

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Birutė Pudžiuvytė

NAUJO TETRAKATIJONINIO PORFIRINO SUKELTOS
ESCHERICHIA COLI FOTOPAŽAIDOS

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006-2011 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete, Biochemijos ir biofizikos katedroje, Fizikos fakultete, Kvantinės elektronikos katedroje ir Paduvos universiteto Biologijos mokslų katedroje.

Mokslinis vadovas:

doc. dr. Elena Bakienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Mokslinis konsultantas:

doc. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02 P)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

dr. Lida Bagdonienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Nariai:

prof. dr. Giedrė Virgilija Streckytė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

doc.dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B)

dr. Elena Servienė (Gamtos tyrimų centras, Botanikos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

dr. Liucija Marcinkevičienė (Vilniaus universitetas, Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Oponentai:

prof. dr. Donaldas Čitavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

doc. dr. Zita Naučienė (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2011m. rugsėjo 09 d 15 val Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Didžiojoje auditorijoje

Adresas: M. K. Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2011 birželio 29d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Biochemijos instituto bibliotekose.

VILNIUS UNIVERSITY

Birutė Pudžiuvytė

PHOTOSENSITIZED DAMAGE TO *ESCHERICHIA COLI*
MEDIATED BY NEW TETRACATIONIC PORPHYRIN

Summary of doctoral dissertation
Physical Sciences, Biochemistry (04 P)

Vilnius, 2011

This dissertation was prepared at the Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University, the Department of Quantum Electronics, Faculty of Physics and Department of Biology, Padova University.

Scientific supervisor:

assoc. prof. dr. Elena Bakienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Scientific advisor:

assoc. prof. dr. Saulius Bagdonas (Vilnius University, physical sciences, physics – 02 P)

The defence of the dissertation will be held at Vilnius University Council of Biochemistry:

Chairman:

dr. Lida Bagdonienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Members:

prof. dr. Giedrė Virgilija Streckytė (Vilnius University, physical sciences, chemistry – 03 P)

assoc. prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, biomedical sciences, biophysics – 02 B)

dr. Elena Servienė (Nature Research Center, Institute of Botany, physical sciences, biochemistry – 04 P)

dr. Liucija Marcinkevičienė (Vilnius University, Institute of Biochemistry, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Opponents:

prof. dr. Donaldas Čitavičius (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01 B)

assoc. prof. dr. Zita Naučienė (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

This dissertation will be defended at the public session of the Council of Biochemistry at 15:00 on September 09, 2011 in the auditorium 214 at the Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

Address: M. K. Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius

Posting date June 29, 2011

The dissertation is available at the Libraries of Vilnius University and Institute of Biochemistry.

ĮVADAS

Antibiotikų atradimas neabejotinai buvo vienas iš svarbiausių XXa. medicinos pasiekimų (Chopra, 2002). Kita vertus, masinis antibiotikų naudojimas ne tik išgelbėjo daugelį gyvybių, bet ir padėjo išsivystyti įvairiems atsparumo mechanizms ir atrinkti atsparias bakterijų padermes, galinčias perduoti šį atsparumą iš kartos į kartą (Nikaido, 2009). Šiuo metu beveik visos žinomos patogeninės bakterijos pasižymi atsparumu vienai, o dažnai ir keletui populiarių antibiotikų grupių, naudojamų infekcinėms ligoms gydyti (Todar, 2011; Goldstein *ir kt.*, 2011). Netinkamas ir nekontroliuojamas antibiotikų vartojimas medicinoje bei veterinarijoje tik pablogino padėtį (Taylor *ir kt.*, 2002; Fernandes, 2006; French, 2010), todėl išaugo poreikis sukurti naujus bakterinių infekcijų gydymo būdus, neskatinančius atsparumo atsiradimo ir plitimo (Willing *ir kt.*, 2011).

Visiškai atsisakyti antibiotikų kol kas yra neįmanoma, todėl atsakingas jų vartojimas galėtų būti paprasčiausia išeitis siekiant sumažinti patogeninių bakterijų padermių, pasižyminčių dauginiu atsparumu antibiotikams, skaičių (Isturiz, 2010). Šiuo metu tiriama daug potencialių kovos su patogenais metodų, grindžiamų skirtingais antimikrobinių medžiagų veikimo principais. Vis labiau populiarėja bandymai antimikrobinei terapijai pritaikyti medžiagas, gebančias slopinti virulentiškumo faktorių raišką ar funkcijas, mažus katijoninius peptidus, patogenui specifinius lizuojančius bakteriofagus arba šviesa aktyvuojamus junginius (Rasko & Sperandio, 2010; Moellering, 2011; Fernebro, 2011). Šiuo metu manoma, jog pastarasis metodas yra pranašesnis už kitus tuo, jog neskatina bakterijų atsparumo atsiradimo (Taylor *ir kt.*, 2002; Maish, 2010).

Fotodinaminės antimikrobinės terapijos esmė yra ta, jog sujungus tris nekenksmingus komponentus: tam tikro bangos ilgio šviesą, ja aktyvuojamą junginį - fotosensibilizatorių bei deguonį gaunama bakterijų ląstelėms pražūtinga kombinacija.

Pagrindiniai šio metodo privalumai:

- 1) Taikinių daugybiškumas, dėl kurio neatsiranda atsparumas daugumai naudojamų fotosensibilizatorių (Soukos & Goodson, 2011);
- 2) Antimikrobinio poveikio stiprumas nepriklauso nuo atsparumo antibiotikams spektro, be to fotosensibilizacija veikli ir prieš biofilmus, kurių neįmanoma sunaikinti naudojant įprastus antibiotikus (Cassidy *ir kt.*, 2010; Collins *ir kt.*, 2010);
- 3) Galimybė apšvitinti tik infekcijos pažeistą plotą sumažina šalutinio poveikio tikimybę bei apsaugo nuo žalingo poveikio įprastą mikroflorą, kuri paprastai sunaikinama sistemingai gydant infekcines ligas antibiotikais (Jori & Roncucci, 2006).

Akivaizdu, jog fotosensibilizacija ateityje taps svarbia priešmikrobinės terapijos dalimi, nors būtų neteisinga sakyti, kad ji yra visų priešmikrobinės terapijos problemų sprendimas (Wainwright, 2009). Nepaisant to, jog šiuo metu fotosensibilizacija jau naudojama stomatologijoje, kovai su periodontinėmis bakterinės kilmės ligomis, tačiau didžioji dauguma pritaikymo sričių ir būdų dar tebėra eksperimentinėje stadijoje.

Fotosensibilizatorių sąveikos su įvairiais bakterinių ląstelių komponentais tyrimai padeda geriau suprasti jų žūties mechanizmą. Nustatyta, kad fotosensibilizacijos metu pažeidžiamos įvairios ląstelės vietos, tačiau manoma, jog pagrindinė bakterijų žūties priežastis yra citoplazminės membranos pažeidimas (Salmon-Divon *ir kt.*, 2004; Jori & Coppellotti, 2007). Nepaisant to, jog nemažai bakterijų fotosensibilizacijos mechanizmo detalių jau yra iširta ir žinoma, vis dar lieka daug neaiškumų, ypač trūksta duomenų apie morfologinius ląstelės pokyčius, vykstančius fotosensibilizacijos metu

Darbo tikslas: Ištirti tetrakis(N-etilpiridino-4-il)porfirino tetratozilato (TN-Et-PyP) spektrines savybes bei sąveiką su atskirais ląstelės komponentais ir išanalizuoti fotodinaminį šio fotosensibilizatoriaus poveikį *E. coli* KMY1 ląstelių membranų vientisumui ir funkcijoms.

Uždaviniai:

- Nustatyti TN-Et-PyP spektrines savybes ir jų pokyčius, atsirandančius dėl fotosensibilizatoriaus sąveikos su lipopolisacharidais, lipidais, baltymais bei nukleorūgštimis.
- Įvertinti morfologinius fotosensibilizuotų *E. coli* ląstelių pokyčius.
- Įvertinti fotodinaminį TN-Et-PyP poveikį *E. coli* ląstelių išorinės ir vidinės membranų pralaidumui.
- Įvertinti fotodinaminį TN-Et-PyP poveikį *E. coli* vidinės membranos funkcijoms.

Mokslinis naujumas

Šis darbas skirtas gramneigiamųjų ląstelių fotosensibilizuotos žūties, veikiant nauju tetrakacijoniniu fotosensibilizatoriumi tetrakis(N-etilpiridino-4-il)porfirino tetratozilatu (TN-Et-PyP), tyrimams. Panaudodami spektroskopinius metodus analizavome fotosensibilizatoriaus sąveiką su ląstelių komponentais, transmisinė elektroninė mikroskopija (TEM) ir enzimologiniai metodai padėjo išsiaiškinti morfologinius ir barjerinės funkcijos pokyčius, mikrobiologiniai ir elektrocheminiai metodai leido įvertinti gyvybingumą bei fiziologinę ląstelių būseną.

Buvo nustatyta, kad TN-Et-PyP agregacija bei molekulių simetrija priklauso nuo tirpiklio joninės prigimties. Be to buferiniame tirpale šis fotosensibilizatorius sudaro kompleksus su neigiamais lipopolisacharidais bei

nukleorūgštėmis. Naudojant nedideles fotosensibilizatoriaus koncentracijas, pažeidžiamas išorinės membranos vientisumas ir padidėja laidumas nedidelėms molekulėms (pvz., dezoksicholatu), tačiau didesnės šarminės fosfatazės molekulės iš ląstelės neišteka arba išteka jau išveiklintos. TN-Et-PyP koncentracijos didinimas koreliuoja su palaipsniu kvėpavimo grandinės funkcijų sutrikimu, membranos įtampos kritimu, junginių sugeriančių 260 nm šviesą (daugiausiai nukleorūgščių) ištekėjimu iš ląstelių bei viduląstelinio fermento β -galaktozidazės aktyvumo sumažėjimu. Elektroninės mikroskopijos duomenys taip pat patvirtino fotosensibilizuotų bakterijų apvalkalėlio ir ląstelių vidinių dalių pažeidimą.

Šio darbo metu gauti duomenys leidžia sukurti TN-Et-PyP fotosensibilizuotų *E. coli* ląstelių žuvimo įvykių seką, susidedančią iš keleto etapų: a) TN-Et-PyP prisijungia prie *E. coli* išorinės membranos komponentų (LPS); b) švitinant bakterijas su fotosensibilizatoriumi pažeidžiamas ląstelių išorinės membranos vientisumas; c) porfirinas pasiekia vidinę membraną, o vėliau ir citoplazmą; d) sutrinka vidinės membranos funkcijos, krinta membranos įtampa e) palaipsniui mažėja ir dingsta fermentiniai periplazminių, o vėliau ir citoplazminių baltymų aktyvumai, daugėja pažeidimų; f) toliau didėjant bakterijų apvalkalėlio laidumui, ląstelės žūsta.

aprašytomis metodikomis (Sambrook & Russell, 2001) Išskirtos plazmidės koncentracija bei švarumas vertinami elektroforetiškai bei pagal optinį tankį žinant, kad $OD_{260} = 1$ atitinka 50 $\mu\text{g/ml}$ dg DNR.

Fosfolipidinių pūslelių paruošimas. Daugiasluoksnės lipidinės pūslelės gaminamos fosfolipidų: fosfatidiletanolamino (PE), fosfatidilglicerolio (PG) ir kardiolipino (KL) (Sigma). Kiekvienas iš jų ištirpinamas chloroformo – metanolio mišinyje (sumaišytu santykiu 9:1) ir visi sumaišomi santykiu PE:PG:KL=65:18:12 (Tanford, 1980). Pūslelės gamintos pagal Cvirkaitės-Krupovič *ir kt* aprašytą metodiką (Cvirkaitė-Krupovič *ir kt*, 2010). Siekiant išvengti pūslelių agregacijos prieš kiekvieną matavimą jos paruošiamos naujai.

Lipopolisacharidų paruošimas. 10 mg *E. coli* O111-B4 lipopolisacharido (Sigma) tirpinama 1 ml PBS buferinio tirpalo (pH=7,3).

Spektriniai matavimai.

Įranga. Sugerties spektrai buvo nustatomi AvaSpec-2048 spektrofluorimetru 173-1100 nm srityje. Fluorescencijos bei sužadavimo spektrai nustatyti Perkin-Elmer spektrofluorimetru 55B, parenkant 10 nm plyšio plotį bei 200 nm/min greitį. Fluorescencija matuota 550-800 nm srityje. Žadinimo bei registravimo bangų ilgiai nurodyti po paveikslais.

Tyrimų metodika. Porfirino sąveika su BSA, NR, LPS, lipidais ir natrio dodecilsulfatu (NDS) buvo tirta stebint sugerties ir fluorescencijos bei sužadavimo spektrų pasikeitimus titruojant šiais junginiais buferinį TN-Et-PyP tirpalą (1,5 μM tirpalas – sugerties spektro pokyčiams bei 0,375 μM tirpalas ($OD_{423} = 0,1$) – fluorescencijos bei sužadavimo spektrų pokyčiams tirti). Sugerties (optinio tankio) sumažėjimas arba hipochromiškumas skaičiuojami pagal formulę:

$$[(OD_f - OD_b)/OD_f] \times 100 \text{ (Mettath et al, 1999)}$$

kur OD_f - laisvo (nesąveikaujančio su tiriamu junginiu) porfirino optinis tankis, o OD_b – optinis tankis mišinio, susidedančio iš nesąveikaujančio bei sąveikaujančio su tiriamu junginiu porfirino.

TN-Et-PyP sąveikai su ląstelėmis tirti, bakterijų suspensija PBS (pH=7,3) sumaišoma su porfirinu reikiama koncentracija ir švitinama (mėginius nuolat maišant) LED, kurio sklaidžiamos šviesos maksimumas yra 415 nm, palaipsniui didinant šviesos dozę iki 72 J/cm². Po kiekvieno švitinimo nustatomi fotosensibilizatoriaus sugerties, fluorescencijos bei sužadavimo spektrai. Kita serija eksperimentų atlikta analogiškai, tačiau po švitinimo arba atitinkamo inkubavimo laiko tamsoje ląstelės atskiriamos nuo supernatanto centrifuguojant (15000 g, 15 min). Sugerties, sužadavimo bei fluorescencijos spektrai nustatomi ir supernatantuose, ir ląstelėse, po centrifugavimo suspenduotose PBS buferiniame tirpale. Visi gauti spektrai apdoroti Origin 7.5 programa. Detalesnė informacija pateikiama po paveikslais.

Bakterijų auginimas ir fotosensibilizacija. Šiame darbe naudotos *E. coli* KMY1 ląstelės (MK12 λ RS45[Φ (emrK'-lacZ)] (Kato *et al*, 2000; Egushi *et al*, 2003) gautos iš prof. R. Utsumi (Kinki universitetas, Japonija). *E. coli* KMY1 ląstelės auginamos per naktį Petri lėkštelėse su BHI arba Luria Bertani (LB) agarizuota terpe, suspenduojamos skystoje BHI arba LB terpėje ir nusodinamos centrifuguojant po 40 min auginimo 37°C temperatūroje. Nuosėdos du kartus praplaunamos steriliu PBS (pH=7,3) ir praskiedžiamos šiuo buferiniu tirpalu iki 1x10⁸ kolonijas sudarančių vienetų (ksv/ml). Pridėjus fotosensibilizatoriaus iki 0 μ M; 0,1 μ M; 0,25 μ M; 0,35 μ M; 0,5 μ M; 0,75 μ M; 1 μ M ; 1,5 μ M; 1,775 μ M; 2,5 μ M; and 3,5 μ M galutinės koncentracijos, ląstelės 30 min laikomos tamsoje, mėginius maišant, po to ląstelės švitinamos LED, kurio sklaidžiamos šviesos maksimumas yra 415 nm arba LED, kurio sklaidžiamos šviesos maksimumas 400 nm (dozė 20 J/cm²). Ląstelių gyvybingumas nustatomas mėginius skiedžiant PBS buferiu ir išsėjant Petri lėkštelėse su BHI arba LB agarizuota terpe. Lėkštelės inkubuojamos 37°C temperatūroje 15-16 val ir skaičiuojamos užaugusios kolonijos.

TN-Et-PyP surišimo ląstelėse tyrimai. *E. coli* KMY1 ląstelių suspensija paruošiama kaip aprašyta anksčiau. Į mėginius pridedama fotosensibilizatoriaus iki 0,25 μM; 0,5 μM; 1 μM; 1,5 μM; 2,5 μM; 3,5 μM galutinės koncentracijos. Mėginiai, juos nuolat maišant, 30 min inkubuojami tamsoje, po to ląstelės nusodinamos centrifuguojant (3000 g, 10 min) ir praplaunamos 1-3 kartus PBS buferiu (pH=7,3). Nuosėdos resuspenduojamos 1 ml 2% vandeninio NDS tirpalo ir paliekamos tamsoje 24 val. Jei reikia, mėginys praskiedžiamas ir išmatuojama jo fluorescencija 550-720 nm spektro srityje, žadinant 430 nm bangos ilgio šviesa. Baltymo koncentracijai mėginiuose nustatyti naudojamas BCA metodas („Thermo Scientific“). Eksperimentas kartojamas 3 kartus.

Ląstelių paruošimas TEM. *E. coli* KMY1 ląstelių suspensija paruošiama kaip aprašyta anksčiau, ji praskiedžiama PBS buferiu iki ~ 5x10⁸ ksv/ml ir pridedama TN-Et-PyP iki galutinės 0,25 μM ir 1 μM koncentracijos. Ląstelės inkubuojamos 30 min tamsoje ir dalis mėginių švitinami LED, kurio skleidžiamos šviesos bangos ilgio maksimumas yra 415 nm (dozė 20 J/cm²). Po to ląstelės nusodinamos centrifuguojant (3000 g, 10 min), praplaunamos PBS ir paruošiamos elektroninei mikroskopijai pagal Bozzola ir Russell rekomendacijas (Bozzola & Russell, 1999). Paruošti pavyzdžiai stebimi transmisiniu elektroniniu mikroskopu Hitachi H600.

Bakterijos apvalkalėlio vientisumo įvertinimas. Išorinės membranos laidumo padidėjimas buvo įvertintas pagal natrio dezoksicholato patekimą į ląsteles bei periplazminio fermento šarminės fosfatazės aktyvumo pokyčius ląstelių viduje bei už jų ribų. Apie vidinės membranos vientisumą buvo sprendžiama pagal citoplazminės β-galaktozidazės aktyvumo pokyčius ir medžiagų, sugeriančių 260 nm bangos ilgio šviesą, ištekėjimą iš ląstelės. Baltymų kiekio pokyčiai ląstelių viduje bei išorėje atspindėjo abiejų membranų būsenas. Metodas leidžiantis įvertinti išorinės membranos pralaidumą modifikuotas pagal J. A. Bengoechea. *ir kt.* bei R. Rasul *ir kt* aprašytąjį. Ląstelės, paveiktos 0,1 μM; 0,25 μM; 0,5 μM; 0,75

μM ; 1 μM ; 1,5 μM ; 2,5 μM ir 3,5 μM TN-Et-PyP, buvo 6 kartus plaunamos PBS (pH=7.3) buferiniu tirpalu, prieš suspenduojant jas natrio dezoksicholato tirpale. Po to mėginiai inkubuojami 30 min 37°C temperatūroje ir ląstelių lizė įvertinama pagal OD₆₀₀ sumažėjimą. Matuotas 50 $\mu\text{g/ml}$ polimiksino B sulfatu visiškai suardytų ląstelių OD₆₀₀.

Fermentinio aktyvumo įvertinimas. Skirtingomis koncentracijomis TN-Et-PyP fotosensibilizuotos ląstelės nusodinamos centrifuguojant (15000 g, 15 min 4°C). Nuosėdos resuspenduojamos PBS buferyje su proteazių slopikliu TLCK ir ardomos ultragarsu 30 min. Suardytų ląstelių nuolaužos atskiriamos centrifuguojant (15000 g, 15 min at 4°C). β -Galaktozidazės ir šarminės fosfatazės fermentinis aktyvumas nustatomas tiek grubiam ląstelių ekstrakte, tiek ir supernatante, likusiame atskyrus ląsteles po fotosensibilizacijos. Fermentiniam aktyvumui nustatyti naudotos šiek tiek modifikuotos Milerio bei Dean metodikos (Miller, 1972; Dean, 2002). Baltymų kiekis mėginiuose įvertintas BCA metodu pagal gamintojų rekomendacijas.

Medžiagų, sugeriančių 260 nm bangos ilgio šviesą, ištekėjimo iš ląstelių įvertinimas. Mėginiai buvo paruošti kaip aprašyta skyrelyje „Fermentinio aktyvumo įvertinimas“.

Elektrocheminių parametų matavimas. Elektrocheminiams parametrams nustatyti reikia daug bakterijų ląstelių, todėl *E. coli* KMY1 buvo auginta LB terpėje 37°C temperatūroje iki OD₆₀₀ = 1,0; ląstelės nusodinamos centrifuguojant (7500 g, 15 min) ir sukonzentruojamos PBS buferiniame tirpale (pH=7,3). Bakterijų membranos įtampos pakitimai stebimi pagal tetrafenilfosfonio jonų (TPP⁺) koncentracijos pasikeitimą terpėje, kuris registruojamas TPP⁺ atrankiais elektrodais. Po sistemos kalibravimo į termostatuotą matavimo kiuvetę įpilama ląstelių suspensija, kurios galutinė koncentracija 5ml 0,1 M Tris-HCl buferio (pH=8,0) su 10 mM EDTA yra $\sim 3 \times 10^8$ ksv/ml. Nusistovėjus jonų srautams iš ląstelių ir į jas, pridėdamas TN-Et-PyP, kurio galutinė koncentracija kiuvetėje

siekia 0,1 μM ; 0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM . Viena iš kiuvečių laikoma tamsoje, o kita apšviečiama LED, kurio sklaidžiamos šviesos maksimumas 400 nm (šviesos dozė 20 J/cm^2). Eksperimento pabaigoje ląstelės depoliarizuojamos 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polimiksino B sulfato.

Bakterijų kvėpavimo grandinės veiklos efektyvumas įvertinamas matuojant deguonies sunaudojimą atrankiu elektrodu. Dėl prietaiso konstrukcijos buvo neįmanoma fotosensibilizuoti ląstelių tiesiai matavimo kiuvetėse, todėl ši procedūra buvo atlikta prieš matavimą. Po fotosensibilizacijos *E. coli* KMY1 ląstelės praskiedžiamos 0,1 M Tris-HCl (pH=8,0) buferiniu tirpalu iki galutinės $\sim 6 \times 10^7$ ksv/ml ląstelių koncentracijos matavimo kiuvetėje. Naudotos 2 mM skyriklio 2,4-dinitrofenolio (DNF) ir 0.1 M energijos šaltinio (gliukozės) koncentracijos. Eksperimentai pakartoti 2-3 kartus.

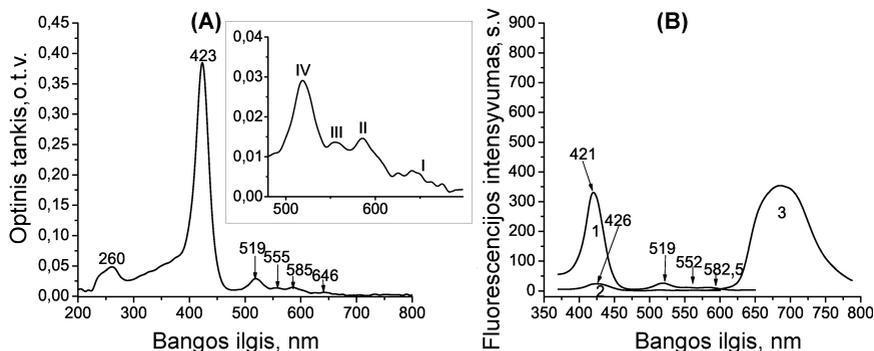
2. REZULTATAI

2.1. TN-Et-PyP sąveikos su ląstelės komponentais spektrinė analizė.

Savo forma bei smailių skaičiumi porfirinų grupės junginių sugerties ir fluorescencijos spektrai yra panašūs (Rotomskis *ir kt.*, 2002; Streckytė *ir kt.*, 2008), tačiau tiksli smailių padėtis priklauso nuo molekulės struktūros. Analizuojant spektrinius pokyčius, atsirandančius dėl tetrakis(*N*-etilpiridino-4-yl)porfirino tetratozilato (TN-Et-PyP) sąveikos su ląstelės komponentais, svarbu atskirti šiam fotosensibilizatoriui būdingas spektrines savybes bei jų pokyčius nuo pokyčių, atspindinčių jo sąveiką su kitais junginiais. Pirmajame darbo etape buvo ištirti spektriniai TN-Et-PyP bruožai bei jų priklausomybė nuo tirpiklio prigimties, pH ir inkubacijos laiko.

2.1.1. TN-Et-PyP spektroskopija

Yra žinoma, kad porfirinų sugerties spektro pokyčiai atspindi šių junginių molekulinę struktūrą, agregaciją ir sąveiką su kitomis molekulėmis. Tradiciškai porfirininių junginių sugerties spektrai sudaryti iš mažo intensyvumo γ juostos UV srityje, Soret juostos (sugerties maksimumas $\sim 400 - 420$ nm) bei keleto Q juostų regimoje srityje (450 – 700 nm). γ juosta dažnai sutampa su daugelio kitų junginių (pvz., nukleorūgščių, amino rūgščių) sugertimi, todėl ji retai naudojama spektrinei analizei. Q juostų pakitimai rodo struktūrinius fotosensibilizatoriaus pokyčius (metalo prijungimą, protonizaciją/ deprotonizaciją ir pan.), tuo tarpu Soret juostos pokyčiai atspindi santykį tarp agregatų ir monomerų bei jo kitimą, taip pat sąveiką su kitais junginiais. Porfirinų fluorescencijos spektrams būdingos dvi juostos, kurių intensyvumas ir padėtis labai priklauso nuo junginio cheminės struktūros bei tirpiklio prigimties (Rotomskis *ir kt.*, 2002). 2 pav. pateiktos TN-Et-PyP spektrinės charakteristikos.

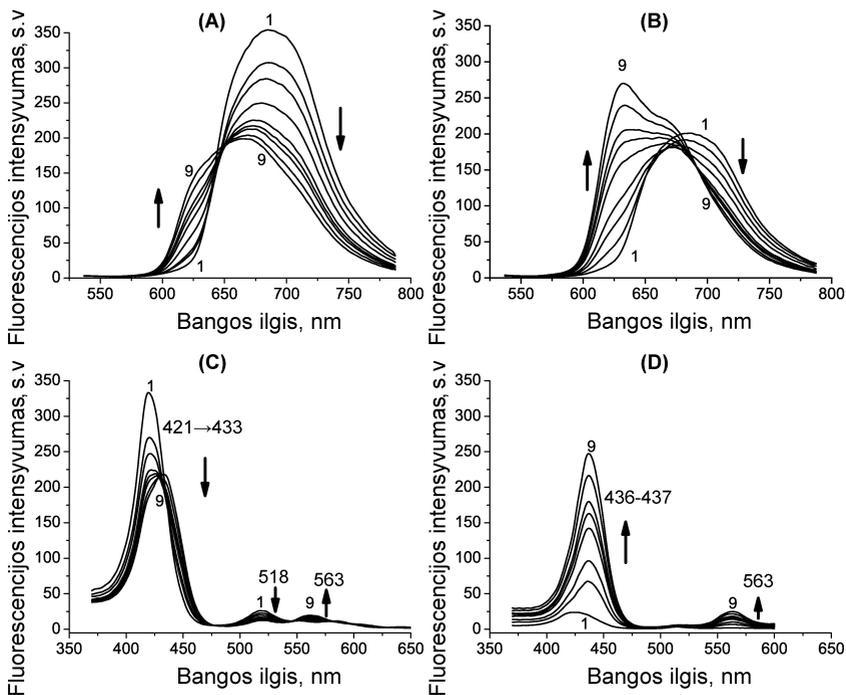


2 pav. TN-Et-PyP spektrinės charakteristikos: optinis tankis (arba sugerties spektras) (A) bei fluorescencijos ir sužadavimo spektrai (B). Sugerties spektrui gauti naudotas 1,5 μM TN-Et-PyP koncentracijos tirpalas PBS buferiniame tirpale (pH=7,3); sužadavimo ir fluorescencijos spektrams gauti naudotas 0,375 μM (atitinka 0,1 o. t. v sugertį, kai $\lambda = 423\text{nm}$) porfirino tirpalas PBS buferyje (pH=7,3). Kreivė 1 (B) grafike atitinka sužadavimo spektrą, registruojant $\lambda = 670$ nm, kreivė 2 – registruojant $\lambda = 623$ nm, kreivė 3 – fluorescencijos spektras, žadinant 423 nm bangos ilgio šviesa.

Fosfatiniame buferyje tirpinto TN-Et-PyP sugerties spektras sudarytas iš γ juostos (maksimumas 260 nm), Soret juostos (423 nm) ir keturių Q juostų (519 nm, 555 nm, 585 nm, 646 nm), kurių intensyvumas mažėja IV>II>III>I tvarka („filo“ tipo išsidėstymas). Varpo formos fluorescencijos spektras leidžia manyti, jog porfirino molekulės buferiniame tirpale sudaro agregatus, dėl to abi porfirinams būdingos fluorescencijos smailės priartėja viena prie kitos ir suformuoja platesnę bendrą smailę.

Ilgalaikė TN-Et-PyP inkubacija kambario temperatūroje leidžia įvertinti PBS buferyje (pH=7,3) tirpinto fotosensibilizatoriaus spektrinių charakteristikų stabilumą, į kurį reikia atsižvelgti dirbant su ląstelių suspensijomis šiame tirpale. Gauti rezultatai parodė dviejų fotosensibilizatoriaus formų egzistavimą PBS buferiniame tirpale. Vienai formai (3 pav., A, C) būdingas sužadavimo spektras kurio maksimumas yra 421 nm, bei mažesnio intensyvumo

518 nm ir 563 nm smailės. Ilgainiui ji virsta kita forma, kuriai būdingas 437 nm sužadavimo maksimumas (žr. 3 pav.) ir tik viena mažesnio intensyvumo 563 nm smailė (3 pav., B, D).



3 pav. Dviejų TN-Et-PyP formų susidarymas PBS (pH=7,3) tirpale, inkubuojant jį tamsoje. Fluorescencijos (A, B) bei sužadavimo (C, D) spektrai. Ištirpinus 0,375 μ M TN-Et-PyP ($OD_{423} = 0,1$) PBS buferiniame tirpale, mėginys inkubuojamas tamsoje 0 min, 5 min, 30 min, 1 val, 2 val, 2,5 val, 3 val, 4 val, 5 val. (1-9 kreivės) ir kiekvieną kartą nustatomi fluorescencijos bei sužadavimo spektrai. Žadinama 423 nm (A), 435 nm bangos ilgio šviesa (B), sužadavimo spektras registruojamas $\lambda = 670$ nm (C) ir $\lambda = 623$ (D). Rodyklės parodo atitinkamų juostų intensyvumo kitimo kryptį, pradedant 1 kreive, baigiant 9.

Šių dviejų formų susidarymas pagreitinamas kaitinant TN-Et-PyP buferinį tirpalą, tačiau jį atšaldžius atvirkštinis virsmas nebevyksta (duomenys nepateikti). Išanalizavus sugerties, fluorescencijos bei sužadavimo spektrų pokyčius inkubuojant etanolinius TN-Et-PyP tirpalus paaiškėjo, jog antrosios

porfirino formos atsiradimas priklauso nuo etanolio koncentracijos tirpale bei inkubacijos laiko: 50% etanolio tirpale ši konversija vyksta daug greičiau nei 96% etanolio tirpale, tačiau lėčiau nei buferiniame PBS tirpale (duomenys nepateikti).

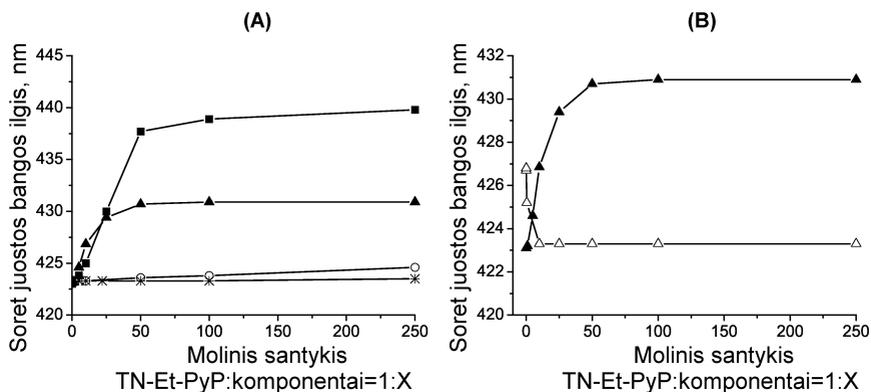
Pastebėtas sužadavimo bei sugerties maksimumų poslinkis į ilgesnių bangų sritį bei palapsnis 518 nm smailės išnykimas kartu su Q juostų skaičiaus sumažėjimu leidžia teigti, kad TN-Et-PyP spektrinės savybės buferiniame tirpale yra nepastovios ir rodo TN-Et-PyP pirolų grupės azotų arba imino grupės azotų protonizaciją ar deprotonizaciją, dėl kurių molekulės simetrija pasikeičia iš D_{2b} į D_{4b} . Labiau tikėtina, jog pirolų grupės azotas atiduoda protoną metilsulfobenzoinei rūgščiai, kurios sugebėjimas sąveikauti su žiedu gali priklausyti nuo joninės tirpiklio prigimties. Šią prielaidą patvirtina ir tai, jog fotosensibilizatorių ištirpinus 96% etanolyje porfirino molekulės simetrijos pasikeitimas vyksta ypač lėtai, tačiau pagreitinėja, ištirpinus jį 50% etanolyje. Mažiau tikėtina, jog TN-Et-PyP molekulės sudaro dimerus tokiu būdu, kad vienos molekulės pirolų azotas protonizuotų kitos molekulės imino grupės azotą, tačiau tokios galimybės visiškai atmesti negalima. Kaip jau minėta, į visus šiuos spektrinius pokyčius reikia atsižvelgti, tiriant TN-Et-PyP sąveiką su ląstelės komponentais.

3.1.2. TN-Et-PyP sąveika su ląstelės komponentais modelinėse sistemose.

TN-Et-PyP ir atskirų ląstelės komponentų sąveikos tyrimai leistų labiau detalizuoti dar ne visiškai išaiškintus pradinius bakterijų fotosensibilizacijos mechanizmo etapus. Ši sąveika buvo tirta paprastose modelinėse sistemose, sudarytose iš TN-Et-PyP bei tiriamo komponento, nes sudėtingose sistemose (bakterinėje ląstelėje) gautus rezultatus labai sunku interpretuoti.

Titruojant 1,5 μM TN-Et-PyP tirpalą PBS ($\text{pH}=7,3$) vis didėjančiomis lipopolisacharido (LPS), lipidų, jaučio serumo albuminu (JSA), nukleorūgščių (NR) koncentracijomis paaiškėjo, jog tik LPS bei NR buvimas tirpale sukelia 7,8 bei 17 nm Soret juostos pasislinkimą į ilgabangę spektro sritį (4 pav.). Šis

batochrominis poslinkis yra vienas iš požymių, rodančių sąveikaujančių medžiagų komplekso susidarymą. Nustatant NR - porfirino sąveikos pobūdį, be kitų kriterijų, įprasta remtis sugerties intensyvumo sumažėjimo verte bei Soret juostos poslinkiu. Todėl sugerties intensyvumo sumažėjimas daugiau nei 35% (šiuo atveju 41%) kartu su 17 nm Soret juostos poslinkiu leidžia manyti, jog TN-Et-PyP įsiterpia (interkaluoja) į nukleorūgštis.

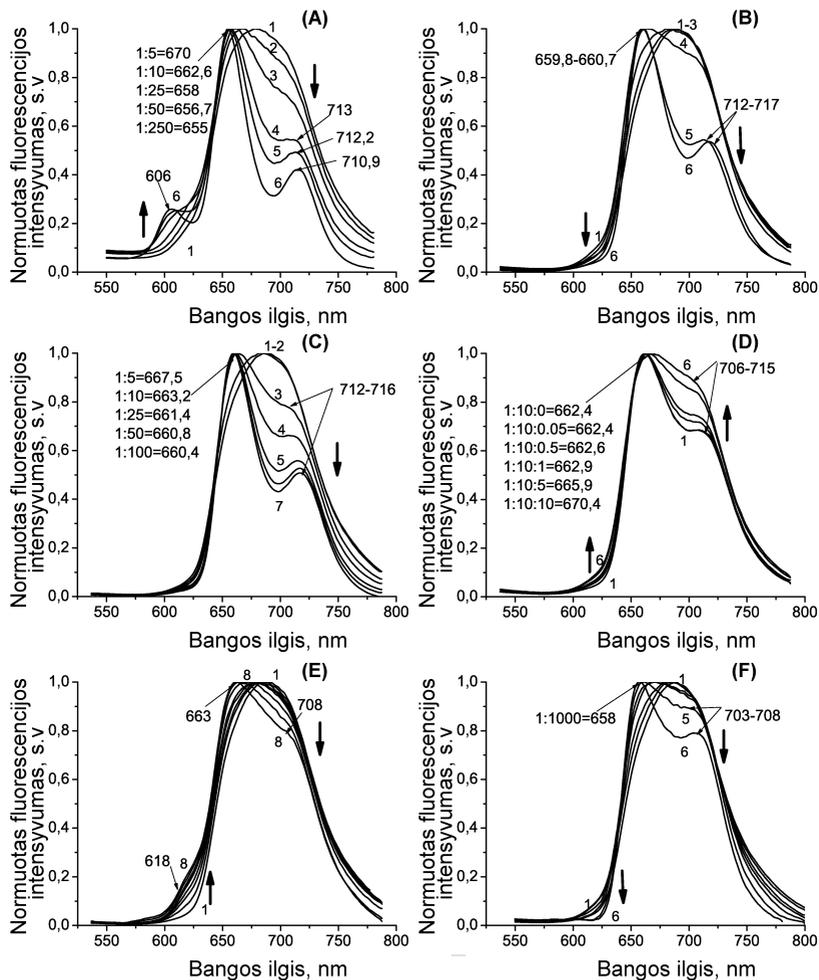


4 pav. TN-Et-PyP sugerties spektro Soret juostos poslinkis atsirandantis fotosensibilizatoriui sąveikaujant su ląstelės komponentais (A) bei palaipsniui disocijuojant porfirino-LPS kompleksui pridėjus $MgCl_2$ (B). 1,5 μM TN-Et-PyP tirpalas PBS (pH=7,3) titruojamas vis didėjančia NR (■), LPS (▲), JSA (○) ir lipidų (*) koncentracija. (B) grafike palygintas tokio paties porfirino tirpalo titravimas LPS (▲) su TN-Et-PyP-LPS kompleksu palaipsniui didėjančia $MgCl_2$ koncentracija (Δ). TN-Et-PyP kompleksas su LPS gaunamas sumaišius buferinius abiejų komponentų tirpalus santykiu 1:10, o po to šis mišinys titruojamas $MgCl_2$.

Gerai žinoma, jog divalentiškai Mg^{2+} ir Ca^{2+} jonai stabilizuoja išorinės membranos struktūrą, neutralizuodami neigiamos krūvio grupes, esančias gretimose LPS molekulėse. Norėdami sužinoti šių jonų įtaką TN-Et-PyP prisijungimui prie ląstelės apvalkalėlio, nusprendėme ištirti porfirino-LPS komplekso likimą, aplinkoje atsiradus Mg^{2+} . 4 pav., B pateikti rezultatai rodo, kad padidėjus šių jonų koncentracijai terpėje, kompleksas pradeda irti, todėl fotosensibilizatoriaus spektras pamažu keičiasi į pradinį, būdingą TN-Et-PyP ištirpintam PBS buferyje. Tai rodo, jog porfirino ir LPS sąveika yra elektrostatinės

prigimties ir Mg^{2+} bei fotosensibilizatorius konkuruoja dėl sąveikos su LPS molekulėmis.

Fluorescencijos matavimas yra daug jautresnis nei UV-VIS sugerties matavimas, todėl TN-Et-PyP sąveikos su ląstelės komponentais tyrimai būtų neišsamūs be šių duomenų. Parodyta, jog porfirinui sąveikaujant su atskirais komponentais, fluorescencijos spektrų forma keičiasi iš gauso (arba varpo formos) kreivės į du fluorescencijos maksimumus turinčią kreivę (5 pav.). Tačiau ląstelės komponentų koncentracija, reikalinga pokyčiui į vieną ar kitą pusę varijuoja nuo labai didelių (JSA – 0,375 mM, lipidų - 0,56 mM) iki gana mažų (3,75 μ M $MgCl_2$).



5 pav. TN-Et-PyP fluorescencijos spektras (žadinant 423 nm bangos ilgio šviesa). TN-Et-PyP tirpalas PBS buferyje ($OT_{423} = 0,1$) tituojamas vis didėjančia pasirinktų ląstelės komponentų koncentracija. Didesnės ryškios rodyklės rodo atitinkamų juostų intensyvumo kitimo kryptį, mažesnės – smailės padėtį. A - TN-Et-PyP tirpalas titruotas grynosios plazmidės DNR tirpalu, moliniu santykiu porfirinas:NR = 1:0; 1:5; 1:10; 1:25; 1:50; 1:250 (kreivės 1-6). B - TN-Et-PyP tirpalas titruotas NDS tirpalu, moliniu santykiu porfirinas:NDS = 1:0; 1:10; 1:50; 1:100; 1:250; 1:500 (kreivės 1-6). C - TN-Et-PyP tirpalas titruotas LPS tirpalu moliniu santykiu porfirinas:LPS = 1:0; 1:0.5; 1:5; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100 (kreivės 1-7). D - TN-Et-PyP tirpalas sumaišytas su LPS tirpalu moliniu santykiu 1:10 ir titruotas $MgCl_2$ tirpalu moliniu santykiu porfirinas:LPS: $MgCl_2$ = 1:10:0; 1:10:0.05; 1:10:0.5; 1:10:1; 1:10:5; 1:10:10; (kreivės 1-6). E - TN-Et-PyP tirpalas titruotas lipidų tirpalu moliniu santykiu porfirinas:lipidai = 1:0; 1:5; 1:10; 1:22; 1:50; 1:250; 1:500; 1:1500 (kreivės 1-8). F - TN-Et-PyP tirpalas titruotas JSA tirpalu moliniu santykiu porfirinas:BSA = 1:0; 1:10; 1:50; 1:250; 1:500; 1:1000 (kreivės 1-6).

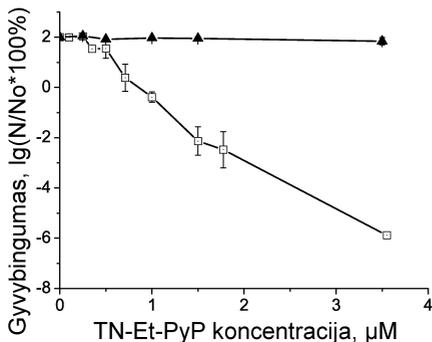
Apibendrinant šiame skyriuje pateiktus duomenis, svarbu pažymėti, jog tirtų ląstelės komponentų buvimas aplinkoje modifikuoja TN-Et-PyP molekulių simetrijos kaitą skirtingais būdais. Neigiamo krūvio NDS, LPS bei NR monomerizuoja katijoninio fotosensibilizatoriaus molekules, sudarydami su jomis kompleksus, kurių atsiradimas pasireiškia spektrinių porfirino savybių (tokių kaip 7,8 - 17 nm Soret juostos poslinkis į ilgabangę sugerties spektro sritį, porfirinų monomerams būdingos fluorescencijos spektrų formos su dviemėmis raiškiomis juostomis atsiradimas) pokyčiu. Tuo tarpu TN-Et-PyP sąveika su JSA bei lipidais labai nežymi, tačiau Q juostų skaičiaus sumažėjimo nebuvimas sugerties spektruose, neraiškios smailės fluorescencijos spektruose bei faktas, jog sužadavimo spektruose nevyrauja 563 nm smailė, leidžia daryti prielaidą apie kitokio pobūdžio (galbūt susijusio su tirpiklio savybių pasikeitimu) slopinantį poveikį TN-Et-PyP simetrijos kaitai.

3.2. Fotosensibilizuota *E. coli* KMY1 ląstelių žūtis

Siekiant apšvitinti gilesnius audinių sluoksnius bei išvengti šalutinių reiškinių, atsirandančių dėl stiprios audinių sugerties matomojoje spektro dalyje, fotodinaminėje terapijoje naudojami raudonos šviesos šaltiniai ($\lambda > 600$ nm), nors porfirinų grupei priklausantys junginiai stipriausiai sugeria 400 – 420 nm bangos ilgio šviesą. Tokio bangos ilgio šviesa netinkama vėžiui gydyti dėl nedidelės skvarbos į audinius, tačiau galėtų tikti paviršinių mikrobinių infekcijų gydymui. Atsižvelgiant į tai, kad trumpesnio bangos ilgio šviesa charakterizuojama didesne energija, švitinimo periodas, reikalingas bakterijoms išnaikinti, turėtų būti daug trumpesnis. Pradiniai tyrimai patvirtina, kad apšvietus *E. coli* mėlyna šviesa kai terpėje yra porfirino, ląstelės žuvo greičiau nei apšvietus jas raudona ar žalia šviesa (Nitzan & Ashkenazi, 2001).

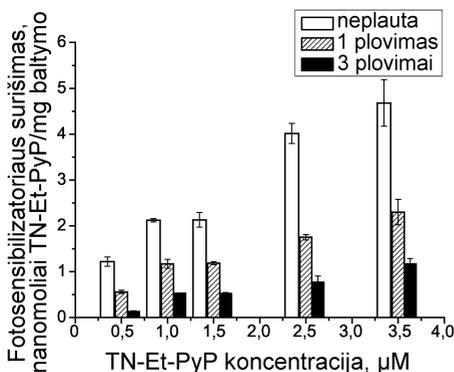
Tiriant *E. coli* KMY1 gyvybingumą paaiškėjo, kad net didžiausia naudota porfirino koncentracija (3,5 μ M) nesukelia pastebimo gyvybingumo

sumažėjimo kol ląstelės inkubuojamos tamsoje. Tačiau jas švitinant LED, kurių skleidžiamos šviesos maksimumas yra 415 nm arba 400 nm, gyvybingumas palaipsniui mažėja 6 eilėmis (6 pav.).



6 pav. *E. coli* KMY1 gyvybingumas fotosensibilizuojant bakterijas skirtingomis TN-Et-PyP koncentracijomis. Šviesos šaltinis LED, kurio skleidžiamos šviesos bangos ilgio maksimumas 415 nm, dozė 20 J/cm². (▲- ląstelių suspensija inkubuota su TN-Et-PyP tamsoje, □ - ląstelių suspensija inkubuota su TN-Et-PyP tamsoje ir švitinta.).

Didėjant TN-Et-PyP koncentracijai vis daugiau porfirino prisijungia prie ląstelių tamsoje, tačiau išotinis nepasiekiamas net naudojant 3,5 µM fotosensibilizatoriaus koncentraciją (7 pav.).



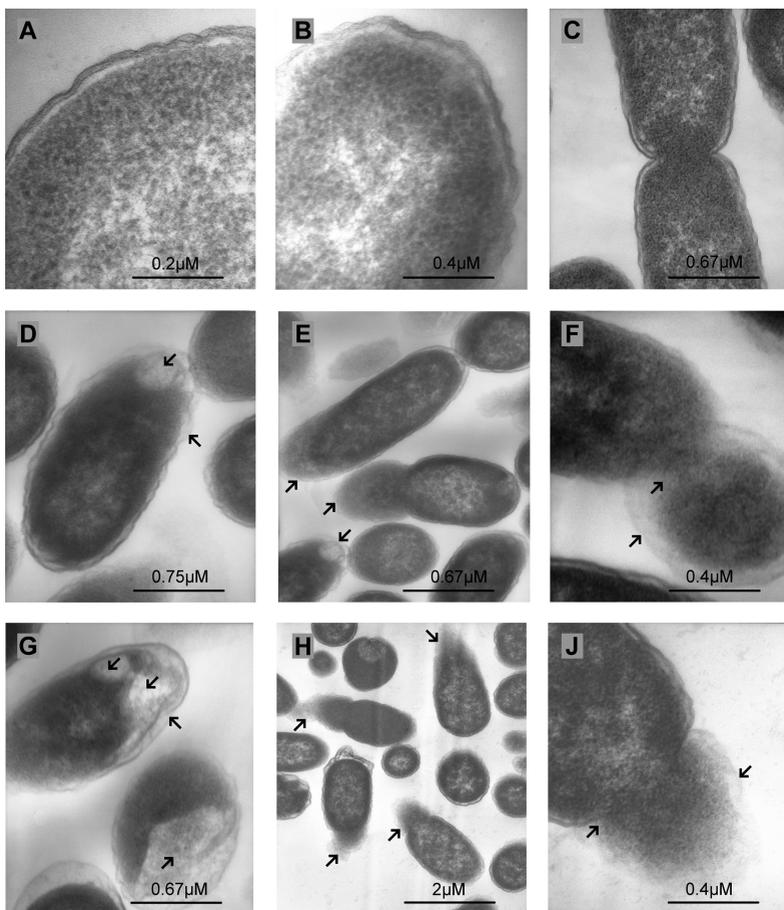
7 pav. TN-Et-PyP prisijungimas prie *E. coli* KMY1 ląstelių, 30min inkubuojant jas tamsoje su skirtinga fotosensibilizatoriaus koncentracija.

Rezultatai rodo, kad dalis fotosensibilizatoriaus lieka prisijungusi prie ląstelių net praplovus jas buferiniu tirpalu 1-3 kartus. Iš to galima daryti prielaidą, jog TN-Et-PyP lokalizuotas gilesniuose išorinės ląstelės membranos sluoksniuose, galbūt LPS vidinės šerdies srityje, o teigiami pakaitai porfirino mezo padėtyse palengvina sąveiką su neigiamomis LPS grupėmis (4 ir 5 pav.).

3.3. Morfologiniai *E. coli* KMY1 ląstelių pokyčiai, fotosensibilizuojant jas TN-Et-PyP

Ankstesni fotosensibilizacijos tyrimai parodė, kad švitinimo metu pažeidžiami ir ląstelės apvalkalėlis, ir citoplazmoje esantys baltymai bei genetinė medžiaga, tačiau naudojant porfirininės struktūros junginius, pirmose proceso stadijose vyrauja apvalkalėlio pažaidos (Wainwright, 1998; Jori & Coppellotti, 2007; Salmon-Divon *ir kt.*, 2004). Besidalinančios ląstelės bei ryškūs išorinės membranos kontūrai elektroninės mikroskopijos nuotraukose rodo, jog nei tamsoje su TN-ET-PyP inkubuotos ląstelės, nei ląstelės, švitintos be fotosensibilizatoriaus, nėra pažeidžiamos (8 pav., A-C).

Švitinant ląsteles su 0,25 μM TN-Et-PyP (8 pav., D-G) pažeidžiama išorinė bakterijų membrana, tai rodo neryškus šių ląstelės dalių kontūras. Tikėtina, jog dėl membranos pažaidų padidėja jos laidumas, be to, ląstelės vidun patekus fotosensibilizatoriaus molekulėms, pažaidų mastas išsiplečia, jos mikrografijose matomos kaip baltos dėmės ląstelių viduje. Taip pat, pažeidus vidinę membraną, vidinis ląstelių turinys viename iš ląstelės polių sudaro didelės pūslelės pavidalo struktūrą, apsuptą pažeista išorine membrana (8 pav., F). Tačiau ląstelių suformavusių pūsleles nėra daug, ir tai gerai dera su nedideliu ląstelių gyvybingumo sumažėjimu (6 pav.). Švitinant ląsteles su didesne (1 μM) TN-Et-PyP koncentracija, stebimos abiejų membranų pažaidos, vidinio ląstelių turinio ištekėjimas į aplinką sprogus susidariusiai pūslelei (8 pav., H-J). Labai pažeistų ląstelių padaugėja ir atitinkamai sumažėja bakterijų gyvybingumas.

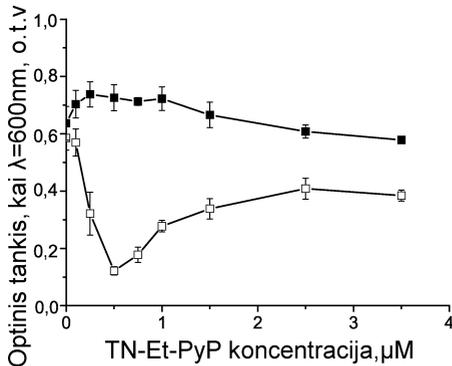


8 pav. TN-Et-PyP fotosensibilizuotų *E. coli* KMY1 ląstelių elektroninės mikroskopijos nuotraukos. Bakterijos suspenduotos 0,1 M PBS (pH=7,3), galutinė jų koncentracija buferiniame tirpale – 3×10^8 ksv/ml. Ši suspensija 30 min inkubuojama tamsoje su tam tikromis TN-Et-PyP koncentracijomis, mėginiai nuolat maišant. Po to mėginiai švitinami LED, kurio skleidžiamos šviesos bangos ilgio maksimumas yra 415 nm (šviesos dozė 20 J/cm^2). A – ląstelės inkubuotos be fotosensibilizatoriaus ir nešvitintos; B – ląstelės inkubuotos tamsoje su $1 \mu\text{M}$ Tn-Et-PyP, bet nešvitintos; C – ląstelės švitintos be fotosensibilizatoriaus; D, E, F, G – ląstelės inkubuotos tamsoje su $0,25 \mu\text{M}$ Tn-Et-PyP ir švitintos; H, J – ląstelės inkubuotos tamsoje su $1 \mu\text{M}$ Tn-Et-PyP ir švitintos. Juodos rodyklės rodo pažeidų vietą ląstelėje.

3.4. Išorinės ir vidinės membranų laidinimas fotosensibilizacijos metu

Apie padidėjusį membranų laidumą dažniausiai sprendžiama pagal tam tikrų ląstelės komponentų ištekėjimą iš ląstelės. Padidėjusi periplazminio fermento šarminės fosfatazės koncentracija ląstelių aplinkoje rodo išorinės membranos laidumo padidėjimą, o padidėjusi β -galaktozidazės koncentracija liudija vidinės membranos vientisumo pažeidimus, kuriuos lydi 260 nm bangos ilgio šviesa sugeriančių junginių ištekėjimas iš ląstelių (Caminos *ir kt*, 2008). Didžiąją šių junginių dalį sudaro DNR ir RNR.

Yra žinoma, kad natrio dezoksicholatas skatina bakterijų lizę, jei išorinė ląstelių membrana pažeista (Bengochea *ir kt*, 1996; Rasul *ir kt*, 2010). Šis procesas stebėtas matuojant bakterijų suspensijos optinio tankio (sugerties) pasikeitimus (kai $\lambda = 600$ nm). Kaip matyti iš 9 pav., ląstelės inkubuotos su skirtingomis TN-Et-PyP koncentracijomis tamsoje beveik nelizuoja.

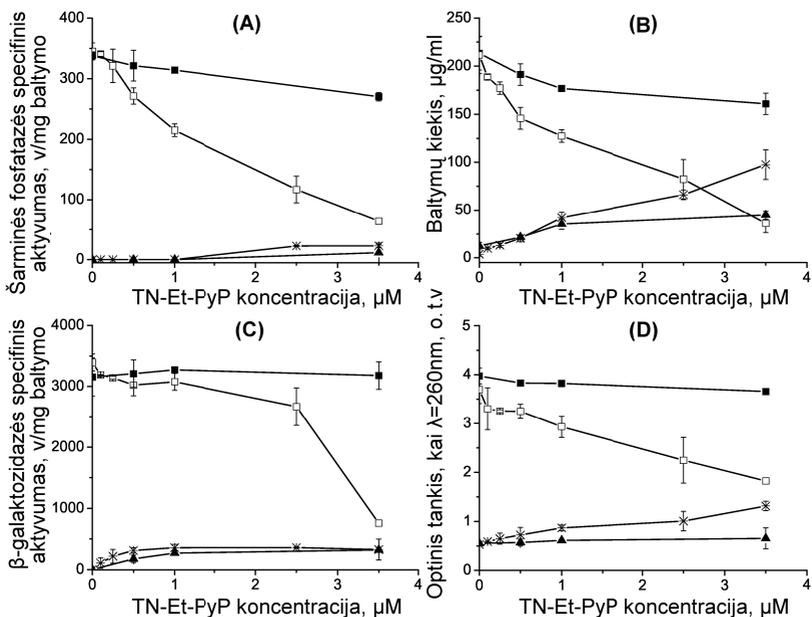


9 pav. Išorinės *E. coli* KMY1 ląstelių membranos vientisumo įvertinimas. Išorinės membranos laidumas vertintas pagal optinio tankio arba sugerties ($\lambda = 600$ nm) pokyčių lizuojant ląsteles natrio dezoksicholatu. ■ - ląstelės inkubuotos tamsoje su tam tikra TN-Et-PyP koncentracija, □ - ląstelės inkubuotos tamsoje ir švitintos su tam tikra TN-Et-PyP koncentracija.

Švitinant *E. coli* KMY1 net su gana nedidelėmis TN-Et-PyP koncentracijomis (0,5 μM) ląstelės lizuoja beveik taip pat stipriai, kaip ir paveikus jas 38,4 μM (arba 50 $\mu\text{g/ml}$) polimiksino B sulfato, kuris dažnai naudojamas išorinei gramneigiamųjų ląstelių membranai suardyti. Deja, padidinus fotosensibilizatoriaus koncentraciją sugerties mažėjimas dėl ląstelių lizės yra kompensuojamas padidėjusiu su ląstelių komponentais sąveikavusio porfirino

kiekiu, kuris patenka į aplinką ląstelei suirus ir sugeria tam tikrą dalį šviesos. Šią prielaidą patvirtina spektroskopiniai tyrimai parodę, jog ir LPS, ir NR gali sudaryti kompleksus su TN-Et-PyP (4-5 pav.).

Siekiant ištirti vidinės ir išorinės membranų laidumo pokyčius, atsiradusius dėl fotodinaminio poveikio, buvo stebimas periplazminės šarminės fosfatazės ir β -galaktozidazės, esančios nepažeistos ląstelės citoplazmoje, fermentinio aktyvumo kitimas bei baltymų ir medžiagų (daugiausiai NR), sugeriančių 260 nm bangos ilgio šviesą, ištekėjimas iš ląstelės (10 pav., A-C). Gauti duomenys rodo, jog nei šarminės fosfatazės, nei β -galaktozidazės fermentiniai aktyvumai terpėje nesustiprėja, tačiau jie abu palaipsniui silpnėja ląstelių frakcijoje.

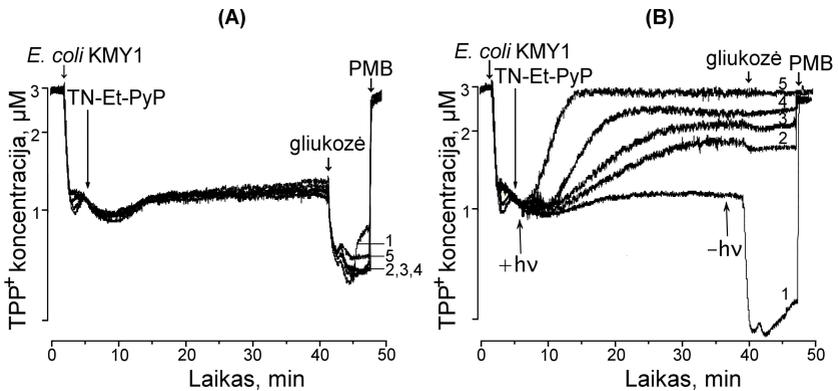


10 pav. *E. coli* KMY1 ląstelių vidinės ir išorinės membranų vientisumo tyrimai. Išorinės membranos laidumas vertinamas pagal periplazminės šarminės fosfatazės ištekėjimą iš ląstelės (A). Vidinės membranos laidumas nustatomas pagal citoplazminės β -galaktozidazės (C) bei 260 nm bangos ilgio šviesą sugeriančių medžiagų (daugiausia NR) ištekėjimą iš ląstelės (D). Baltymų kiekio ląstelių viduje ir terpėje pokyčiai rodo abiejų membranų pažeidimą. Bakterijos suspenduojamos 0,1 M PBS (pH=7,3) buferiniame tirpale (koncentracija 3×10^8 ksv/ml) ir inkubuojamos 30 min tamsioje su skirtinga TN-Et-PyP koncentracija. Po to dalis mėginių švitinama LED, kurio skleidžiamos šviesos bangos ilgio maksimumas yra 400 nm (šviesos dozė 20 J/cm^2). Siekiant nustatyti fermentinį aktyvumą ląstelių viduje, jos ardomos ultragarsu. (▲ – supernatantas gautas nucentrifugavus nešvitintas bakterijų ląsteles, * - supernatantas gautas nucentrifugavus švitintas bakterijų ląsteles, ■ – nešvitintos bakterijų ląstelės, □ - švitintos bakterijų ląstelės).

Tačiau svarbu pažymėti, jog β -galaktozidazei išveiklinti reikia daug didesnių TN-Et-PyP koncentracijų nei šarminei fosfatazei. Be to, didinant fotosensibilizatoriaus koncentraciją, į aplinką išteka vis daugiau medžiagų, sugeriančių 260 nm bangos ilgio šviesą bei baltymų (10. pav. B, D), o tai vienareikšmiškai parodo palaipsnį abiejų membranų laidumo didėjimą.

3.5. TN-Et-PyP fotodinaminis poveikis vidinės membranos funkcijoms.

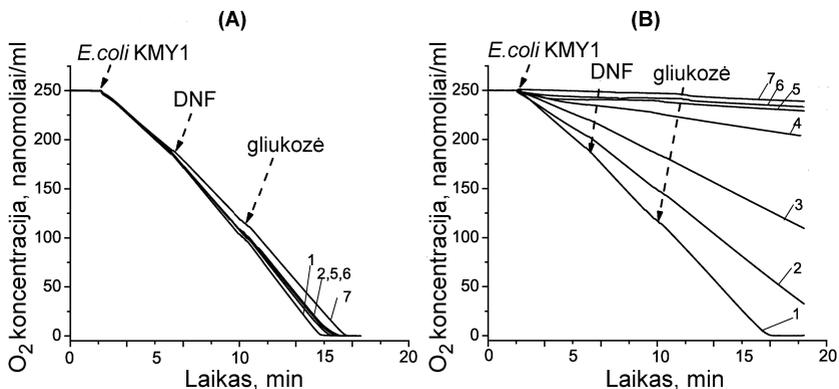
Membranos įtampos (11 pav.) bei ląstelių kvėpavimo efektyvumo matavimai (12 pav.) leidžia spręsti apie bakterijų vidinės membranos fiziologinę būseną. Membranos įtampą sukuria efektyvi kvėpavimo grandinė, o atskirais atvejais ATPazės veikla, dėl kurios ląstelės vidus įgauna neigiamą krūvį, kuris traukia indikatorinius tetrafenilfosfonio jonus (TPP^+). Lipofilinės struktūros TPP^+ jonai lengvai difunduoja per lipidines membranas, o jų srantai į ląsteles ir iš jų registruojami TPP^+ jonams jautriais elektrodais. Tačiau dėl neigiamo krūvio LPS molekulių išorinė bakterijų membrana sukuria barjerą, neleidžiantį indikatoriniams jonams patekti į ląsteles. Ši kliūtis išnyksta naudojant EDTA, kuri destabilizuoja LPS ir pralaidina išorinę membraną. Nedidelės TPP^+ jonų dalies pasyvus (nuo membranos įtampos nepriklausomas) susirišimas su ląstelėmis trukdo matavimų tikslumui, todėl vidinė membrana depoliarizuojama polimiksino B sulfatu norint įvertinti pasyviai prisijungusių jonų kiekį.



11 pav. *E. coli* KMY1 membranos įtampos pokyčiai fotosensibilizuojant ląsteles pasirinktomis TN-Et-PyP koncentracijomis (A – nešvitintos ląstelės, B – švitintos ląstelės). Bakterijos suspenduojamos 5 ml 0,1 M Tris-HCl, (pH=8,0) buferiniame tirpale (galutinė ląstelių koncentracija 3×10^8 ksv/ml). Švitinama tiesiogiai termostatuotose matavimo kiuvetėse, kartu matuojant ir membranos įtampą. Šviesos šaltinis LED, skleidžiantis šviesą, kurios bangos ilgio maksimumas 400 nm (šviesos dozė 20 J/cm²). Tuo pat metu matuojama ląstelių inkubuojamų su fotosensibilizatoriumi tamsoje membranos įtampa. 1 kreivė – 0 μ M TN-Et-PyP; 2 kreivė – 0,1 μ M; 3 kreivė – 0,25 μ M; 4 kreivė – 0,5 μ M; 5 kreivė – 1 μ M.

Tamsoje su TN-Et-PyP inkubuotų ląstelių membranos įtampa keičiasi nežymiai ir tai rodo, jog vidinės ląstelių membranos vientisumas ar baltymai-membranos įtampos generatoriai – dar nepažeisti (11 pav., A). Švitinant mėginius su skirtingomis porfirino koncentracijomis, įtampa palaipsniui išnyksta (11 pav., B). Tai rodo vidinės membranos pažaidas, tačiau kyla klausimas, ar pažeidžiamas membranos vientisumas ar baltymai – įtampos generatoriai. Siekiant atsakyti į šį klausimą, buvo matuotas ląstelių kvėpavimo efektyvumas fotosensibilizacijos metu.

Tamsoje su fotosensibilizatoriumi inkubuotų ląstelių deguonies suvartojimo greitis kito labai nežymiai (12 pav., A).



12 pav. *E. coli* KMY1 deguonies sunaudojimo greičio pokyčiai fotosensibilizuojant ląsteles pasirinktomis TN-Et-PyP koncentracijomis (A – nešvitintos ląstelės, B – švitintos ląstelės). Po fotosensibilizacijos bakterijų ląstelės praskiedžiamos 0,1 M Tris-HCl (pH=8,0) buferiniu tirpalu iki galutinės $\sim 6 \times 10^7$ ksv/ml ląstelių koncentracijos matavimo kiuvetėje. Matavimo metu į kiuvetę dedama 0,002 M DNF ir 0,1 M gliukozės. 1 kreivė - 0 μ M TN-Et-PyP; 2 kreivė - 0,1 μ M; 3 kreivė - 0,15 μ M; 4 kreivė - 0,25 μ M; 5 kreivė - 0,5 μ M; 6 kreivė - 1 μ M; 7 kreivė - 2,5 μ M.

Švitinant ląsteles deguonies suvartojimo greitis palaipsniui mažėja fotosensibilizatoriaus koncentracijai didėjant (12 pav., B). Svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog net mažiausios TN-Et-PyP koncentracijos neveikia kaip skyriklis, todėl tikėtina, kad kvėpavimo grandinės baltymų pažaidos yra pagrindinė fotodinaminio

poveikio pasekmė, o membranos laidumas yra antrinis įvykis, pasireiškiantis gausėjant ląstelių pažaidoms.

REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe naudotas porfirinas TN-Et-PyP priklauso katijoninių porfirinų grupei. Ne kartą buvo įrodyta, kad šios grupės junginiai yra veiksmingi fotosensibilizatoriai (Merchat *ir kt*, 1996; Jori & Coppellotti, 2007; Caminos *ir kt*, 2008; Dai *ir kt*, 2009; Maish *ir kt*, 2010), veikiantys pavienes bei biofilmus sudarančias, antibiotikams atsparias grameigiamąsias ir gramneigiamąsias bakterijas, grybus, virusus bei parazitinius pirmuonis (Merchat *ir kt*, 1996; Reddi *ir kt*, 2002; Kassab *ir kt*, 2002; Cormic *ir kt*, 2009; Smijs & Pavel, 2011). Gramneigiamosios bakterijos dėl sudėtingo ląstelių apvalkalėlio bei išorinės membranos nepralaidumo medžiagoms, kurių dydis viršija 600 Da, pasižymi santykinai didesniu atsparumu įvairioms antimikrobinėms medžiagoms nei paprastesnės struktūros grameigiamosios bakterijos. Geriausiai ištirtas gramneigiamųjų bakterijų atstovas *E. coli* yra populiariausias fotobiologinių tyrimų objektas (Usatcheva *ir kt*, 2001; Lazzeri *ir kt*, 2004; Scalise & Durantini, 2005; Banfi *ir kt*, 2006; Hussain *ir kt*, 2006; Tegos *ir kt*, 2006b; Rossoni *ir kt*, 2010).

Veikiant *E. coli* bakterijas TN-Et-PyP, paaiškėjo, jog nesant šviesos, net pati didžiausia naudota porfirino koncentracija (t.y., 3,5 μM) nesukelia nei ląstelių gyvybingumo sumažėjimo, nei ryškių jų struktūros bei apvalkalėlio funkcijų pokyčių. Kita vertus, fotosensibilizatoriaus prisijungimo prie ląstelių duomenys (7 pav.) rodo, jog TN-Et-PyP kaupiasi apvalkalėlio išorinėje dalyje, ir sąveika su paviršiniaisiais komponentais tokia stipri, jog net praplovus ląsteles buferiniu tirpalu 1-3 kartus, vis dar nemažai porfirino molekulių pasilieka prikibę prie apvalkalėlio (atitinkamai nuo 50% iki 20% lyginant su pradiniu prisijungusio

dažo kiekiu). Šie duomenys leidžia manyti, jog net tamsoje TN-Et-PyP gali sąveikauti su bakterijų apvalkalėliu, pvz., su neigiamo krūvio grupėmis lipopolisacharidų molekulėse. Modelinių sistemų, skirtų porfirino sąveikai su ląstelių komponentais tirti, spektrinė analizė patvirtina, jog TN-Et-PyP sudaro kompleksus su LPS ir jų sąveika yra elektrostatinės prigimties (4-5 pav.). Nepaisant to, kad ši analizė nepatvirtina nei sąveikos su trimis pagrindiniais bakterijų membranoms būdingais fosfolipidais, nei su baltymais, tokių sąveikų buvimo negalima atmesti, nes modelinės sistemos nevisiškai atspindi situaciją gyvoje ląstelėje. Nagrinėjant modelines sistemas neatsižvelgiama į tokius veiksnius kaip membranos įtampa, kuri gali turėti reikšmės fotosensibilizatoriaus prisijungimui prie apvalkalėlio paviršiaus (Engelman *ir kt*, 2007). Be to darbe naudotas JSA negali atstovauti visiems ląstelės baltymams, tarp jų ir porinams, kurie dėl kūvį turinčių aminorūgščių galbūt galėtų įtakoti stipresnį TN-Et-PyP prisijungimą.

Remiantis minėtais pastebėjimais, tikėtina, kad pradiniai *E. coli* fotosensibilizacijos vyksmai prasideda netoli išorinės bakterijos membranos. Vienlypis (singuletinis) deguonis yra pagrindinis gretimas molekules oksiduojantis junginys, susidarantis švitinant porfirininės kilmės junginius deguoninėje aplinkoje (Moan, 1990; Foote, 1991). Jis išlieka chemiškai reaktyvus gana trumpą laiką ir gali difunduoti palyginus netoli nuo susidarymo vietos (~ 0,1 μm) (Moan, 1990), todėl paprastai manoma, kad pirmiausiai pažeidžiamos tos biomolekulės, kurios atsiduria greta fotosensibilizatoriaus molekulių. Elektroninės mikroskopijos nuotraukos aiškiai parodo, kad apšvitinus bakterijas su 0,25 μM TN-Et-PyP pirmiausiai pažeidžiamas išorinės membranos vientisumas, kuris matomas kaip išorinės membranos kontūrų ryškumo praradimas (8 pav., D-G). Šis pastebėjimas sutampa su kitų autorių gautais rezultatais (Nitzan *ir kt*, 1992; Spesia *ir kt*, 2009). Kai kurie iš jų pastebi nedidelių pūslelių susidarymą bakterijų paviršiuje švitinant ląsteles su Zn (II) ftalocianinu: jų atsiradimas aiškinamas atsaku į stiprią

membranos baltymų oksidaciją. Švitinant *E. coli* ląsteles su TN-Et-PyP, pastebimi vidinių ląstelės struktūrų pažeidimai, kurie atsiranda dėl fotosensibilizatoriaus molekulių bei fotosensibilizacijos metu susidarančių reaktyvių deguonies formų patekimo į periplazmą bei citoplazmą (8 pav., D, G). Be to, viename iš ląstelių polių susiformuoja didelė pūslelės pavidalo struktūra (8 pav., F): manome, kad ji pripildyta pažeistų vidinių ląstelės komponentų. Padidinus porfirino koncentraciją iki 1 μM , stebimas šios pūslelės suirimas ir vidinių ląstelės komponentų ištekėjimas į aplinką, bakterija žūsta (8 pav., H-J).

Prarandus išorinės membranos vientisumą (8 pav.), o kartu padidėjus ir fotosensibilizatoriaus koncentracijai ląstelės viduje, pažeidų pagausėja, pvz., išveiklinami žinomi periplazmos ir citoplazmos žymenys – šarminė fosfatazė bei β -galaktozidazė. Tikėtina, jog šie fermentai praranda aktyvumą dar būdami ląstelės viduje, nes bakterijas supančioje aplinkoje padidėjusių jų aktyvumų nepastebime (10 pav., A, C). Be to palaipsniui silpnėja ir vidinės membranos funkcijos: mažėja ir visai išnyksta membranos įtampa (11 pav.), sutrinka kvėpavimo grandinės veikla (12 pav.). Membranos įtampa priklauso nuo vidinės membranos vientisumo ar (tam tikrais atvejais) šios įtampos generatorių: kvėpavimo grandinės bei ATPazės fiziologinės būsenos. Anksčiau buvo parodyta, kad oksidacinio fosforilavimo baltymai yra jautrūs *mezo*-tetra(N-metil-4-piridilo) porfino fotosensibilizaciniam poveikiui, tačiau ATPazės transmembraniniai segmentai apsaugoti labiau nei NADH dehidrogenazė, todėl ATPazė daug atsparesnė oksidavimui (Valduga *ir kt.*, 1999). Švitinant *E. coli* su skirtingomis TN-Et-PyP koncentracijomis, deguonies suvartojimo greitis mažėja tiesiog proporcingai fotosensibilizatoriaus koncentracijos didėjimui, o tai liudija apie vis gausėjančias membranos įtampos generatorių pažeidas. Įdomu, kad net naudojant mažas porfirino koncentracijas, nestebimas padidėjęs deguonies suvartojimas, kuris rodytų vidinės membranos vientisumo pažeidimus ir jų sukeltą protonų gradiento sumažėjimą, kurį ląstelės stengtųsi kompensuoti. Šie pastebėjimai

leidžia daryti išvadą, jog kvėpavimo grandinės baltymai pažeidžiami anksčiau, nei atsiranda vidinės membranos nevientisumas.

Didinant TN-Et-PyP koncentraciją, membranų vientisumas pažeidžiamas taip stipriai, kad iš ląstelės jau gali ištekėti nukleorūgštys, baltymai bei kitos 260 nm bangos ilgio šviesą sugeriančios medžiagos (10 pav., D), liudijančios bakterijų žūtį ir jų ląstelių suirimą. Spektriniai duomenys patvirtina, jog katijoninis porfirinas TN-Et-PyP gali sudaryti kompleksus su neigiamomis nukleorūgštimis, tai pasireiškia Soret juostos poslinkiu ilgabangės spektro srities kryptimi bei fluorescencijos spektro formos pokyčiu (4-5 pav.). Remiantis dideliu Soret juostos poslinkiu (17 nm) bei sugerties intensyvumo mažėjimu (41%) būtų galima daryti prielaidą, kad TN-Et-PyP įsiterpia į nukleorūgštis, juo labiau, kad panašus sąveikos būdas jau nustatytas giminingam porfirinui TMPyP (Sari *ir kt*, 1990; Munson & Fiel, 1992). Tačiau taip teigti būtų šiek tiek per drąsu, nes izobestinio taško nebuvimas sugerties spektre gali rodyti kiek sudėtingesnę sąveikos pobūdį arba papildomą sąveiką su preparate esančiomis RNR priemaišomis. Galutinai nustatyti sąveikos rūšį galėtų padėti tik žiedinio dichroizmo tyrimai.

Šio darbo rezultatai leidžia sukurti tetrakacijoninio porfirino sukeltos *E. coli* ląstelių fotožūties modelį susidedantį iš keletos etapų:

*TN-Et-PyP prisijungimas prie E.coli išorinės
membranos (pvz., prie LPS)*

⇓ švitinimas 400-415 nm bangos
ilgio šviesa

Išorinės membranos modifikavimas

⇓ padidėjęs išorinės membranos
laidumas

Porfirino patekimas į periplazmą/citoplazmą

⇓ švitinimas 400-415 nm bangos
ilgio šviesa

*Fermentų aktyvumo praradimas, membranos
įtampos išnykimas/ kvėpavimo grandinės
veiklos sutrikimas*

⇓ viduląstelinės organizacijos
suardymas

Vis didėjantis bakterijų apvalkalėlio laidumas

⇓ 260 nm šviesą sugeriančių
medžiagų ištekėjimas iš ląstelių

E. coli žūtis

IŠVADOS

1. Buferiniame ir etanoliniame tirpaluose TN-Et-PyP molekulių simetrija keičiasi iš D2b į D4b, tačiau etanoliniame tirpale ši konversija lėtesnė.
2. Katijoninis TN-Et-PyP buferiniame tirpale sudaro kompleksus su nukleorūgštimis ir lipopolisacharidais, ši sąveika yra elektrostatinės prigimties.
3. *E. coli* apvalkalėlis yra pralaidinamas švitinant bakterijas su TN-Et-PyP.
4. Švitinant bakterijas su didėjančiomis TN-Et-PyP koncentracijomis, šarminė fosfatazė ir β -galaktozidazė yra išveiklinamos ląstelių viduje, tačiau β -galaktozidazės aktyvumui nuslopinti reikia didesnių TN-Et-PyP koncentracijų.
5. Fotosensibilizacijos metu pažeidžiamos apvalkalėlio funkcijos: sumažėja membranos įtampa bei sutrinka kvėpavimo grandinės veikla.

Paskelbti moksliniai straipsniai:

B. Pudžiuvytė, R. Daugelavičius, V. Kirvelienė, A. Sasnauskienė, R. Bonnett, E. Bakiene (2008). Photodynamic action of cationic dye tetrakis(N-ethylpyridinium-4-yl)porphyrin tetratosylate on *Escherichia coli* cell envelope, *Biologija*, 54, 3, 198-201.

B. Pudziuvyte, E. Bakiene, R. Bonnett, P. A. Shatunov, M. Maggaragia, G. Jori (2011). Alterations of *Escherichia coli* envelope as a consequence of photosensitization with tetrakis(N-ethylpyridinium-4-yl)porphyrin tetratosylate, *Photochem Photobiol Sci*, 10, 6, 1046-1055..

Pranešimai konferencijose:

1. Stendinis pranešimas „Antimikrobinė fotodinaminė chemoterapija – pagrindiniai principai ir taikymo perspektyvos“ Lietuvos mikrobiologų draugijos, Botanikos instituto, Lietuvos Respublikos švietimo ir mokslo ministerijos organizuotoje konferencijoje „Mikroorganizmai žmogaus aplinkoje ir jų veiklos kontrolė“, Vilnius, 2007 06 12.
2. Žodinis pranešimas tema „Fotodinaminis katijoninio dažiklio tetrakis (N-etilpiridino-4il) tetratozilato poveikis *Escherichia coli* ląstelės apvalkalėliui“ Biochemikų X suvažiavime konferencijoje „Biochemija ir sistemų biologija“, Tolieja, 2008 06 20-22.
3. Stendinis pranešimas tema “Photodynamic action of cationic dye TN-Et-PyP on *E. coli* cell envelope” tarptautinėje konferencijoje Scanbalt forum and scanbalt biomaterials days, Vilnius, 2008 09 24-26.
4. Žodinis pranešimas tema „Fotosensibilizacijos principai ir taikymas medicininėje mikrobiologijoje“ konferencijoje „Mikroorganizmų atsparumas antibiotikams ir antibiotikoterapija“, vykusioje Šiauliuose 2009 11 27.
5. Stendinis pranešime “Alterations of *Escherichia coli* envelope as a consequence of photosensitization with tetrakis(N-ethylpyridinium-4yl)porphyrin” Fotobiologijos vasaros mokykloje Bressanone, Italija, 2010 06 21-27.

PADEKA

Norėčiau padėkoti visiems padėjusiems rengti šį darbą:

Vidai Kirvelienei už galimybę išbandyti save doktorantūroje. Savo vadovei Elenutei Bakienei už toleranciją mano saviveiklai, už neišsejamus mokslinės literatūros arodus, pagalbą, šilumą ir rūpestį. Savo moksliniam konsultantui Sauliui Bagdonui už spektroskopijos atradimo dėka, pagalbą, neišsenkančią kantrybę ir draugiškumą. Prof. Giulio Jori ir jo laboratorijos žmonėms už konsultacijas, visapusišką pagalbą darbe ir ruošiant straipsnį, už reiklumą ir už nepamirštas vasaras Paduvoje ir Bressanone.

Jurgiui Kadziauskui už kritišką darbo perskaitymą, patarimus ir tinkamus klausimus, privertusius mane kitaip pažvelgti į savo darbą. Ramutei, Arvydui, Julijai, Vaidai ir Daivai už patarimus, reagentus ir konsultacijas. Visiems ketedros žmonėms, kurių laboratorijose dirbau už draugiškumą ir svetingumą. Justinai, Sandrai, Simonai, Anai, Silvijai, Linai, Natalijai, Andriui ir Tadui už pagalbą, palaikymą ir draugystę.

Ypač noriu padėkoti savo Tėveliams už paramą ir tikėjimą manimi.

SUMMARY

Since the development of multidrug resistance in pathogenic bacteria is putting the future utilization of antibiotics under certain doubt, photodynamic antibacterial chemotherapy becomes more and more promising technique for combating the infectious diseases. The compounds belonging to phenothiazine, phthalocyanine and porphyrin classes have been reported to be most promising antimicrobial chemotherapeutic agents used in photosensitized inactivation of microbial cells. However, Gram-negative bacteria due to complex structure of their envelope are efficiently eradicated only using photosensitizer together with outer membrane permeabilizer or applying the cationic derivatives of the dyes.

In this work we analysed the photodynamic action of the tetra-cationic photosensitizer tetrakis(N-ethylpyridinium-4-yl)porphyrin tetratosylate (TN-Et-PyP) on integrity and functions of *E. coli* KMY1 cell membranes in order to replenish the existing hypothetical photosensitization mechanism. This work revealed that porphyrin TN-Et-PyP is interacting with such cellular components as lipopolysaccharides which increases the possibility to inflict photodynamic damage to the cell envelope. Applying gradually increasing concentrations of photosensitizer the damage is inflicted to the outer membrane and results in higher permeability of the membrane, inactivation of the periplasmic alkaline phosphatase and a cytoplasmic β -galactosidase, though these activities have not been noticed to increase outside the cells, suggesting that inactivation of the enzymes probably occurs in inner cell districts. Increase of the photosensitizer concentration also correlates with inactivation of respiratory chain and drop in plasma membrane voltage. Since uncoupling effect is not seen even irradiating cells with the lowest TN-Et-PyP concentration used, it can be presumed that inactivation of the proteins residing in the membranes is the primary effect of TN-Et-PyP mediated photosensitization, whereas increased permeability is a result of subsequent amplification of photodamage in the cells. The big vesicle full of inner components is formed in one of the cell poles as the degree of photosensitized damage is increasing. The vesicle disruption has fatal consequences for the bacterial cells and inner components such as proteins and nucleic acids, absorbing the light of 260 nm are released into the media.

Birutė Pudžiuvytė

VU Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedros doktorantė

Darbo adresas:

Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Čiurlionio 21, LT-03101, Vilnius

Tel:(8-5) 239-82-34

Fax: (8-5) 239-82-31

El. paštas: birute.pudziumyte@gmail.com

Gimimo data: 1976 lapkričio 23d.

Išsilavinimas: 1998 – Biologijos bakalauras (VU, Gamtos mokslų fakultetas), 2000 – mikrobiologijos krypties magistras (VU, Gamtos mokslų fakultetas).

Darbo patirtis: 1998-2000 m. – inžinierė mikrobiologė; 2000-2004 jaunesnioji mikrobiologė, AB "Fermentas".

Stażuotės 2009 06 01 – 2009 10 01 – stažuotė Paduvos universitete, Biologijos skyriuje pagal Erasmus praktikos programą.

Moksliniai interesai: membranų biochemija, bakterijų fotosensibilizacija, antimikrobinės medžiagos.

Publikacijos:

B. Pudžiuvytė, R. Daugelavičius, V. Kirvelienė, A. Sasnauskienė, R. Bonnett, E. Bakienė (2008). Photodynamic action of cationic dye tetrakis(N-ethylpyridinium-4-yl)porphyrin tetratosylate on *Escherichia coli* cell envelope, *Biologija*, 54, 3, 198-201.

B. Pudžiuvytė, E. Bakiene, R. Bonnett, P. A. Shatunov, M. Maggaragia, G. Jori (2011). Alterations of *Escherichia coli* envelope as a consequence of photosensitization with tetrakis(N-ethylpyridinium-4-yl)porphyrin tetratosylate, *Photochem Photobiol Sci*, 10, 6, 1046-1055.

LITERATŪROS ŠARŠAS

1. **Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V. (2006).** Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 85, 28-38.
2. **Bengoechea J. A., Diaz R., Moriyon I. (1996).** Outer membrane differences between pathogenic and environmental *Yersinia enterocolitica* probed with hydrophobic permeants and polycationic peptides, *Infect Immun*, 64, 12, 4891–4899.
3. **Bozzola J. J., Russell L. D. (1999).** Electron microscopy, ch. 2 Specimen preparation for transmission electron microscopy, ch.4 Ultramicrotomy, 18-46; 74-109 2nd ed, Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.
4. **Caminos D. C., Spesia M. B., Pons P., Durantini E. N. (2008).** Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic 5,10,15,20-tetr(4-N,N,N-trimethylamoniumphenyl) porphyrin, *Photochem Photobiol Sci*, 7, 1071-1078.
5. **Cassidy C. M., Donnelly R. F., Tunney M. M. (2010)** Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antibacterial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates. *J Photochem Photobiol B*, 99, 1, 62-66.
6. **Chopra I. (2002).** Encyclopedia of Life Sciences, ch. Antibiotics, John Wiley and Sons Ltd., www.els.net
7. **Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *PNAS*, 69, 2110-2114.
8. **Collins T. L., Markus E. A., Hassett D. J., Robinson J. B. (2010).** The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Curr Microbiol*, 61, 5, 411-416.
9. **Cormic M. P., Alvarez M. G., Rovera M., Durantini E. N. (2009).** Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetracationic porphyrin derivatives, *Eur J Med Chem*, 44, 4, 1592-1599.
10. **Cvirkaitė-Krupovič V., Poranen M., Bamford D.H (2010).** Phospholipids act as a secondary receptor during the entry of enveloped dsRNA bacteriophage phi6, *J Gen Virol*, Pt 8, 2116-2120.
11. **Dai T., Huang Y. Y., Hamblin M. R. (2009).** Photodynamic therapy for localized infections – State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6, 170-188.
12. **Dean R. L. (2002).** Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations, *Biochem Mol Bio. Educ*, 30, 6, 401–407.
13. **Egushi Y., Oshima T., Mori H., Aono R., Yamamoto K., Ishihama A., Utsumi R. (2003).** Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system *Escherichia coli*, *Microbiology*, 149, 2819–2828.

14. **Engelmann F. M., Mayer I., Gabrielli D. S., Toma H. E., Kowaltowski A. J., Araki K., Baptista M. S. (2007).** Interaction of cationic *meso*-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes, *J Bioenerg Biomembr*, 39, 175-185.
15. **Fernandes P. (2006).** Antibacterial discovery and development- the failure of success, *Nature Biotechnology*, 24, 12, 1497-1503.
16. **Fernebro J. (2011).** Fighting bacterial infections – future treatment options, *Drug Resistance Updates*, 14, 125-139.
17. **Foote C. F. (1991).** Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation, *Photochem Photobiol*, 54, 5, 569.
18. **French G. L. (2010).** The continuing crisis in antibiotic resistance, *Int J Antimicrob Agents*, 3653, 53-57.
19. **Goldstein E., Citron D. M., Geffen D. (2011).** Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria, part I, *Clinical Microbiology Newsletter*, 33,1, 1-8.
20. **Goldstein E., Citron D. M., Geffen D. (2011).** Resistance trends in antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria part II, *Clinical Microbiology Newsletter*, 33, 2, 9-15.
21. **Hussain S., Harris F., Phoenix D. A. (2006).** The phototoxicity of phenothiazinium-based photosensitizers to bacterial membranes, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46, 1, 124-130.
22. **Isturiz R. E. (2010).** Optimising antimicrobial prescribing. *Int J Antimicrob Agents*, 3653, 519-522.
23. **Jori G., Roncucci G. (2006).** Photodynamic therapy in microbial infections, *Adv Clin Exp Med*, 15, 3, 421-426.
24. **Jori G., Coppellotti O. (2007).** Inactivation of Pathogenic Microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications. *Anti-Infect Agents Med Chem*, 6, 119-131.
25. **Kato A., Ohnishi H., Yamamoto K., Furuta E., Tanabe H., Utsumi R. (2000).** Transcription of *emrKY* is regulated by the EvgA-EvgS two-component system in *Escherichia coli* K12, *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 1203–1209.
26. **Kassab K., Ben-Amor T., Jori G., Coppellotti O. (2002).** Photosensitization of *Colpoda inflata* cysts by meso-substituted cationic porphyrins, *Photochem Photobiol Sci*, 1, 560-564.
27. **Lazzeri D., Rovera L., Pascual L., Durantini E. N. (2004).** Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using *meso*-substituted cationic porphyrins with asymmetric charge distribution, *Photochem Photobiol*, 80, 2, 286-293.
28. **Maish T., Hackbarth S., Regensburger J., Felgenträger A., Baumler W., Landthaler M., Röder B. (2010)** Photodynamic inactivation of multiresistant bacteria (PIB) – a new approach to treat superficial infections in the 21st century, *J Dtsch Dermatol Ges (Journal of the German Society of Dermatology)*, 8, DOI:10.1111/j.1610-0387.2010.07577.x.
29. **Merchat M., Bertolini G., Giacomini P., Villanueva A., Jori, G. (1996).** Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B*, 32, 153–157.

30. **Mettath S., Munson B. R., Pandey R. K. (1999).** DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position, *Bioconjugate Chem*, 10, 94-102.
31. **Миллер Дж. (1976).** Эксперименты в молекулярной генетике. – М: Мир, 365-371.
32. **Moan J. (1990).** Properties for optimal PDT sensitizers. *J Photochem Photobiol B*, 5, 521–524.
33. **Moellering R.C. (2011).** Discovering new antimicrobial agents, *Int J Antimicrob Agents*, 37, 2-9.
34. **Munson B. R., Fiel R. J. (1992).** DNA intercalation and photosensitization by cationic meso-substituted porphyrins, *NAR*, 20, 6, 1315-1319.
35. **Nikaido H. (2009).** Multidrug resistance in bacteria, *Annu Rev Biochem*, 78, 119-146.
36. **Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B. (1992).** Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins, *Photochem Photobiol*, 55, 1, 89-96.
37. **Nitzan Y., Ashkenazi H. (2001).** Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli B* by cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths, *Curr Microbiol*, 42, 408-414.
38. **Pasternack R. F., Huber P. R., Boyd P., Engasser G., Francesconi L., Gibbs E., Fasella P., Cerio Venturo G., Hinds L. (1972).** On the aggregation of meso-substituted water soluble porphyrins, *J Am Chem Soc*, 94, 13, 4511–4517.
39. **Rasko D. A., Sperandio V. (2010).** Anti-virulence strategies to combat bacterial mediated disease. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 9, 117-128.
40. **Rasul R., Cole N., Balasubramanian D., Chen R., Kumar N., Willcox M. P. D. (2010).** Interaction of the antimicrobial peptide melamine with bacterial membranes, *Int J Antimicrob Agents*, 35, 566–572.
41. **Reddi E., Ceccon M., Valduga G, Jori G., Bommer J. C., Elisei F., Latterini L., Mazzucato U. (2002).** Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins, *Photochem Photobiol*, 75, 5, 462-470.
42. **Rossoni R. D., Junqueira E. L., Santos E. L. S., Costa A. C. B., Jorge A. O. C. (2010).** Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosine in photodynamic therapy against *Enterobacteriaceae*, *Lasers Med Sci*, 25, 581-586.
43. **Rotomskis R., Streckytė G, Gričiūtė L. (2002).** Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai, sk. 4 Fotosensibilizatoriai, sk. 5 Fotosensibilizuoti procesai navikų terapijoje, sk. 6 Sensibilizatorių fotostabilumas bei fototransformacijos ir jų reikšmė fototerapinėms dozėms, sk. 7 Endogeniniai fotosensibilizatoriai „Lietuvos mokslas“ 73-97, 139-152, 161-174, 201-210.
44. **Salmon-Divon M., Nitzan Y., Malik Z. (2004).** Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(N-methylpyridyl)porphine, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 423-429.
45. **Sambrook J., Russell D. W. (2001).** Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed, I ch. Plasmids and their usefulness in molecular cloning; Appendix 1 Preparation of buffers and stock solutions for use in molecular biology; Appendix 8 Commonly used technique in molecular cloning, 1.24, 1.31-1.42; A1-7-1.16; A8.12-8.16 Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

46. **Sari M. A., Battioni J. P., Dupre D., Mansuy D., Le Pecq J. B. (1990).** Interaction of cationic porphyrins with DNA: Importance of the number and position of charges and minimum structural requirements for intercalation, *Biochemistry*, 29, 4205-4215.
47. **Scalise I., Durantini E. N. (2005).** Synthesis, properties and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and noncharged Zn(II)pyridyloxyphthalocyanine derivatives, *Bioorg Med Chem*, 13, 8, 3037-3045.
48. **Smijs T. G. M., Pavel S. (2011).** The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*, *Photochem Photobiol*, 87, 1, 2-13.
49. **Soukos N. S., Goodson J. M. (2011).** Photodynamic therapy in the control of oral biofilms, *Periodontol 2000*, 55, 1, 143-166.
50. **Spesia M. B., Caminos D. A., Pons P., Durantini E. N. (2009).** Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by a tetracationic zinc(II)phthalocyanine derivative, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6, 52-61.
51. **Streckytė G., Didžiapetrienė J., Kirvelienė V., Bagdonas S., Rotomskis R. (2008).** Fotosensibilizacija biosistemose: taikymas ir perspektyvos, sk. 4 Pirminiai fotosensibilizuoti vyksmai, sk. 6 Fotosensibilizatoriai, „Progretus“ poligrafijos centras, 42-52, 71-84.
52. **Tanford C. (1980).** The Hydrophobic Effect: formation of micelles and biological membranes, 2nd edition, John Wiley & Sons Inc; p 109.
53. **Taylor P. W., Stapleton P. D., Luzio J. P.(2002).** New ways to treat bacterial infections, *DDT*, 7, 21, 1086-1091.
54. **Tegos G. P., Anbe M., Yang C., Demidova T. N., Satti M., Mroz P., Janjua S., Gad F., Hamblin M. R. (2006b).** Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorine e6 for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 4, 1402-1410.
55. **Todar K.,** Todar's online textbook of bacteriology, ch. Bacterial resistance to antibiotics, address: <http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>.
56. **Usatheva M. N., Teichert M. C., Biel M. A. (2001).** Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Laser Surg Medicine*, 29, 165-173.
57. **Valduga G., Breda B., Giacometti G., Jori G., Reddi E. (1999).** Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 84-88.
58. **Wainwright M. (1998).** Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*, 42, 13-28.
59. **Wainwright M. (2009).** Photosensitizers in biomedicine, ch. 11 Antimicrobial application – photodynamic antimicrobial chemotherapy, John Wiley & Sons Ltd., 237-247.
60. **Willing B. P., Russell S. L, Finlay B. B. (2011).** Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism, *Nature Reviews Microbiology*, doi:10.1038/nrmicro2536