomų naudojimas vaistų pristatymui, genų pernešimui, imunodiagnostikai ir kitoms sritims (El-Hammadi ir Arias, 2019) (dos Santos Rodrigues et al., 2018).

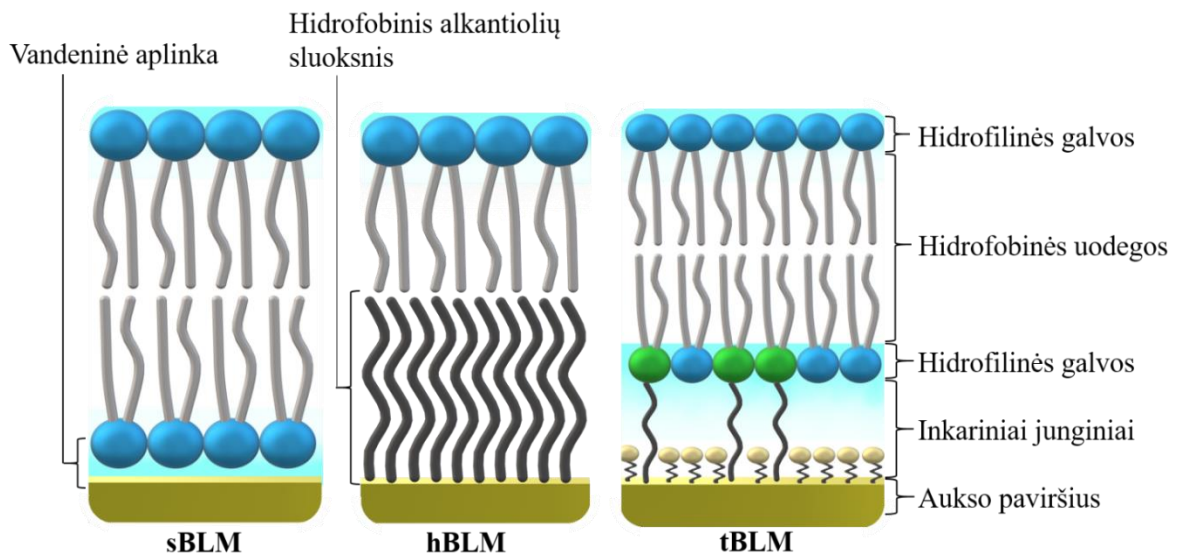
Juodosios lipidinės membranos (BLM) tai seniausi biomimetiniai lipidiniai dvisluksniai, P. Mueller sukurti beveik prieš 60 metų (Mueller et al., 1962). Tradiciškai tokios membranos yra formuojamos hidrofobinės medžiagos (pvz.: teflono, nailono) plėvelėje padarytoje kiauřymėje (~1 mm skersmens), kuri yra apsupta vandeninės terpės (Budvytytė, 2012). Tokiu būdu gaunama membrana sudaryta iš dviejų amfifilinių monosluksnių. Jų hidrofilinės „galvos“ sąveikauja su vandenine terpe, o hidrofobinės „uodegos“ yra dvisluksnio centre. Per pastaruosius dešimtmečius daugiau dėmesio skiriama šių dvisluksnių formavimui poringose medžiagose, siekiant sukurti nedidelius, pigius prietaisus, kuriais būtų galima tirti daugiau mėginių vienu metu. Naudojant tokias sistemas tiriami jonų kanalai, vaistų difuzija per membraną, bei membranos elektrinės savybės (varža, talpa) (Aminipour et al., 2017). Tačiau juodosios lipidinės membranos yra mechaniškai nestabilios, todėl nėra tinkamos atlikti daug laiko reikalaujančius tyrimus (Sun et al., 2020).

Suspenduotos lipidinės membranos (sBLM) formuojamos ant kieto, hidrofilinio paviršiaus (6 pav.): stiklo (Mapar et al., 2018), žėručio (Banerjee ir Lyubchenko, 2021), silicio ir įvairių metalų bei kitų medžiagų (Siontorou et al., 2017). Tokias membranas nesunku paruošti, jos yra stabilios, ir tinkamos taikant daugelį paviršiaus tyrimo metodų: atominės jėgos mikroskopiją (Neupane et al., 2021), paviršiaus plazmonų rezonansą bei kvarco kristalo mikrogravimetrines svarstyklas (Parkkila et al., 2018) ir kitus. Tačiau sBLM neturi pomembraninio vandeninio rezervuaro ir lipidų lateralinė difuzija yra mažesnė negu BLM. Nors sBLM modeliai yra tobulinami, pavyzdžiui, membrana liejama ant polimerais padengto paviršiaus, kol kas nėra būdo pašalinti didžiausių šio modelio trūkumų (Sun et al., 2020).

Hibridinės lipidinės membranos (hBLM) yra formuojamos ant kieto hidrofobinio paviršiaus (6 pav.). Kietas paviršius (auksas, žėrutis ar kiti metalai) yra padengiamas hidrofobiniu alkantiolių savitvarkiu monosluksniu (SAM), ant kurio liejamos liposomos. Taip suformuojama hBLM susidedanti iš savitvarkio monosluksnio bei fosfolipidų monosluksnio (Sabirovos et al., 2021). Alkantioliai prie metalų paviršiaus jungiasi kovalentiniu ryšiu, per sieros grupę, todėl tokia sistema yra stabili (išlieka nepakitusi kelis mėnesius) ir atspari buferio, pH ar joninės jėgos pokyčiams. hBLM naudojamos biojutiklių kūrimui (Favero et al., 2005), elektronų pernašos sistemų (Ma et al., 2013) ir kituose tyrimuose. Tačiau hibridinė lipidinė membrana mažiau panaši į biologinę membraną ir tankus alkantiolių sluoksnius neleidžia įsiterpti transmembraniniams baltymams ir juos tirti (Plant, 1999).

Prikabintos lipidinės membranos (tBLM), tai membranos inkariniais junginiais prikabintos prie kieto paviršiaus (6 pav.). Struktūrinės ir funkcinės tBLM savybės priklauso nuo

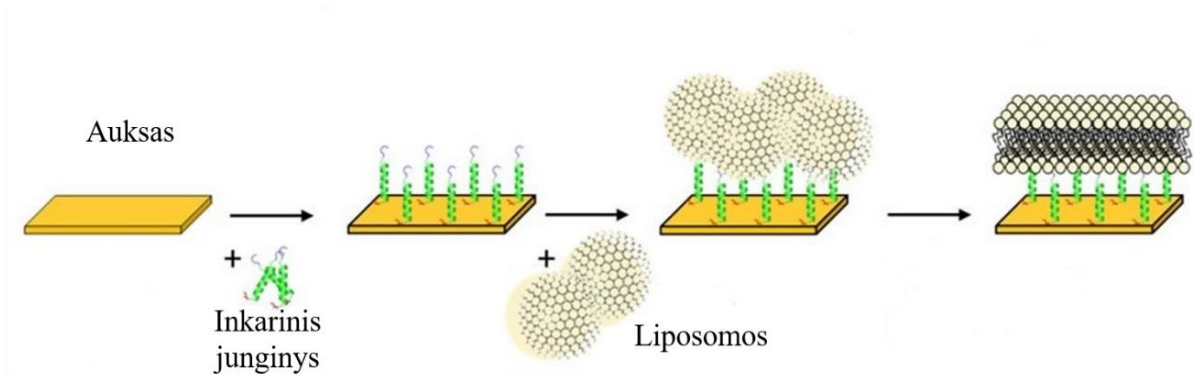
kelių faktorių: pagrindo, pomembraninio sluoksnio dydžio, inkarinių junginių tipo bei jų išsidėstymo tankio (Bompard et al., 2021). tBLM dažniausiai formuojamos ant aukso (Maccarini et al., 2016), tačiau gali būti formuojamos ant žėručio (Motegi et al., 2019), sidabro (Aleknavičienė et al., 2021) ir kitų medžiagų. Membrana prie kieto paviršiaus yra pritvirtinta inkariniais junginiais, kuriuos sudaro trys dalys: tiolinė (ja jungiasi prie paviršiaus), hidrofiliinė – etilenoksidas (reguliuojamo ilgio), hidrofobinė – 14-20 anglies atomų turinčios grandinės įsiskverbiančios į lipidinį dv sluoksnį (Ragaliauskas, 2017). Šie junginiai leidžia atskirti membraną nuo kieto paviršiaus ir sukurti norimo dydžio pomembraninį vandeninį sluoksnį (Bompard et al., 2021). Inkariniai junginiai tarpusavyje yra atskirti skiediklio molekulių. Tai dažniausiai įvairaus ilgio etilenoksido fragmentai, be hidrofobinės dalies (Ragaliauskas, 2017). tBLM sistema yra stabili, bet išlaiko mechaninį lankstumą, turi reguliuojamo dydžio pomembraninį vandeninį rezervuarą, kuris reikalingas transmembraninių baltymų įsiterpimui bei membraną perėjusių jonų kaupimuisi. Dėl šių priežasčių modelis plačiai naudojamas įvairiose srityse: baltymų (pvz.: poras formuojančių toksinų, amiloido beta peptidų, jonų kanalų) struktūriniuose ir funkciniuose tyrimuose, nanodalelių charakterizavimui, atsparumui antibiotikams tirti, virusų detekcijai (Penkauskas ir Preta, 2019).



6 pav. Plokščiosios dv sluoksnės lipidinės sistemos.

Prikabintos lipidinės membranos ruošiamos dviem etapais. Visų pirma, ant kieto paviršiaus suformuojamas savitvarkis monosluoksnis. Tuomet ant paruošto paviršiaus formuojama norimos kompozicijos lipidinė membrana (7 pav.). Ši procedūra gali būti atliekama keliais būdais: Langmuir-Blodgett metodu (Ahmed Karaballi et al., 2018), tirpiklių pakeitimo (Subczynski et al.,

2017) ir dvisluoksnių (Chadli et al., 2017) ar daugiasluoksnių liposomų liejimo metodais (Ragaliauskas, 2017). Dauguma šių metodų reikalauja pakankamai daug laiko bei išskirtinės technikos, o kartu ir darbuotojo kompetencijos. Paprasčiausias būdas suformuoti prikabintas lipidines membranas yra liejant daugiasluoksnes liposomas. Šis metodas leidžia suformuoti tBLM per mažiau nei 60 minučių ir nereikalauja brangios įrangos, tokios kaip ultragarsinė maišyklė ar ekstruderis (Ragaliauskas, 2017).



7 pav. tBLM formavimas. Adaptuota iš: Bompard et al., 2021.

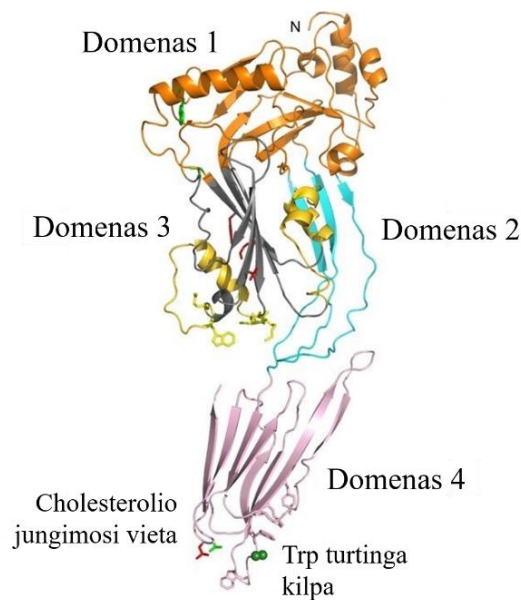
1.3 Nuo cholesterolio priklausomi citolizinais

Pagrindinis ląstelės apsauginis barjeras, tai jos membrana. Evoliucijos eigoje vystantis ląstelės apsauginiams mechanizms, vystėsi ir bakterijų mechanizmai, kurie leido apeiti ląstelės gynybą. Galybė bakterijų gamina baltymus, kurie sąveikaudami su membrana sutrikdo signalų perdavimą arba pažeidžia pačią membraną. Viena iš grupių naudojanti pastarąjį mechanizmą yra poras formuojantys toksinai (PFT) (Morton et al., 2019). Jie bakterijų išskiriami vandenyje tirpių monomerų pavidalu, kurie difunduoja iki ląstelės membranos, prie jos prisikabina, oligomerizuojasi ir sudaro įvairaus dydžio poras. Poros suardo ląstelės barjerą, todėl sutrinka ląstelės homeostazė ir ji žūsta. Pagal poros struktūrą PFT skirstomi į: α -PFT ir β -PFT. α -PFT formuoja lanksčias, segtuko-spiralės motyvų struktūras, o β -PFT – stabilias β -statinės formos poras (Peraro ir van der Goot, 2016).

Viena iš β -PFT pošeimių yra nuo cholesterolio priklausomi citolizinais (CDC). Šiuos baltymus gamina apie 20 bakterijų rūšių, kurios dažniausiai yra Gram teigiamos (pvz.: *Streptococcus pyogenes* streptolizinas O, *Streptococcus pneumoniae* pneumolizinas) (Gilbert, 2010). CDC iš 35-50 monomerų suformuoja itin dideles – 250-300 Å poras (Tveten, 2005). 1939 metais L. Hewitt ir E. W. Todd preinkubavo streptolizina O su cholesteroliu ir pastebėjo, kad tai inhibuoja toksino

aktyvumą. Taip išaiškinta, kad šio baltymo veikimui reikalingas cholesterolis (Hewitt ir Todd, 1939). Vėliau parodyta, kad visi CDC šeimos toksinai, veikia tik membranas, kuriose yra cholesterolio (Shewell et al., 2020).

Per pastaruosius 30 metų nustatytos daugumos CDC baltymų pirminės struktūros. Atlikus sekų analizę paaiškėjo, kad CDC baltymai yra labai konservatyvūs (tapatumas siekia 40-70 %). Regionas, kuriame sekos dažniausiai yra identiškos – tai 11 aminorūgščių seka, vadinama triptofanu turtinga kilpa. Ši sritis reikalinga CDC sąveikai su membrana (Dowd ir Tweten, 2012). Toksinų monomerų tretinės struktūros, taip pat, turi daug panašumų. Tai daug β klosčių turinčios (50-72 kDa masės) struktūros, suskirstytos į 4 domenus: D1-D4 (8 pav.) (Christie et al., 2018). 4 domenas, sąveikauja su ląstelės membrana. Jame yra tam svarbi triptofanu turtinga kilpa, bei cholesterolio atpažinimo motyvu (Farrand et al., 2010). Kiti trys domenai lieka membranos išorėje. 3-iajame domene esančios dvi α spiralės yra svarbios poros įsiterpimui į membraną. O 1-asis ir 2-asis domenas apjungia membranos atpažinimą ir poros įsiterpimą bei yra svarbūs baltymo struktūros išlaikymui (Reboul et al., 2014).



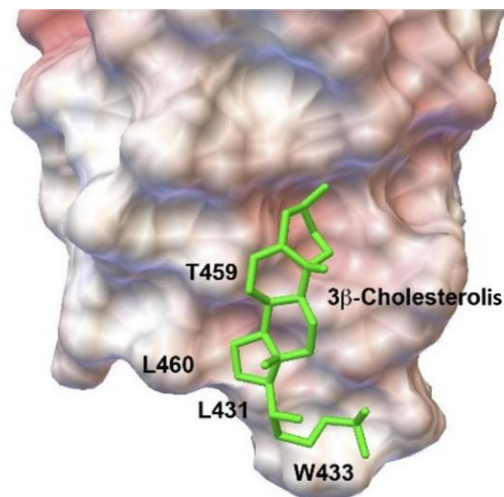
8 pav. Pneumolizino molekulinė struktūra. Adaptuota iš: Lawrence et al., 2015.

1.3.1 *Streptococcus pneumoniae* bakterijos ir jų toksinas – pneumolizinas

Streptococcus pneumoniae, yra plačiai paplitusios oportunistinės bakterijos. Jos ypač pavojingos vaikams, vyresnio amžiaus ir imuninės sistemos sutrikimų turintiems žmonėms. *S. pneumoniae* yra vienas pagrindinių apatinių kvėpavimo takų ligų sukėlėjų ir viena iš pagrindinių

mirties nuo šių ligų priežasčių (Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018). WHO duomenimis, pneumokokinės infekcijos kasmet pasaulyje nusineša 1,6 milijonus gyvybių (World Health Organization, 2008). Daugumos suaugusiųjų organizme šios bakterijos viršutinių kvėpavimo takų ar nosiaryklės gleivinėse, yra normalios mikrofloros dalis. Tačiau susilpnėjus imuninės sistemos veiklai bakterijos gali pasklisti ir sukelti įvairias ligas. Plaučiuose sukelia pneumoniją, patekusios į kraują – bakteriemiją, perėjusios kraujo-smegenų barjerą – meningitą, taip pat, sukelia infekcijas Eustachijaus vamzdyje ir sinusuose (Peyrani et al., 2019). *S. pneumoniae* pablogina kitų infekcijų, tokių kaip gripas ar Covid-19, eigą. C. R. MacIntyre ir kolegos apibendrinė 75 tyrimų rezultatus, kurie parodė, kad kilus 2009 metų gripo pandemijai, beveik ketvirtadalis sirgusiųjų turėjo antrines bakterines infekcijas, kurios yra siejamos su didesniu mirštamumu (MacIntyre et al., 2018). X. Zhu ir kolegos parodė, kad 94,2 % (iš tirtų 257-ių) Covid-19 pacientų turėjo antrines infekcijas (Zhu et al., 2020). Dažniausias antrinių infekcijų sukėlėjas abiem atvejais, buvo *S. pneumoniae* bakterijos.

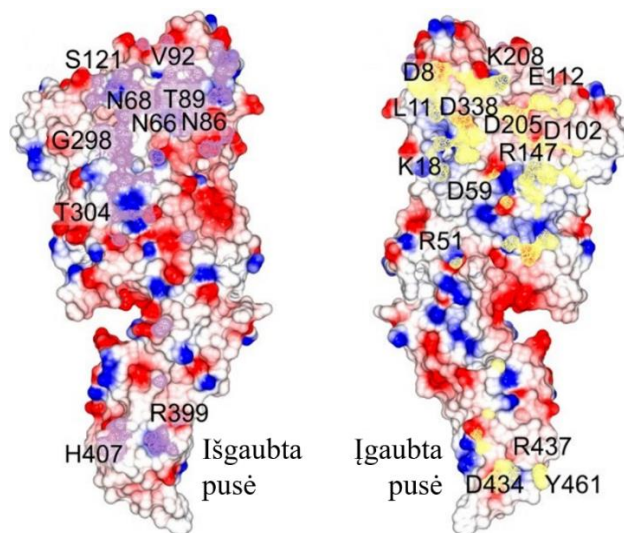
Nors *S. pneumoniae* turi keletą virulentiškumo faktorių (pvz.: įvairūs lipoproteinai, pneumokokinis paviršiaus baltymas A (Martinez et al., 2019)), tačiau pagrindinis šių bakterijų toksinas yra pneumolizinas (PLY). Tai 471 aminorūgščių ilgio (52 kDa) baltymas priklausantis nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai (Nishimoto et al., 2020). Kaip ir kiti šios šeimos baltymai, jis jungiasi prie cholesterolio turinčių membranų. Nors sąveika su cholesteroliu yra būtina pneumolizino poros susidarymui, tačiau nustatyta, kad PLY potencialiai sąveikauja ir su glikanų bei manozės receptoriais (Lim et al., 2013) (Shewell et al., 2020). Membranose PLY sudaro 300-400 Å skersmens ir 80 Å aukščio poras, kurias gali pereiti ne tik nedidelės molekulės, jonai, bet ir baltymai (van Pee et al., 2017). Todėl, sutrikdoma ląstelės homeostazė ir ji žūsta.



9 pav. Pneumolizino sąveika su cholesteroliu. Adaptuota iš: Park et al., 2016.

Pastarųjų metų tyrimai leido išaiškinti molekulinis pneumolizino poros susidarymo mechanizmus. Pirma, vandenyje tirpūs PLY monomerai difunduoja iki membranos ir jungiasi su joje esančio cholesterolio β -OH grupe (Alouf et al., 1984). Šiai sąveikai palankią hidrofobinę aplinką sukuria Thr459 ir Leu460 aminorūgščių pora, bei greta jos, triptofanu turtingoje kilpoje, esančios Leu431 ir Trp433 aminorūgštys (9 pav.). Pakeitus šias aminorūgštis, mutantų aktyvumas sumažėja (Park et al., 2016). Detalesnės kompiuterinės simuliacijos parodė, kad Trp433, Trp435 ir Trp436 (triptofanu turtingoje kilpoje) bei Thr459, Leu460 ir Tyr461 (4-ame domene) tiesiogiai sąveikauja su cholesterolio molekulėmis, o Tyr435 ir Trp436 sudaro inkarą lipidiniame dvisluoksnyje (Vögele et al., 2019).

Membranos paviršiuje monomerai oligomerizuojasi ir sudaro preporą. Vieno monomero įgaubta, labiau teigiamai įkrauta pusė sąveikauja su kito monomero išgaubta, labiau neigiamai įkrauta puse. Iš viso tarpusavio ryšius sudaro tik 85-ios aminorūgštys, dauguma jų yra 1-ajame ir 4-ajame domenuose (10 pav.). Beveik visos monomerų sąveikoje dalyvaujančios aminorūgštys yra konservatyvios, o dalis identiškos visuose CDC (Marshall et al., 2015). Tarpusavyje PLY monomerai sudaro kelis druskų tiltelius (K18-E84, D93-R208 ir K188-E260), juos kartu, taip pat,

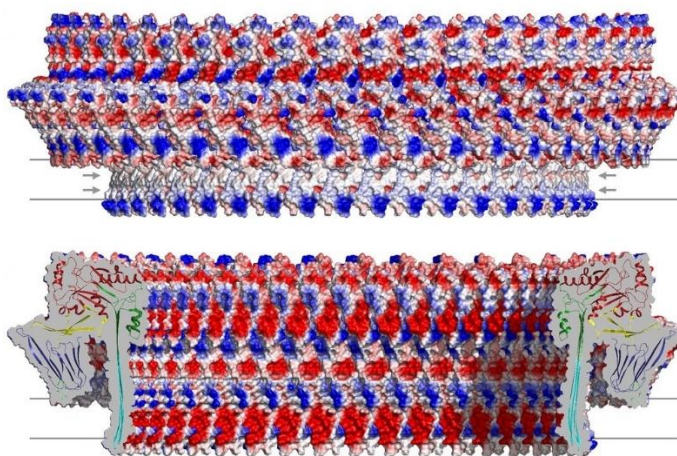


10 pav. Pneumolizino monomerų sąveika. Spalvomis pažymėtas elektrinis potencialas: raudona – neigiamas, mėlyna – teigiamas. Monomerų sąlyčio regionai pažymėti violetine ir geltona spalvomis. Pažymėtos sąveikai svarbiausios aminorūgštys. Adaptuota iš: Marshall et al., 2015.

jungia hidrofobiniai, vandeniliniai ryšiai bei Van der Valso (Van der Waals) jėgos. S. L. Lawrence ir kolegės parodė, kad monomerų sąveikoms svarbios Asn66 ir Ser68 aminorūgštys. Pakeitus Asn66 triptofanu PLY aktyvumas sumažėja 50 %, pakeitus Ser68 – nepakinta, bet pakeitus abi aminorūgštis PLY inaktyvuojamas (Lawrence et al., 2015). J. E. Marshall ir kolegės atrinko 18 aminorūgščių esančių monomerų sąlyčio paviršiuje ir atliko mutagenėzės eksperimentus. Beveik visų mutantų

aktyvumas buvo sumažėjęs (Marshall et al., 2015). Šie eksperimentai parodė, kad preporos susiformavimui būtinos specifinės monomerų tarpusavio sąveikos.

Apie 44 pneumolizino monomerai suformuoja preporą (Faraj et al., 2020). Preporai įsiterpiančiam į membraną įvyksta drastiški monomerų struktūros pokyčiai. 1-ajame ir 4-ajame domenuose vyksta mažai modifikacijų, tačiau 2-asis ir 3-iasis domenai labai pasikeičia. D1 ir D4 jungiančiame 2-ajame domene esantys β -lakštai, persitvarko ir pasisuka 90° kampu, o tai sąlygoja D1 pasisukimą link membranos paviršiaus. Todėl pneumolizino monomerai subliūkšta. 3-ajame domene esančios trumpos α -spiralės išsivynioja ir persitvarko į β -plaukų segtuko struktūras, kurios perveria membraną. Skirtingų monomerų β -plaukų segtuko struktūros susijungia į vieną didelę β -statinę, kurią sudaro apie 176 gijos, kurias tarpusavyje jungia druskų tilteliai (11 pav.) (van Pee et al., 2017).



11 pav. Pneumolizino pora. Viršuje vaizduojamas poros išorinis paviršius, apačioje – vidinis. Spalvomis pažymėtas elektrinis potencialas: raudona – neigiamas, mėlyna – teigiamas. Adaptuota iš: van Pee et al., 2017.

1.3.2 *Streptococcus pyogenes* bakterijos ir jų toksinas – streptolizinas O

Streptococcus pyogenes (arba A grupės streptokokai), tai bakterijos, kurios kaip ir *S. pneumoniae* yra siejamos su kvėpavimo takų ligomis. *Streptococcus pyogenes*, tai žmogui specifiniai patogenai, kurie sukelia dažnas infekcijas: faringitą (ryklės gleivinės ir pogleivio uždegimas), skarlatiną, impetingą (infekcinė odos liga), kartais gyvybei pavojingas infekcijas: streptokokų toksinio šoko sindromą, nekrozinį fascitą, pneumoniją ir kitas infekcijas (Feil et al., 2014). Kasmet, pasaulyje nuo *S. pyogenes* sukeltų infekcijų miršta apie 500 tūkstančių žmonių (ULAC, 2021). Keli antibiotikų tipai, pavyzdžiui penicilinas, yra naudojami kovoje su šiomis infekcijomis, tačiau jų poveikis invazyvioms infekcijos formoms yra mažesnis. Mirštamumas nuo invazyvios infekcijos siekia daugiau negu 30 %. Tai siejama su didesne toksino streptolizino O

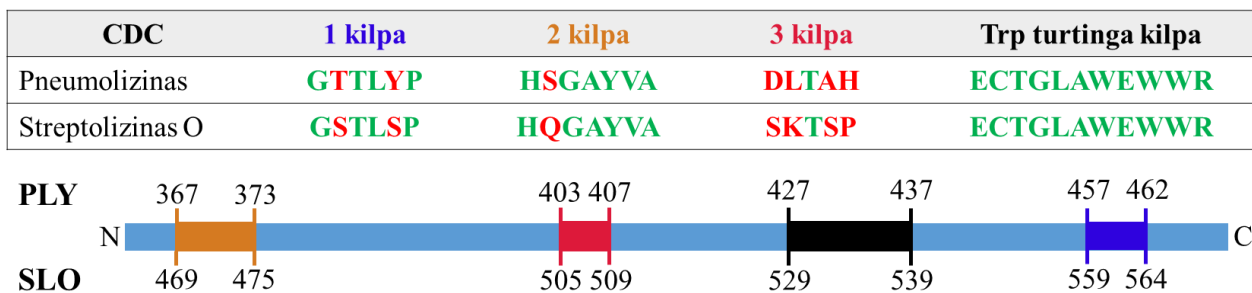
produkcija (Aikawa et al., 2021). 2014-2016 metais Anglijoje padidėjus infekcijų invazyvia *S. pyogenes* forma stipriai išaugo susirgimų skarlatina skaičius (Lynskey et al., 2019).

Streptolizinas O (SLO) yra pagrindinis A grupės streptokokų virulentiškumo faktorius, kuris priklauso nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai. Kaip ir kiti šios šeimos atstovai, SLO sudaro poras cholesterolio turinčiose membranose (Stevens ir Bryant, 2011). Šis baltymas susintetinamas kaip 571 aminorūgšties ilgio peptidas (Gerlach et al., 1993). Sekretuojama forma gaunama streptokokų proteinazėms nuo baltymo N galo pašalinus apie 70 aminorūgščių, kurios vadinamos 0-iniu domenu. Jo seka neatitinka jokio kito CDC sekos ir manoma, kad neįtakoja toksino aktyvumo, tačiau yra reikalinga bakterinių NAD-glikohidrolazių translokacijai į šeimininko ląstelės citoplazmą. Tai sąlygoja didesnę bakterijų citotoksiškumą (Feil et al., 2014).

Streptolizinas O turi CDC būdingą struktūrą ir poros formavimo mechanizmą. SLO, taip pat, turi D1-D4 domenus. 4-ajame domene yra visiems CDC būdinga triptofanu turtinga kilpa ir treonino-leucino (Thr490-Leu491) pora reikalinga sąveikai su membranoje esančiu cholesteroliu. Tačiau nustatyta, kad SLO, kaip ir kitų CDC baltymų, sąveikai su membrana, svarbus ne tik cholesterolis. CDC baltymų aktyvumas skiriasi tų pačių ląstelių membranose. Pelių miocitų membranose perfringolizino O (CDC šeimos toksinas) aktyvumas yra mažesnis negu SLO aktyvumas, nors abu baltymai cholesterolį atpažįsta atitinkama leucino ir treonino pora. Manoma, kad skirtingi CDC atpažįsta cholesterolį skirtingoje lipidinėje aplinkoje (Farrand et al., 2015).

CDC membranoje įsitvirtina dėka 4-ajame domene esančių kilpų. Iš viso jos yra keturios: hidrofobinės 1-a, 2-a ir 3-ia kilpos bei triptofanu turtinga kilpa. Pirmiausiai, membranoje esantis cholesterolis yra atpažįstamas 1-oje kilpoje esančių leucino ir treonino aminorūgščių, tuomet į membraną įsiterpia 2 ir 3 kilpa, bei triptofanu turtinga kilpa (Soltani et al., 2007). 1 kilpa ir 2 kilpa turi nemažai visiems CDC konservatyvių aminorūgščių, tačiau jose yra ir besiskiriančių aminorūgščių. Šių aminorūgščių savybės gali įtakoti toksinų sąveikos su membrana ypatybes ir tai kokiose membranose šie baltymai veikia (Savinov ir Heuck, 2017). Trečioji kilpa yra mažiausiai konservatyvi (12 pav.). A. J. Farrand ir kolegės parodė, kad 3 kilpos sąveika su membrana kinta, pakeitus joje esančias aminorūgštis, o tai įtakoja baltymo poros įsiterpimą į membraną. PFO (perfringolizinas O) pakeitę Asp434 aminorūgštį, tyrėjai pagerino baltymo sąveiką su pelių miocitų membrana, o pakeitę Asp434 analogą SLO (Ser505), jie sumažino SLO prisijungimą (Farrand et al., 2015) (Johnson et al., 2017). Taigi, CDC su membrana sąveikaujančių kilpų aminorūgščių sekos ypatumai gali nulemti skirtingą toksinų afiniškumą skirtingoms membranoms. Pneumolizino ir

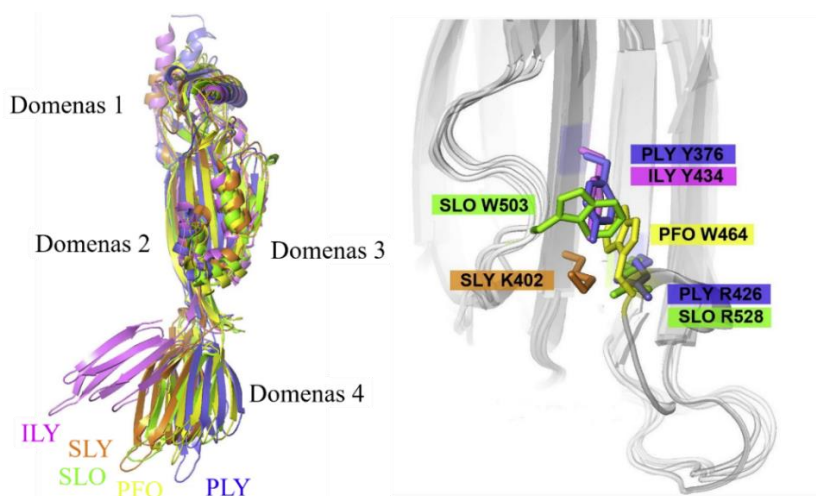
streptolizino O kilpų aminorūgščių sekos turi keletą skirtumų, tai gali lemti jų sąveikas su membrana skirtumus (12 pav.).



12 pav. Pneumolizino ir streptolizino O D4 kilpų aminorūgščių sekų palyginimas. Žalia – sutampančios aminorūgštys, raudona – skirtingos aminorūgštys. Adaptuota iš: Savinov ir Heuck, 2017.

PLY ir SLO C galo paviršiuose, yra ne tik kilpų, bet ir kiti pirminės baltymo struktūros skirtumai. Pirma, Trp456 esantis PLY yra pakeistas į Ser558 SLO. Tokia mutacija galimai keičia baltymo-baltymo sąveikas. Taip pat, pastebėti skirtumai regione: 461-YPQVE-465. Pavyzdžiui, PLY esantis tirozinas Y461 SLO yra pakeistas serinu (S563) (didelė aromatinė aminorūgštis pakeista į mažą alifatinę), glutaminas Q463 SLO yra pakeistas į tiroziną (Y565) (alifatinė aminorūgštis į aromatinę), glutamo rūgštis E465 SLO pakeista į seriną (S567) (neigiama aminorūgštis į neutralią) (Kucinskaite-Kodze et al., 2020).

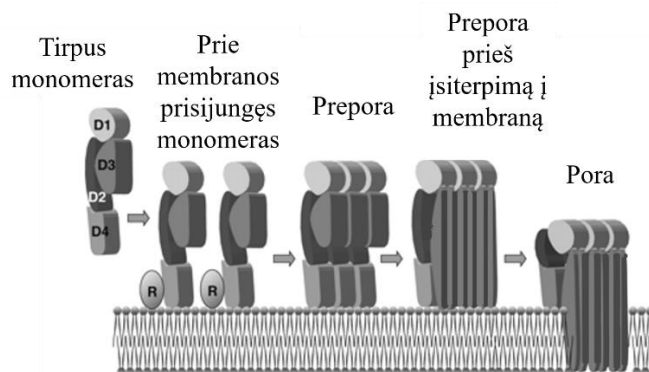
PLY ir SLO tretinės struktūros yra gana panašios (13 pav.). Palyginus skirtingų CDC struktūras, apskaičiuojant kvadratinio vidurkio nuokrypius, pastebėta, kad vieni mažiausių skirtumų buvo tarp PLY, SLO ir SLY (suilzinas). Pneumolizino ir streptolizino O triptofanu turtingoje kilpoje susidarantys vandeniliniai ryšiai, taip pat, sutampa, išskyrus streptolizino O Trp537, kurio atitikmuo PLY yra Trp435, sudaromus ryšius (Lawrence et al., 2015). Tačiau PLY struktūra yra linijinė ir D4 domenas, kartu su triptofanu turtinga kilpa, yra beveik nepakrypęs nuo baltymo vidurio ašies (Park et al., 2016). Kita vertus, SLO triptofanu turtinga kilpa, nors ir turi 3 vandenilinius ryšius (Trp535-Ala398, Trp535-His40, Trp537-Thr245) ir van der Valso sąveikas su 4-u domenu, nuo jo yra nususukusi ir yra ištemptos konformacijos. Tai suteikia mobilumo kilpai, kurioje yra cholesterolį atpažįstančios aminorūgštys. Dėl to, šioje kilpoje esanti leucino aminorūgštis atsiduria neįprastoje pozicijoje – išsikišusi vienoje D4 pusėje, kaip „hidrofobinis pirštas“ (Feil et al., 2014).



13 pav. Kairėje, nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai priklausančių toksinų tretinės struktūros palyginimas. Dešinėje, toksinų 4 domeno struktūros palyginimas. ILY – intermedilizinas, SLY – suilzinas, SLO – streptolizinas O, PFO – perfringolizinas O, PLY – pneumolizinas. Adaptuota iš: Park et al., 2016.

Skiriasi ne tik 4-asis SLO ir PLY domenas. PLY 2-ajame domene esančios dvi aminorūgščių grandinės (29-35 ir 46-50 aminorūgštys) yra labai mobilios. Tai būdinga tik PLY. Todėl, vandenilinių ryšių tarp D2 ir D3, bei D2 ir D4, kurie yra kituose CDC, PLY neturi (Lawrence et al., 2015). SLO šiuos ryšius sudaro. Jo 4-as domenas iš viso sudaro 31 vandenilinių ryšių su 1-3 domenais (Feil et al., 2014). Nors SLO ir PLY tretinės struktūros yra panašios, tačiau šie baltymai turi struktūrinių skirtumų ir evoliuciškai yra nutolę (Ahmad et al., 2011).

SLO kaip ir kiti CDC yra išskiriamas vandenyje tirpių monomerų pavidalu. Manoma, kad šis toksinas gali sudaryti tiek pilnas, tiek dalines poras. Pilna pora (250-300 Å) susidaro, kai 36-40 iki membranos difundavusių monomerų oligomerizuoja ir susidariusi prepora įsiterpia į membraną (14 pav.). Dalines poras sudaro mažiau monomerų, jos į membraną įsiterpia nesudarius pilnai preporai, todėl yra mažesnės (Stewart et al., 2015).



14 pav. CDC pilnos poros formavimo mechanizmas. Adaptuota iš: Tweten, 2005.

1.3.3 *S. pneumoniae* ir *S. pyogenes* sukeltų kvėpavimo takų infekcijų diagnostika

Antibiotikų atradimas buvo vienas iš reikšmingiausių atradimų žmonijos istorijoje. Šie preparatai leido prailginti vidutinę žmogaus gyvenimo trukmę net 23-ejais metais. Tačiau nauji antibiotikai atrandami ar sukuriama vis rečiau, o dėl perteklinio jų vartojimo, vis daugiau žmonėms specifinių patogenų įgyja atsparumą šiems preparatams (Hutchings et al., 2019). Dažniausiai antibiotikai skiriami gydant kvėpavimo sistemos ligas, nors toks gydymas ne visuomet yra būtinas (Higienos institutas, 2010). Todėl, norint sumažinti antibiotikų vartojimą, kai tai nėra racionalu, tačiau išvengti netikslios ligos diagnozės ir uždelsto gydymo, būtini greiti, prieinami ir tikslūs bakterinių kvėpavimo takų ligų diagnostikos metodai.

Apatinių kvėpavimo takų ligas, tokias kaip plaučių uždegimas, dažnai sukelia *Streptococcus pneumoniae* bakterijos (sukelia 35-60 % plaučių uždegimo atvejų) (Sakalauskas et al., 2016). Tačiau pneumoniją, gali sukelti ir virusai (pvz.: žmogaus rinovirusas, gripo virusas) ar grybeliai (Dandachi ir Rodriguez-Barradas, 2018). Nuo sukėlėjo priklauso ir gydymas. Todėl, tiksli diagnostika turi didelę reikšmę. Anksčiau, patvirtinti virusinę infekciją, dažnai buvo naudojami virusų kultūrų auginimo ir virusų antigenų detekcijos metodai, bet jie gali būti invaziniai ir rezultatų gali tekti laukti savaitę ar daugiau (Freeman ir Leigh, 2021). Vis dažniau naudojami tikslūs, greitesni genų amplifikacijos tyrimai, bet juos atlikti vis tiek užtrunka kelias valandas (Dandachi ir Rodriguez-Barradas, 2018). Taip pat, gali būti atliekami citologiniai tyrimai (Martínez-Girón ir Pantanowitz, 2017) ar serologiniai tyrimai antikūnų kiekiui nustatyti (Sakalauskas et al., 2016).

Bakterinė pneumonija gali būti nustatyta atlikus skreplių tepinėlio tyrimą. Prieš pradėdant gydymą paimtas skreplių tepinėlis dažomas Gramo būdu ir mikroskopuojamas. Šio metodo jautrumas yra mažas, todėl gali būti pasitelktas mikrobiologinis skreplių pasėlio tyrimas. Nors jo jautrumas yra didesnis, bet net ir šiuo metodu sunku atskirti kolonizuojančias bakterijas, nuo pneumonijos sukėlėjo. Patikimai nustatyti koks yra ligos sukėlėjas galima tik išauginus mikrobiologinį pasėlį iš aplinkos nepaveiktų ermių: kraujo, pleuros skysčio ar plaučių audinio. Tačiau tai yra specifinis, invazinis ir ilgai trunkantis tyrimas. Šiuo metu jau yra prieinamas *S. pneumoniae* C polisacharido antigeno nustatymo šlapime tyrimas. Jis yra greitas (trunka 15 minučių), jautrumas siekia 50-80 %, o specifiškumas viršija 90 %, vienintelis trūkumas – kaina (Sakalauskas et al., 2016).

Streptococcus pyogenes yra dažnas viršutinių kvėpavimo takų ligų sukėlėjas. Ūmus faringitas/ūmus tonzilitas (ŪFT) tai ryklės ar tonzilių uždegimas. Jį dažniausiai sukelia įvairūs virusai (gripo, paragripo, Herpes simplex virusai, Coxsackie A, Epstein-Barr ir citomegalo virusai),

tačiau gali sukelti ir bakterijos bei mikroskopiniai grybai. Pagrindinis bakterinio faringito sukėlėjas yra *S. pyogenes* bakterijos. Jos yra labai paplitusios tarp 5-15 m. amžiaus vaikų (sukelia 15-30 % faringito atvejų), tačiau sukelia 15 % atvejų ir suaugusiems asmenims (Higienos institutas, 2010). Netinkamai ar ne laiku diagnozuotas ŪFT gali sukelti rimtas komplikacijas (pvz.: peritonozilinį arba retrofaringinį abscesą) (Buckiūnienė ir Janonienė, 2019). Todėl svarbu greitai ir tinkamai diagnozuoti bakterijų sukeltą ŪFT.

Bendri kraujo tyrimai neleidžia patikimai atskirti virusinio ir bakterinio ŪFT, todėl reikia atlikti kitus tyrimus: greitojo A grupės beta hemolizinio streptokoko antigeno nustatymo testą (GAST) ir mikrobiologinį pasėlį (Higienos institutas, 2010). Kiekvieno testo kokybę iš esmės apibūdina jo jautrumas (tai teisingai teigiamų rezultatų dalis iš rezultatų visumos) ir specifiškumas (tai teisingai neigiamų rezultatų dalis iš rezultatų visumos) (Kasiulevičius, 2014). Jautriausias, didžiausio specifiškumo tyrimas yra gerklės tepinėlio mikrobiologinis pasėlis, tačiau jis yra brangus ir gauti rezultatus užtrunka 48-72 valandas. GAST testai yra pigesni ir greitesni. GAST testai gali būti: imunochromatografiniai (jautrumas 84 %, specifiškumas 96 %), imunofermentiniai (jautrumas 86 %, specifiškumas 96 %), optinės imunoanalizės (jautrumas 86 %, specifiškumas 94 %), molekulinės technikos (jautrumas 92 %, specifiškumas 99 %), lateksinės agliutinacijos (jautrumas 53-91 %, specifiškumas 85-89 %), liposominiai tyrimai (jautrumas 65 %, specifiškumas 96 %) (Lean et al., 2014). Seniausi antigeno nustatymo testai yra lateksinės agliutinacijos testai, tačiau praktikoje jie beveik nebenaudojami. Šiuo metu, dėl didelio jautrumo, populiarėja molekulinės technikos, tačiau tokie tyrimai trunka apie 1-2 valandas ir jiems reikalinga speciali įranga, todėl išauga tokių tyrimų kaina (Buckiūnienė ir Janonienė, 2019). Kiekvienas GAST testas turi savų trūkumų, tačiau GAST taikymas 53 % sumažina antibiotikų skyrimą vaikams, kurie neserga A grupės streptokokų sukeltomis infekcijomis ir 7,9 % padidina antibiotikų taikymą šiomis infekcijomis sergantiems vaikams (Kose et al., 2016). Todėl tokių testų tobulinimas ar naujų testų diegimas, gali padėti sumažinti perteklinį antibiotikų vartojimą.

Kitaip, negu ūminio faringito, pagrindinis skarlatinos sukėlėjas yra *S. pyogenes*. 10-15 % jų sukeltų infekcijų pasireiškia skarlatinos sindromu (karščiavimas, angina ir tipiškas bėrimas odoje). Ši liga įprastai diagnozuojama pagal būdingus požymius, tačiau diagnozės laboratoriniam patvirtinimui, kaip ir nustatant ŪFT, gali būti atliktas mikrobiologinis žiočių tepinėlio pasėlio tyrimas, serologiniai (ieškant antikūnų kraujyje) ir GAST tyrimai (ULAC, 2021).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2-propanolis	-	C ₃ H ₇ OH (Honeywell, Vokietija);
β-merkaptioetanolis	-	β-ME (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Chloroformas	-	CHCl ₃ (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Dejonizuotas vanduo	-	dist. H ₂ O (Milli-Q plus, JAV);
Diklio fosfatas	-	K ₂ HPO ₄ (Carl ROTH, Vokietija);
Dinatrio fosfatas	-	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Etanolis	-	EtOH (AB „Vilniaus degtinė“, Lietuva);
Inkarinis junginys	-	LB1*;
Kalio fosfatas	-	KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Natrio chloridas	-	NaCl (Fisher Scientific, Jungtinė Karalystė);
Natrio dihidrofosfatas	-	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Acros Organics, JAV);
Natrio hidroksidas	-	NaOH (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Oktadekantiolis	-	ODT (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Sieros rūgštis	-	H ₂ SO ₄ (Sigma-Aldrich, Vokietija);
Trizma® bazė	-	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ (Sigma-Aldrich, JAV);
Trizma® hidrochloridas	-	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ ·HCl (Sigma-Aldrich, JAV).

* Komerciniais tikslais junginio struktūra negali būti atskleista.

Lipidai

1,2-diarachidonoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas	-	DAPC (Avanti Polar Lipids, JAV);
1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfocholinas	-	DOPC (Avanti Polar Lipids, JAV);
1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerolio-3- fosfocholinas	-	DPPC (Avanti Polar Lipids, JAV);
1,2-dipetroselenoil- <i>sn</i> -glicerolio-3-fosfocholinas	-	DOPC6 (Avanti Polar Lipids, JAV);
Cholesterolis	-	Chol (Avanti Polar Lipids, JAV);
N-(trikosanoil)-sfingo-4-enino-1-fosfocholinas	-	SM (Avanti Polar Lipids, JAV).

Toksinai

Pneumolizinas	-	PLY;
Streptolizinas O	-	SLO.

Toksinai gauti iš dr. Aurelijos Žvirblienės (Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Instituto).

2.2 Metodai

2.2.1 Aukso plėvelių paruošimas

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) matavimams stiklo plokštelės (75x25 mm, 1 mm storio, Thermo Fischer Scientific, UK) (15 pav.) pirmiausiai plaunamos denatūruotu etilo alkoholiu, mechaniškai nuvalomos, plaunamos dejonizuoto (18.2 Ohm/cm², Mili-Q, Millipore) vandens ir denatūruoto etilo alkoholio mišiniu (santykis 1:1) ir gerai nuplaunamos dejonizuotu vandeniu. Išdžiovinamos azoto dujų (99.99%) srove. Sekančiame etape plokštelės plaunamos sieros rūgštimi, vėlgi gerai nuplaunamos dejonizuotu vandeniu ir išdžiovinamos azoto dujų srove. Paviršiaus plazmonų rezonanso (SPR) matavimams BK7 stiklo diskai (25 mm diametro ir 1 mm storio, AutoLab, Methorm, Nyderlandai) (15 pav.) 20 minučių inkubuojami sieros rūgšties ir persulfato (10 g/l) mišinyje, nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir išdžiovinami azoto dujų srove. Galiausiai, stiklo plokštelės bei diskai padengiami 1 nm chromo (galia – 200 W, argono slėgis – 4 mTorr) pasluoksniu ir ~80 nm ar ~50 nm (EIS ir SPR matavimams, atitinkamai) aukso (galia – 200 W, argono slėgis – 3 mTorr) sluoksniu naudojant PVD 75 (Kurt J. Lesker Company, JAV) magnetroninio garinimo sistemą.



15 pav. Aukso sluoksniu padengtos stiklo plokštelė. EIS tyrimams kairėje, SPR tyrimams – dešinėje.

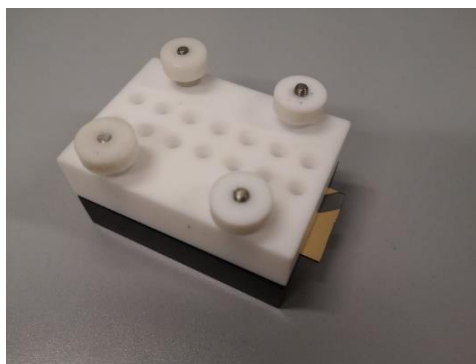
2.2.2 Daugiasluoksnių vezikulių paruošimas

Prikabintos lipidinės (tBLM) bei hibridinės lipidinės (hBLM) membranos formuojamos keliais etapais: i) ant plonu aukso sluoksniu padengtos plokštelės suformuojamas savitvarkis monosluoksnis (SAM), ii) paruošiamos daugiasluoksnių vezikulės, iii) ant SAM paviršiaus liejamos vezikulės.

Vezikulės gaminamos iš medžiagų skyriuje nurodytų sausų lipidų ar lipidų tirpalų chloroforme, kurie gaunami iš Avanti Polar Lipids Inc. (JAV). Arba sausius lipidus tirpinant chloroforme (99 %), arba chloroformu skiedžiant koncentruotus lipidų tirpalus, paruošiami standartiniai 10 mM lipidų tirpalai. Gauti tirpalai laikomi šaldiklyje -20 °C temperatūroje. Prieš

gaminant vezikulių tirpalus standartiniai lipidų tirpalai atšildomi kambario temperatūroje. Naujame mėgintuvėlyje ruošiami, pageidaujamos sudėties, liposomų tirpalai. Chloroformas išgarinamas apie 30 minučių tirpalą laikant po azoto dujų srove, kol susidaro lipidinė plėvelė. Įpilama buferinio tirpalo (0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, pH 4,4). Bendra lipidų koncentracija tirpale yra 1 mM. Naudojant automatinę pipetę su 1 mL antgaliu, įsiurbimo ir išsiurbimo ciklais (apie 1 ciklas per sekundę) tirpalas sumaišomas. Jis turi būti homogeniškas, pieno spalvos (viso 50-100 ciklų). Pagaminti tirpalai, gali būti laikomi šaldytuve 4 °C temperatūroje apie mėnesį. Prieš naudojant tirpalą pakartotinai, jis turi būti išmaišytas iki pieno spalvos, kaip aprašyta anksčiau.

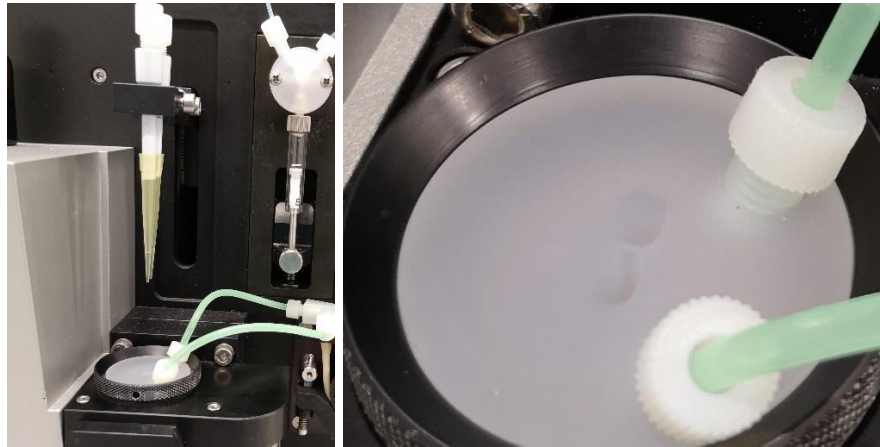
2.2.3 Dirbtinių lipidinių membranų paruošimas



16 pav. 14-os kanalų elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimų celė.

Pirmas žingsnis ruošiant prikabintas lipidines membranas – auksu padengtas plokšteles panardinti į 2-propanolio (Honeywell, Vokietija), β-merkaptioetanolio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misūris) bei inkarinio junginio tirpalą. Plokštelės inkubuojamos 10-12 valandų, nuplaunamos 2-propanoliu ir išdžiovinamos azoto dujų srove. Taip suformuojamas savitvarkis monosluoksnis. Surenkama 14-os kanalų elektrocheminių matavimų celė (16 pav.). Į kiekvieną kanalą įpilama po 100 μL daugiasluoksnių liposomų tirpalo. Inkubuojama 30 minučių ir išplaunama 3 mL buferio (0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7).

Ruošiant hibridines lipidines membranas pirmiausiai, taip pat, suformuojamas savitvarkis monosluoksnis. Tam aukso sluoksniu padengti diskai per naktį inkubuojami 2-propanolio ir oktadekantiolio tirpale. Pavyzdžiai nuplaunami 2-propanoliu ir išdžiovinami azoto dujų srove. Aukso bei SAM padengti diskai dedami į SPR matavimų prietaisą, surenkama celė (2-ų kanalų) (17 pav.). Į abu kanalus įleidžiama po 150 μL liposomų tirpalo. Po 30 minučių celės išplaunamos apie 3-5 mL buferio (0,1 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7).



17 pav. Kairėje SPR matavimų sistema, dešinėje – 2-ų kanalų SPR matavimų celė.

2.2.4 Pneumolizino ir streptolizino O naudojimas

Membranos sudėties įtakos toksinų aktyvumui nustatymui EIS metodu 2,45 μL pradinio pneumolizino tirpalo (0,65 mg/mL koncentracijos tirpalas, gautas iš Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Instituto) ar 4,52 μL pradinio streptolizino O tirpalo (0,88 mg/mL koncentracijos tirpalas, gautas iš Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Instituto) įleidžiami į 3 mL pH 7 buferio (0,1 M NaCl, 0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7). SPR matavimams 1 mL pH 7 buferio naudojami 4,08 μL pneumolizino arba 7,53 μL streptolizino O pradinio tirpalo. pH įtakos tyrimams tokie pat baltymų kiekiai įleidžiami į pH 6 (0,1 M NaCl, 0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 8 (0,1 M NaCl, 0,01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) ar pH 9 (0,1 M NaCl, 0,01 M $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3/\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\cdot\text{HCl}$) buferius. Toksinai šiuose tirpaluose inkubuojami 15 minučių. Tiek EIS, tiek SPR celėse išlyginamas buferio kiekis. EIS celės tūris 270 μL , celė pilnai pripildoma pH 6, 7, 8 ar 9 buferio, nusiurbama 150 μL . SPR celės tūris mažesnis – 170 μL , todėl nusiurbama tik 50 μL buferio. Į kiekvieną tiek EIS, tiek SPR celės kanalą įleidžiama po 30 μL toksino tirpalo. Galutinė pneumolizino koncentracija EIS celėje – 2 nM, SPR celėje – 10 nM. Tuo tarpu, galutinė streptolizino O koncentracija EIS celėje – 5 nM, o SPR celėje – 25 nM. Po 30 minučių inkubacijos su toksinais, celės išplaunamos atitinkamo pH buferiu. SPR matavimų metu, mėginiai sumaišomi laiko momentais: 20 s bei 1200 s, kad greičiau būtų pasiektas įsotinimas.

2.2.5 Elektrocheminio impedanso matavimai

Elektrocheminio impedanso matavimai atlikti elektrocheminėje 12-os ar 14-os kanalų matavimų celėje. Matavimai atliekami lygiagrečiai visuose kanaluose, naudojant PalmSens matavimų įrangą (programinė įrangą PStrace 5.6). Spektrų dažnio diapazonas 0,5-100 kHz.

Matavimams naudojami du elektrodai: sidabro-sidabro chloridinis (Ag/AgCl) kietas elektrodas ir stiklo plokštelė padengta auksu – darbinis elektrodas. Matuojama naudojant 10 mV kintamąją srovę.

2.2.6 Paviršiaus plazmonų rezonanso matavimai

SPR matavimai atlikti Autolab Twingle sistema (Eco Chemie B.V., Nyderlandai), naudojant SPR Acquisition (Metrohm, Nyderlandai) programinę įrangą. Matavimams naudojama BK7 prizmė, kurios refrakcinis indeksas – 1,518. SPR spektras gaunamas į paviršių automatiškai skirtingu kampu, nuo 62 iki 78° (mililaisnio rezoliucija), leidžiant plačiai poliarizuotą 670 nm bangos ilgio šviesos srautą. Atsispindėjusios šviesos intensyvumas fiksuojamas detektoriaus kamera. Matavimų metu F34 šaldymo/šildymo cirkuliacinio siurblio (Julabo, Vokietija) pagalba palaikoma pastovi $22 \pm 0,1$ °C temperatūra. SPR duomenų analizė atlikta Kinetic Evaluation programa.

2.2.7 Statistinė duomenų analizė

Duomenų analizė atlikta RStudio. Kiekvienas EIS bei SPR eksperimentas pakartotas mažiausiai tris kartus. Iš elektrocheminio impedanso metodu gautų Bode diagramų randamas dažnis, kuriame fazės poslinkis buvo mažiausias. Gautos fazės minimumo vertės standartizuojamos kiekvieną vertę padauginus iš santykio tarp baltymo poveikio kontrolinei membranai visų matavimų vidurkio ir tos dienos toksino poveikio kontrolinei membranai vidurkio. Taip perskaičiuotos reikšmės perkeliamos į bendrą matavimų skalę, tačiau išlaikomi skirtumai tarp grupių. Standartizavimas atliekamas, kadangi pastebėta, kad fazės minimumo reikšmės varijuoja skirtingomis dienomis, nors skirtumai tarp grupių išlieka beveik vienodi. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo jautrumas baltymams gali priklausyti nuo ant aukso padengto savitvarkio monosluoksnio savybių. M. C. Brothers ir kolegos nustatė, kad šio metodo jautrumui baltymams įtakos turi: i) inkarinio junginio tankis, ii) inkarinio junginio grandinės ilgis iii) SAM krūvio pasiskirstymas ir kiti faktoriai (Brothers et al., 2020). Yra nustatyta, kad šie ir kiti, savitvarkio monosluoksnio parametrai turi įtakos ant jo išlietos tBLM elektrinėms savybėms (Rakovska et al., 2015), (Basit et al., 2011), (Park et al., 2020). Pačio SAM formavimuisi įtakos turi temperatūra, drėgmė ir kiti faktoriai (Singh et al., 2020). SAM sluoksnis kiekvienam eksperimentui ruošiamas atskirai, todėl, kai kurie iš daugelio jo formavimuisi įtaką darančių faktorių, gali skirtis, dėl to suformuoto SAM bei ant jo išlietos tBLM savybės gali šiek tiek skirtis, o tai gali įtakoti elektrocheminio impedanso spektroskopijos jautrumą baltymams.

Po fazės minimumo reikšmių standartizavimo pašalinamos išskirtys. Jomis laikomos reikšmės mažesnės už:

$$Q_1 - 1,5 \cdot IQR \quad (1)$$

kur Q_1 – pirmasis kvartilis, IQR – tarpkvartilinis plotis, bei reikšmės didesnės už:

$$Q_3 + 1,5 \cdot IQR \quad (2)$$

kur Q_3 – trečiasis kvartilis, IQR – tarpkvartilinis plotis.

Statistinis reikšmingumas vertinamas kiekvieną tiriamą grupę lyginant su kontrole (iš 50 % DOPC ir 50 % cholesterolio sudarytos tBLM paveiktos pH 7 inkubuotu tiriamu toksinu). Kadangi visuomet bent vienoje iš grupių duomenų kiekis buvo nedidesnis negu 20, naudojamas neparametrinis Mano-Vitnio-Vilkoksono kriterijus. Paveiksluose pateikiamas vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistinis reikšmingumas pateikiamas atitinkamai: ns – statistiškai nereikšmingas, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

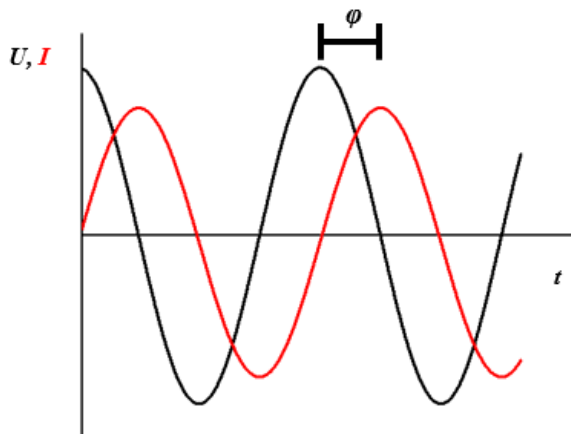
Paviršiaus plazmonų rezonanso duomenys, analizuojami Rstudio bei Microsoft Excel. Po 30 minučių matavimo nustatomas rezonansinio kampo pokytis. Tuo pačiu būdu kaip aprašyta EIS duomenų analizei pašalinamos išskirtys ir jeigu tekste nenurodyta kitaip, statistinei duomenų analizei, taip pat, naudojamas Mano-Vitnio-Vilkoksono kriterijus.

2.2.8 Elektrocheminio impedanso spektroskopija

Prikabintos lipidinės membranos yra populiarus modelis baltymų (pvz.: poras formuojančių toksinų) sąveikos su membrana tyrimams. Membrana, kurioje nėra pažeidimų yra nelaidi elektros srovei. Tačiau dėl baltymų sąveikos ar įsiterpimo į membraną, joje atsiradę defektai padidina jos laidumą. Vienas iš būdų, kuriuo galima įvertinti tokius membranos laidumo pokyčius, yra elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodas. Jis, taip pat, leidžia išmatuoti sistemos talpumą, dielektrinę konstantą ir kitus parametrus (Budvytytė, 2012). Todėl yra naudojamas ir kitose srityse: metalų korozijos (Encinas-Sánchez et al., 2019), baterijų (Křivík et al., 2019) tyrimams, sensoriams (Chiriaco et al., 2018), taip pat, biologinių sistemų tyrimams: antikūnų ir antigenų sąveikų (Radhakrishnan et al., 2016), patogenų aptikimui (Hnaïen et al., 2008) ir kitiems.

EIS metodas yra pagrįstas nuo dažnio priklausomo elektrocheminės sistemos impedanso matavimu. Tiriama sistema yra sužadinama mažos amplitudės (2–10 mV) sinusoidiškai kintančia įtampa (U) (“Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance”). Užduodamas dažnis gali būti keičiamas nuo kelių mHz iki kelių kHz priklausomai nuo tiriamos sistemos ir turimos įrangos (El-Beyrouthy ir Freeman, 2021). Matuojamas gautas srovės atsakas (I). Jis yra kitokios amplitudės ir atsilieka nuo žadinančio signalo tam tikru kampu (18 pav.). Impedansas yra žadinančios įtampos ir

matuojamos srovės santykis, apibūdinamas amplitude ir fazės poslinkiu – ϕ (“Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance”).



18 pav. Sinusoidinė kintama **sužadavimo** (juoda) ir **atsako** (raudona) srovė. U – įtampa, I – srovės stipris, t – laikas, ϕ – fazės poslinkis.

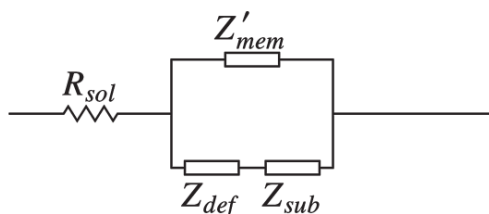
Naudojant EIS metodą tirti prikabinoms lipidinėms membranoms, sistema dažniausiai supaprastintai yra modeliuojama kaip elektrinė grandinė. Membranos savybės elektriniame lauke didžiaja dalimi atitinka kondensatoriaus savybes, todėl ji vaizduojama kaip kondensatorius. Tuomet membranos impedansas priklauso nuo jos talpumo (El-Beyrouthy ir Freeman, 2021):

$$Z'_{mem}(\omega) = \frac{1}{j\omega C_{mH}} \quad (3)$$

kur Z'_{mem} – membranos impedansas (Ω), ω – kampinis dažnis (rad/s), C_{mH} – membranos ir elektrinio (Helmholtz) sluoksnio talpumas (F), j – menamasis vienetas. Membranos talpumas apskaičiuojamas:

$$C_m = \frac{\varepsilon\varepsilon_0 A}{d} \quad (4)$$

kur C_m – membranos elektrinė talpa, ε – elektrai nelaidaus sluoksnio santykinė dielektrinė skvarba, ε_0 – vakuumo dielektrinė konstanta lygi $8,85 \cdot 10^{-14}$ (F/cm), A – sluoksnio paviršiaus plotas (cm^2), d – sluoksnio storis (cm) (“Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance”).



19 pav. tBLM sistemą atitinkanti elektrinė schema (Valinčius et al., 2012).

Į elektrinę grandinę įtraukiami ir kiti elementai: membranoje esančių defektų impedansas (Z_{def}), pomembraninio sluoksnio impedansas (Z_{sub}) ir tirpalo, kuriame yra membrana, varža (R_{sol}) (19 pav.). Naudojant tokią elektrinę schemą bendras sistemos impedansas (Z_b) apskaičiuojamas:

$$Z_b = R_{sol} + \frac{1}{N_{def} \frac{1}{(Z'_{mem})^{-1} + (Z_{def} + Z_{sub})^{-1}}} \quad (5)$$

kur Z_b – bendras sistemos impedansas (Ω), R_{sol} – tirpalo varža viename paviršiaus ploto kvadratiniam centimetre (Ω), N_{def} – defektų tankis viename kvadratiniam centimetre (μm^{-2}), Z'_{mem} , Z_{def} , ir Z_{sub} yra atitinkamai membranos, defekto ir pomembraninio sluoksnio impedansas vienam defektui (Ω) (Valinčius et al., 2012). Ši formulė leidžia įvertinti membranoje susidarančių defektų tankį, žinant grandinės komponentų impedansą.

Tačiau nei viena elektrinė schema negali visiškai tiksliai aprašyti tBLM sistemos. Reali membrana yra heterogeniška ir turi natūraliai susidarančių defektų, todėl jos talpa dažnai yra neideali. Tokiu atveju, ji elgiasi kaip pastovios fazės elementai (CPE), o ne idealus kondensatorius (Ragaliauskas, 2017). CPU elemento fazė nepriklauso nuo dažnio (Holm et al., 2021). Jo impedansas:

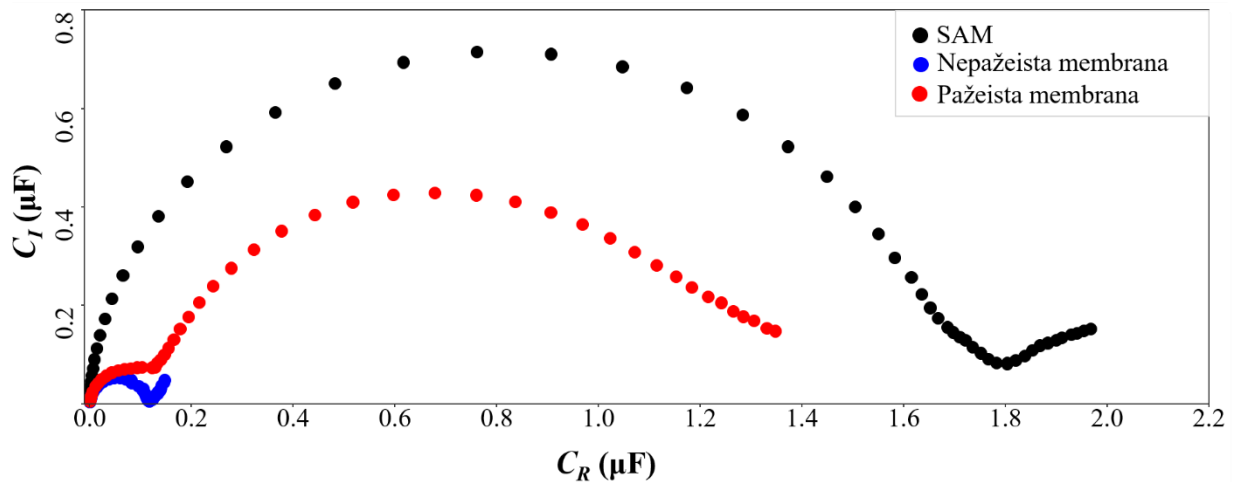
$$Z_{CPU} = \frac{1}{Q(i\omega)^\alpha} \quad (6)$$

kur Z_{CPU} – pastovios fazės elemento impedansas, Q – CPE parametras ($Fs^{-(1-\alpha)}$ arba $\Omega^{-1}s^\alpha$), α – CPE laipsnio rodiklis ($0 < \alpha \leq 1$), ω – kampinis dažnis (rad/s) (Córdoba-Torres et al., 2012). α rodiklis nurodo sistemos heterogeniškumą. Paprastam kondensatoriui, kurio paviršius yra homogeniškas $\alpha = 1$. Kuo geometriškai ar energetiškai heterogeniškesnis paviršius, tuo α yra mažesnis. Todėl šis rodiklis atspindi sistemos (pvz.: prikabintos lipidinės membranos) defektiškumą (Valinčius et al., 2012).

Priklausomai nuo to, ką norima stebėti, elektrocheminio impedanso duomenys gali būti vaizduojami skirtingais būdais, vienas jų – Cole-Cole diagrama. X ašyje atidedama realioji elektrinė talpa, o Y – menamoji. Naudojamas ir kitas duomenų pateikimo būdas – Bode diagrama. X ašyje vaizduojamas dažnis, logaritminėje skalėje, o Y – absoliuti impedanso reikšmė arba fazės poslinkis. Šis vaizdavimo būdas leidžia apskaičiuoti įvairius sistemos parametrus (talpumą, varžą ir kitus) (Jackman et al., 2012). Yra ir kitų duomenų vaizdavimo būdų: Nyquist diagrama ar Lisajaus figūros, tačiau jie naudojami rečiau, dėl sudėtingo duomenų interpretavimo (“Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance”).

Cole-Cole diagramoje matomi ant elektrodo paviršiaus besiformuojantys nauji sluoksniai, jų storis ir heterogeniškumas. 20-ame paveiksle pateiktos Cole-Cole diagramos: savitvarkio

monosluoksnio (SAM), suformuotos membranos ir membranos po poveikio poras formuojančiu baltymu. Membranos parametrus charakterizuoja pusapskritimio minimumas, kuris parodo suformuoto sluoksnio elektrinę talpą (kuo didesnė talpa, tuo plonesnis sluoksnis), ir pusapskritimio „uodegos“ ilgis, kuris nusako membranos defektiškumą (kuo ilgesnė uodega, tuo daugiau defektų) (Kwak et al., 2010). Taigi, Cole-Cole diagrama yra patrauklus būdas besiformuojančių sluoksnių tyrimams.

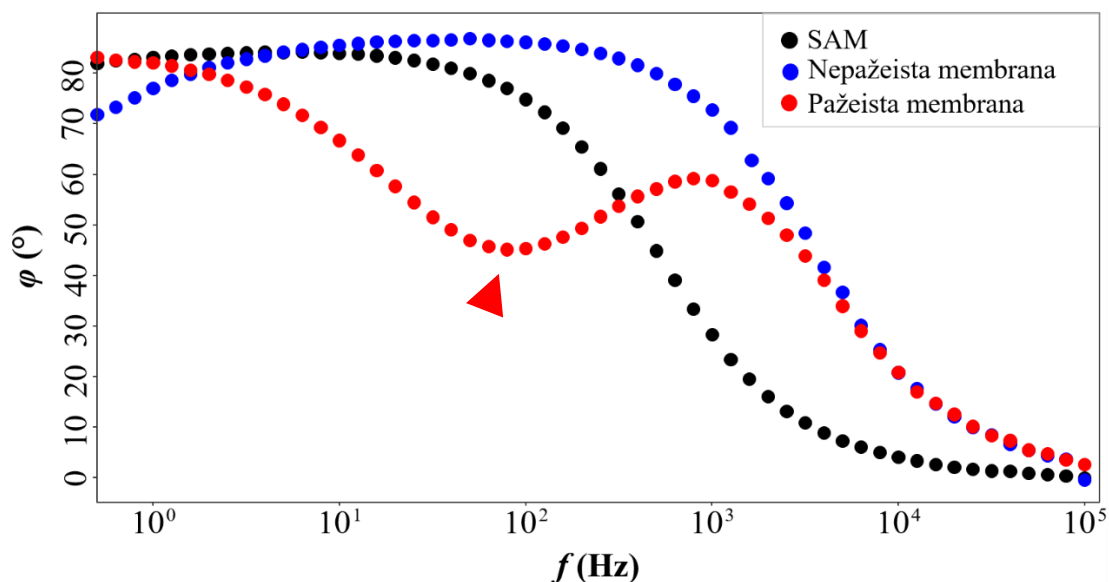


20 pav. Skirtingų sluoksnių ant aukso paviršiaus Cole-Cole diagramos.

Bode fazinė diagrama naudojama poras formuojančių baltymų poveikio membranai tyrimams. Kai membrana yra nepažeista fazės minimumas Bode diagramoje yra žemų dažnių srityje ($f_{min} \leq 2$ Hz). Prie membranos prisijungus baltymo monomerams, susidarius dalinėms ar pilnoms poroms fazės minimumas slenkasi į aukštesnių dažnių sritį (21 pav.). Kuo aukštesnių dažnių srityje yra fazės minimumas, tuo daugiau pažeidimų yra membranoje. Membranoje esančių pažeidimų tankis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\lg(N_{def}) = 0,934 \lg(f_{min}) - 0,953 \quad (7)$$

kur, N_{def} – defektų tankis (μm^{-2}), f_{min} – dažnis, kuriame yra fazės minimumas (Hz) (Ragaliauskas et al., 2019). Todėl, Bode diagrama patogiu naudotis tiriant poras formuojančių baltymų poveikį membranai, pavyzdžiui nuo cholesterolio priklausomų citolizinių poveikį tBLM arba atvirkščiai – tBLM komponentų įtaką poras formuojančių toksinų aktyvumui.



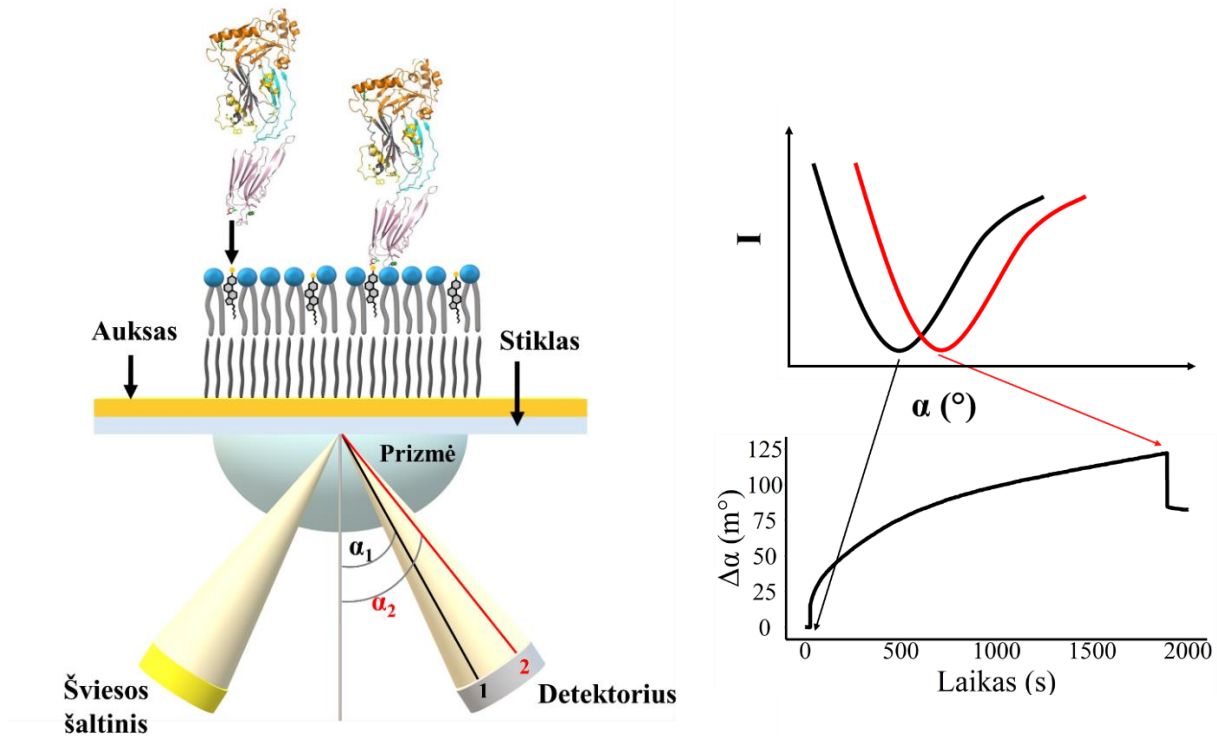
21 pav. Skirtingų sluoksnių ant aukso paviršiaus Bode diagramos. Rodyklė žymi fazės minimumą.

2.2.9 Paviršiaus plazmonų rezonansas

Paviršiaus plazmonų rezonanso (SPR, angl. Surface Plasmon Resonance) metodas, leidžia realiu laiku, dideliu jautrumu fiksuoti molekulių sąveikas. Plazmonai, tai elektronų tankio virpesiai, kurie gali egzistuoti tik tarp laisvų elektronų turinčio metalo ir dielektrinio sluoksnių. Virpesių dažnis dažniausiai yra artimas optiniams dažniams, todėl SPR metodas remiasi paviršiaus plazmonų optiniu sužadimu (Gupta, 2019). Elektronų virpėjimas sensoriaus paviršiuje (metalo-skysčio ar metalo-oro sąlytyje) sužadinamas tik plačiai poliarizuotos, specifinio bangos ilgio, bei tinkamu kampu (α_{rez}) į paviršių nukreiptos šviesos. Kokia šviesa ir koku kampu nukreipta į paviršių, sužadins elektronų virpėjimą, priklauso nuo medžiagos esančios sensoriaus paviršiuje lūžio rodiklio (n). Šis parametras yra skirtingas visoms medžiagoms ir jų grupėms (Schasfoort, 2017). Pavyzdžiui, jeigu aukso paviršius yra padengtas hibridine lipidine membrana ir ši sistema turi lūžio rodiklį n_{hBLM} , tuomet $\alpha_{rez} = \alpha_1$. Į sistemą įleidus pneumolizino, kuris turi n_{PLY} , PLY monomerams kabinantis prie hBLM, bendras sistemos lūžio rodiklis keisis priklausomai nuo to kiek monomerų prisikabins ir α_{rez} bus lygus α_2 . Tuomet pneumolizino monomerų prisikabinimo sukeltas rezonansinio kampo pokytis $\Delta\alpha = \alpha_2 - \alpha_1$.

Rezonansinis kampas išmatuojamas skirtingu kampu (tam tikrame diapazone) leidžiant šviesą į mėginį ir matuojant tokiu pačiu kampu atsispindėjusios šviesos intensyvumą. Kuo toliau nuo α_{rez} tuo atsispindėjusios šviesos intensyvumas bus didesnis. O kampas, kuriuo nukreipus šviesą į mėginį atsispindėjusios šviesos intensyvumas bus mažiausias, yra rezonansinis kampas

(Schasfoort, 2017). Tuomet, pagal šviesos intensyvumo pokyčius radus rezonansinio kampo vertes galima nubrėžti rezonansinio kampo pokyčio laike kreivę, kuri yra vadinama sensograma (22 pav.). Prie paviršiaus prisikabinusios medžiagos kiekis yra proporcingas rezonansinio kampo pokyčiui. Jį galima apskaičiuoti rezonansinio kampo pokytį dauginant iš kampo pokyčio jautrumo tiriamoms medžiagoms (jautrumas baltymams $S_{baltymai} = 0,82 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$ (Stenberg et al., 1991)) (Ragaliauskas, 2017).



22 pav. Paviršiaus plazmonų rezonanso metodo veikimo principas, baltymų sąveikos su hBLM tyrimams.

Pubmed duomenimis straipsnių, kuriuose naudojamas SPR metodas, kasmet daugėja, taigi metodas populiarėja. Jis naudojamas maisto alergenų nustatymui (Zhou et al., 2019), bakterinių patogenų (Boulade et al., 2019), imunoglobulinų detekcijai (Zheng et al., 2018) ir kitiems tyrimams (Jing et al., 2019). Šiame darbe šis metodas naudotas nustatyti poras formuojančių toksinų sąveikos su membrana pokyčiams keičiant membranos sudėtį ar pH.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Streptococcus pneumoniae bei *Streptococcus pyogenes* išskiriami nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimos toksinai: pneumolizinas ir streptolizinas O, ląstelės membranoje formuoja poras, taip sutrikdo homeostazę bei nužudo ląstelę. Šie toksinai yra svarbūs bakterijų plitimui bei įsigalėjimui organizme – bakterijų sukeliamų kvėpavimo takų infekcijų eigai. Būtent kvėpavimo takų ligų gydymui dažniausiai skiriami antibiotikai, nors jie ne visuomet yra reikalingi. Todėl šių toksinų tyrimai svarbūs tiek naujų diagnostikos metodų kūrimui, tiek fundamentalių tyrimų aspektu.

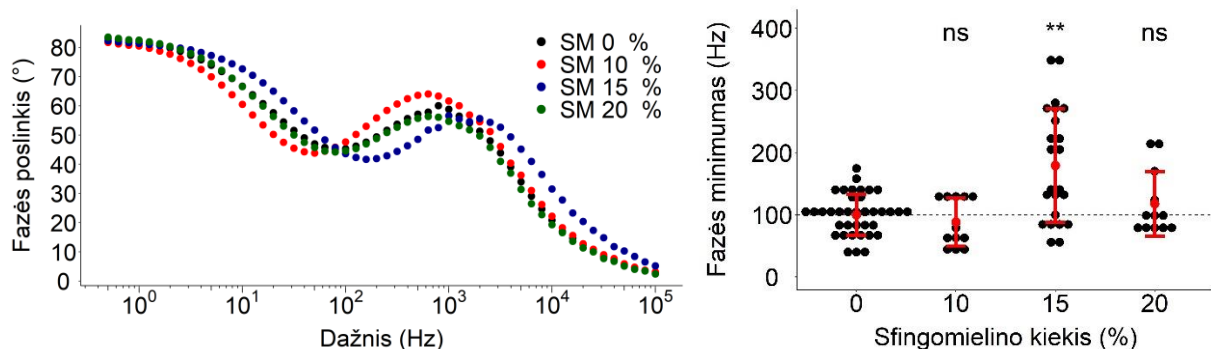
Literatūroje plačiai aprašyta, kad nuo cholesterolio priklausomų citolizinių aktyvumas gali skirtis priklausomai nuo membranoje esančio cholesterolio, nesočiųjų, sočiųjų lipidų, sfingolipidų bei kitų lipidų kiekio (Ragaliauskas et al., 2019), (Drücker et al., 2018), (Flanagan et al., 2009). Taip pat, nustatyta, kad šių toksinų aktyvumą gali įtakoti pH (Ahmad et al., 2011), (Nomura et al., 2007). Todėl šiame darbe ištirtas nuo cholesterolio priklausomų citolizinių, aptinkamų kvėpavimo takuose: pneumolizino ir streptolizino O, poveikis įvairios sudėties dirbtinėms lipidinėms membranoms bei pH įtaka jų aktyvumui.

3.1 Sfingomielino įtaka pneumolizino aktyvumui

Sfingolipidai yra viena iš pagrindinių lipidų kategorijų. Jie randami gyvūnuose, augaluose, grybuose, kai kuriuose prokariotiniuose organizmuose bei virusuose (Merrill, 2008). Sfingolipidai ir jų metabolitai siejami su įvairių signalų perdavimu ląstelėse (Pulli et al., 2018). Sfingomielinas (SM) yra žinduolių ląstelėse dažniausiai aptinkamas sfingolipidas (sudaro 10-20 % plazminės membranos lipidų). Žmogaus smegenų endotelinėse ląstelėse skirtingų šaltinių duomenimis randama 17-33 % sfingomielino (Siakotos ir Rouser, 1969), (Tewes ir Galla, 2001). Plaučių endotelio ląstelėse randama apie 12 % sfingomielino, tačiau plaučių epitelinėse ląstelėse, jo beveik neaptinkama (Kyle et al., 2018). Daugiausiai sfingomielino yra išoriniame plazminės membranos sluoksnyje (Kikas et al., 2018). Taigi, šis lipidus gali įtakoti prie išorinės membranos pusės besijungiančių baltymų sąveiką su ja.

Įvertinti sfingomielino poveikį pneumolizino aktyvumui naudotos prikabintos lipidinės membranos, kurių elektrinių savybių pokyčiai tirti elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu. Šis metodas leidžia įvertinti toksinų sukeltus, ant kieto paviršiaus suformuotos prikabintos lipidinės membranos, kokybės bei laidumo pokyčius (Aleknavičienė et al., 2021). EIS metodu gautose Bode diagramose esantis fazės minimumas atspindi membranoje susidariusių defektų tankį:

kuo labiau fazės minimumas pasislinkęs link didesnių dažnių pusės, tuo daugiau defektų yra membranoje (Valinčius et al., 2012).



23 pav. Skirtingą sfingomielino kiekį turinčių, tBLM, paveiktų 2 nM PLY, EIS Bode diagramos ir fazės minimumo priklausomybė nuo sfingomielino kiekio membranoje. tBLM sudėtys: SM:DOPC:Chol – 0 %:50 %:50 %; 10 %:40 %:50 %; 15 %:40 %:45 %; 20 %:40 %:40 %.

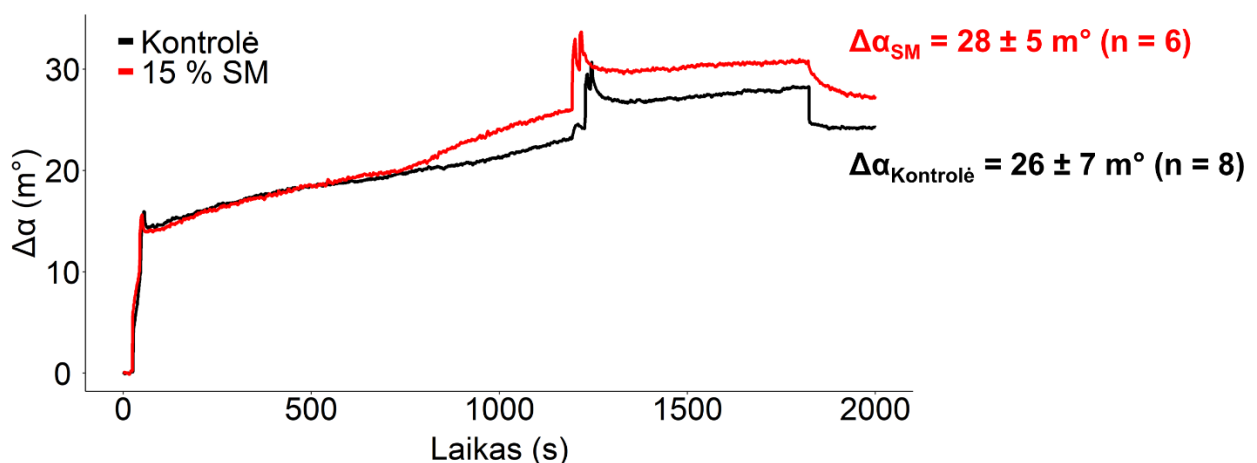
Siekiant įvertinti sfingomielino kiekio membranoje įtaką pneumolizino aktyvumui, pagamintos 0, 10, 15 ar 20 mol% (toliau darbe lipidų moliniai procentiniai santykiai yra išreikšti tik procentais) sfingomielino turinčios prikabintos lipidinės membranos (SM:DOPC:Chol – 0 %:50 %:50 %; 10 %:40 %:50 %; 15 %:40 %:45 %; 20 %:40 %:40 %). Tyrimui naudotas smegenų sfingomielinas. Jo didžioji dalis yra 18-os anglies atomų ilgio bei vieną dvigubąjį ryšį vienoje grandinėje turintis sfingomielinas. Dvigubasis ryšys yra išsidėstęs netoli lipido polinės cholino grupės. EIS metodu išmatuotos gautų tBLM elektrinės savybės. Pagal Bode diagramą įvertinta membranų kokybė. Atrinktos tik tos membranos, kurių Bode spektruose esantis fazės minimumas buvo nedidesnis negu 2 Hz – defektų tankis $\leq 0,2 \mu\text{m}^{-2}$ (tokios membranos laikomos beveik idealiomis). Šios tBLM inkubuotos su 2 nM pneumolizino ir dar kart išmatuotos jų elektrinės savybės.

Membranose, kuriose buvo 10 ar 20 % sfingomielino, pastebėti tik nedideli fazės minimumo pokyčiai. Fazės minimumas 10 % SM turinčiose membranose – 88 ± 39 Hz, o 20 % – 117 ± 52 Hz. Taigi, pneumolizino aktyvumas šiuo atveju beveik nesikeičia. Tačiau, kai tBLM sudėtyje yra 15 % sfingomielino, fazės minimumas išauga beveik 2 kartus (iki 179 ± 91 Hz) lyginant su membranomis, kuriose sfingomielino nebuvo ($f_{min} = 100 \pm 33$ Hz) (23 pav.).

Literatūroje aprašyta, kad nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai priklausančio toksino, perfringolizino O (PFO), aktyvumas mažėja didinant sfingomielino kiekį membranoje nuo 10 %. Nors duomenyse matyti, kad liposomose turinčiose 10 % sfingomielino, PFO aktyvumas šiek tiek išauga lyginant su jo aktyvumu, kontrolinėse iš 50 % DOPC ir 50 % cholesterolio sudarytose membranose. O membranose turinčiose 17 % sfingomielino šio toksino aktyvumas yra beveik toks

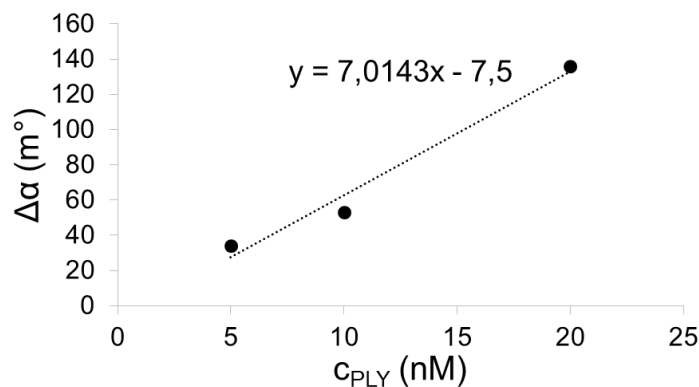
pat kaip kontrolinėse. PFO aktyvumo mažėjimas aiškinamas sumažėjusiu cholesterolio prieinamumu, dėl sfingomielino sąveikos su juo (Flanagan et al., 2009). Todėl, iškelta hipotezė, kad sfingomielinas turi įtakos ir pneumolizino monomerų sąveikai su membrana. Jai patikrinti pasitelktas paviršiaus plazmonų rezonanso metodas, kuris leidžia įvertinti prie membranos paviršiaus prisikabinusių baltymų kiekį (Ragaliauskas, 2017). Toksino kiekį membranos paviršiuje atitinka rezonansinio kampo pokytis – $\Delta\alpha$.

SPR tyrimams naudotos tos pačios kompozicijos liposomos, turinčios 0 arba 15 % sfingomielino. Jas naudojant pagamintos hibridinės lipidinės membranos, kurios 30 minučių inkubuotos su 10 nM pneumolizino. SPR sensogramos rodo, kad prie 15 % sfingomielino turinčių hBLM, pneumolizino monomerų prisikabino beveik tiek pat ($\Delta\alpha = 28 \pm 5 \text{ m}^\circ$) kiek prie kontrolinių membranų ($\Delta\alpha = 26 \pm 7 \text{ m}^\circ$) (24 pav.). Taigi, sfingomielinas neturi įtakos prie membranos prisijungusių monomerų kiekiui. O EIS metodu gauti rezultatai yra nesusiję su pakitusiu toksino monomerų membranos atpažinimu.



24 pav. Skirtingą sfingomielino kiekį turinčių, hBLM, paveiktų 10 nM PLY, SPR sensogramos. Laiko momentais: 20 s ir 1200 s, mėginys buvo maišomas, o po 1800 s celės praplaunamos.

EIS metodu gauti rezultatai gali būti paaiškinta tuo, kad sfingomielino turinčiose membranose susidaro mažesnės poros, kadangi prie membranos prisikabina tas pats monomerų kiekis, o porų susidaro daugiau. Pneumolizino poros susidarymo tyrimai, patvirtina, kad toksinas gali sudaryti skirtingo dydžio poras. Jas gali sudaryti apie 30-50 monomerų, vidutinis porų skersmuo – 30 nm (Marshall et al., 2015). Tačiau, gali susidaryti dalinės, iš mažiau nei 30 monomerų sudarytos, poros (Pleckaityte, 2020). Aptinkama ir porų, kurių dydis tesiekia 1-2 nm (Sonnen et al., 2014).



25 pav. Rezonansinio kampo pokyčio priklausomybė nuo pneumolizino koncentracijos.

Galimas porų dydis skirtingos sudėties tBLM, buvo įvertintas apskaičiuojant kokia adsorbuoto baltymo dalis (n_{PLY} , toliau vadinama „efektyviaja baltymo dalimi“) sudarytų poras membranoje, jeigu vieną porą sudarytų 50, 40, 30, 20 ar 10 monomerų. Pirmiausiai, naudojant SPR metodą, nustatyta rezonansinio kampo pokyčio priklausomybė nuo pneumolizino koncentracijos (25 pav.). Panaudojus gautos tiesės lygtį apskaičiuota kokį rezonansinio kampo pokytį sukeltų 2 nM pneumolizino (koncentracija naudota EIS matavimams). Žinant, kad SPR jautrumas baltymams yra $0,82 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$ (Stenberg et al., 1991), o vieno PLY monomero masė yra 53 kDa (Lee et al., 2018) apskaičiuotas PLY monomerų kiekis membranos paviršiuje. Tai leido įvertinti kiek skirtingo dydžio defektų pneumolizinas galėtų sudaryti membranoje. Iš EIS duomenų naudojant 7 formulę apskaičiuotas realus membranoje susidariusių defektų kiekis. Galiausiai apskaičiuota efektyvioji baltymo dalis:

$$n_{PLY} = \frac{N_{def EIS}}{N_{def SPR}} \cdot 100 \% \quad (8)$$

kur $N_{def EIS}$ – defektų tankis apskaičiuotas iš EIS duomenų, $N_{def SPR}$ – defektų tankis apskaičiuotas iš SPR duomenų (Ragaliauskas, 2017).

1 lentelė. „Efektyvioji pneumolizino dalis“ kontrolinėse ir sfingomielino turinčiose tBLM, kai vieną porą sudaro 50, 40, 30, 20 ar 10 monomerų.

Monomerų kiekis	50	40	30	20	10
n_{PLY} (Kontrolė)	67 %	54 %	40 %	27 %	13 %
n_{PLY} (15 % SM)	116 %	93 %	69 %	46 %	23 %

1-oje lentelėje pateikti duomenys rodo, kad tikėtina, jog pneumolizinas yra labiau linkęs sudaryti mažesnes poras sfingimielino turinčiose membranose, kitu atveju efektyvioji baltymo dalis šiose membranose būtų didesnė negu 100 %.

Kyla klausimas nuo ko priklauso poros dydis? J. C. Gilbert kinetiniai pneumolizino poros susidarymo tyrimai rodo, kad poros dydis priklauso nuo laisvų monomerų prieinamumo. Greitesnis monomerų susitelkimas į preporą leidžia susidaryti didesnėms poroms. Greitesnė monomerų difuzija membranoje leidžia greičiau susirinkti preporai, o esant lėtesniai difuzijai iš mažesnio monomerų skaičiaus sudarytos preporos yra kinetiškai „įkalintos“, ir nesulaukusios naujų, laisvų monomerų, įsiterpia į membraną (Gilbert ir Sonnen, 2016). Taigi, monomerų difuzijos greitis gali būti susijęs su susidariusios poros dydžiu.

B. P. Ziemba ir J. J. Falke atlikti tyrimai, nurodo tris faktorius nulemiančius periferinių baltymų difuzijos greitį: i) lipidų su kuriais sąveikauja baltymai difuzijos greitis, ii) lipidų sąveikaujančių su baltymu skaičius ir iii) baltymų įsiterpimo į membranos angliavandenilių sluoksnį, gylis (Ziemba ir Falke, 2013). Lipidų difuzijos greitis priklauso nuo membranos sudėties. Skirtingų lipidų geometrinės ir cheminės savybės, bei jų išsidėstymas membranoje, lemia membranos fluidiškumo pokyčius, o kartu keičia ir lipidų bei baltymų difuziją (Javanainen et al., 2013). Iš 50 % DOPC ir 50 % cholesterolio sudarytuose lipidų dvisluoksniuose, lipidų difuzijos koeficiento vertė yra apie $3,25 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Scherfeld et al., 2003), o iš 25 % sfingomielino, 25 % DOPC ir 50 % cholesterolio sudarytose membranose – $1,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Kahya et al., 2003). Taigi, sfingomielino buvimas membranoje turi įtakos lipidų difuzijai.

Literatūroje aprašyta, kad sfingomielino turinčiose membranose, kuriose yra didelis cholesterolio kiekis ($\geq 40 \%$), lipidų plauštai nesusidaro (Filippov et al., 2004). Kadangi visose tirtose membranose cholesterolio buvo 40 % ar daugiau, galima daryti prielaidą, kad lipidų plauštai nesusidaro, lipidai pasiskirsto gana tolygiai ir yra toje pačioje fazėje. Tokiu atveju, visų lipidinių komponentų difuzija yra vienoda (Lindblom et al., 2006). Yra žinoma, kad dvikomponentinėse DOPC/cholesterolio bei DOPC/SM sistemose, tiek cholesterolio, tiek sfingomielino kiekio didinimas lemia sulėtėjusią difuziją (Kahya et al., 2003). Tačiau, taip pat, pastebėta, kad iš trijų komponentų: DOPC, sfingomielino ir cholesterolio, sudarytose membranose, cholesterolio kiekiui pasiekus 33 % ir toliau augant, kai kuriais atvejais, lipidų difuzija greitėja (Filippov et al., 2004). Pagal P. Almeida modelį lipidų difuzija greitėja augant laisvam tūriui vienai molekulei (Almeida et al., 1992). Taigi, didesnius fosfolipidus, keičiant mažesnėmis cholesterolio molekulėmis, išauga laisvas tūris vienam lipidui bei difuzijos greitis.

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos rezultatus tuomet galima paaiškinti tuo, kad difuzija sfingomielino turinčiose membranose lėtėja didinant sfingomielino kiekį nuo 10 iki 20 % (cholesterolio kiekiui mažėjant nuo 50 iki 40 %). Lėtėjant lipidų difuzijai, lėtėja ir pneumolizino

monomerų difuzija, bei mažėja porų dydis. Galimai lipidų difuzijos skirtumai kontrolinėse iš 50 % DOPC ir 50 % cholesterolio sudarytose ir 10 % sfingomielino turinčiose membranose yra per maži, kad įtakotų porų dydį, todėl pneumolizino aktyvumas šiose membranose beveik nesiskiria. Tačiau difuzijos greičio pokyčiai 15 % SM turinčiose membranose yra pakankami, kad įtakotų pneumolizino porų dydį, todėl EIS duomenyse matomas išaugęs PLY sukeltas defektų tankis.

Sunku paaiškinti, kodėl 20 % sfingomielino turinčiose membranose pneumolizino aktyvumas nepadidėja. Kaip minėta šio skyriaus pradžioje, J. Flanagan ir kolegės sumažėjusį PFO aktyvumą didinant sfingomielino kiekį membranoje aiškina tuo, kad sfingomielinui sąveikaujant su cholesteroliumi, pastarasis tampa nebeprieinamas toksinui (Flanagan et al., 2009). Pneumolizino aktyvumas 30 % ar daugiau cholesterolio turinčiose membranose yra pastovus, tačiau pradeda mažėti, mažinant cholesterolio kiekį (Ragaliauskas, 2017). Taigi, padidinus sfingomielino kiekį iki 20 %, šioms molekulėms sąveikaujant su cholesteroliumi, pneumoliziniui prieinamo cholesterolio kiekis gali nebesiekti 30 %, todėl toksino aktyvumas gali sumažėti. Tačiau baltymo aktyvumo sumažėjimą gali kompensuoti lėtesnės difuzijos įtakotas mažesnių porų susidarymas. Galbūt todėl EIS duomenys nerodo statistiškai reikšmingų skirtumų tarp pneumolizino sukulto defektų tankio kontrolinėse, bei 20 % sfingomielino turinčiose membranose.

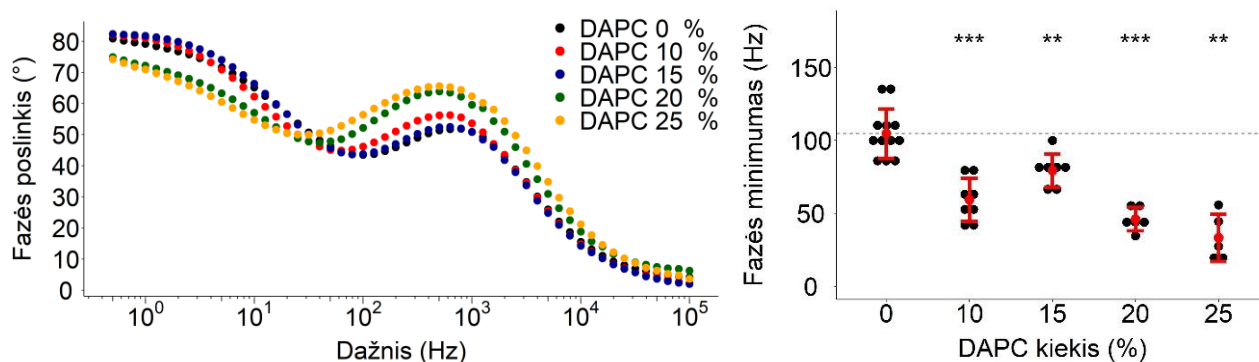
Realios trijų lipidų sistemos yra sudėtingos, todėl teoriškai aprašyta difuzija gali skirtis nuo realios. Taip pat, negalime atmesti kitų faktorių įtakos, pavyzdžiui pakitusio baltymo-lipidų sąveikų skaičiaus, ar gylio į kurį membranoje įsiterpia monomerai, šių faktorių kombinacijos ar kitų faktorių nesusijusių su monomerų difuzija.

3.2 Pneumolizino aktyvumo priklausomybė nuo lipidų riebalų rūgščių sotumo

Viena iš toksinų sąveikos su membrana tyrimų kryptų – toksinų aktyvumo priklausomybė nuo lipidų riebalų rūgščių grandinių sotumo. J. Flanagan ir kolegės dar 2009 metais parodė, kad perfringolizinas O, sukelia daugiau pažeidimų liposomose turinčiose nesočiųjų lipidų ir cholesterolio, negu iš sočiųjų lipidų ir cholesterolio sudarytose liposomose (Flanagan et al., 2009). P. Drücker ir kolegės parodė, kad pneumolizino aktyvumas yra didesnis liposomose sudarytose iš cholesterolio ir nesočiųjų N-oleoil-sfingozilfosforilcholino lipidų, negu liposomose sudarytose iš cholesterolio ir sočiųjų N-palmitoil-sfingozilfosforilcholino lipidų (Drücker et al., 2018). Panašius rezultatus mes gavome tirdami pneumolizino poveikį prikabinoms lipidinėms membranoms, sudarytoms iš 50 % cholesterolio ir 50 % skirtingo sotumo riebalų rūgščių turinčių lipidų. Naudojant lipidus riebalų

rūgščių grandinėse turinčius vieną papildomą dvigubą jungtį (DOPC vietoje POPC) pneumolizino sukeltų defektų tankis padidėjo apie 2 kartus (Katkauskaitė, 2020).

Nuo seno žinoma, kad polinesočiosios riebalų rūgštys (PUFA) (pvz.: omega-3 polinesočiosios riebalų rūgštys) yra svarbios palaikant normalias organizmo funkcijas. Dideli kiekiai fosfolipidų turinčių PUFA randami specializuotų ląstelių membranose, o jų pašalinimas, sutrikdo šių ląstelių funkcijas (Stillwell ir Wassall, 2003). Neuronų membranose aptinkama daug polinesočiasias riebalų rūgštis turinčių lipidų (pvz.: lipidų turinčių arachidoninę (20:4) ir dokozaheksaeno (22:6) rūgštis) (Ingólfsson et al., 2017). J. E. Kyle ir kolegų atlikta 3-ų pacientų plaučių ląstelių lipidomo analizė, parodė, kad plaučių endotelio ląstelėse polinesotieji lipidai sudaro apie 29 % visų membranos fosfolipidų, kita vertus plaučių epitelinėse ląstelėse šių lipidų randama tik apie 6 % (Kyle et al., 2018). Todėl nuspręsta ištirti kokį poveikį pneumolizino aktyvumui turi polinesočiasias riebalų rūgščių grandines turintys lipidai.



26 pav. Skirtingą DAPC kiekį turinčių, tBLM, paveiktų 2 nM PLY, EIS Bode diagramos ir fazės minimumo priklausomybė nuo DAPC kiekio membranoje. tBLM sudėtys: DAPC:DOPC:Chol – 0 %:50 %:50 %; 10 %:40 %:50 %; 15 %:35 %:50 %; 20 %:30 %:50 %; 25 %:25 %:50 %.

Tyrimui pasirinkti DAPC lipidai, iš kurių sudaryti lipidiniai dvisluoksniai yra plačiai aprašyti literatūroje. Tai lipidai turintys cholino polinę grupę ir dvi 20-ies anglies atomų ilgio riebalų rūgštis, kurių kiekviena turi po 4 *cis* konformacijos dvigubuosius ryšius. Tyrimui paruoštos tBLM turinčios skirtingą DAPC, DOPC ir cholesterolio kiekį (DAPC:DOPC:Chol – 0 %:50 %:50 %; 10 %:40 %:50 %; 15 %:35 %:50 %; 20 %:30 %:50 %; 25 %:25 %:50 %). Paveikus membranas 2 nM pneumolizino ir atlikus EIS matavimus pastebėta, kad membranose vietoje DOPC turinčiose DAPC fazės minimumas yra žemesnių dažnių srityje lyginant su membranomis, kurių sudėtyje DAPC nebuvo (DAPC: 0 % - 105 ± 17 Hz; 10 % - 59 ± 15 Hz; 15 % - 79 ± 11 Hz; 20 % - 46 ± 8 Hz; 25 % - 33 ± 16 Hz). Statistinė analizė parodė, kad pneumolizino membranoje sukeltas defektų tankis,

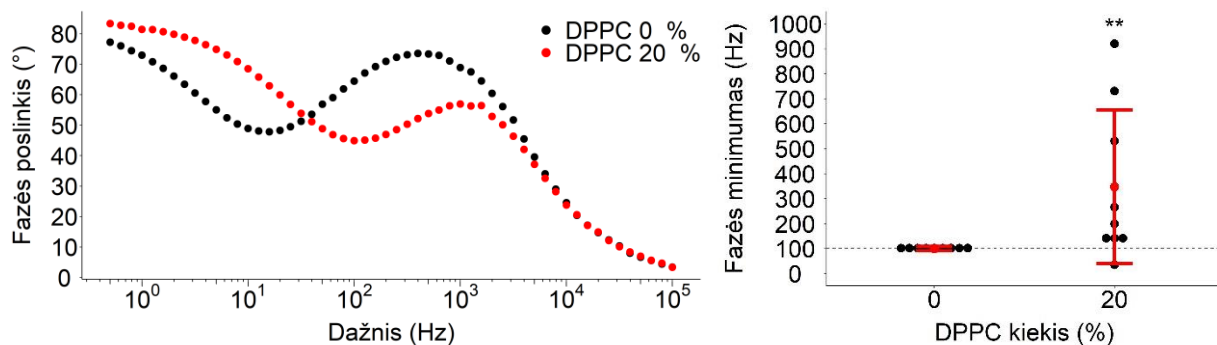
DAPC turinčiose membranose buvo statistiškai reikšmingai mažesnis negu DAPC neturinčiose membranose (26 pav.).

Neutronų difrakcijos tyrimai naudojant deuterintą cholesterolį ir dinaminės simuliacijos parodė, kad membranoje cholesterolis dažniausiai yra nutolęs nuo fosfolipidų dvisluoksnio vidurio, o jo hidroksilo grupė yra arti membranos paviršiaus. Tačiau, kai membranos yra sudarytos iš polinesočiųjų lipidų, tokių kaip DAPC, cholesterolis yra linkęs išsidėstyti membranos viduryje (Harroun et al., 2008) (Marrink et al., 2008) (Gawrisch ir Soubias, 2008). Membranose, kurių sudėtyje yra trijų rūšių lipidai: DAPC, POPC ir cholesterolis, didinant POPC kiekį cholesterolis grįžta į poziciją, kai jo hidroksilo grupė yra netoli paviršiaus, tik tuomet, kai POPC kiekis pasiekia apie 50 % (Marquardt et al., 2016). DOPC nuo POPC skiriasi tik tuo, kad vietoje vienos palmitoilo grandinės, šis lipidus turi oleoilo grandinę. Todėl cholesterolis tirtose, DAPC ir DOPC turinčiose, membranose galimai, taip pat, išsidėsto arčiau membranos vidurio. Tokiu atveju, cholesterolio hidroksilo grupė tampa nebepraeinama pneumoliziniui, todėl toksino aktyvumas sumažėja.

Nors aprašyti tyrimai daugeliu atvejų rodo, kad nuo cholesterolio priklausomų citolizinių aktyvumas sumažėja, kai membranos yra sudarytos iš didesnio sotumo laipsnio lipidų (išskyrus polinesočiųuosius lipidus), tačiau aprašyti atvejai, kai sočiųjų lipidų buvimas membranoje, padidina CDC toksinų aktyvumą. J. Flanagan ir kolegų tyrime parodyta, kad perfringolizino O poveikis buvo šiek tiek didesnis liposomoms, kurios buvo sudarytos iš 50 % cholesterolio, ir sočiųjų lipidų, tokių kaip DPPC ir DSPC, o ne nesočiųjų, šiuo atveju POPC (Flanagan et al., 2009). Sočiųjų lipidų kiekis įvairiose membranose gali skirtis ir siekti 50 % ar daugiau (Ingólfsson et al., 2017). Todėl įvertinta sočiųjų lipidų įtaka pneumolizino aktyvumui.

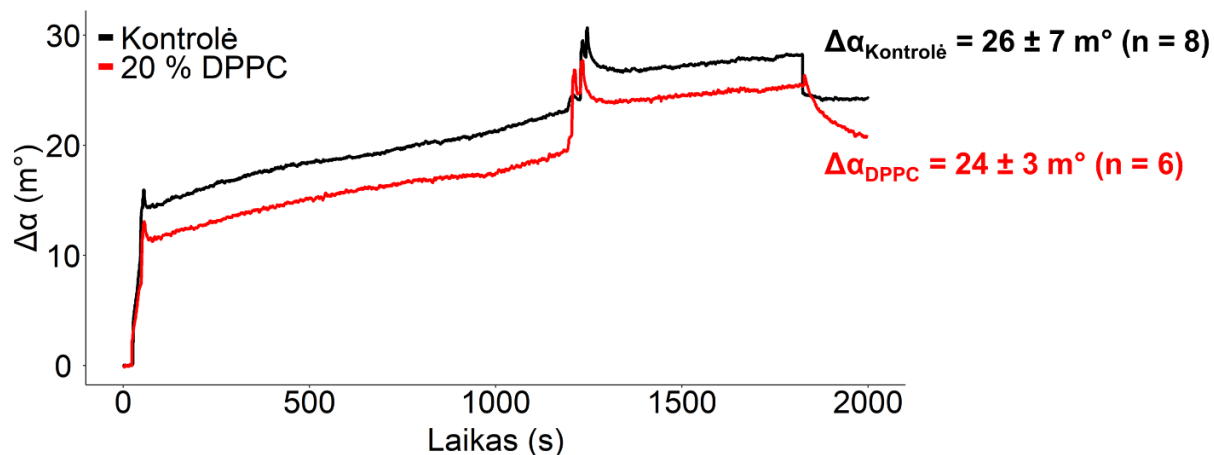
Įgyvendinti šiam siekiui pasirinkti DPPC lipidai. Kaip ir kiti tyrime naudoti lipidai, šie taip pat, turi cholino polinę grupę. DPPC turi sočiasias 16-os anglies atomų ilgio grandines. Šie lipidai sudaro didžiąją dalį plaučių surfaktanto lipidų (Agudelo et al., 2020). Jie aptinkami plaučių epitelio ir endotelio ląstelėse, nors pastarosiose jų randama mažiau (Kyle et al., 2018). Paruoštos didelę cholesterolio koncentraciją (50 %) turinčios tBLM, turinčios 20 % DPPC ir 30 % DOPC, bei membranos turinčios tik 50 % cholesterolio ir 50 % DOPC. Toks DPPC kiekis pasirinktas, todėl, kad plaučių endotelinėse ląstelėse soti lipidai sudaro 40 % visų fosfolipidų (Kyle et al., 2018). Kadangi, gaminamos tBLM turi 50 % cholesterolio, tai atitinka 20 % bendro lipidų kiekio. tBLM paveiktų pneumolizinu EIS matavimai rodo, kad pneumolizinas DPPC turinčiose membranose sukėlė daugiau pažeidimų negu šių lipidų neturinčiose membranose. Tai rodo tiek fazės minimumo

poslinkis nuo 100 ± 9 Hz iki 347 ± 308 Hz Bode diagramoje, tiek statistinė duomenų analizė (27 pav.).



27 pav. Skirtingą DPPC kiekį turinčių, tBLM, paveiktų 2 nM PLY, EIS Bode diagramos ir fazės minimumo priklausomybė nuo DPPC kiekio membranoje. tBLM sudėtys: DPPC:DOPC:Chol – **0 %:50 %:50 %**; **20 %:30 %:50 %**.

Kaip ir tiriant sfingomielino poveikį pneumolizino aktyvumui, taip ir šįkart pasitelkiant SPR metodą buvo įvertintas prie membranos prisikabinusių pneumolizino monomerų kiekis. Sensogramos rodo, kad prie membranos prisijungusios medžiagos kiekis beveik nesiskyrė DPPC turinčiose ($\Delta\alpha = 24 \pm 3$ m°) ir neturinčiose ($\Delta\alpha = 26 \pm 7$ m°) membranose (28 pav.).



28 pav. Skirtingą DPPC kiekį turinčių, hBLM, paveiktų 10 nM PLY, SPR sensogramos. Laiko momentais: 20 s ir 1200 s, mėginys buvo maišomas, o po 1800 s celės praplaunamos.

Sočiųjų lipidų uodegos išsidėsto glausčiau viena kitos, negu nesočiųjų lipidų (Guo et al., 2014). Todėl tik iš sočiųjų lipidų ir cholesterolio sudarytose membranose, cholesteroliui sąveikaujant su lipidų uodegomis jis yra labiau uždengiamas lipidų polinių grupių ir yra mažiau prieinamas nuo cholesterolio priklausomiems citolizinas. Galimai, todėl daugelyje literatūroje aprašytų tyrimų sočiųjų lipidų buvimas membranoje yra siejamas su mažesniu CDC aktyvumu. Tačiau atliktame tyrime naudotos tBLM pagamintos iš trijų lipidų mišinio: sočiųjų lipidų, nesočiųjų

lipidų ir cholesterolio. Yra žinoma, kad maksimaliai pneumolizino sąveikai su membrana pakanka 30 % cholesterolio (Ragaliauskas, 2017). Taigi, šiuo atveju, netgi, jeigu 20 % cholesterolio būtų pneumoliziniui neprieinama dėl sąveikos su sočiaisiais DPPC lipidais, likusios cholesterolio dalies pakanka maksimaliai pneumolizino sąveikai su membrana. Todėl prie membranos prisijungusių PLY monomerų kiekis beveik nepakinta.

Kaip aptarta 3.1 skyriuje, EIS duomenyse matomas pneumolizino aktyvumo padidėjimas gali būti susietas su lėtesne lipidų difuzija membranoje. Panašios į tirtų membranų sudėties dvisluoksniuose (DOPC 25 %, DPPC 25 %, Chol 50 %), difuzijos koeficiento vertė yra $1,85 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Scherfeld et al., 2003). Taigi, lipidų difuzija šiose membranose yra lėtesnė negu kontrolinėse. Įvertinus efektyvią baltymo dalį, matyti, kad DPPC turinčiose membranose gali susidaryti dar mažesnės poros, negu sfingomielino turinčiose membranose (2 lentelė). Galimai, dėl lėtos difuzijos, tiek sfingomielino, tiek DPPC turinčiose membranose susidaro daugiau mažesnių porų, negu kontrolinėse membranose. Todėl EIS duomenys rodo apie 3,5 karto padidėjusį fazės poslinkį DPPC turinčiose membranose, lyginant su kontrole.

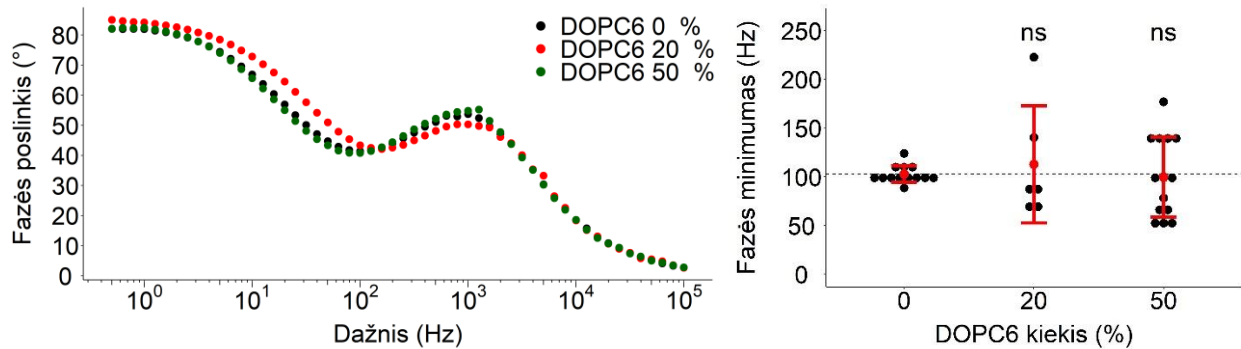
2 lentelė. „Efektyvioji pneumolizino dalis“ kontrolinėse, sfingomielino ar DPPC turinčiose tBLM, kai vieną porą sudaro 50, 40, 30, 20 ar 10 monomerų.

Monomerų kiekis	50	40	30	20	10
nPLY (Kontrolė)	67 %	54 %	40 %	27 %	13 %
nPLY (15 % SM)	116 %	93 %	69 %	46 %	23 %
nPLY (20 % DPPC)	212 %	170 %	127 %	85 %	42 %

3.3 Lipidų dvigubųjų ryšių pozicijos riebalų rūgščių grandinėje įtaka pneumolizino aktyvumui

Literatūroje aprašyta, kad dvigubosios ryšio pozicija turi įtakos lipidų užimamam plotui, jų išsidėstymo tvarkingumui ir sąveikai su cholesteroliumi (Martinez-Seara et al., 2008). Todėl, nuspręsta iširti kokią įtaką dvigubųjų ryšių vieta riebalų rūgščių grandinėse turi PLY aktyvumui. Tyrimui pasirinkti 18:1 (Δ^9 -Cis) PC (DOPC) ir 18:1 (Δ^6 -Cis) PC (DOPC6). Šie lipidai tarpusavyje skiriasi tik dvigubųjų ryšių vieta, DOPC grandinėse dvigubieji ryšiai yra 9-oje pozicijoje, o DOPC6 – tie patys ryšiai yra 6-oje pozicijoje. Pagamintos membranos turinčios skirtingą DOPC, DOPC6 ir cholesterolio kiekį (DOPC6:DOPC:Chol – 0 %:50 %:50 %; 20 %:30 %:50 %; 50 %:0 %:50 %) paveiktos pneumolizinu. Elektrocheminio impedanso matavimai rodo, kad membranoje esant 20 % DOPC6, fazės minimumas šiek tiek labiau pasislenka į auštesnių dažnių pusę ($f_{min} = 113 \pm 60 \text{ Hz}$),

o esant 50 % ($f_{min} = 103 \pm 9$ Hz) beveik nesiskiria nuo kontrolės ($f_{min} = 100 \pm 41$ Hz) (29 pav.). Fazės minimumo pokyčiai nebuvo statistiškai reikšmingi.



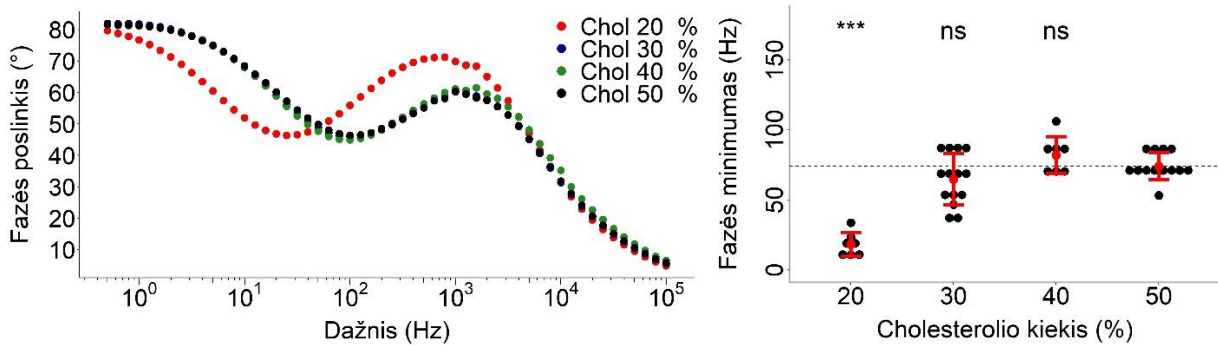
29 pav. Skirtingą DOPC6 kiekį turinčių, tBLM, paveiktų 2 nM PLY, EIS Bode diagramos ir fazės minimumo priklausomybė nuo DOPC6 kiekio membranoje. tBLM sudėtys: DOPC6:DOPC:Chol – **0 %:50 %:50 %**; **20 %:30 %:50 %**; **50 %:0 %:50 %**.

H. Martinez-Seara ir kolegų tyrimai rodo, kad didžiausias membranos fluidiškumas, tai yra, netvarkingiausias lipidų išsidėstymas yra membranose sudarytose iš lipidų turinčių dvigubąjį ryšį riebalų rūgščių grandinės viduryje. Kuo toliau dvigubasis ryšys yra nutolęs nuo anglies atomų grandinės vidurio (tiek link dvisluoksnio vidurio, tiek link polinės galvos), tuo tvarkingiau lipidai išsidėsto membranoje (Martinez-Seara et al., 2008). DOPC dvigubieji ryšiai yra grandinės viduryje, o DOPC6 jie yra arčiau fosfolipido polinės grupės. Tačiau, DOPC ir DOPC6 esančių dvigubųjų ryšių pozicijos skiriasi tik per tris anglies atomus. Iš šių lipidų sudarytose membranose jų užimamas plotas ($A_{DOPC6} = 0,728$ nm², $A_{DOPC} = 0,731$ nm²) bei sudarytos membranos storis ($d_{DOPC6} = 3,72$ nm, o $d_{DOPC} = 3,71$ nm) beveik nesiskiria (Martinez-Seara et al., 2008). Galimai, DOPC6 ir DOPC struktūros skirtumai nesukuria pakankamai didelio pokyčio lipidų išsidėstyme. Taigi, nepakankamai pakeičia cholesterolio prieinamumą pneumoliziniui, todėl DOPC pakeitimas DOPC6 neturi didelės įtakos toksino aktyvumui.

3.4 Cholesterolio įtaka pneumolizino ir streptolizino O aktyvumui

Poras formuojančių toksinų poveikis skirtingą cholesterolio kiekį turinčioms membranoms yra skirtingas. Žinoma, kad nuo cholesterolio priklausomo citolizino vaginolizino, aktyvumas didėja, didinant cholesterolio kiekį membranoje iki 50 % (Ragaliauskas et al., 2019). Kita vertus, pneumolizino aktyvumas didėja cholesterolio kiekį membranoje didinant tik iki 30 %, o pasiekus šią ribą, toliau didinant cholesterolio kiekį pneumolizino aktyvumas nebesikeičia (Vögele et al., 2019), (Ragaliauskas, 2017). Todėl EIS metodu ištirta kokią įtaką streptolizino O aktyvumui turi cholesterolio kiekis membranoje. Tam iš DOPC ir cholesterolio paruoštos keturios skirtingos

prikabintų lipidinių membranų kompozicijos, kuriose buvo 20, 30, 40 ar 50 % cholesterolio ir atitinkamas kiekis DOPC. Mažiau cholesterolio turinčios kompozicijos nepasirinktos tyrimui, nes susidariusios membranos turi daug natūralių defektų, todėl EIS metodu sunku nustatyti kokią įtaką joms turi poras formuojantys toksinai.



30 pav. Skirtingą cholesterolio kiekį turinčių, tBLM, paveiktų 5 nM SLO, EIS Bode diagramos ir fazės minimumo priklausomybė nuo cholesterolio kiekio membranoje. tBLM sudėtys: DOPC:Chol – 50 %:50 %; 60 %:40 %; 70 %:30 %; 80 %:20 %.

SLO aktyvumas 30, 40 ir 50 % cholesterolio turinčiose membranose beveik nesiskyrė. Fazės minimumo vertės varijavo apie 74 Hz. Tačiau toksino poveikis membranoms, kuriose buvo 20 % cholesterolio, buvo statistiškai reikšmingai mažesnis, o fazės minimumas tesiekė 25 ± 9 Hz (30 pav.). Šie rezultatai rodo, kad streptolizino O aktyvumas, kaip ir pneumolizino, didėja membranoje didinant cholesterolio kiekį iki 30 %, o perkopus šią ribą, toksino aktyvumas išlieka pastovus.

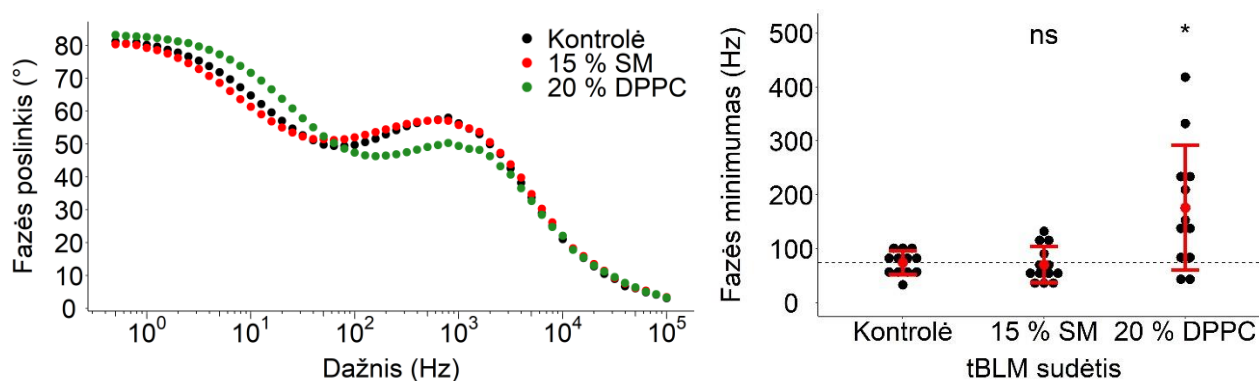
Nors toksinai yra filogenetiškai nutolę (Ahmad et al., 2011), tačiau abu sukelia kvėpavimo takų ligas. Kadangi PLY ir SLO veikia panašioje aplinkoje esančias ląsteles, galimai šie toksinai yra prisitaikę veikti panašios lipidinės sudėties membranas.

3.5 Pneumolizino ir streptolizino O poveikis skirtingos sudėties membranoms

Kaip aprašyta 1.3.2 skyriuje, manoma, kad skirtingi CDC atpažįsta cholesterolį skirtingoje lipidinėje aplinkoje. Todėl nuspręsta palyginti, PLY ir SLO aktyvumą skirtingos sudėties dirbtinėse lipidinėse membranose.

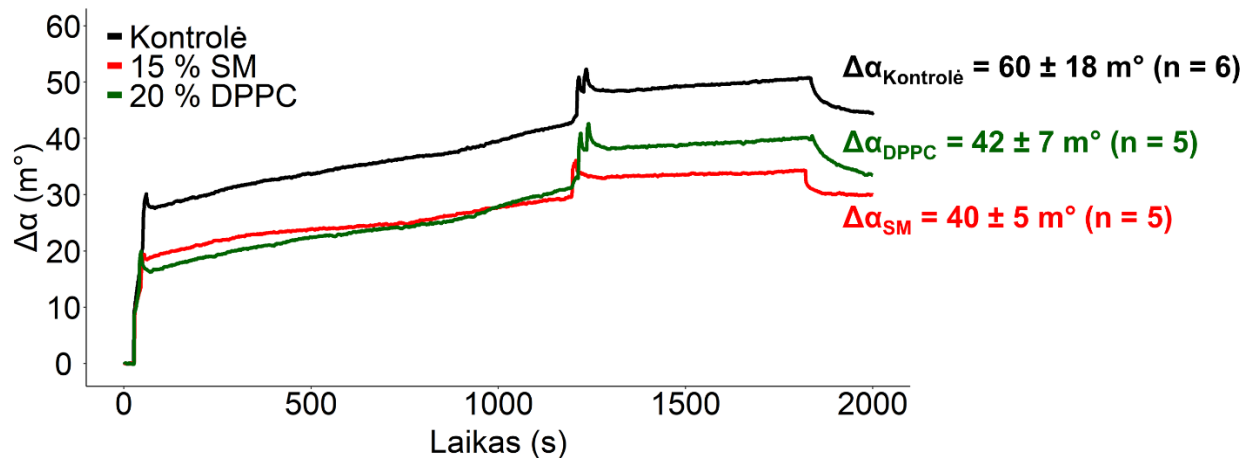
Ankstesniuose skyriuose aprašyti pneumolizino aktyvumo priklausomybės nuo lipidinės membranos sudėties tyrimai nurodo dvi membranos sudėtis, kuriose pneumolizinas veikia geriau negu kitose. Tai membranos, kurių sudėtyje yra 20 % DPPC (DPPC:DOPC:Chol – 20 %:30 %:50 %) arba 15 % sfingomielino (SM:DOPC:Chol – 15 %:40 %:45 %). Todėl toliau buvo vertinami pneumolizino ir streptolizino O poveikio šioms membranos skirtumai. Pagamintos tBLM inkubuotos su 2 nM PLY arba 5 nM SLO. Didesnė SLO koncentracija pasirinkta, kadangi iš

eritrocitų hemolizės tyrimų, žinoma, jog šis toksinas įprastai sukelia mažiau pažeidimų negu pneumolizinas.



31 pav. Streptolizinu O paveiktų tBLM Bode spektrai bei 5 nM SLO sukulto fazės minimumo poslinkio priklausomybė nuo membranos sudėties. tBLM sudėtys: **DOPC:Chol – 50 %:50 %** (kontrolė); **SM:DOPC:Chol – 15 %:40 %:45 %**; **DPPC:DOPC:Chol – 20 %:30 %:50 %**.

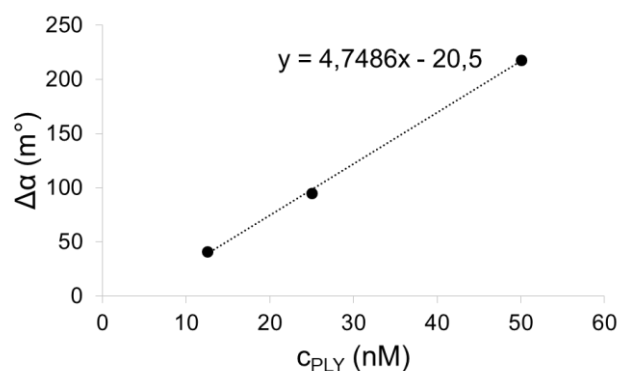
Kitaip negu PLY, kurio poveikis 15 % sfingomielino turinčioms membranoms buvo apie 2 kartus didesnis, negu kontrolinėms, paveikus SM turinčias membranas SLO, reikšmingi skirtumai tarp kontrolinių ($f_{min} = 74 \pm 22$ Hz) ir sfingomielino turinčių membranų ($f_{min} = 71 \pm 33$ Hz) Bode spektrų nepastebėti. Statistinė analizė rodo, kad skirtumai tarp toksinų veikimo 15 % sfingomielino turinčiose membranose yra statistiškai reikšmingi (Mano-Vitnio-Vilkoksono kriterijus, $W = 124$, $p = 0,003$). Tačiau DPPC turinčias membranas inkubavus su PLY ar SLO, abiem atvejais EIS Bode



32 pav. Skirtingos sudėties hBLM, paveiktų 25 nM SLO, SPR sensogramos. Laiko momentais: 20 s ir 1200 s, mėginys buvo maišomas, o po 1800 s celės praplaunamos.

spektuose fazės minimumas labiau pasislinko didesnių dažnių link, negu inkubavus kontrolines membranas su šiais toksiniais (31 pav.). Nors fazės minimumo poslinkis SLO paveiktose, DPPC turinčiose membranose, padidėjo mažiau – nuo 74 ± 22 Hz iki 176 ± 115 Hz, tai yra apie 2,5 karto (paveikus PLY išauga apie 3,5 karto).

SPR analizė neparodė jokių reikšmingų streptolizino O sąveikos su skirtingos sudėties membranomis skirtumų (Kruskal-Wallis kriterijus, $\chi^2(2) = 5,43$, $p = 0,066$) (32 pav.). Rezonansinio kampo pokytis kontrolinėse membranose buvo 60 ± 18 m°, SM turinčiose membranose – 40 ± 5 m°, DPPC turinčiose membranose – 42 ± 7 m°. Todėl įvertinus rezonansinio kampo pokyčio priklausomybę nuo SLO koncentracijos (33 pav.), apskaičiuota efektyvioji baltymo dalis, kai vieną porą sudaro skirtingas monomerų skaičius. Tikėtina, kad streptolizinas O sudaro tokio paties dydžio poras tiek sfingomielino turinčiose, tiek kontrolinėse membranose, tačiau, kaip ir PLY, yra linkęs sudaryti mažesnes poras DPPC turinčiose membranose (3 lentelė).



33 pav. Rezonansinio kampo pokyčio priklausomybė nuo streptolizino O koncentracijos.

Sunku pasakyti kodėl pneumolizino ir streptolizino O aktyvumas bei galimi porų dydžiai skiriasi skirtingos sudėties membranose, tačiau tai gali būti susiję su tyrimo sąlygomis. Pneumolizino ir streptolizino O tyrimams naudotas skirtingas toksinų kiekis: 2 nM ir 5 nM, atitinkamai. Literatūroje aprašyta, kad CDC baltymų poros dydis gali priklausyti nuo toksino koncentracijos. Kai toksino koncentracija yra mažesnė susidaro mažesnes poras, esant didesniai koncentracijai gali susidaryti pilnos poros (Gilbert ir Sonnen, 2016). Taigi, jeigu fazės minimumo pokyčiai paveikus DPPC ar SM turinčias membranas streptolizinu O, taip pat, kaip ir paveikus šias membranas pneumolizinu, yra susiję su lipidų difuzijos greičio pokyčiais, galimai didesnės koncentracijos poveikis porų susidarymui kompensuoja sumažėjusio monomerų difuzijos greičio poveikį.

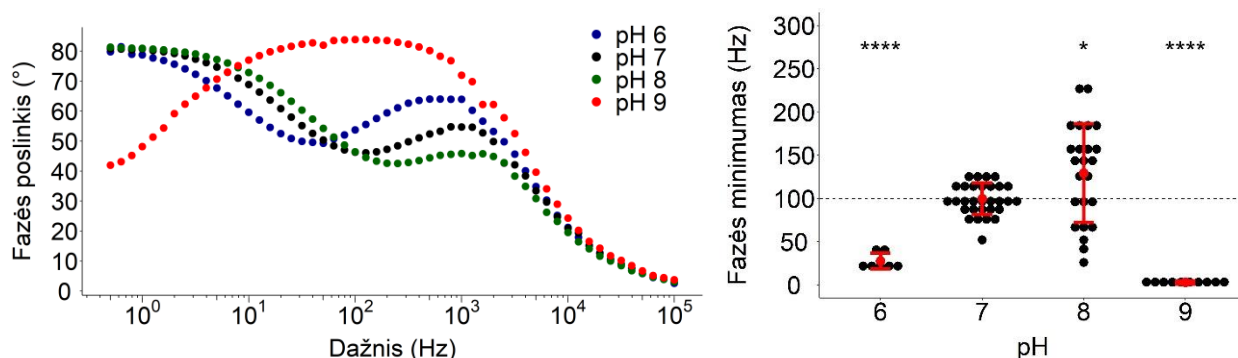
3 lentelė. „Efektyvioji streptolizino O dalis“ kontrolinėse, sfingomielino ar DPPC turinčiose tBLM, kai vieną porą sudaro 50, 40, 30, 20 ar 10 monomerų.

Monomerų kiekis	50	40	30	20	10
n_{SLO} (Kontrolė)	125 %	100 %	75 %	50 %	25 %
n_{SLO} (15 % SM)	119 %	95 %	72 %	48 %	24 %
n_{SLO} (20 % DPPC)	278 %	222 %	167 %	111 %	56 %

3.6 Pneumolizino aktyvumo priklausomybė nuo pH

Baltymų aktyvumas gali priklausyti nuo pH. pH pokyčiai gali paveikti įvairias baltymų savybes (pvz.: klampumą (Ho et al., 2018), tirpumą (Gao et al., 2020)), jų struktūrą bei funkcijas (Chen et al., 2019). Todėl skirtingose ląstelėse, audiniuose ir organuose palaikomas specifinis pH. Pavyzdžiui, normaliomis sąlygomis nosies gleivinėje pH yra šiek tiek rūgštinis: 5,6-6,7, viršutiniuose kvėpavimo takuose apie 6,6, o apatiniuose apie 7,1 (McShane et al., 2003). Kai kurių ligų atveju stebimi pH pokyčiai: pneumonijos metu plaučių pH sumažėja iki 6,62-6,72, lėtinio bronchito metu bronchuose išauga iki 7,59-7,83 (Zajac et al., 2021), rinitas padidina pH nosies gleivinėje iki 7,2-8,3 (England et al., 1999). pH gali turėti įtakos tiek normalioms ląstelių funkcijoms organizme, tiek patogenų augimui ir plitimui (Zajac et al., 2021).

Įvairūs tyrimai rodo, kad CDC baltymų aktyvumas gali skirtingai priklausyti nuo pH. Skiriasi poras formuojančių toksinų vaginolizino ir inerolizino (Ragaliauskas et al., 2019), listeriolizino O bei perfringolizino O (Nomura et al., 2007), bei kitų CDC aktyvumo priklausomybė nuo pH. Todėl šiame tyrimo etape, atliktas pneumolizino bei streptolizino O aktyvumo priklausomybės nuo pH palyginimas. Pirmiausiai įvertintas pH poveikis pneumolizino aktyvumui. Tam skirtingame pH paruoštos tos pačios sudėties (DOPC:cholesterolis – 50 %:50 %) tBLM. Jos paveiktos 2 nM PLY inkubuoto pH 6, 7, 8 ar 9 buferyje. Atlikti EIS matavimai rodo, kad fazės minimumas didėja nuo 28 ± 9 Hz iki 129 ± 57 Hz pH didinant nuo 6 iki 8, tačiau, kai pH pasiekia 9, fazės minimumas sumažėja iki 3 ± 1 Hz (apie 30 kartų lyginant su pH 7) (34 pav.).

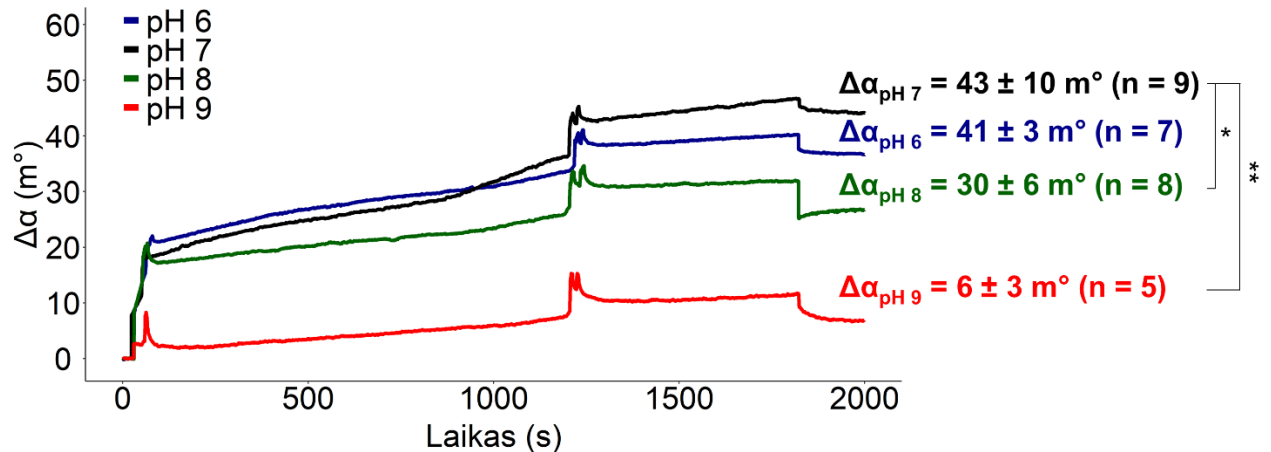


34 pav. Pneumolizinu inkubuotu skirtingame pH, paveiktų tBLM, Bode spektrai bei PLY sukulto fazės minimumo poslinkio priklausomybė nuo pH ($C_{PLY} = 2$ nM). tBLM sudėtis: DOPC:Chol – 50 %:50 %.

SPR metodu ištyrus toksino sąveikos su membrana pokyčius, nustatyta, kad toksino kiekis membranos paviršiuje, išlieka nepakitęs, inkubavus baltymą tiek pH 6, tiek 7 (41 ± 3 m° ir 43 ± 10 m°, atitinkamai). Tačiau šarminiame pH prie membranos prisijungusio toksino kiekis

statistiškai reikšmingai sumažėti. pH pakėlus iki 8 rezonansinio kampo pokytis sumažėja iki $30 \pm 6 \text{ m}^\circ$, o pH pasiekus 9 – $6 \pm 3 \text{ m}^\circ$ (35 pav.).

Parodyta, kad *Listeria* genties bakterijų išskiriamų CDC toksinų, pavyzdžiui listeriolizino O bei ivanolizino O, aktyvumas priklauso nuo pH, dėl struktūrinių pokyčių atsirandančių neoptimalaus pH sąlygomis, kurie sutrikdo toksino sąveiką su membrana (Nomura et al., 2007). Taigi, pneumolizino kiekio membranos paviršiuje sumažėjimas, toksiną inkubavus šarminiame pH, taip pat, gali būti įtakotas, dėl struktūrinių pokyčių, pakitusios monomerų sąveikos su membrana.



35 pav. Skirtingame pH inkubuotu PLY paveiktų hBLM, SPR sensogramos ($c_{\text{PLY}} = 10 \text{ nM}$). Laiko momentais: 20 s ir 1200 s, mėginys buvo maišomas, o po 1800 s celės praplaunamos.

Nuo cholesterolio priklausomų citolizinių porų dydis gali priklausyti nuo toksino koncentracijos (Gilbert ir Sonnen, 2016), todėl sumažėjęs toksino kiekis membranoje, pH padidinus iki 8, galėjo nulemti mažesnių porų susidarymą, bei padidėjusį fazės minimumą EIS tyrimuose. Tačiau pasiekus pH 9, itin didelis toksino koncentracijos membranos paviršiuje sumažėjimas, galimai leido susidaryti tik labai mažam porų skaičiui.

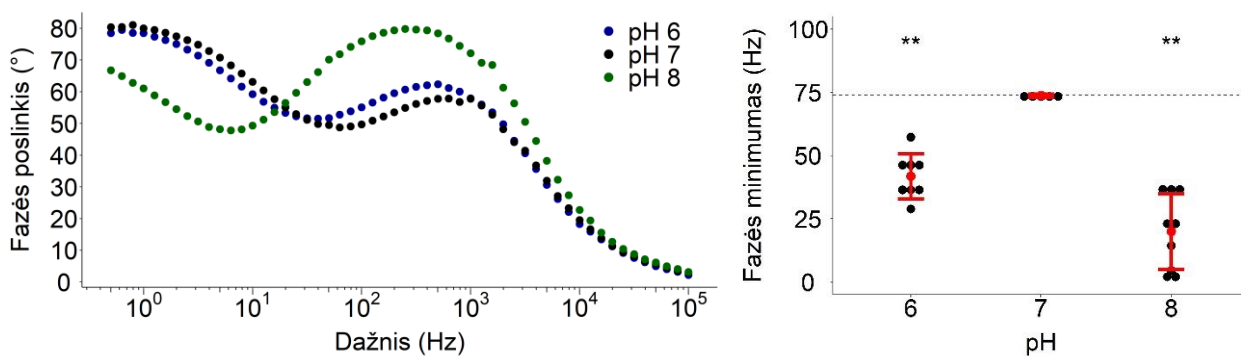
Sunku pasakyti, kodėl fazės minimumas sumažėja pneumolizina inkubavus pH 6, tačiau SPR duomenys rodo, kad tai nėra susiję su pakitusiu toksino kiekiu membranos paviršiuje. R. Rampersaud ir kolegės nustatė, kad inerolizino aktyvumas neutraliame pH (optimalus pH ineroliziniui yra rūgštinis) sumažėja, dėl preporos įsiterpimo į membraną inhibicijos (Rampersaud et al., 2018). Taigi, pneumolizino aktyvumo sumažėjimas, taip pat, galėtų būti siejamas su sutrikusiu preporų įsiterpimų į membraną. Tačiau negalima atmesti pokyčių kituose poros formavimosi žingsniuose: i) keičiantis monomero struktūrai jam prisijungus prie membranoje esančio cholesterolio arba ii) oligomerizacijos proceso pokyčių.

Gauti rezultatai iš dalies prieštarauja literatūroje aprašytiems duomenims. T. Nomura ir kolegės naudodami Western blot metodą parodė, kad PLY sąveika su cholesteroliumi nepriklauso nuo

pH. Eritrocitų hemolizės tyrimai po PLY inkubacijos pH 6, 7 ar 8 fosfatinuose buferiuose, taip pat, neparodė jokio PLY aktyvumo pokyčio (Nomura et al., 2007). Tačiau R. Rampersaud ir kolegos paprieštaravo T. Nomura ir kolegų padarytai išvadai, kad pneumolizino aktyvumas yra nepriklausomas nuo pH, kadangi jie nustatė, kad pneumolizino aktyvumas sumažėja rūgštiniame pH (4,5) lyginant su šiek tiek šarminiu pH (7,4) (Rampersaud et al., 2018). Tokie skirtumai tiek tarp literatūroje aprašytų, tiek tarp atliktų tyrimų rezultatų, galėjo būti nulemti pneumolizino gamybos, inkubavimo skirtingame pH protokolų bei tyrimams naudotų metodų skirtumų.

3.7 Streptolizino O aktyvumo priklausomybė nuo pH

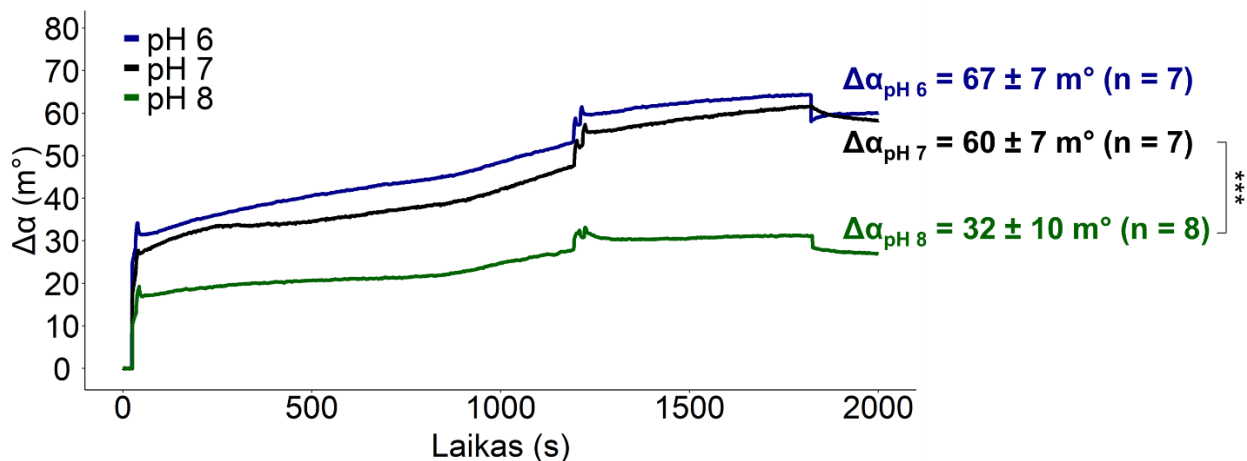
Įvertinti streptolizino O aktyvumo pokyčiams skirtingame pH, kaip ir vertinant pH įtaką pneumolizino aktyvumui, skirtingame pH pagamintos 50% DOPC ir 50% cholesterolio turinčios tBLM. Inkubavus 5 nM SLO pH 6, 7 ar 8,05 buferyje, toksino tirpalas įleistas į celes, kuriose buvo suformuotos tBLM. 36 paveiksle pateikti EIS duomenys rodo, kad streptolizino O aktyvumas sumažėja tiek rūgštiniame, tiek šarminiame pH. Fazės minimumas atitinkamai sumažėja apie 2 (nuo 74 ± 1 Hz iki 42 ± 9 Hz) ir 4 (nuo 74 ± 1 Hz iki 20 ± 15 Hz) kartus, lyginant su neutraliu pH. Šie rezultatai prieštarauja T. Nomura ir kolegų tyrimų duomenims, kurie neparodė jokių SLO aktyvumo pokyčių jį inkubavus pH 6, 7 ar 8 (Nomura et al., 2007). Tačiau kaip minėta 3.6 skyriuje, tai gali būti susiję su toksinų gamybos, naudotų metodų, bei protokolų skirtumais. Pavyzdžiui, T. Nomura tyrimuose naudotas pH 8 buferis, mūsų tyrimuose – 8,05. Nedidelis, tačiau galimai reikšmingas skirtumas tarp SLO inkubacijai naudotų buferių pH, galėjo nulemti gautų rezultatų skirtumus.



36 pav. Streptolizinu O inkubuotu skirtingame pH, paveiktų tBLM Bode spektrai bei SLO sukulto fazės minimumo poslinkio priklausomybė nuo pH ($c_{SLO} = 5$ nM). tBLM sudėtis: DOPC:Chol – 50 %:50 %.

SPR metodu įvertinti medžiagos kiekio pokyčiai membranos paviršiuje. Sensogramos rodo, jog prie membranos prisijungusių SLO monomerų kiekis, beveik nesiskyrė toksiną inkubavus neutralaus ar rūgštinio pH buferyje. Inkubavus toksiną pH 6 rezonansinio kampo pokytis buvo

$67 \pm 7 \text{ m}^\circ$, pH 7 – $60 \pm 7 \text{ m}^\circ$. Bet inkubavus streptoliziną O pH 8, rezonansinio kampo pokytis statistiškai reikšmingai sumažėjo iki $32 \pm 10 \text{ m}^\circ$ (37 pav.). SPR tyrimų rezultatai nurodo, jog streptolizino O aktyvumo sumažėjimas šarminiame pH, kaip ir pneumolizino, yra susijęs su sąveikos su membrana pokyčiais. Tačiau toksino aktyvumo sumažėjimas rūgštiniame pH nebuvo įtakotas sumažėjusio toksino kiekio membranos paviršiuje. Kaip ir pneumoliziniui, SLO poveikio membranai sumažėjimas, galėtų būti paašškintas pokyčiais vėlesniuose poros formavimosi žingsniuose.



37 pav. Skirtingame pH inkubuotu SLO paveiktų hBLM, SPR sensogramos ($c_{\text{SLO}} = 25 \text{ nM}$). Laiko momentais: 20 s ir 1200 s, mėginys buvo maišomas, o po 1800 s celės praplaunamos.

IŠVADOS

1. Pneumolizino membranoje sudaromų defektų tankis priklauso nuo membranos sudėties. Mažiausias toksino aktyvumas stebimas membranose, turinčiose polinesočiuosius 1,2-diarachidonoil-*sn*-glicerolio 3-fosfocholino (DAPC) lipidus. Didžiausias toksino aktyvumas stebimas membranose, kurių sudėtyje yra 15 % sfingomielino ar 20 % sočiųjų 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholino (DPPC) lipidų.
2. Streptolizino O membranoje sudaromų defektų tankis priklauso nuo membranos sudėties: didžiausias toksino aktyvumas stebimas membranose, kurių sudėtyje yra 20 % sočiųjų DPPC lipidų. Tačiau streptolizino O aktyvumas šiose membranose yra 2 kartus mažesnis nei pneumolizino.
3. Pneumolizino ir streptolizino O aktyvumas priklauso nuo terpės pH. Pneumolizino didžiausias aktyvumas stebimas prie pH 8, streptolizino O – pH 7.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Aida Katkauskaitė

Magistro baigiamasis darbas

Pneumolizino ir streptolizino O sąveikos su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis tyrimai

Santrauka

Streptococcus pneumoniae ir *Streptococcus pyogenes* yra vieni iš pagrindinių bakterinių kvėpavimo takų infekcijų sukėlėjų. Šie patogenai išskiria nuo cholesterolio priklausomus citolizinus: pneumoliziną ir streptoliziną O, atitinkamai. Toksinai ląstelių membranose sudaro poras, kurios sutrikdo membranos barjerinę funkciją, todėl ląstelė žūsta. Kvėpavimo takų ligų gydymui antibiotikai yra skiriami dažniausiai, nors šie vaistai ne visuomet yra reikalingi. Todėl kvėpavimo takų ligas sukeliančių patogenų išskiriamų toksinų tyrimai ne tik leistų nustatyti detalesnius, šių baltymų poros formavimo mechanizmus, bet ir sukurti greitesnius ir tikslesnius diagnostinius metodus, kurie galėtų padėti sumažinti perteklinį antibiotikų vartojimą.

Ankstesni nuo cholesterolio priklausomų citolizinių tyrimai buvo sutelkti į poros formavimo principų nustatymą, tačiau dabar vis daugiau darbų siekia nustatyti membranos bei kitų aplinkos faktorių, tokių kaip pH, įtaką šių toksinų aktyvumui. Todėl pagrindinis šio darbo tikslas buvo ištirti membranos sudėties bei pH įtaką pneumolizino bei streptolizino O, sąveikai su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis.

Atlikti tyrimai parodė, kad pneumolizino membranoje sudaromų defektų tankis priklauso nuo membranos sudėties. Mažiausias toksino aktyvumas stebimas membranose, turinčiose polinesočiuosius 1,2-diarachidonoil-*sn*-glicerolio 3-fosfocholino (DAPC) lipidus. Didžiausias toksino aktyvumas stebimas membranose, kurių sudėtyje yra 15 % sfingomielino ar 20 % sočiųjų 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholino (DPPC) lipidų. Kaip ir pneumolizino, streptolizino O membranoje sudaromų defektų tankis priklauso nuo membranos sudėties: didžiausias toksino aktyvumas stebimas membranose, kurių sudėtyje yra 20 % sočiųjų DPPC lipidų. Pneumolizino ir streptolizino O aktyvumas priklauso nuo terpės pH. Pneumolizino didžiausias aktyvumas stebimas prie pH 8, streptolizino O – pH 7.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Aida Katkauskaitė

Master thesis

**Functional Reconstitution of Cholesterol Dependent Cytolysins
Pneumolysin and Streptolysin O into Biomimetic Membranes**

SUMMARY

Streptococcus pneumoniae and *Streptococcus pyogenes* are of the main pathogens causing bacterial respiratory tract infections. They secrete cholesterol-dependent toxins: pneumolysin and streptolysin O, respectively. These toxins cause cell death by forming pores in the cell membrane. Antibiotics are most often prescribed to treat respiratory tract diseases, but they are not always necessary. For this reason, research on toxins produced by pathogens of the respiratory tract could help us not only to understand pore formation mechanism more deeply but also allow us to create faster and more accurate tools for diagnostics, which could reduce unnecessary consumption of antibiotics.

Latest studies of cholesterol-dependent cytolysins are concentrated on the influence of membrane composition and environmental factors such as pH, on the activity of these toxins. So the focus of this Master thesis was to evaluate effect of membrane composition and pH on the activity of cholesterol-dependent toxins found in respiratory tract: pneumolysin and streptolysin O.

Using electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance we found that activity of pneumolysin is affected by membrane composition. Pneumolysin is most active in tBLMs containing 15 % of sphingomyelin or 20 % of saturated 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) lipids. Activity of streptolysin O is also affected by tBLM composition. Highest activity is reached in membranes containing 20 % of DPPC. Both toxins: pneumolysin and streptolysin O, are affected by pH. Pneumolysin is most active when pH is 8, while activity of streptolysin O peaks at pH 7.

LITERARŪROS SARAŠAS

1. Agudelo CW, Samaha G, Garcia-Arcos I. Alveolar lipids in pulmonary disease. A review. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):122.
2. Ahmad A, Ghosia L, Ali R. Structural and functional features of Streptolysin O. *Int J Bioinforma Res Appl.* 2011;7:427–44.
3. Aikawa C, Kawashima K, Fukuzaki C, Nakakido M, Murase K, Nozawa T, Tsumoto K, Nakagawa I. Single-chain variable fragment (scFv) targeting streptolysin O controls group A Streptococcus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;566:177–83.
4. Aleknavičienė I, Jankunec M, Penkauskas T, Valincius G. Electrochemical properties of tethered lipid bilayers on thin film silver substrates. *Electrochimica Acta.* 2021;389:138726.
5. Almeida PFF, Vaz WLC, Thompson TE. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry.* 1992;31(29):6739–47.
6. Alouf JE, Geoffroy C, Pattus F, Verger R. Surface properties of bacterial sulfhydryl-activated cytolytic toxins. Interaction with monomolecular films of phosphatidylcholine and various sterols. *Eur J Biochem.* 1984;141(1):205–10.
7. Aminipour Z, Khorshid M, Bayoumi M, Losada-Pérez P, Thoelen R, Bonakdar S, Keshvari H, Maglia G, Wagner P, Van der Bruggen B. Formation and electrical characterization of black lipid membranes in porous filter materials. *Phys Status Solidi A.* 2017;214(9):1700104.
8. Banerjee S, Lyubchenko YL. Topographically smooth and stable supported lipid bilayer for high-resolution AFM studies. *Methods.* 2022;197:13–9.
9. Basit H, Van der Heyden A, Gondran C, Nysten B, Dumy P, Labbé P. Tethered Bilayer Lipid Membranes on Mixed Self-Assembled Monolayers of a Novel Anchoring Thiol: Impact of the Anchoring Thiol Density on Bilayer Formation. *Langmuir.* 2011;27(23):14317–28.
10. Berry KAZ, Murphy RC, Kosmider B, Mason RJ. Lipidomic characterization and localization of phospholipids in the human lung. *J Lipid Res.* 2017;58(5):926–33.
11. Bompard J, Maniti O, Aboukhachfe R, Ausserre D, Girard-Egrot A. BALM: Watching the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Submicron Lateral Resolution. *Langmuir.* 2021;37(31):9457–71.
12. Boulade M, Morlay A, Piat F, Roupioz Y, Livache T, G. Charette P, Canva M, Leroy L. Early detection of bacteria using SPR imaging and event counting: experiments with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *RSC Adv.* 2019;9(27):15554–60.
13. Brender J, McHenry A, Ramamoorthy A. Does Cholesterol Play a Role in the Bacterial Selectivity of Antimicrobial Peptides? *Front Immunol.* 2012;3:195.
14. Brothers MC, Moore D, St. Lawrence M, Harris J, Joseph RM, Ratcliff E, Ruiz ON, Glavin N, Kim SS. Impact of Self-Assembled Monolayer Design and Electrochemical Factors on Impedance-Based Biosensing. *Sensors.* 2020;20(8):2246.
15. Buckiūnienė A, Janonienė R. Greitojo A grupės beta hemolizinio streptokoko antígeno nustatymo testo efektyvumas. *Visuom Sveik.* 2019;7.
16. Budvytytė R. Dirbtinės fosfolipidinės sistemos baltymų bei peptidų sąveikos su biologinėmis membranomis tyrimams [disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2012.
17. Castro-Gómez P, Garcia-Serrano A, Visioli F, Fontecha J. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015;101:41–51.

18. Cevc G. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry*. 1991;30(29):7186–93.
19. Chadli M, Rebaud S, Maniti O, Tillier B, Cortès S, Girard-Egrot A. New Tethered Phospholipid Bilayers Integrating Functional G-Protein-Coupled Receptor Membrane Proteins. *Langmuir*. 2017;33(39):10385–401.
20. Chen W, Wang W, Ma X, Lv R, Watharkar RB, Ding T, Ye X, Liu D. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Food Chem*. 2019;274:234–41.
21. Chiriaco MS, Rizzato S, Primiceri E, Spagnolo S, Monteduro AG, Ferrara F, Maruccio G. Optimization of SAW and EIS sensors suitable for environmental particulate monitoring. *Microelectron Eng*. 2018;202:31–6.
22. Christie MP, Johnstone BA, Tweten RK, Parker MW, Morton CJ. Cholesterol-dependent cytolysins: from water-soluble state to membrane pore. *Biophys Rev*. 2018;10(5):1337–48.
23. Córdoba-Torres P, Mesquita TJ, Devos O, Tribollet B, Roche V, Nogueira RP. On the intrinsic coupling between constant-phase element parameters α and Q in electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*. 2012;72:172–8.
24. Dandachi D, Rodriguez-Barradas MC. Viral pneumonia: etiologies and treatment. *J Investig Med*. 2018;66(6):957–65.
25. Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2016;44(1):381–91.
26. Dowd KJ, Tweten RK. The Cholesterol-Dependent Cytolysin Signature Motif: A Critical Element in the Allosteric Pathway that Couples Membrane Binding to Pore Assembly. *PLoS Pathog*. 2012;8(7):e1002787.
27. Drücker P, Bachler S, Wolfmeier H, Schoenauer R, Köffel R, Babiyuchuk VS, Dittrich PS, Draeger A, Babiyuchuk EB. Pneumolysin-damaged cells benefit from non-homogeneous toxin binding to cholesterol-rich membrane domains. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(8):795–805.
28. Dupont JL. LIPIDS | Chemistry and Classification. In: Caballero B, editor. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 2005. p. 126–32.
29. Dutta PC, Przybylski R, Eskin MNA, Appelqvist LÅ. 7 - Formation, Analysis, and Health Effects of Oxidized Sterols in Frying Fat. In: Erickson MD, editor. *Deep Frying*. 2nd ed. AOCS Press; 2007. p. 111–64.
30. Eeman M, Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Société Environ*. 2010;14(4):719-36.
31. El-Beyrouthy J, Freeman E. Characterizing the Structure and Interactions of Model Lipid Membranes Using Electrophysiology. *Membranes*. 2021;11(5):319.
32. El-Hammadi MM, Arias JL. An update on liposomes in drug delivery: a patent review (2014–2018). *Expert Opin Ther Pat*. 2019;29(11):891–907.
33. Encinas-Sánchez V, de Miguel MT, Lasanta MI, García-Martín G, Pérez FJ. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): An efficient technique for monitoring corrosion processes in molten salt environments in CSP applications. *Sol Energy Mater Sol Cells*. 2019;191:157–63.
34. England RJ, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1999;24(1):67–8.

35. Faraj BHA, Collard L, Cliffe R, Blount LA, Lonnen R, Wallis R, Andrew PW, Hudson AJ. Formation of pre-pore complexes of pneumolysin is accompanied by a decrease in short-range order of lipid molecules throughout vesicle bilayers. *Sci Rep.* 2020;10(1):4585.
36. Farrand AJ, Hotze EM, Sato TK, Wade KR, Wimley WC, Johnson AE, Tweten RK. The Cholesterol-dependent Cytolysin Membrane-binding Interface Discriminates Lipid Environments of Cholesterol to Support β -Barrel Pore Insertion *. *J Biol Chem.* 2015;290(29):17733–44.
37. Farrand AJ, LaChapelle S, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(9):4341–6.
38. Favero G, Campanella L, Cavallo S, D'Annibale A, Perrella M, Mattei E, Ferri T. Glutamate Receptor Incorporated in a Mixed Hybrid Bilayer Lipid Membrane Array, as a Sensing Element of a Biosensor Working under Flowing Conditions. *J Am Chem Soc.* 2005;127(22):8103–11.
39. Feil SC, Ascher DB, Kuiper MJ, Tweten RK, Parker MW. Structural Studies of *Streptococcus pyogenes* Streptolysin O Provide Insights into the Early Steps of Membrane Penetration. *J Mol Biol.* 2014;426(4):785–92.
40. Filippov A, Orädd G, Lindblom G. Lipid Lateral Diffusion in Ordered and Disordered Phases in Raft Mixtures. *Biophys J.* 2004;86(2):891–6.
41. Flanagan JJ, Tweten RK, Johnson AE, Heuck AP. Cholesterol Exposure at the Membrane Surface Is Necessary and Sufficient to Trigger Perfringolysin O Binding. *Biochemistry.* 2009;48(18):3977–87.
42. Freeman AM, Leigh J. *Viral Pneumonia.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
43. gamry.com [internetinè svetainè]. Gamry Instruments Inc; [atnaujinta 2021; cituota 2021 06 13]. Adresas: <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>
44. Gao Z, Shen P, Lan Y, Cui L, Ohm JB, Chen B, Rao J. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Res Int.* 2020;131:109045.
45. Gawrisch K, Soubias O. Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers-significance for GPCR function. *Chem Phys Lipids.* 2008;153:64–75.
46. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1191–210.
47. Gerlach D, Köhler W, Günther E, Mann K. Purification and characterization of streptolysin O secreted by *Streptococcus equisimilis* (group C). *Infect Immun.* 1993;61(6):2727–31.
48. Gilbert RJC. Cholesterol-Dependent Cytolysins. In: Anderluh G, Lakey J, editors. *Proteins Membrane Binding and Pore Formation.* New York: Springer; 2010. p. 56–66.
49. Gilbert RJC, Sonnen AFP. Measuring kinetic drivers of pneumolysin pore structure. *Eur Biophys J.* 2016;45:365–76.
50. Guo Y, Pogodin S, Baulin V. General model of phospholipid bilayers in fluid phase within the single chain mean field theory. *J Chem Phys.* 2014;140:174903.
51. Gupta RK. *Surface plasmon resonance of ultrathin films and application IT 4.* India: Indira Gandhi Centre for Atomic Research; 2019.
52. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 May;19(5):281–96.

53. Harroun TA, Katsaras J, Wassall SR. Cholesterol is found to reside in the center of a polyunsaturated lipid membrane. *Biochemistry*. 2008;47(27):7090–6.
54. Hewitt L, Todd EW. The effect of cholesterol and of sera contaminated with bacteria on the hæmolysins produced by hæmolytic streptococci. 1939;49(1):45-51.
55. Higienos institutas. Viršutinių kvėpavimo takų infekcijų diagnostika ir gydymas antibiotikais. Metodinės rekomendacijos. Vilnius: Higienos institutas; 2010.
56. Hnaïen M, Diouani MF, Helali S, Hafaid I, Hassen WM, Renault NJ, Ghram A, Abdelghani A. Immobilization of specific antibody on SAM functionalized gold electrode for rabies virus detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochem Eng J*. 2008;39(3):443–9.
57. Ho QT, Murphy KM, Drapala KP, O’Callaghan TF, Fenelon MA, O’Mahony JA, McCarthy NA. Effect of pH and heat treatment on viscosity and heat coagulation properties of milk protein concentrate. *Int Dairy J*. 2018;85:219–24.
58. Holm S, Holm T, Martinsen ØG. Simple circuit equivalents for the constant phase element. *PLOS ONE*. 2021;16(3):e0248786.
59. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*. 2019;51:72–80.
60. Ingólfsson HI, Carpenter TS, Bhatia H, Bremer PT, Marrink SJ, Lightstone FC. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J*. 2017;113(10):2271–80.
61. Jackman JA, Knoll W, Cho NJ. Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes. *Materials*. 2012;5(12):2637–57.
62. Javanainen M, Hammaren H, Monticelli L, Jeon JH, Miettinen MS, Martinez-Seara H, Metzler R, Vattulainen I. Anomalous and normal diffusion of proteins and lipids in crowded lipid membranes. *Faraday Discuss*. 2013;161(0):397–417.
63. Jing JY, Wang Q, Zhao WM, Wang BT. Long-range surface plasmon resonance and its sensing applications: A review. *Opt Lasers Eng*. 2019;112:103–18.
64. Johnson BB, Breña M, Anguita J, Heuck AP. Mechanistic Insights into the Cholesterol-dependent Binding of Perfringolysin O-based Probes and Cell Membranes. *Sci Rep*. 2017;7(1):13793.
65. Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Poolman B, Schwille P. Probing Lipid Mobility of Raft-exhibiting Model Membranes by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. *J Biol Chem*. 2003;278(30):28109–15.
66. Karaballi RA, Merchant R, Power SR, Brosseau CL. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) study of the interaction between protein aggregates and biomimetic membranes. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(6):4513–26.
67. Kasiulevičius V. Ligų diagnostikos ir gydymo principai pirminėje sveikatos priežiūroje (juosmens skausmo modelis). 2014.
68. Katkauskaitė A. Pneumolizino aktyvumo priklausomybės nuo membranos sudėties tyrimas elektrocheminio impedanso metodu [bakalaurinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2020.
69. Kikas P, Chalikias G, Tziakas D. Cardiovascular Implications of Sphingomyelin Presence in Biological Membranes. *Eur Cardiol Rev*. 2018;13(1):42–5.
70. Kose E, Sirin Kose S, Akca D, Yildiz K, Elmas C, Baris M, Anil M. The Effect of Rapid Antigen Detection Test on Antibiotic Prescription Decision of Clinicians and Reducing Antibiotic Costs in Children with Acute Pharyngitis. *J Trop Pediatr*. 2016;62(4):308–15.

71. Křivík P, Vaculík S, Bača P, Kazelle J. Determination of state of charge of lead-acid battery by EIS. *J Energy Storage*. 2019;21:581–5.
72. Kucinskaite-Kodze I, Simanavicius M, Dapkunas J, Pleckaityte M, Zvirbliene A. Mapping of Recognition Sites of Monoclonal Antibodies Responsible for the Inhibition of Pneumolysin Functional Activity. *Biomolecules*. 2020;10(7):1009.
73. Kwak KJ, Valincius G, Liao W-C, Hu X, Wen X, Lee A, Yu B, Vanderah D, Lu W, Lee LJ. Formation and Finite Element Analysis of Tethered Bilayer Lipid Structures. *Langmuir*. 2010;26(23):18199–208.
74. Kyle JE, Clair G, Bandyopadhyay G, Misra RS, Zink EM, Bloodsworth KJ, Shukla AK, Du Y, Lillis J, Myers J, Ashton J, Bushnell T, Cochran M, Deutsch G, Baker ES, Carson JP, Mariani TJ, Xu Y, Whitsett JA, Pryhuber G, Ansong C. Cell type-resolved human lung lipidome reveals cellular cooperation in lung function. *Sci Rep*. 2018;8(1):13455.
75. Lawrence SL, Feil SC, Morton CJ, Farrand AJ, Mulhern TD, Gorman MA, Wade KR, Tweten RK, Parker MW. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Sci Rep*. 2015;5(1):14352.
76. Lean WL, Arnup S, Danchin M, Steer AC. Rapid Diagnostic Tests for Group A Streptococcal Pharyngitis: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 2014;134(4):771–81.
77. Lee J, Suh E, Byambabaatar S, Lee S, Kim H, Jin KS, et al. Structural Characteristics of Pneumolysin and Its Domains in a Biomimetic Solution. *ACS Omega*. 2018;3(8):9453–61.
78. Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol*. 2020;30(5):341–53.
79. Lim JE, Park SA, Bong SM, Chi YM, Lee KS. Characterization of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*, interacting with carbohydrate moiety and cholesterol as a component of cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(2):659–63.
80. Lindblom G, Orädd G, Filippov A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol: An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem Phys Lipids*. 2006;141(1):179–84.
81. Lorent JH, Levental KR, Ganesan L, Rivera-Longworth G, Sezgin E, Doktorova M, Lyman E, Levental I. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat Chem Biol*. 2020;16(6):644–52.
82. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(4):225–45.
83. Lynskey NN, Jauneikaite E, Li HK, Zhi X, Turner CE, Mosavie M, Pearson M, Asai M, Lobkowitz L, Chow JY, Parkhill J, Lamagni T, Chalker VJ, Sriskandan S. Emergence of dominant toxigenic MIT1 *Streptococcus pyogenes* clone during increased scarlet fever activity in England: a population-based molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(11):1209–18.
84. Ma W, Ying YL, Qin LX, Gu Z, Zhou H, Li DW, Sutherland TC, Chen HY, Long YT. Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. *Nat Protoc*. 2013;8(3):439–50.
85. Maccarini M, Watkins EB, Stidder B, Alcaraz JP, Cornell BA, Martin DK. Nanostructural determination of a lipid bilayer tethered to a gold substrate. *Eur Phys J E*. 2016;39(12):123.
86. MacIntyre CR, Chughtai AA, Barnes M, Ridda I, Seale H, Toms R, Heywood A. The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1)pdm09. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):637.

87. Mapar M, Jõemetsa S, Pace H, Zhdanov VP, Agnarsson B, Höök F. Spatiotemporal Kinetics of Supported Lipid Bilayer Formation on Glass via Vesicle Adsorption and Rupture. *J Phys Chem Lett.* 2018;9(17):5143–9.
88. Marquardt D, Kučerka N, Wassall SR, Harroun TA, Katsaras J. Cholesterol's location in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids.* 2016;199:17–25.
89. Marrink SJ, de Vries AH, Harroun ThadA, Katsaras J, Wassall SR. Cholesterol Shows Preference for the Interior of Polyunsaturated Lipid Membranes. *J Am Chem Soc.* 2008;130(1):10–1.
90. Marshall JE, Faraj BHA, Gingras AR, Lonnen R, Sheikh MA, El-Mezgueldi M, Moody PCE, Andrew PW, Wallis R. The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex. *Sci Rep.* 2015;5(1):13293.
91. Martinez PJ, Farhan A, Mustafa M, Javaid N, Darkoh C, Garrido-Sanabria E, Fisher-Hoch SP, Briles DE, Kantarci A, Mirza S. PspA facilitates evasion of pneumococci from bactericidal activity of neutrophil extracellular traps (NETs). *Microb Pathog.* 2019;136:103653.
92. Martínez-Girón R, Pantanowitz L. Lower respiratory tract viral infections: Diagnostic role of exfoliative cytology. *Diagn Cytopathol.* 2017;45(7):614–20.
93. Martinez-Seara H, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M, Reigada R. Interplay of Unsaturated Phospholipids and Cholesterol in Membranes: Effect of the Double-Bond Position. *Biophys J.* 2008;95(7):3295–305.
94. McShane D, Davies JC, Davies MG, Bush A, Geddes DM, Alton EFWF. Airway surface pH in subjects with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2003;21(1):37–42.
95. Merrill AH. CHAPTER 13 - Sphingolipids. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* 5th ed. San Diego: Elsevier; 2008. p. 363–97.
96. Morton CJ, Sani MA, Parker MW, Separovic F. Cholesterol-Dependent Cytolysins: Membrane and Protein Structural Requirements for Pore Formation. *Chem Rev.* 2019;119(13):7721–36.
97. Motegi T, Hoshino H, Sakamoto K, Hayashi F. Construction of tethered bilayer lipid membrane with oriented membrane proteins on surface modified mica substrate. *Jpn J Appl Phys.* 2019;58(SI):SIIB12.
98. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro. *Circulation.* 1962;26(5):1167–71.
99. Müller P, Schiller S, Wieprecht T, Dathe M, Herrmann A. Continuous measurement of rapid transbilayer movement of a pyrene-labeled phospholipid analogue. *Chem Phys Lipids.* 2000;106(1):89–99.
100. Neupane S, Betlem K, Renner FU, Losada-Pérez P. Solvent-Assisted Lipid Bilayer Formation on Au Surfaces: Effect of Lipid Concentration on Solid-Supported Membrane Formation. *Phys Status Solidi A.* 2021;218(13):2000662.
101. Nishimoto AT, Rosch JW, Tuomanen EI. Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target. *Front Microbiol.* 2020;11:1543.
102. Nomura T, Kawamura I, Kohda C, Baba H, Ito Y, Kimoto T, Watanabe I, Mitsuyama M. Irreversible loss of membrane-binding activity of Listeria-derived cytolysins in non-acidic conditions: a distinct difference from allied cytolysins produced by other Gram-positive bacteria. *Microbiol Read Engl.* 2007;153:2250–8.
103. Nuytten N, Hakimhashemi M, Ysenbaert T, Defour L, Trekker J, Soenen SJH, Van der Meeren P, De Cuyper M. PEGylated lipids impede the lateral diffusion of adsorbed proteins at the surface of (magneto)liposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;80(2):227–31.

104. Park S, Yorulmaz Avsar S, Cornell B, Ferhan AR, Jeon WY, Chung M, Cho NJ. Probing the influence of tether density on tethered bilayer lipid membrane (tBLM)-peptide interactions. *Appl Mater Today*. 2020;18:100527.
105. Park SA, Park YS, Bong SM, Lee KS. Structure-based functional studies for the cellular recognition and cytolytic mechanism of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J Struct Biol*. 2016;193(2):132–40.
106. Parkkila P, Elderdfi M, Bunker A, Viitala T. Biophysical Characterization of Supported Lipid Bilayers Using Parallel Dual-Wavelength Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Measurements. *Langmuir*. 2018;34(27):8081–91.
107. van Pee K, Neuhaus A, D’Imprima E, Mills DJ, Kühlbrandt W, Yildiz Ö. CryoEM structures of membrane pore and prepore complex reveal cytolytic mechanism of Pneumolysin. Scheres SH, editor. *eLife*. 2017;6:e23644.
108. Penkauskas T, Preta G. Biological applications of tethered bilayer lipid membranes. *Biochimie*. 2019;157:131–41.
109. Peraro MD, van der Goot FG. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(2):77–92.
110. Peyrani P, Mandell L, Torres A, Tillotson GS. The burden of community-acquired bacterial pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Expert Rev Respir Med*. 2019;13(2):139–52.
111. Plant AL. Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics. *Langmuir*. 1999;15(15):5128–35.
112. Plečkaityte M. Cholesterol-Dependent Cytolysins Produced by Vaginal Bacteria: Certainties and Controversies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9:452.
113. Pulli I, Asghar MY, Kemppainen K, Törnquist K. Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2018;1865:1668–77.
114. Raczyński P, Dawid A, Piętek A, Gburski Z. Reorientational dynamics of cholesterol molecules in thin film surrounded carbon nanotube: Molecular dynamics simulations. *J Mol Struct*. 2006;792–793:216–20.
115. Radhakrishnan R, Pali M, Lee HJ, Lee TR, Suni II. Impedance Biosensor Incorporating a Carboxylate-Terminated Bidentate Thiol for Antibody Immobilization. *J Electrochem Soc*. 2016;163(5):B125.
116. Ragaliauskas T. Lipidinių membranų imobilizavimas ant paviršiaus ir jų tyrimas paviršiaus plazmonų rezonanso metodu [disertacija]. Vilnius: Vilnius University; 2017.
117. Ragaliauskas T, Plečkaitytė M, Jankunec M, Labanauskas L, Baranauskiene L, Valincius G. Inerolysin and vaginolysin, the cytolysins implicated in vaginal dysbiosis, differently impair molecular integrity of phospholipid membranes. *Sci Rep*. 2019;9(1):10606.
118. Rakovska B, Ragaliauskas T, Mickevičius M, Jankunec M, Niaura G, Vanderah DJ, Valinčius G. Structure and Function of the Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*. 2015;31(2):846–57.
119. Rampersaud R, Lewis EL, LaRocca TJ, Ratner AJ. Environmental pH modulates inerolysin activity via post-binding blockade. *Sci Rep*. 2018;8(1):1542.
120. Reboul CF, Whisstock JC, Dunstone MA. A New Model for Pore Formation by Cholesterol-Dependent Cytolysins. *PLOS Comput Biol*. 2014;10(8):e1003791.
121. Rothfield LI. *Structure and Function of Biological Membranes*. New York: Academic Press; 2014.
122. Rubenstein JL, Smith BA, McConnell HM. Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76(1):15–8.

123. Sabirovas T, Valiūnienė A, Valincius G. Hybrid bilayer membranes on metallurgical polished aluminum. *Sci Rep.* 2021;11(1):9648.
124. Sakalauskas R, Danila E, Malakauskas K, Zablockis R, Vitkauskienė A, Ambrazaitienė R, Bagdonas A, Blažienė A, Miliauskas S, Nargėla RV, Valavičius A, Zolubas M. Suaugusiųjų pneumonijos diagnostika ir gydymas (Lietuvos pulmonologų sutarimas). Kaunas: Lietuvos pulmonologų ir alergologų draugija; 2016.
125. Sang S, Zhu Y. Chapter 10 - Bioactive Phytochemicals in Wheat Bran for Colon Cancer Prevention. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health.* San Diego: Academic Press; 2014. p. 121–9.
126. dos Santos Rodrigues B, Oue H, Banerjee A, Kanekiyo T, Singh J. Dual functionalized liposome-mediated gene delivery across triple co-culture blood brain barrier model and specific in vivo neuronal transfection. *J Controlled Release.* 2018;286:264–78.
127. Savinov SN, Heuck AP. Interaction of Cholesterol with Perfringolysin O: What Have We Learned from Functional Analysis? *Toxins.* 2017;9(12):381.
128. Schasfoort RBM, editor. Chapter 1: Introduction to Surface Plasmon Resonance. In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance.* 2nd ed. Croydon: The Royal Society of Chemistry; 2017. p. 1-26
129. Scherfeld D, Kahya N, Schwille P. Lipid Dynamics and Domain Formation in Model Membranes Composed of Ternary Mixtures of Unsaturated and Saturated Phosphatidylcholines and Cholesterol. *Biophys J.* 2003;85(6):3758–68.
130. Shewell LK, Day CJ, Jen FEC, Haselhorst T, Atack JM, Reijneveld JF, Everest-Dass A, James DB, Boguslawski KM, Brouwer S, Gillen CM, Luo Z, Kobe B, Nizet V, von Itzstein M, Walker MJ, Paton AW, Paton JC, Torres VJ, Jennings MP. All major cholesterol-dependent cytolysins use glycans as cellular receptors. *Sci Adv.* 2020;6(21):eaaz4926.
131. Siakotos AN, Rouser G. Isolation of highly purified human and bovine brain endothelial cells and nuclei and their phospholipid composition. *Lipids.* 1969;4(3):234–9.
132. Singh M, Kaur N, Comini E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *J Mater Chem C.* 2020;8(12):3938–55.
133. Siontorou CG, Nikoleli GP, Nikolelis DP, Karapetis SK. Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. *Membranes.* 2017;7(3):38.
134. Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(51):20226–31.
135. Sonnen AFP, Plitzko JM, Gilbert RJC. Incomplete pneumolysin oligomers form membrane pores. *Open Biol.* 2014;4(4):140044.
136. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J Colloid Interface Sci.* 1991;143(2):513–26.
137. Stevens DL, Bryant AE. CHAPTER 30 - Group A Streptococcal and Staphylococcal Infections. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice.* 3rd ed. Edinburgh: W.B. Saunders; 2011. p. 203–11.
138. Stewart SE, D'Angelo ME, Piantavigna S, Tabor RF, Martin LL, Bird PI. Assembly of streptolysin O pores assessed by quartz crystal microbalance and atomic force microscopy provides evidence for the formation of anchored but incomplete oligomers. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2015;1848:115–26.
139. Stillwell W, Wassall SR. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids.* 2003;126(1):1–27.

140. Subczynski WK, Widomska J, Mainali L, Raguz M. Cholesterol bilayer domain in eye lens health. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(8):3636–3636.
141. Sun Y, Zang X, Sun Y, Wang L, Gao Z. Lipid membranes supported by planar porous substrates. *Chem Phys Lipids.* 2020;228:104893.
142. Tewes BJ, Galla HJ. Lipid polarity in brain capillary endothelial cells. *Endothel J Endothel Cell Res.* 2001;8(3):207–20.
143. Tweten RK. Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins. *Infect Immun.* 2005;73(10):6199–209.
144. ulac.lt [internetinė svetainė]. Vilnius: Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras; [atnaujinta 2021; cituota 2021 10 11]. Adresas: <http://www.ulac.lt/ligos/S/skarlatina>
145. Valinčius G, Meškauskas T, Ivanauskas F. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes. *Langmuir.* 2012;28(1):977–90.
146. Vögele M, Bhaskara RM, Mulvihill E, van Pee K, Yildiz Ö, Kühlbrandt W, Müller DJ, Hummer G. Membrane perforation by the pore-forming toxin pneumolysin. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(27):13352–7.
147. Watson H. Biological membranes. *Essays Biochem.* 2015;59:43–69.
148. World Health Organization. 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2008; 83(42):373–384.
149. Yeagle PL. Chapter 6 - Laboratory Membrane Systems. In: Yeagle PL, editor. *The Membranes of Cells 3rd ed.* Boston: Academic Press; 2016. p. 95–114.
150. Zajac M, Dreano E, Edwards A, Planelles G, Sermet-Gaudelus I. Airway Surface Liquid pH Regulation in Airway Epithelium Current Understandings and Gaps in Knowledge. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3384.
151. Zheng Y, Lang T, Cao B, Jin J, Dong R, Feng H. Fiber optic SPR sensor for human Immunoglobulin G measurement based on the MMF-NCF-MMF structure. *Opt Fiber Technol.* 2018;46:179–85.
152. Zhou J, Qi Q, Wang C, Qian Y, Liu G, Wang Y, Fu L. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosens Bioelectron.* 2019;142:111449.
153. Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, Zhu F, Zhu B, Cui L. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res.* 2020;285:198005.
154. Ziemba BP, Falke JJ. Lateral diffusion of peripheral membrane proteins on supported lipid bilayers is controlled by the additive frictional drags of (1) bound lipids and (2) protein domains penetrating into the bilayer hydrocarbon core. *Chem Phys Lipids.* 2013;172–173:67–77.