

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

ARŪNAS STIRKĖ

CHEMINIO IR ELEKTRINIO POVEIKIŲ *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE MIELIŲ LĄSTELIŲ SAVYBĖMS TYRIMAS

Daktaro disertacija

Fizikiniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2013

Disertacija buvo ruošiama 2008 – 2013 metais Vilniaus universitete ir Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Fizinių ir technologijos mokslų centras.

Moksliniai vadovai:

prof. habil. dr. Arūnas Ramanavičius (Vilnius Universitetas, fizikiniai mokslai, chemija – 03P) (2008 – 2010)

doc. dr. Almira Ramanavičienė (Vilnius Universitetas, fizikiniai mokslai, chemija – 03P) (2010 – 2013)

skiriu tēvams

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Mielės ir jų struktūra.....	15
1.2. Mielių sienelė ir funkcijos	16
1.2.1. β -gliukanai	17
1.2.2. Glikoproteinai.....	18
1.3. Mielių ląstelių pralaidumas ir jo tyrimo metodai	20
1.3.1. Cheminis mielių sienelės modifikavimas.....	21
1.3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių ląstelėms.....	22
1.4. Ląstelės tamprumas ir tyrimai AJM	28
1.5. Mielių sienelės pralaidumo tyrimai	31
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	35
2.1. Reagentai ir tirpalai.....	35
2.2. Mielių kamienai, kultivavimas ir transformacija.....	36
2.2.1. Mielių kamienai ir jų auginimas.....	36
2.2.2. Cheminis mielių sienelės modifikavimas genų pernašos metodu	36
2.3. Mielių ląstelių paruošimas tamprumo tyrimams	37
2.4. Matavimų atominių jėgų mikroskopu metodika.....	38
2.4.1. Mielių ląstelių vaizdinimas ir tamprumo matavimai skystyje	39
2.5. Impulsinio elektrinio lauko generavimo eksperimentinė įranga	41
2.5.1. Mikrosekundžių trukmės impulsų generatorius	41

2.5.2.	Nanosekundžių trukmės impulsų generatorius.....	43
2.5.3.	Mielių elektroporacijai sukonstruota kiuvetė	45
2.6.	Mielių ląstelių pralaidumo tyrimų metodikos	46
2.6.1.	Ląstelių suspensijos paruošimas elektroporacijai ir tetrafenilfosfonio jonų kaupimo matavimas	46
2.6.2.	Fluorescencinė mikroskopija.....	47
2.7.	Elektrinių impulsų poveikio mielių gyvybingumui įvertinimas	48
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	50
3.1.	Chemiškai modifikuotų mielių ląstelių tamprumo tyrimai ...	50
3.1.1.	Mielių imobilizuotų ant paviršiaus vaizdinimas AJM	50
3.1.2.	Mielių imobilizacija membranoje ir vaizdinimas AJM.....	52
3.1.3.	DTT įtaka mielių ląstelių tamprumui ir sienelės šiurkštumui	55
3.1.4.	Mielių tamprumo modulio skaičiavimai	58
3.1.5.	Mielių ląstelių Young'o modulio analizė	60
3.2.	Impulsinio elektrinio lauko įtaka mielių ląstelių pralaidumui ir gyvybingumui	64
3.2.1.	Mikrosekundžių trukmės didelės galios impulsų poveikis mielių ląstelių pralaidumui	64
3.2.2.	Nanosekundžių trukmės didelės galios impulsų poveikis mielių ląstelių pralaidumui	68
3.2.3.	Teorinė eksperimentinių elektropermeabilizacijos tyrimų analizė	71
3.2.4.	Eksperimentinių mielių pralaidumo tyrimų, naudojant mikrosekundinius elektrinius impulsus, analizė	73
3.2.5.	Eksperimentinių permeabilizacijos tyrimų, naudojant nanosekundinius elektrinius impulsus, analizė	76
3.2.6.	Elektriniu lauku stimuliuotos TPP ⁺ skvarbos mechanizmas ..	77
3.3.	Impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių gyvybingumui vykdant elektroporaciją	78
3.3.1.	Porų susidarymas mielių plazminėje membranoje.....	82

3.3.2. Nanosekundžių trukmės impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių gyvybingumui	83
IŠVADOS.....	87
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	89
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	91
PADĖKA	99

SANTRUMPOS

- μ s – mikrosekundė (0,000 001 s)
- AJM - atominių jėgų mikroskopas
- ASB – šarmams jautri jungtis
- CWI – (cell wall integrity) ląstelės sienelės vientisumas
- CWP – (cell wall proteins) ląstelės sienelės baltymai
- DNR – deoksiribonukleiorūgštis
- DTT – ditionitritolis
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
- EPB – elektroporacijos buferis
- FITC – fluoresceino izotiocianatas
- FTIR - Furjė infraraudonų spindulių spektroskopija
- GlcNAc – N - acetilgliukozaminas
- Glu - gliukozė
- GPI – glikozilfosfatidilinozitolis
- IEL – impulsinis elektrinis laukas
- IGBT – bipolinis tranzistorius su izoliuota užtūra
- ISE – jonams selektyvus elektrodas
- YPD – mielių peptono dekstrozės terpė
- KARS – koherentinė antistokso Ramano sklaida
- KFE – kolonijų formavimosi efektyvumas
- Leu - leucinas

NDS – natrio dodecilsulfatas

ns – nanosekundė (0,000 000 001 s)

OT – optinis tankis

PEG – polietilenglikolis

PIR – (proteins with internal repeats) baltymai turintys vidinį pasikartojimą

ps – pikosekundė (0,000 000 000 001 s)

SC – pilna sintetinė mielių terpė

SEM – skenuojantis elektroninis mikroskopas

STM – skenuojantis tunelininis mikroskopas

TEM – peršviečiantis elektroninis mikroskopas

TPP⁺ – tetrafenilfosfonio jonas

TRIS – trishidroksimetilaminometanas

TTL – tranzistorius – tranzistorius impulsų generatorius

VLJ – visos ląstelės jutiklis

$\Delta\psi$ – membranos potencialas

ĮVADAS

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* – žemesnieji eukariotiniai mikroorganizmai naudojami kaip modelinis objektas įvairiuose fizikocheminiuose tyrimuose, kurių rezultatai leidžia giliau suprasti analogiškų procesų eigą ir reguliavimą aukštesniuose eukariotuose (Botstein ir Fink 2011). Mielių ląsteles gaubianti sienelė yra dinaminė struktūra veikianti kaip laidumo barjeras įvairioms toksinėms ir netoksinėms medžiagoms (Ganeva ir kt., 1995; Aouida ir kt., 2003). Be to sienelė apsprendžia sąveiką tarp mikroorganizmo ir aplinkos. Pavyzdžiui ji nulemia ląstelių tarpusavio sąveiką (flokuliaciją) (Brückner ir Mösch 2012), taip pat atsakinga už grybelinę žinduolių infekciją, bei sąveiką vykstančią tarp infekuojamų ir mielių ląstelių (Kanbe ir kt., 1997).

Mielių ląstelių paviršiaus struktūrinėms ypatybėms bei jų laidumo pokyčiams įvairioms medžiagoms tirti plačiai naudojami biologiniai ir fizikocheminiai tyrimo metodai. Pastaruoju metu šalia klasikinių metodų šiems tikslams pasiekti pradėti taikyti tokie metodai kaip: TEM (peršviečiantis elektroninis mikroskopas), SEM (skenuojantis elektroninis mikroskopas), FTIR (Furjė infraraudonų spindulių spektroskopija) (Corte ir kt., 2010), KARS (koherentinė antistokso Ramano sklaida) (Kano ir Hamaguchi 2005), elektrocheminiai (Garjonyte ir kt., 2009) ir AJM (atominių jėgų mikroskopas) (Suchodolskis ir kt., 2011). Tai greitai ir informatyvūs tyrimo metodai, leidžiantys *in vivo* nustatyti ląstelių sienelės struktūrinių komponentų kokybinius ir kiekybinius pokyčius. Šių metodų pagalba galima ne tik nustatyti bei charakterizuoti mikroorganizmus, bet ir tirti įvairių veiksnių poveikį mikroorganizmų ląstelėms.

Gerinant antibiotikų poveikį bei prasiskverbimo per sienelę greitį dažniausiai keičiamos pačios antibiotikų molekulė arba sienelės pralaidumas (Ghannoum ir Rice 1999). Todėl mielių sienelė tiriama siekiant įvertinti paveiktos sienelės pralaidumą įvairioms medžiagoms, skirtoms kryptingai

paveikti mielių savybes (De Nobel ir Barnett 1991; Chen ir kt., 2008) arba padidinti išėigą technologiniu požiūriu reikalingų, nesekretuojamų baltymų (Ganeva ir kt., 2003). Chemiškai pakeitus sienelės pralaidumą yra pasiekiamas didesnis mielių ląstelių genetinės transformacijos (ląstelės genetinių savybių pakeitimas) efektyvumas (Ito ir kt., 1983; Filyak ir kt., 2013). Akivaizdu, jog cheminio poveikio iššauktas sienelės pralaidumo kitimas turėtų būti lydimas ir ženkliau mechaninių ląstelės savybių pakitimu. Tačiau tyrimai atskleidžiantys cheminio poveikio įtaką mechaninėm mielių savybėm lig šiol nebuvo atliekami.

Atominių jėgų mikroskopas pastaruojau metu sėkmingai buvo panaudojamas gyvūninių ląstelių ir mielių mechaninių savybių tyrimams (Janmey ir McCulloch 2007; Dague ir kt., 2010). AJM pasižymi labai aukšta skiriamąja geba (nm ribose) ir leidžia tirti paviršines objekto savybes bei paviršiaus sąveikų ypatumus nanometrų atstumų ribose. Labai svarbu pažymėti, jog AJM pagalba ląstelės gali būti tiriamos joms giminingoje supančioje aplinkoje, tai yra skystyje (Higgins ir kt., 2006; Dague ir kt., 2007). Specialiai modifikuoti cheminiais junginiais AJM zondai leidžia tirti ir nustatyti cheminių ryšių lokalizaciją bei jėgą (Barattin ir Voyer 2008; David ir kt., 2008). Tuo tarpu kontaktiniame režime, įvertinant zondo ir objekto deformaciją, galima iširti biologinio objekto mechanines savybes (Kasas ir Dietler 2008). Todėl vienas iš šio darbo tikslų buvo, naudojant AJM, iširti mielių ląstelių mechanines savybes veikiant jas sienelės pralaidumą keičiančiomis cheminėmis medžiagomis.

Yra žinoma, jog išorinis elektrinis laukas pakeičia gyvūninių ląstelių membranos pralaidumą. Dėl to buvo iškelta hipotezė, kad impulsinis elektrinis laukas ląstelės membranoje pakeičia ląstelės membranine įtampą, kuriai pasiekus kritinę vertę (Bernhardt ir Pauly 1973) įvyksta membranos elektroporacija t.y. joje susidaro poros (skylutės). Manoma, kad ląstelės membranos pralaidumo įvairiems cheminiams junginiams padidėjimas, yra dėl šių porų atsiradimo (Ganeva ir kt., 1995). Išorinio elektrinio lauko parametrai

įtakoja porų kiekį ar/ir dydį, tai yra porų susidarymo proceso grįžtamumą arba negrįžtamumą. Nėra žinoma, kokio dydžio ar kiekio porų reikia, kad procesas vyktų negrįžtamai. Molekulinis porų susidarymo mechanizmas nėra pilnai paaiškintas, nes iki šiol nėra eksperimentiškai įrodytas ir porų egzistavimas lipidiniame dvisluoksnyje. Įrodyta, kad paveikus impulsiniu elektriniu lauku membranos pralaidumas įvairioms molekulėms priklauso nuo kelių pagrindinių parametru: impulso intensyvumo, trukmės ir impulsų skaičiaus. Elektrinio poveikio ląstelių savybėms tyrimai labai suintensyvėjo pastarąjį dešimtmetį, kai kartu su plačiai naudojamais mikro-mili sekundžių trukmės impulsais buvo pradėti naudoti ir didelės galios nanosekundžių trukmės impulsai (Aouida ir kt., 2003; Saulis 2008; Tanino ir kt., 2012). Stiprus (kelių šimtų kV/cm) kelių dešimčių nanosekundžių trukmės elektrinio lauko poveikis ląstelės membranai, viduląstelinėms ląstelės organelėms, apoptozei ir kitiems ląstelės procesams bei objektams buvo tirtas (Vernier ir kt., 2004; Frey ir kt., 2006; Titushkin ir Cho 2009; Stacey ir kt., 2011) ir kitų autorių darbuose. Tačiau tenka pažymėti, jog pagrindinis tyrimų objektas naudojant stipraus elektrinio lauko impulsus buvo gyvūninės ląstelės. Ląstelės sienelę turintys mikroorganizmai retai naudojami nanosekundžių trukmės impulsų poveikiui tirti dėl to, kad trūksta jautrių analizės metodų šiam poveikiui vertinti (Eing ir kt., 2009). Membranos pralaidumui tirti dažniausiai naudojami fluorescensiniai dažai, kurie pereina hidrofobinį barjerą ir kaupiasi citoplazmoje (Ganeva ir kt., 1995). Buvo parodyta, kad medžiagos neprasiskverbia pro membraną jeigu elektroporacijos metu atsiradusios poros yra per mažos šių medžiagų transportavimui (Saulis ir Praneviciute 2005). Taigi elektroporacijos tyrimams naudojant trumpus didelės galios impulsus svarbu turėti ir tinkamus šio poveikio įvertinimui skirtus tyrimo metodus.

Šiam tikslui gali būti pritaikyti polimeriniai jonams selektyvūs elektrodai (ISE), kurie jau senai naudojami organinių ir neorganinių jonų nustatymui (Buhlmann ir kt., 1998). ISE jautrūs riebaluose tirpiems katijonams leidžia tirti įvairių organizmų ląstelių, organelių, vezikulių ar liposomų

membranos potencialą ir pralaidumą (Brown ir Cooper 1995; Rotenberg 1997). Gyvūninių ląstelių membranos pralaidumui tirti sėkmingai buvo pritaikyti skvarbieji lipofiliniai katijonai (tetrafenilfosfonio (TPP⁺)) (Min ir kt., 2004), kurie palyginti lengvai pereina membraną ir, priklausomai nuo jų sukaupto kiekio ląstelės viduje, galima įvertinti ląstelės potencialą (Flewelling ir Hubbell 1986). Tačiau šio metodo taikymas sienelę turinčių organizmų membranos potencialo matavimams yra komplikuotas (Ballarin-Denti ir kt., 1994). Ištyrus priešastis paaiškėjo, kad TPP⁺ katijonai gali būti sulaikomi mielių ląstelės sienelėje ir dėl to lėčiau skverbiasi į mielių ląstelę (Zimkus ir Chaustova 2003). Dėl šios savybės TPP⁺ katijonai gali būti panaudoti kaip selektyvūs indikatoriai sienelės pralaidumui tirti, paveikus mielių ląsteles cheminėmis medžiagomis ar impulsiniu elektriniu lauku.

Darbo tikslas

Ištirti mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) ląstelių mechaninių savybių ir mielių plazminės membranos bei sienelės pralaidumo pakitimus, veikiant mielių ląsteles cheminėmis medžiagomis bei mikro- ir nanosekundžių trukmės didelės galios impulsais.

Pagrindiniai uždaviniai

- Atominių jėgų mikroskopu įvertinti mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) ląstelių mechaninio tamprumo pakitimus, paveikus mielių sienelės pralaidumą įtakojančia medžiaga - ditiotreitolu.
- Panaudojus elektrocheminį TPP⁺ katijonų koncentracijos matavimo metodą, ištirti TPP⁺ absorbcijos mielių ląstelėse greičio priklausomybę, paveikus jas 5-150 μs trukmės iki 10 kV/cm elektrinio lauko stiprio impulsais.
- Ištirti 60 nanosekundžių trukmės 2-200 kV/cm elektrinio lauko stiprio impulsų poveikį mielių ląstelių TPP⁺ absorbcijos greičiui

ir nustatyti impulsinio elektrinio lauko poveikį mielių gyvybingumui.

Temos aktualumas ir mokslinis naujumas

Panaudojus atominių jėgų mikroskopą, pirma kartą buvo nustatyta mielių ląstelių mechaninio tamprumo pakitimai, paveikus jas cheminėmis medžiagomis, keičiančiomis sienelės pralaidumą.

Pasiūlytas naujas metodas, panaudojant elektrocheminį TPP⁺ katijonams atrankų elektrodą, tirti elektrinio lauko poveikį mielių sienelių pralaidumui. Naudojant šį metodą parodyta, jog nanosekundžių trukmės stipraus (iki 200 kV/cm) elektrinio lauko impulsai padidina mielių ląstelių pralaidumą TPP⁺ jonams, tačiau neturi įtakos mielių ląstelių gyvybingumui.

Stipraus impulsinio elektrinio lauko poveikio mielių sienelės pralaidumui bei cheminių medžiagų poveikio mielių mechaniniam tamprumui tyrimų duomenys leidžia kurti naujus šių ląstelių modifikavimo metodus, keičiant jų savybes.

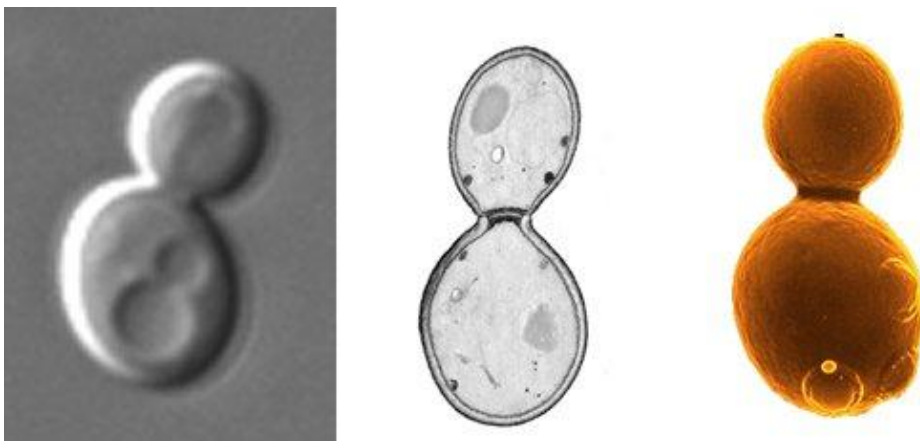
Ginamieji teiginiai

1. Paveikus *Saccharomyces cerevisiae* mieles ditiotreitolio tirpalu sumažėja ląstelės mechaninis tamprumas. Eksperimentines įdubimo nuo apkrovos priklausomybes gerai aprašo Sneddon'o modelis. Chemiškai paveiktų mielių ląstelių Young'o modulių vertės apskaičiuotos naudojant šį modelį yra iki 2 kartų didesnės lyginant su chemiškai nepaveiktomis ląstelėmis.
2. Elektrocheminis TPP⁺ jonų absorbcijos tyrimų metodas leidžia nustatyti elektrinio lauko poveikį mielių sienelių pralaidumui, kai šios ląstelės yra veikiamos nanosekundžių ar mikrosekundžių trukmės didelės galios elektriniais impulsais. Tokie stipraus (iki 200 kV/cm) elektrinio lauko impulsai padidina TPP⁺ absorbcijos greitį mielių ląstelėse.
3. Eksperimentinę absorbuoto mielių ląstelėse TPP⁺ kiekio priklausomybę nuo elektrinio lauko stiprio gerai aprašo modelis gautas naudojant antros eilės kinetinę lygtį ir darant prielaidą, jog koeficientas, charakterizuojantis TPP⁺ absorbcijos greitį, yra kvadratinė elektrinio lauko stiprio funkcija. Tai rodo, jog mielių sienelių pralaidumas priklauso nuo elektrinio impulso energijos.
4. Veikiant nanosekundžių trukmės elektriniais impulsais, sukuriančiais elektrinį lauką iki 200 kV/cm, nestebimi mielių ląstelių gyvybingumo pokyčiai. Mielių gyvybingumas sumažėja iki 60% jas paveikus mikrosekundžių trukmės impulsais, pasiekiančiais iki 10 kV/cm elektrinio lauko stiprį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mielės ir jų struktūra

Saccharomyces cerevisiae – tai pumpuruojančios vienaląstės mielės priklausančios *Ascomycota* grybų tipui. Jau keletą dešimtmečių laikomos kaip modeliniai eukariotiniai (tai organizmai turintys membrana nuo citoplazmos atskirtą branduolį bei kitas viduląstelines organėles turinčias membraną) organizmai idealiai tinkantys ir naudojami atskleisti pagrindinius eukariotų gyvenimo fenomenus (Botstein ir Fink 2011; Castrillo ir Oliver 2011; Breitenbach ir kt., 2012). Šios mielės naudojamos kaip modeliniai mikroorganizmai, nes pagrindiniai procesai (DNR ir chromosomų replikacija, ląstelės dalijimasis, genų raiška, baltymų transliacija, signalų perdavimas ir metabolizmas) yra konservatyvus tarp mielių ir aukštesniųjų eukariotų. Pagrindiniai eukariotų biocheminiai ir metaboliniai keliai pirmiausia buvo ištirti *S. cerevisiae* mielėse. Tarp pagrindinių savybių, lemiančių mielių patrauklumą biologinėms studijoms, yra ir tai, kad jos yra saugios, greitai auginamos naudojant paprastus kultivavimo metodus. Be to, dėl paprastų genetinių manipuliacijų, mielėms pirmosioms buvo nuskaitytas visas genomas (Goffeau ir kt., 1996; Castrillo ir Oliver 2011).



1.1. pav. Mielių struktūra šviesiniu, elektroniniu ir fluorescensiniu mikroskopais.

Mielių ląstelės yra po vieną ar sukibusios po kelias, paprastai elipsės formos nuo 1 iki 10 μm diametro, vienaląščiai mikroorganizmai. Aktyviai besidauginančios mielių ląstelės dalinasi asimetriškai suformuodamos dukterinę ląstelę – pumpurą (1.1. pav.), kuriam atsikabinus motininėje ląstelėje lieka randas (Feldmann 2005). Mielių ląstelę gaubia sienelė, kuri atlieka ne tik apsauginę, bet ir formos palaikymo, atpažinimo bei sulipimo arba adhezijos funkcijas (Lipke ir Ovalle 1998; Klis ir kt., 2006; Veelders ir kt., 2010; Breitenbach ir kt., 2012).

1.2. Mielių sienelė ir funkcijos

Iš beveik 6000 mielės genų net 1200 jų atsakingi už sienelės sandarą ir struktūrą (Goffeau ir kt., 1996; Klis ir kt., 2006). Komponentai kovalentiškai sujungti į makromolekulinius kompleksus suformuoja sienelę. Jos sudėtyje dominuoja du pagrindiniai komponentai β 1,3-gliukanas ir glikoproteinai (1 lentelė) (Klis ir kt., 2006). Be to, oportunistinio žmogaus patogeno *Candida albicans* sienelę sudaro tie patys komponentai (Iorio ir kt., 2008), kas leidžia daryti išvadą, kad gauta informacija apie struktūrinius *S. cerevisiae* mielių pokyčius gali būti pritaikoma kitų eukariotinių ląstelių tyrimuose.

Mielių sienelė yra dinaminė organelė apsprendžianti ląstelės formą bei integralumą ląstelei dalijantis ar augant. Taip pat priklausomai nuo aplinkos osmosinio slėgio suteikia ląstelei mechaninį atsparumą (Dague ir kt., 2010). Mielių *Saccharomyces cerevisiae* citoplazminis osmosinis slėgis paprastai yra didesnis nei ląstelę supančios aplinkos. Tvirta, bet kartu ir labai elastinga ląstelės sienelė apsaugo nuo per didelio vandens patekimo į ląstelės vidų dėl susidarančio osmosinių slėgių skirtumo ląstelės viduje ir išorėje. Dėl į ląstelės vidų patenkančio vandens, ląstelė didėja, todėl sienelė išsitempia neutralizuodama slėgių skirtumą ir taip sustabdydama vandens patekimą į ląstelės vidų (Klis ir kt., 2006).

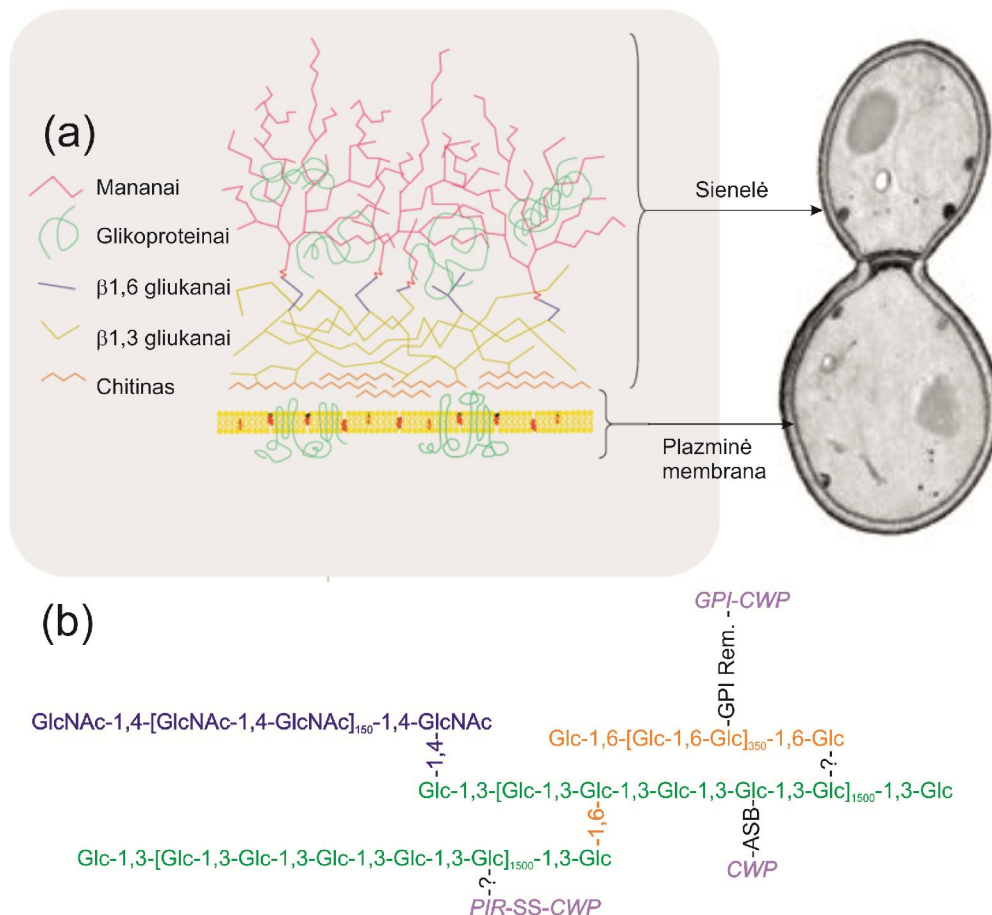
1 lentelė. Pagrindiniai mielių ląstelių sienelės komponentai (Stenson 2008). Žr. pav. 1.2

Sienelės komponentas (polimerizacijos laipsnis)	Masės vidurkis (kDa)	Procentinė dalis ląstelės sienelėje (%)
β 1,3-gliukanas (1500)	240	30-45
Glikoproteinai	Kinta	30-50
β 1,6-gliukanas (150)	24	5-10
Chitinas (120)	25	1,5-6

Ląstelės sienelė būdama mechaniškai atspari ir labai elastinga perduoda bei sumažina mechaninį stresą. Taip pat formos palaikymas yra būtinas morfogenezei. Mielių ląstelės priklausomai nuo aplinkos sąlygų gali augti ovalios formos, tačiau esant tam tikriems veiksniams (pvz. azoto trūkumui), gali įgauti elipsės formą ar augti sudarydamos pseudohifus. Ne mažiau svarbus vaidmuo ląstelės sieniei tenka vykstant mielių dauginimuisi: ląstelė įgauna tam tikrą formą, kuri yra kaip atsakas į aplinkoje esančius priešingo kryžminimosi tipo ląstelių feromonus (Klis ir kt., 2006).

1.2.1. β -gliukanai

β 1,3-gliukanas vienas iš pagrindinių pluoštinių sienelės struktūrinių komponentų. Šio polimerinio polisacharido pluoštą sudaro daugiau kaip 1500 gliukozės liekanų (1.2. pav. b). Manoma, kad pagrindinė šių pluoštų funkcija yra suteikti sieniei mechaninį tamprumą. Mielių sienelės ekstraktuose β 1,3-gliukanas randamas šakotos struktūros, kurių pluoštai sujungiami per β 1,6 jungtį. β 1,3-gliukanas kovalentiškai sujungtas su kitais sienelės komponentais: neredukuoti galai sujungti su redukuotais chitino galais per β 1,4 ryšį; β 1,6-gliukanas ir β 1,3-gliukanas sujungti per dar nežinomą ryšį. Taip pat kai kurie o-monozilinti sienelės baltymai per šarmams jautrią jungtį (angl. alkali-sensitive bond (ASB)) yra prijungti prie β 1,3-gliukano pluošto (Lesage ir Bussey 2006).



1.2. pav. Mielių ląstelių sienelės molekulinės sandaros schema (a) ir cheminė sudėtis (b). Remiantis (Odds ir kt., 2003; Klis ir kt., 2006; Lesage ir Bussey 2006; Neiman 2011). Santrumpų reikšmės: Glc – gliukozė; GlcNAc – N-acetilgliukozaminas; PIR – baltymai turintys vidinius pasikartojimus; -SS- – disulfidiniai ryšiai; CWP – sienelės baltymai.

1.2.2. Glikoproteinai

Polisacharidinis ląstelės sienelės skeletas tarnauja kaip karkasas išorėje esančiam glikoproteinų sluoksniui (1.2. pav. a). Šie glikoproteinai, o tiksliau jų angliavandenių šoninės grandinės, nepraleidžia per ląstelės sienelę makromolekulių iš aplinkos ir tokiu būdu yra lyg apsauginis skydas nuo svetimų baltymų. Iš kitos pusės šie glikoproteinai nepraleidžia tirpių produktų

iš ląstelės į aplinką. Toks limituotas ląstelės sienelės pralaidumas sąlygoja viduląstelinės mikroaplinkos susidarymą. Didelis ląstelės sienelės baltymų glikozilinimo laipsnis, taip pat ir neigiamai įkrautos fosfato grupės šoninėse angliavandenių grandinėse gali būti susiję su viduląstelinio vandens išlaikymu bei su sienelės paviršiaus krūvio suformavimu (Stenson 2008).

Mielių *S. cerevisiae* sienelėje buvo nustatytos dvi oligosacharidinių baltymų modifikacijos. N-glikozilintuose baltymuose asparagino liekana per N-glikozidinę jungtį yra sujungta su oligosachadu GlcNAc. Tuo tarpu prie O-glikozilintų baltymų serino ar treonino hidroksilo liekanų per α -manozilinę jungtį prijungiama trumpa manozijų grandinė. Dauguma per glikozilfosfatidilinozitolio (GPI) inkarą plazminėje membranoje imobilizuoti baltymai ir per PIR (*angl.* **p**rotein with **i**nternal **r**epeats) baltymus prie β 1,3-gliukanų prijungti baltymai yra O-monozilinti (Lesage ir Bussey 2006). Manoma, kad daugelis už indukuojamą agregaciją (flokuliaciją) atsakingų baltymų yra taip pat stipriai N- ir O-glikozilinti (Goossens ir Willaert 2010). Taigi, mielių sienelės baltymus būtų galima suskirstyti į tris grupes: a) baltymai dalyvaujantys sienelės sintezėje, tai hidrolazės ir transglikozidazės; b) tai nefermentiniai agliutinai, flokuliniai ir β 1,3-gliukanus sujungiantys baltymai. Šios dvi grupės baltymų vadinamos ląstelės sienelės baltymai (CWP) (Orlean 2012). Trečia grupė baltymų (c) – tai plasminėje membranoje imobilizuoti baltymai turintys trumpą C-galinį citoplazminį domeną ir serinu/treoninu turtingą ekstraląstelinį domeną (pvz. Wsc baltymai). Tai baltymai mechaniniai jutikliai, reaguojantys į ląstelės sienelės stresą ir aktyvuojantys ląstelės sienelės vientisumo (CWI) signalinį kelią (Levin 2011).

Svarbias specifines funkcijas atlieka ir atskiri ląstelės sienelės baltymai. Nustatyta, kad išorinis baltyminis ląstelės sienelės sluoksnis susideda ir mažiausiai 20-ties skirtingų glikoproteinų. Šio baltyminio sluoksnio sudėtis gali kisti priklausomai nuo ląstelės augimo sąlygų. Ląstelės sienelės baltymų dėka ląstelė atpažįsta kryžminimosi partnerį, formuoja bio-plėvelę, įgauna

pseudo-hifinį ar invazinį augimą (Klis ir kt., 2006), taip pat formuoja antibiotikams atsparią plėvelę (Verstrepen ir Klis 2006).

β 1,6- gliukanas ir chitinas atsakingi už mechanines mielių ląstelių savybes. Be to, chitinas dažniausiai sutinkamas gilesniuose sienelės sluoksniuose (apie 0,1-0,2 % visos sienelės masės) bei rando vietoje (apie 2 % visos sienelės masės). Taip pat buvo parodyta, kad chitino kiekis sienelėje priklauso nuo mechaninio streso ar mutacijų mielių sienelėje ir gali padidėti net iki 20 % visos sienelės masės (Dallies ir kt., 1998; Klis ir kt., 2002)

1.3.Mielių ląstelių pralaidumas ir jo tyrimo metodai

Mielių sienelė pasižymi įvairiomis funkcijomis: atpažinimo, sukibimo su paviršiais, toksinių medžiagų sulaikymo ir kt. Šiame darbe daugiausia dėmesio bus skiriama mielių sienelės mechaniniam atsparumui bei pralaidumui tirti.

Mielių ląstelių pralaidumui keisti skiriama vis daugiau dėmesio, nes mielės ne tik dažnai naudojamos maisto pramonėje, biotechnologijų pramonėje bet ir biomedicinoje (rekombinantinių baltymų gamybai) (Andersen ir Krummen 2002), biologinėje katalizėje (Chen 2007) ir biologinių visos ląstelės jutiklių (VLJ) kūrimui (Garjonyte ir kt., 2009; Su ir kt., 2011). Tačiau dažniausiai šiose srityse susiduriama su membranos ir sienelės pralaidumu, kuris apsunkina susintetintų medžiagų išgavimą ir katalizėje naudojamų medžiagų patekimą į ląsteles bei mažina analizuojamų medžiagų atrankumą (Su ir kt., 2011). Todėl labai svarbu yra ištirti kokios cheminės medžiagos lemia sienelės mechanines savybes bei kokie veiksniai galėtų įtakoti membranos ir sienelės pralaidumą ir kaip būtų galima paprastai tas savybes pakeisti.

1.3.1. Cheminis mielių sienelės modifikavimas

Siekiant padidinti katalizės aktyvumą ar VLJ jautrumą paprastai naudojamos hidrofobinės medžiagos, kas gali dar labiau apsunkinti šių medžiagų transportą per ląstelių membraną ir sienelę bei gali sukelti ląstelių žūtį. Medžiagos, sukeliančios sienelės struktūros ar pralaidumo pakitimus, ne tik veikia į sienelės struktūrinius komponentus, bet ir aktyvuoja CWI signalinį kelią, dėl kurio gali būti paleidžiami programuojamos žūties mechanizmai. Buvo parodyta, kad chitino antagonistai (Kalkoflor baltasis ir Kongo raudonasis), β 1,3-gliukano sintetazės inhibitoriai (paprastai tai enchinokandino dariniai naudojami kaip fungicidai) (Debono ir Gordee 1994), sienelės komponentus ardantys fermentai (zimolazės) ir kofeinas aktyvina CWI signalinį kelią, tuo pačiu keisdamas ir sienelės pralaidumą (Levin 2011). Nepaisant galimo netiesioginio sienelės pralaidumo reguliavimo dažniausiai yra naudojamos cheminės medžiagos pralaidumui padidinti.

Tiriant mielių rekombinantinės glioksalazės išėigos padidinimą, panaudojus tirpiklių mišinį (etanolio ir izopropanolio alkoholių), buvo pastebėta, kad šios medžiagos padidino šio fermento išėigą net iki 380 – 580 kartų. Toks katalizės padidėjimas buvo siejamas su greitesniu substratų patekimu į ląstelės vidų (Liu ir kt., 1999). Taip pat 50 % etanolio tirpalas didino laktuliozės produkciją β -galoktozidazės pagalba iki 2 kartų (Lee ir kt., 2004). Kitų autorių tyrimai parodė, kad 50 % tolueno tirpalas padidino katalazės katalizuojamą reakciją iki 6 kartų (Kubal ir D'Souza 2004).

Druskų tirpalai gali keisti ląstelių membranos ir sienelės pralaidumą įvairioms medžiagoms. Ištyrus L(-) karnitino produkcijos *E. coli* ląstelėse priklausomybę nuo NaCl koncentracijos paaiškėjo, kad į augimo terpę pridėjus iki 0,5 M šios druskos, karnitino išėiga padidėjo nuo 40 iki 80 % lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Padaryta išvada, kad bakterijų sienelė buvo pagrindinis substrato transportą ribojantis veiksnys (Cánovas ir kt., 2003).

EDTA taip pat didina sienelės pralaidumą, nes sujungia divalenčius jonus į kompleksus, silpnindamas sienelės struktūrą (Chen 2007). Mielių *Schizosaccharomyces pombe* šarminis apdorojimas (pH 11, 90 min) esant 0,3 % cetiltrimetilamino bromido (CTAB) taip pat pakeitė sienelės pralaidumą (Isoai ir kt., 2002).

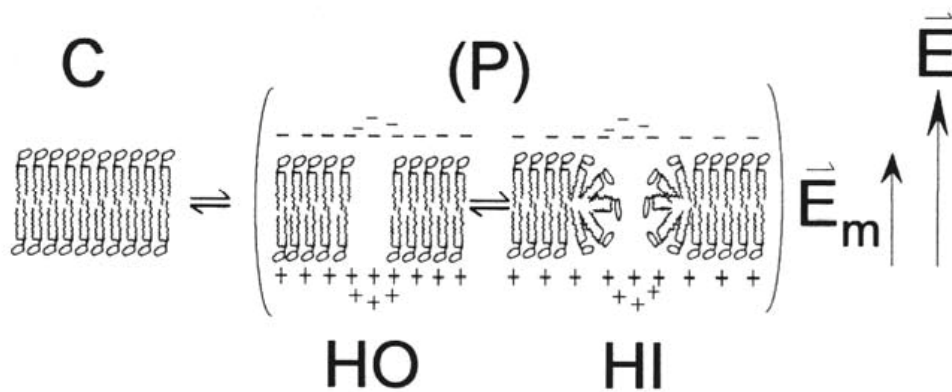
Dažniausiai naudojamos medžiagos mielių sienelės pralaidumui padidinti yra ditiotreitolis (DTT) (Reddy ir Maley 1993), 2-merkaptoetanolis (Klis ir kt., 2007), EDTA (etilendiamintetracto rūgštis) (De Nobel ir kt., 1989), Li⁺ jonai, PEG (polietilenglikolis) (Ito ir kt., 1983) ir dimetilsulfoksidas (Hill ir kt., 1991). Kuriamos ir naujos, polimerinės medžiagos sienelės pralaidumui padidinti ir taip pagerinti DNR patekimą į ląstelės vidų. Šiam tikslui buvo susintetintas dimetilaminoetilmetakrilato pagrindu elektrolitinis polimeras palengvinantis DNR patekimą į ląstelę (Filyak ir kt., 2013).

Šie tyrimai turi didelę reikšmę biotechnologijoje, siekiant į ląsteles įterpti didelės molekulinės masės makromolekules, tokias kaip DNR. Bio-kuro ar maisto pramonėse naudojamos mielės yra sunkiai transformuojamos DNR, todėl mielių sienelės tyrimai bei jos palaidumo padidinimas yra labai aktualūs. Ilgalaikis cheminio ląstelių modifikavimo priemonių vartojimas suardo membranas ir net gali sukelti ląstelių žūtį, taip mažindamas VLJ selektyvumą bei jautrumą (Su ir kt., 2011). Todėl ieškoma alternatyvių metodų ląstelių pralaidumui pakeisti, kurie nesukeltų nepageidaujamų reiškinių.

1.3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių ląstelėms

Praeitame skyriuje daugiausia buvo kalbama apie mielių ląstelės sienelės barjerines funkcijas ir jų modifikavimą. Tačiau ne mažesnę reikšmę įvairių medžiagų patekimui, transportui į ląstelės vidų ar iš jos turi ir membrana (1.2. pav. a).

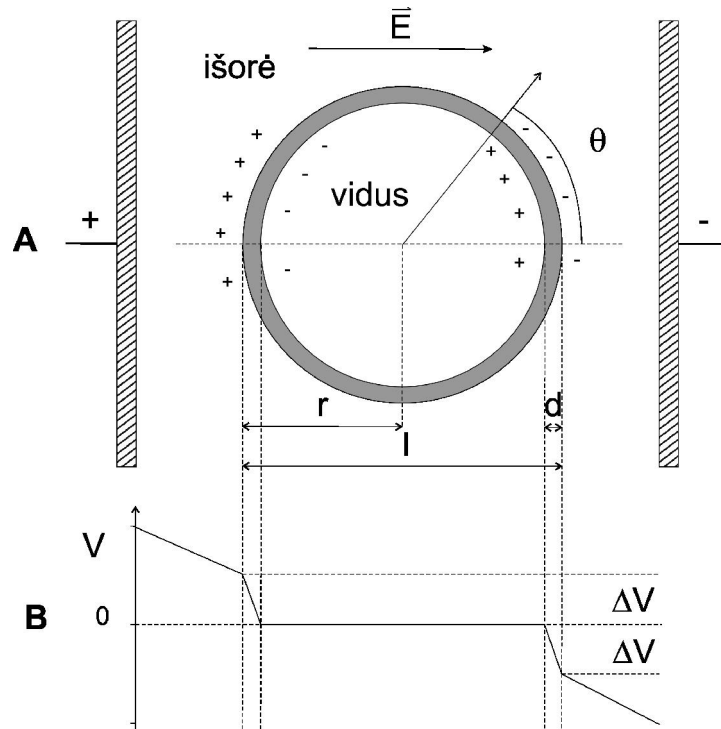
Membrana yra selektyviai pralaidi struktūra atsakinga už reikiamų medžiagų praleidimą ar/ir transportą, bei sulaikymą tų medžiagų, kurios galėtų būti toksiškos. Pastebėta, kad ląsteles paveikus impulsiniu elektriniu lauku į ląsteles patenka tos medžiagos, kurios natūraliai nepraeina membranos barjero ir nėra žinomas aktyvus šių medžiagų transportas į ląstelės vidų (Saulis 2008). Padidėjusio pralaidumo membranos būseną, priklausomai nuo išorinio impulso trukmės, gali trukti nuo milisekundžių iki sekundžių (priklauso dar ir nuo aplinkos temperatūros). Manoma, kad elektrinio lauko sukelta tokia pralaidi membranos būseną turėtų būti poliarizuota ir orientuota, todėl lokali pralaidi membranos vieta gali būti vadinama pora. Elektroporacija – tai impulsinio elektrinio lauko sukeltas plazminės membranos pralaidumo jonams, dažams ar nelaidžioms makromolekulėms padidėjimas, susidarant hidrofiliems ar hidrofobiniams poroms (Neumann ir kt., 2000). Neumann'as pasiūlė modelį (1.3. pav.), kuriame teigiama, kad išorinis elektrinis laukas (E) lemia uždaro membranos būsenos (C) (ji suprantama kaip kondensatoriaus (+, -)) paviršinę joninę poliarizaciją. Šio lauko indukuotas membranos elektrinis laukas E_m inicijuoja vandens molekulių tekėjimą į membraną, sukuriant cilindrinę hidrofobines (HO) arba invertuotas hidrofiliines (HI) poras (P), t.y. vyksta elektriniu lauku indukuoti membranos cheminės būsenos persitvarkymai. $C \rightleftharpoons HO \rightleftharpoons HI$ (Neumann ir kt., 1999).



1.3. pav. Impulsinio elektrinio lauko sukeltas membranos pralaidumo kitimo modelis. *C* – uždara dvisluoksni būsena; *(P)* – pora; *HO* – hidrofobinė pora; *HI* – hidrofilinė pora; E_m – membranos elektrinis laukas; E – išorinis elektrinis laukas (Neumann ir kt., 1999).

Elektroporacijos efektyvumas paprastai kontroliuojamas keičiant išorinio elektrinio lauko stiprį (E) bei impulso trukmę t . Be to, šie parametrai gali kisti priklausomai nuo ląstelių dydžio, tipo ir terpės. Didelę reikšmę elektrinių parametrų pasirinkimui turi įvairios sekretuojamos ląstelių medžiagos, išaugos, apvalkalai ir ląstelės sienelė (Neumann 1992).

Gyvos ląstelės plazminė membrana yra izoliatorius (savitoji talpa $C_m \sim 1 \mu\text{F cm}^{-2}$), todėl stačiakampio formos impulso metu ląstelės plazminėje membranoje sinchroniškai, pagal eksponentinį dėsnį, susiformuoja transmembraninė įtampa arba potencialas (ΔV) (1.4. pav.) (Neumann 1992; Schoenbach ir kt., 2004):



1.4. pav. Paviršinės ląstelės membranos poliarizacijos modelis išoriniame impulsiniame lauke. **A** – ląstelė išoriniame elektriniame lauke E , kai: r – ląstelės spindulys; $\cos \theta$ – nurodo ląstelės kampinę padėtį elektrinio lauko (E) vektoriaus atžvilgiu. **B** – išorinio elektrinio lauko E indukuotos transmembraninės įtampos ΔV kritimas elektrinio lauko kryptimi, kai membranos storis d (Neumann ir kt., 1999).

$$\Delta V(t) = -f \cdot r \cdot E \cos \theta \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_p}\right)\right) \quad (1.1)$$

kur (-) rašomas remiantis Maxwell'o apibrėžimu ($E = -\nabla V$), kuris sako, kad dėka teigiamų jonų elektrinis potencialas krenta išorinio elektrinio lauko vektoriaus kryptimi (1.4 pav. A). Kai kurioms ląstelėms gali būti svarbi kampinė padėtis elektrinio lauko (E) vektoriaus atžvilgiu ($\cos \theta$), patalpinus jas tarp elektrodų ir paleidus tam tikros trukmės (t) stačiakampio impulso formos impulsą. Transmembraninė įtampa kis ląstelės membranoje per tam tikrą laiką (τ_p). Kitaip tariant, jeigu $t > \tau_p$ tam, kad įvyktų elektroporacija ($\Delta V \approx 1V$) reikia didinti elektrinio lauko stiprį (E) (Sale ir Hamilton 1967). f yra faktorius apibrėžiantis ląstelių formą ir yra apskaičiuojamas pagal formulę:

$$f = \frac{l}{(l - \frac{2r}{3})} \quad (1.2)$$

Kai ląstelės ilgis l yra lygus ląstelės diametru $2r$, f yra 1,5 (Tsai-Fu ir kt., 2004). Šis faktorius neturi didelės reikšmės dirbant su gyvūninėmis ląstelėmis, nes dauguma jų yra sferinės formos. Tačiau prokariotiniams mikroorganizmams, pasižymintiems cilindrinėmis ląstelių formomis, t.y. $l > 2r$, f faktorius gali siekti net 3,5, todėl E turės būti didesnis, norint pasiekti $\Delta V \approx 1V$. Mielės natūraliai linkusios agreguoti (Molinari ir kt., 2004), todėl šio faktoriaus įvertinimas labai svarbus mielių elektroporacijai ar transformacijai prognozuoti.

Elektriniam laukui veikiant membraną, joje susiformuoja įvairių tipų poros. Tai gali būti hidrofobinės ar hidrofilinės poros, poros tarp baltymų ir lipidų. Porų susidarymas ir tipas priklauso nuo elektrinio lauko amplitudės ir impulso trukmės. Jeigu porų dydis ir skaičius membranoje viršija tam tikrą kritinę vertę, ląstelės membrana gali suirti – tai vadinama negrįžtama elektroporacija. Tai dažniausiai naudojama pramoninėje elektro-pasterizacijoje (Molinari ir kt., 2004), aplinkos apsaugoje (Sakugawa ir kt., 2012) ir vėžio elektro-terapijoje (Yu ir kt., 2012). Tinkamai nustačius elektroporacijos sąlygas, porų susidarymas membranoje yra grįžtamasis reiškinys ir ląstelės išlieka gyvybingos.

Didžiausias šio metodo taikymo genų pernašoje (transformacija ar transfekcija) trūkumas yra tai, kad dėl nepakankamai ištirta šio metodo taikymo po genų pernašos gaunamas prastas ląstelių gyvybingumas. Paprastai po genų ar baltymų elektropernašos gaunama kiek daugiau nei 40 % ląstelių gyvybingumas (Delorme 1989). Jau yra sukaupta nemažai informacijos apie elektrinių impulsų parametrus, reikalingus ląstelėms transformuoti, tačiau siekiant didesnio ląstelių išgyvenimo ir genų elektropernašos efektyvumo būtina tirti trumpų impulsų (nanosekundžių trukmės) poveikį ląstelėms. Be to,

tikima, kad impulsų moduliacija, taikant ms ar μ s trukmės impulsus su ns trukmės būtų galima pasiekti naujų rezultatų (Reberšek ir Miklavčič 2011).

Iki šiol dauguma ląstelių elektroporacijos tyrimų buvo atliekama, naudojant ilgus – mikro-milisekundžių trukmės – elektrinio lauko impulsus. Tik pastaruoju metu buvo pademonstruota, kad manipuliacijoms su ląstelėmis ir viduląstelinėmis struktūromis reikėtų naudoti ypač trumpus – nanosekundinius impulsus (Stacey ir kt., 2011). Aukštos įtampos nanosekundžių trukmės impulsai paveikia ląstelių plazminę membraną ir įvairias viduląstelines struktūras. Todėl šiais impulsais būtų galima manipuluoti viduląsteliniais ir/ar ląstelinius procesus.

Vienas pirmųjų mokslinių darbų demonstruojančių elektrinio lauko poveikį mielių ląstelėms buvo Sale ir Hamilton'o darbas atspausdintas 1967 metais (Sale ir Hamilton 1967). Jie parodė, kad esant tam tikram elektrinio lauko stipriui (iki 25 kV/cm) ir pasikartojantiems elektriniams impulsams pasiekiami mielių ląstelių žūtis. Vienas iš svarbiausių įrodymų buvo tai, kad ląstelių žūtis susijusi ne su temperatūros padidėjimu suspensijoje, kaip buvo manoma anksčiau. Jie šį reiškinį pavadino elektriniu pramušimu, ko pasekmėje membrana nebeatlieka barjerinės savo funkcijos. Kiek vėliau buvo pasiūlyti elektrinio lauko parametrai leidžiantys išlaikyti mieles gyvas ir pasiekti pakankamus transformacijos rezultatus (Delorme 1989). Praktiškai iki šiol šios rekomendacijos ir sukurti protokolai naudojami daugelyje biotechnologijos ir mikrobiologijos laboratorijų (Kawai ir kt., 2010).

Elektrinio lauko poveikis ląstelių membranai bei jo mechanizmas yra ištirtas, tačiau elektroporacijos įtaka ląstelės komponentams kol kas vis dar tiriamas. Jau yra žinoma trumpų, nanosekundžių, trukmės impulsų poveikis ląstelės mitochondrijoms (Batista Napotnik ir kt., 2012), citoskeletui, branduolio membranai, telomeroms (Stacey ir kt., 2011) ir endoplazminiam tinklui (White ir kt., 2004). Taip pat vis daugėja informacijos apie tiesioginį viduląstelinį membranų pralaidumo ryšį su ląstelėse vykstančiais procesais, tokiems kaip: apoptozė (Beebe ir kt., 2003), viduląstelinio signalo aktyvacija

(Morotomi-Yano ir kt., 2011), transliacijos supresija (Morotomi-Yano ir kt., 2012) ir oksidacija (Pakhomova ir kt., 2012). Tačiau informacijos apie elektrinio lauko poveikį mielių ląstelių komponentams yra labai mažai. Dar 1989 metais T. Tomov'as ir I. Tsoneva parodė, kad impulsinio elektrinio lauko poveikyje mielių sienelė dėl iš ląstelės vidaus išeinančių jonų, pakeičia krūvį (Tomov ir Tsoneva 1989). Vėliau pasirodė daugiau eksperimentų įrodančių, kad sienelė yra barjeras elektroporacijos metu į ląstelės vidų patenkančioms medžiagoms ir taip po elektrinio lauko poveikio pakinta ląstelės krūvis (Ganeva ir kt., 1995). Tačiau iki šiol nėra aiškus mechanizmas, kodėl elektroporacijos metu, ar po jos, pasikeičia mielių sienelės krūvis, kas atveria kelią tokioms polinėms medžiagoms kaip bleomicinas (Aouida ir kt., 2003) ar kiti antibiotikai (Debono ir Gordee 1994). Be to, vis didėjantis nanosekundžių trukmės impulsų poveikio taikymas parodė, kad itin trumpi impulsai nepažeisdami plazminės membranos inicijuoja gliutatio sintezę mielėse (Tanino ir kt., 2012), o aukštesniųjų eukariotų ląstelėse įjungia streso viduląstelinius signalinius kelius (Stacey ir kt., 2003).

1.4.Ląstelės tamprumas ir tyrimai AJM

Ląstelės yra veikiamos kompleksinių cheminių ir mechaninių aplinkos veiksnių. Paprastai išorinės fizikinės jėgos gali įjungti tam tikrus signalinius kelius, ko pasekmėje keičiasi ląstelės viduląstelinis citoskeletas. Procesas, kurio metu fizikinė jėga verčiama į biocheminį signalą vadinamas mechanotransdukcija, kuris priklauso nuo ląstelės tamprumo (Carl ir Schillers 2008). Kiekvienam ląstelių tipui būdingas savitas tamprumas, todėl tamprumo pakitimas į ne fiziologinę būseną rodo pato-fiziologinę ląstelių būklę – ligą. Taigi, ląstelių tamprumas gali būti charakteringas požymis, kai kurių ligų atveju, tokių kaip: artrito ligos atveju chondrocitų tamprumo pakitimai, plaučių lygiųjų raumenų ląstelių tamprumo padidėjimas astmos atveju ir krūtinės ąstelių vėžio atveju vėžinių ląstelių tamprumo sumažėjimas (Carl ir Schillers 2008).

Paprastai tiriamos šios biofizikinės ląstelių savybės: tamprumas (tamprumo modulis), viskoelastingumas ir standumas. Medžiagos savybė, esant išorinei deformacijai, grįžti į pradinę formą panaikinus išorinę deformaciją vadinama tamprumu. Tokiu atveju deformacija yra tiesiogiai proporcinga išorinei jėgai. Vienalytėms nekristalinėms medžiagoms deformacija yra charakterizuojama dviem koeficientais: Young'o moduliu E ir Poisson'o koeficientu ν . Young'o modulis nusako medžiagos atsparumą gniuždymui ar tempimui. Kai vyksta deformacija išilgai, objektas keičia matmenis statmenai veikiamai jėgai ir tai charakterizuojama Poisson'o koeficientu (Kasas ir Dietler 2008; Boal ir Boal 2012).

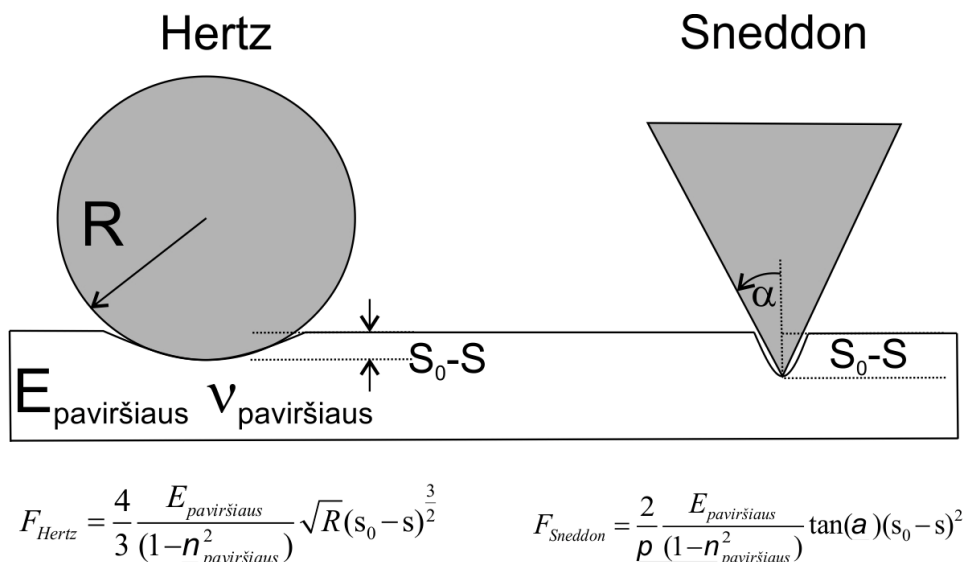
1920 metais panaudojant mikro magnetines daleles pirmą kartą atlikti kiekybiniai gyvų ląstelių tamprumo matavimai. Tamprumo vertės skaičiavimai net ir užtikrinus stabilias sąlygas bei gavus gerai atsikartojančias tamprumo vertes yra sunkiai interpretuojamos. Daugiausia keblumų kelia tai, kad ląstelės išorinės ir vidinės struktūros yra nehomogeniškos. Taigi, tamprumo skaičiavimai labai priklauso nuo pasirinkto modelio (Janmey ir McCulloch 2007). Taip pat priklauso ir nuo pasirinkto objekto, pavyzdžiui Gram neigiamos (turinčių ploną ląstelės sienelę apie 3-8 nm storio) bakterijos atlaiko apie 3-5 atmosferų išorinį slėgį, tuo tarpu Gram teigiamos (sienelės storis apie 25 nm) bakterijos gali atlaikyti daugiau nei 20 atmosferų. Dažniausiai gyvų organizmų tamprumas apskaičiuojamas pagal nuo krypties priklausomo Young'o modulio E matavimus. Tiriant Gram teigiamų bakterijų tamprumą gauta, kad išdžiovintų bakterijų $E = 1,3 \pm 0,3 \times 10^{10} \text{ J/m}^3$, o drėgnų - $3 \times 10^7 \text{ J/m}^3$ (Boal ir Boal 2012). Taigi, Young'o modelis yra santykis tarp poveikio (s) ir deformacijos (ϵ), ir jis apibudina medžiagų tamprumą (Hobbie ir Mielczarek 1998):

$$E = \frac{s}{\epsilon} \quad (1.3)$$

Jėgos spektroskopijos modeliai, skirti skaičiuoti pusiau begalinei aplinkai, yra vadinami Hertz'o ir Sneddon'o modeliais (dar vadinama Hertz-

Sneddon'o modeliui) (Kasas ir Ikai 1995), kurie aprašo ryšį tarp deformacijos ir objektą veikiančios mechaninės jėgos. Randamas Young'o modulis E , kuris naudojamas ląstelių mechaninių savybių palyginimui. Hertz'o modelis yra išvestas su sąlyga, kad deformacija yra daug mažesnė, negu yra sferinio kontakto radiusas, be to, Sneddon'o modeliui galioja sąlyga, kad deformacija (S_0-S) yra didelė lyginant su kūgio viršūnės nupjauto galo matmenimis (1.5. pav.) (Sneddon 1965).

Siekiant išskirti viduje ekspresuojamus rekombinantinius baltymus, mielių ląstelių suardymas yra aktuali tyrimų sritis biotechnologijoje. Mielės (*Saccharomyces cerevisiae*) yra plačiai naudojamos bio-farmacinių baltymų gamybai, tokiu kaip hepatito B vakcina (McAleer ir kt., 1984), hidrokortizonas (uždegimą slopinantis steroidinis hormonas) (Kelly ir Kelly 2003), artemisinino pirmtakas (prieš maliarinis preparatas) (Zeng ir kt., 2008) ar žmogaus kraujo baltymai (Martínez ir kt., 2012). Paprastai šie produktai yra ekspresuojami ląstelių viduje ir negali būti sekretuojami, todėl ląstelių suardymas nepakenkiant produktui yra svarbi ir aktuali problema (Stenson



1.5. pav. Sneddon'o ir Hertz'o modelių palyginimas, kietu kūnu spaudžiant minkštą paviršių (Sneddon 1965). $S_0 - S$ – deformacija.

2008). Kiekybinių metodų, leidžiančių tirti mielių ląstelės sienelės tamprumo pakitimus fiziologinėse (kiek įmanoma mielėms natūraliose) sąlygose, kontroliuojant temperatūrą, drėgmę ir maisto medžiagas, nėra daug. Anksčiau buvo naudojamas STM, tačiau AJM leidžia atlikti mielių sienelės fizikinių ir mechaninių savybių tyrimus fiziologinėse sąlygose (Dague ir kt., 2007). Taip pat išanalizavus literatūrą matyti, kad naudojant tą pačią AJM metodiką mielių tamprumas skiriasi nuo 0,6 MPa iki 2 MPa dėl to, kad tuose eksperimentuose buvo naudotos skirtingos aplinkos sąlygos, be to, dažniausiai tokiuose eksperimentuose naudojamos necharakterizuotos mielės (kepimo) (Bui ir kt., 2008). Taip pat yra žinoma, kad mielių sienelės sudėtis keičiasi priklausomai nuo aplinkos sąlygų ir nuo kultūros amžiaus, todėl logiška būtų manyti, kad ir tamprumas gali kisti priklausomai nuo augimo stadijos.

Dague su bendraautoriais atlikę išsamesnius mielių, turinčių įvairias mutacijas (kurios pažeidė: β -gliukanų sintezę (*fks1Δ* ir *knr4Δ*), sienelės baltymų glikozilinimą (*mnn9Δ*), chitino sintezę (*chs3Δ*), sienelės β -gliukanų išsidėstymą (*gas1Δ*) ir sienelės komponentų tarpusavio susirišimą (*crh1Δcrh2Δ*)) ląstelės sienelėje tyrimus nustatė, kad mielių tamprumas mažai priklauso nuo sienelės cheminės sudėties, nors *chs3Δ* mutantai pasižymėjo mažesniu Young'o moduliu (0,6 MPa, lyginant su laukiniu kamienu, kurio modulis buvo 1,6 MPa), o labiau priklauso nuo sienelės komponentų tarpusavio ryšių buvimą ar nebuvimo (*crh1Δcrh2Δ* ir *gas1Δ* mutantai pasižymėjo mažiausiu tamprumo moduliu) (Dague ir kt., 2010). Beje, darbų kuriuose būtų ištirtas cheminių medžiagų, veikiančių į mielių sienelės komponentus, poveikis sienelės tamprumui, nėra.

1.5. Mielių sienelės pralaidumo tyrimai

Yra žinoma, kad sąlyginai nedideli albuminai (apie 60 kDa) yra sulaikomi ląstelės sienelės, o tokie mielių baltymai kaip invertazė (apie 200 kDa) ar mielių *Cryptococcus* amilozė (2000 kDa) yra sekretuojamos į

terpę. Manoma, kad eksponentinėje augimo stadijoje augančių mielių sienelė yra pralaidi ne didesniems kaip 400 kDa globuliniams baltymams, kas atitinka 5,8 nm hidrodinaminį radiusą (De Nobel ir Barnett 1991). Todėl galime daryti išvadą, kad mielių sienelės negalima laikyti pasyviu rėčiu ir kad jos pralaidumas dar priklauso ir nuo molekulės prigimties. Mielių sienelės pralaidumo tyrimais siekiama ištirti kokios medžiagos ar/ir kokie išoriniai veiksniai gali pakeisti sienelės laidumą įvairiems fungicidams, nes, kaip buvo minėta anksčiau, pagrindinė mielių sienelės funkcija yra sustabdyti polinių molekulių difuziją į ląstelės vidų.

Fosforilintos manozės šoninės grandinės, esant fiziologiniam terpės pH, mielių ląstelių sienelėms suteikia neigiamą paviršiaus krūvį (Van Holle ir kt., 2012). Ląstelių sienelių hidrofobiškumas ir krūvis yra pagrindiniai mielių adheziją ant abiotinių paviršių lemiantys veiksniai. Todėl mielių paviršiaus krūvio analizė turi didelę reikšmę medicinoje, tiriant mikroorganizmų bioplėveles ant žmonių audinių, ir maisto pramonėje, kur mielėmis užteršti maisto ir gėrimų industrijoje naudojami paviršiai (Rhymes ir Smart 2001; White ir Walker 2011).

Yra keli skirtingi būdai pakeisti ląstelės pralaidumą, t. y. chemiškai paveikti ląsteles pridėjus redukuojančių medžiagų, tokių kaip ditiotreitolis (Klis ir kt., 2007), arba antibiotikais, slopinančiais mielių sienelės komponentų sintezę (Brajtburg ir kt., 1990). Taip pat ląstelių pralaidumas pasikeičia padidinus išorinį mechaninį slėgį (Smith ir kt., 2000) ir paveikus impulsiniu elektriniu lauku (elektroporacija), kurių poveikyje išteka viduląsteliniai baltymai, jonai ir nukleorūgštys (Liu ir kt., 2011). Siekdami nustatyti membranos pralaidumą, kiti mokslininkai naudojo fluorescentines medžiagas, tokias kaip FITC-dekstraną (Weaver ir kt., 1988; Ganeva ir kt., 1995) ar floksiną B (Muraji ir kt., 1993). Tačiau tokios medžiagos yra didelės (pvz. FITC-dekstranas apie 70 kDa) ir apsunkina kiekybinius ląstelės pralaidumo nustatymo pokyčius, nes dėl per didelės molekulės greičiau pasiekama ląstelių žūtis, nei aptinkamas molekulės prasiskverbimas per susidariusias hidrofilines

poras. Taip pat naudojami netiesioginiai pralaidumo matavimo metodai, tokie kaip terpės elektrinis laidumas ar ζ -potencialo pokytis. Buvo pasiūlytos hipotetinės prielaidos apie elektrinio lauko sukeltus mielių ląstelių paviršiaus krūvio pokyčio mechanizmus (El Zakhem ir kt., 2006).

Tiriant elektrinio lauko sukeltus mielių ląstelių sienelių paviršiaus krūvio pokyčius, taikant skirtingo krūvio molekulių adsorbcijos matavimo metodą pastebėta, kad tokių molekulių adsorbcija kito (Tomov ir Tsoneva 1989). Tai buvo pirmasis darbas rodantis, kad elektrinis laukas gali pakeisti ir sienelės savybes. Bleomicinas yra priešvėžinis vaistas, kuris veikia ir mielių gyvybingumą. Tai hidrofilinė molekulė, kuri negali pereiti ląstelės membranos difuzijos būdu dėl teigiamų šio vaisto molekulės dalių (Chen ir Stubbe 2005). Tai gali būti šios molekulės prisijungimo prie mielių ląstelių paviršiaus priežastis. Tiriant elektrinio lauko poveikį šio vaisto patekimo į mielių ląstelę dinamikai bei poveikį gyvybingumui buvo nustatyta, kad bleomicino patekimą riboja ląstelės sienelė (Aouida ir kt., 2003). Tokiu būdu buvo galima analizuoti ląstelės sienelės įtaką pralaidumui. Tačiau naudojant šiuos metodus sunku kiekybiškai įvertinti ląstelių pralaidumo pokyčius. Be to, šiais metodais negalima įvertinti atrankaus ląstelių sienelės pralaidumo pakitimo, nesukeliant ląstelių žūties.

Tetrafenilfosfonio katijonas (TPP^+) yra dažnai naudojamos prokariotinių ir eukariotinių ląstelių ramybės potencialui ($\Delta\psi$) matuoti. TPP^+ yra polinė molekulė tirpstanti lipiduose, ir jos prasiskverbimas per ląstelės membraną yra labai greitas $10^{-2} - 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Todėl, TPP^+ kiekis susikaupiantis ląstelėje priklauso nuo ląstelių membranos potencialo (Flewelling ir Hubbell 1986). Pirmasis darbas panaudojus TPP^+ koncentracijos matavimo metodiką membranos potencialui tirti mielėse buvo atliktas 1981 metais (Vacata ir kt., 1981). Buvo pastebėta, kad membranos potencialas tiriant TPP^+ absorbcijos kiekį mielėse ir tiesiogiai į ląsteles įvedant mikroelektrodus skiriasi. 1994 metais Ballarin-Denti su bendraautoriais atliko eksperimentus, kurių metu nustatė, kad TPP^+ koncentracija mielių ląstelių viduje nusistovi tik po kelių

dešimčių minučių ar net valandų. Todėl autorių nuomone, mielės per šį laiką gali adaptuotis ir pradėti atsikratyti katijono. Taigi, buvo padaryta išvada, kad TPP⁺ absorbcijos matavimai mielių ląstelėse kaip membranos potencialo matavimo metodas yra nepatikimas, be to eukariotinėms ląstelėms turinčioms sienelę (pvz.: augalams) taip pat netinka (Ballarin-Denti ir kt., 1994). Nepaisant šių darbų, buvo atlikti mielių, turinčių mutacijas genuose lemiančiuose sienelės architektūroje, tyrimai. Panaudojus TPP⁺ jonams atrankų elektrodą bei potenciometrinius matavimo metodus buvo nustatyta, kad TPP⁺ susikaupimas mielių ląstelėse priklauso nuo sienelės komponentų. Pavyzdžiui, mielių kamienas SEY6210 (*kre2*), pasižymintis klaidinga α -1,2-manoziltransferazės sinteze, kuri atsakinga už baltymų O-glikozilinimą, sukaupe beveik dvigubai daugiau TPP⁺ negu laukinis šio kamieno tipas (Zimkus ir Chaustova 2004). Todėl, galima teigti, kad šis metodas galėtų būti naudojamas kiekybiniam ir selektyviam mielių ląstelių sienelių pralaidumo tyrimams.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Reagentai ir tirpalai

FLUKA:	adeninas, TRIS
MERCK:	CaCl ₂ , D-galaktozė, kalio acetatas, MgSO ₄ ·7H ₂ O, NaCl, triptonas, agar-agaras
REANAL:	D(L)-leucinas, L-triptofanas
REAXIM:	histidinas,
ROTH:	(NH ₃) ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ , metioninas, D-gliukozė
SERVA:	LiCl, MgSO ₄ ·7H ₂ O, uracilas
SIGMA:	EDTA, NDS, mielių ekstraktas, peptonas, SC, minimali SC

LIFE TECHNOLOGIES: kalceinas mėlynasis.

Milipore: ISOPORE - polikarbonatinė hidrofiliinė membrana, 5,0 μm, 25 mm diametro;

Tirpalai: **Elektroporacijos buferis (EPB):** 1 M sorbitolio, 20 mM TRIS, pH 7,4 (4 °C).

SC terpė su Glu (sintetinė pilna su gliukozės priedu): 6,7 g mielių azoto bazė ir 2 % gliukozės.

Atranki SC terpė –leu: 6,7 g minimalios SC terpės su azoto šaltiniu, vitaminais, druskomis ir reikiamu amino rūgščių ar auktrofinių priedų kiekiu: histidino 20 mg/L; uracilo 20 mg/L; triptofano 20 mg/L; adenino 20 mg/L 100 mL dejonizuotame vandenyje. Be leucino.

2.2. Mielių kamienai, kultivavimas ir transformacija

2.2.1. Mielių kamienai ir jų auginimas

Darbe naudoti mielių *Saccharomyces cerevisiae* SP1 (*MAT α his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can^R*) (Stanhill ir kt., 1999) ir SEY6210 (*MAT α , leu2-3, leu2-112, ura3-52, his3- Δ 200, trp1- Δ 901, lys2-801, suc2- Δ 9, GAL*) (dovanotas H. Bussey, Kanada) kamienai. Auginimo sąlygos bei ląstelių kultūros paruošimas buvo atliekamos vadovaujantis standartinėmis procedūromis pagal literatūros šaltinius (Potter ir Heller 2010) su tam tikromis modifikacijomis. Mielių kultūra auginama skystoje YPD (2 % gliukozės, 2 % peptono, 1 % mielių ekstrakto) ar agarizuotoje (YPD su 1,5 % agar agaru) terpėje 30 °C temperatūroje aeruojant 12 - 36 val. Visi eksperimentai buvo atliekami su mielių ląstelėmis išskirtomis ankstyvosios eksponentinės augimo fazės metu ($OT_{600\text{ nm}}$ 0,8 – 1,0). Eksponentinėje augimo fazėje buvo pasirinkta ląstelių suspensija siekiant didžiausio mielių ląstelių transformacijos efektingumo ir jautrumo fiziniam poveikiui (Anton-Leberre ir kt., 2010). Mielių ląstelės buvo suspenduojamos 20 mM Tris-HCl buferyje, pH 7,4 (Zimkus ir kt., 2006).

2.2.2. Cheminis mielių sienelės modifikavimas genų pernašos metodu

Mielių ląstelės buvo auginamos ir paruošiamos, kaip nurodyta anksčiau, naudojant tas pačias auginimo sąlygas. *S. cerevisiae* mielių kamienas SP1 buvo auginamas iki ankstyvos eksponentinės augimo fazės, po to du kartus plaunama 1 mL 100 mM Tris-HCl buferiu su 150 mM NaCl ir 1 mM EDTA, pH 8,0 siekiant pašalinti terpės likučius. Suspenduojama 1 mL 100 mM Tris/EDTA su 0,1 M ličio acetato, pH 8,0 ir inkubuojama 45 min. 30 °C temperatūroje. Po to pridėta 25 μ L 1 M DTT tirpalo ir ląstelių suspensija buvo

inkubuojama 15 min. Mielių ląstelės buvo du kartus perplaunamos 1 mL 4°C temperatūros (0,01 M fosfatiniu buferiu su 0,0027 M kalio chlorido ir 0,137 M natrio chlorido, pH 7,4) (PBS) tam, kad būtų pašalinti DTT likučiai. Po to mielės buvo plaunamos ir suspenduojamos 0,5 mL 4 °C temperatūros 1 M sorbitolio tirpalo. Mielės buvo laikomos lede iki tyrimo AJM. Paruoštos mielių ląstelės buvo transformuojamos elektroporuojuant pRS425 (YE-tipo „shuttle“ vektorius, 2 μm ori, *LEU2*, *ampR*) 0,05 μg/μL plazmidinės DNR. Elektroporacija ir transformacijos kontrolė buvo vykdomos pagal standartinį protokolą, naudojant „Multiporator“ (Eppendorf, AG) generuojantį 5 ms trukmės 2500 V impulsus (1,25 kV/cm elektriniu lauku) (Sambrook ir Russell 2001). Po 5-7 parų transformuotų ląstelių atrankai naudota selektyvi SC –leu terpė.

2.3.Mielių ląstelių paruošimas tamprumo tyrimams

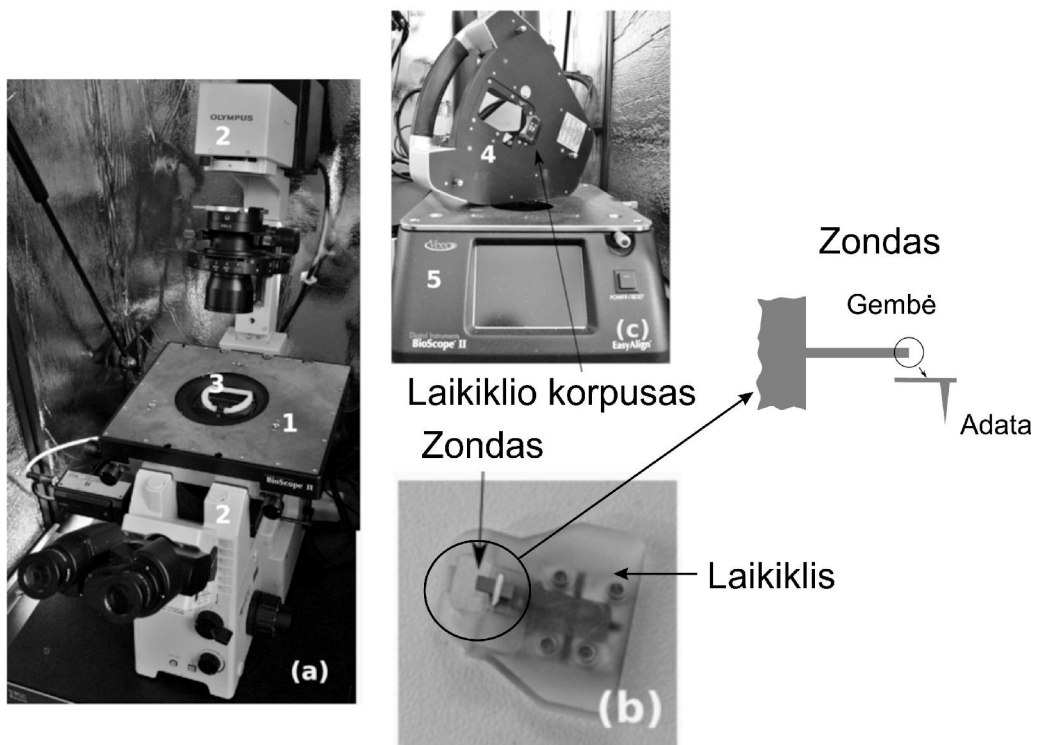
Mielių imobilizacijai ant stiklo paviršiaus mielių suspensija (apie 10^4 ląstelių/mL) paruošiama 500 μL tūrio dejonizuotame vandenyje (DV) (pH 6,5) prieš tai du kartus ląsteles plaunant (2000 aps./min. centrifuguojant 3 min), siekiant išvengti pašalinių medžiagų (terpės likučių). Suspensija paskleidžiama ant stiklo paviršiaus ir laikoma kambario temperatūroje (≈ 20 °C) apie 1-2 h iki pilno skysčio išdžiuvimo.

DV paruošta mielių ląstelių suspensija (apie 10^4 ląstelių/mL) filtruojama per ISOPORE membraną, kurios porų dydis atitinka gyvų ląstelių skersmenį (apie 5 μm). Membrana buvo nuskalauta dejonizuotu vandeniu keletą kartų, kad visos į poras nepatekusios ląstelės būtų pašalintos. Centrinė membranos dalis dvipuse lipnia juostele buvo pritvirtinta prie objektinio stiklelio ir perkelta nuskaityti į AJM.

2.4. Matavimų atominių jėgų mikroskopu metodika

Darbe yra naudojamas Veeco Bioscope II (Bruker, JAV) atominių jėgų mikroskopas (2.1. pav.), sujungtas su optiniu mikroskopu Olympus IX71 (Olympus, JAV). Buvo naudojami 17 serijos n-tipo silikoniniai zondai (CSC17/AIBS, MikroMash, Vokietija), kurių jėgos koeficientas buvo apie 0,18 N/m su keturkampės piramidės formos adata, kurios galas yra apie 8 nm skersmens (2.1. pav.).

Mūsų aprašytuose tyrimuose buvo naudojamas AJM veikiantis dviem pagrindiniais matavimo režimais: kontaktiniu ir virpančio zondo. Kontaktiniame režime, kai adata yra pastoviam kontakte su tiriamo objekto paviršiumi, jėga tarp bandinio ir zondo yra palaikoma vienoda, parenkant tam



2.1. pav. Pagrindinės atominių jėgų mikroskopo Bioscope II sudedamosios dalys: (a) XY kryptimis judantis bandinio stalas (1), kuriame įmontuotas mėginio laikiklis (3) ant optinio invertuoto mikroskopo (2); (b) zondo laikiklis; (c) laikiklio korpusas (4) ir lazerio spindulio centravimo įrenginys (5).

tikra jėgą prispaudžiančią adatą prie paviršiaus. Lazerio spindulys atsispindi nuo atsilenkiančios gembės ir patenka į tam tikros konstrukcijos fotodiodinį detektorių. Taip, priklausomai nuo gembės atsilenkimo kampo, spindulys atspindimas į skirtingas detektoriaus zonas.

Matuojant virpančio zondo režime gembė virpa tam tikru rezonansiniu dažniu. Šį režimą galima apibūdinti tokiais parametrais: amplitudė, dažnis, fazė, kurie pasikeičia zondui, trumpam kontaktuojant su bandinio paviršiumi. Kiekvienas iš šių parametrų gali būti naudojamas grįžtamojo ryšio signalo formavimui. Papildomai yra galimybė susieti optinį vaizdą su aukštos skiriamosios gebos AJM matavimais. Siekiant sumažinti tiriamų biologinių objektų negrįžtamą suardymą, mielės ore buvo matuojamos virpančio zondo režimu.

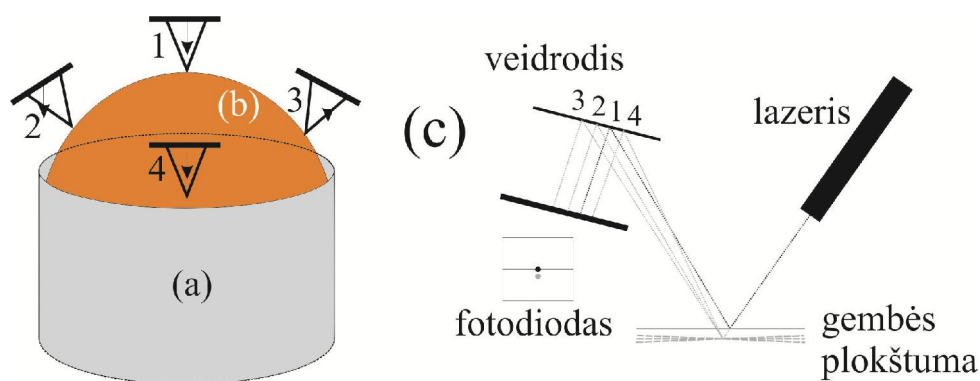
2.4.1. Mielių ląstelių vaizdinimas ir tamprumo matavimai skystyje

Paruoštų ir ant paviršiaus imobilizuotų mielių vaizdinimui buvo naudojami silikono nitrido zondai (MLTC, Brucker) su trikampe gembe ir 20 nm skersmens keturšonės piramidės adata. Tikslus gembės standumo koeficientas buvo nustatytas terminių svyravimų metodu, naudojant Sader terminio suderinimo metodą, analizuojantį gembės terminių svyravimų „triukšmo“ spektrą. Nustatytas standumo koeficientas buvo mažesnis nei 0,1 N/m ir sutapo su nurodytu gamintojo specifikacijoje.

ISOPORE membranoje imobilizuotų nepaveiktų ir chemiškai apdorotų mielių ląstelių tyrimai buvo atliekami tokiomis pat sąlygomis bei naudojant tokį pat zondą, ant membranos užlašinant apie 100 – 200 μ L DV. Be to, buvo siekiama atrinkti mieles be pumpuravimosi rando, galinčio iškreipti tamprumo rezultatus ir parenkant panašią mielių padėtį membranos poroje.

Mielių ląstelių deformacija ($d - z$) buvo tiriama viename taške ir daugelyje taškų apie pasirinktos ląstelės centrą. Kiekvieno iš matavimo karto

buvo užrašomos bent penkios deformacijos kreivės. Vertinant, ar ląstelės vieta (lokalizacijos gylis) membranos poroje nepakito, buvo lyginami eksperimento metu gauti AJM vaizdai prieš ir po jėgos matavimų. Kontaktiniame AJM režime zondo pakilimo/nusileidimo greitis buvo išlaikomas ne didesnis kaip 200 nm/s, kad viskoelastinių savybių įtaka būtų sumažinta (Bui ir kt., 2008). Maksimalaus įdubimo suformavimo jėga siekė iki 36 nN. Išmatavus $175 \mu\text{m} \times 175 \mu\text{m}$ matmenų ISOPORE membranos plotą (3.2. pav.) buvo nustatomos membranos poros su imobilizuotomis ląstelėmis. Įvertinus ląstelių imobilizavimo gylį buvo pereinama prie atskiros ląstelės matavimų (3.2. pav.).



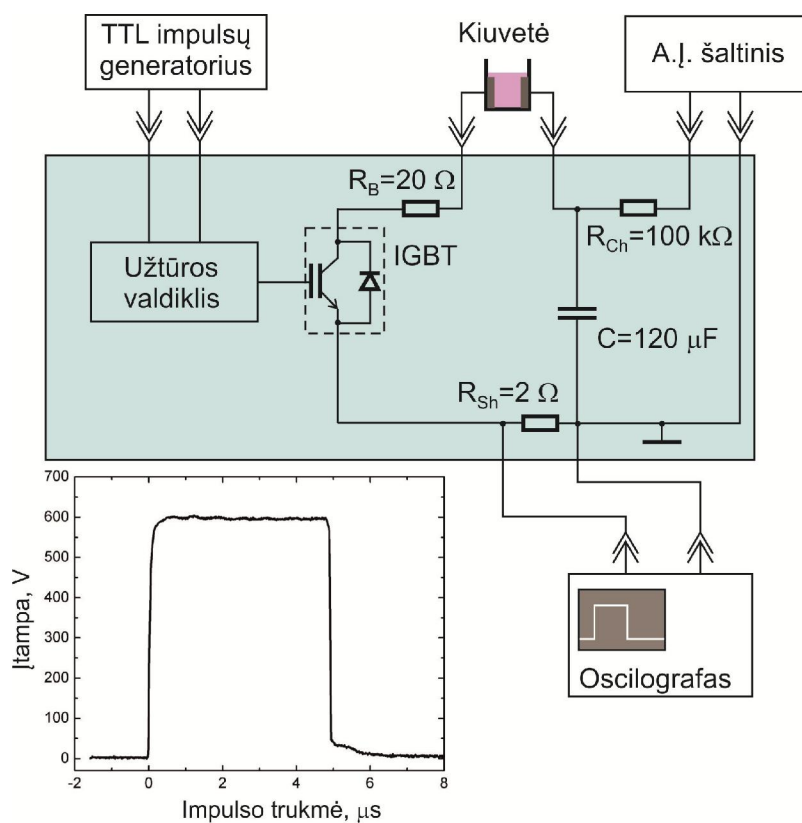
2.2. pav. Membramoje (a) imobilizuotų mielių (b) tiriamos vietos pasirinkimas (1, 2, 3 ir 4) bei galimos klaidos (c), atsirandančios dėl klaidingai pasirinktos analizuojamos vietos, aiškinimas. Rodyklėmis pavaizduota jėgos kryptis.

Užregistravus ląstelės vaizdą ir optiškai ją įvertinus ant ląstelės paviršiaus buvo pasirenkami taškai, kuriuose buvo matuojamos jėgos–atstumo kreivės. Kiekviename pasirinktame taške buvo užregistruotos bent penkios jėgos – atstumo kreivės (2.2. pav.). Tyrimų metu pastebėta, kad rezultatai priklauso nuo analizei pasirinktos vietos imobilizuotos mielės paviršiuje. Atliekant matavimus lateralinuose taškuose (2.2. pav. 2, 3, 4) gaunamos klaidos yra aiškinamos atspindėto lazerio spindulio kampo kitimu dėl pasvirusios gembės (2.2. pav. c). Gauti vaizdai ir duomenys apdorojami mikroskopo programine įranga (Nanoscope v. 8).

2.5. Impulsinio elektrinio lauko generavimo eksperimentinė įranga

2.5.1. Mikrosekundžių trukmės impulsų generatorius

Eksperimentų metu mielių elektroporacija mikrosekundžių trukmės impulsais buvo atliekama naudojant įrangą (2.3. pav.), sudarytą iš aukštos įtampos šaltinio (A.Į. šaltinis), TTL (tranzistorius – tranzistorius loginio grandynas) žemos įtampos mikrosekundžių trukmės impulsų generatoriaus (TG 5011, Thurlby Thandar Instruments, DB), aukštos įtampos impulsus formuojančios grandinės (Pav. 2.3., pilka zona), kiuvetės, kurioje patalpintas elektroporavimo buferis su mielėmis ir realaus laiko oscilografo, matuojančio



2.3. pav. Mikrosekundžių trukmės impulsų generatorius schema ir tipinis stačiakampio formos impulsas esant 600 V įtampai ir 5 μs impulso trukmei.

impulsų parametrus (impulso formą ir amplitudę). AĮ šaltinis naudojamas įkrauti 120 μF talpos kondensatorių. Įkrovimo įtampa gali kisti nuo kelių voltų iki 1 kV. G5-54 tipo generatorius naudojamas kaip stačiakampių TTL impulsų generatorius, formuojantis impulsus, kurių trukmė ir amplitudė gali kisti atitinkamai nuo 0,1 μs iki 1 ms ir nuo 1 V iki 75 V. Aukštos įtampos impulsus formuojanti grandinė, galinti generuoti stačiakampio formos impulsus, kurių amplitudė siekia iki 1 kV, o trukmė nuo 1 μs iki 1 ms, sukurta naudojant bipolinį tranzistorių su izoliuota užtūra (IGBT). Oscilografas (DPO4034, Tektronix, JAV) buvo naudojamas matuoti aukštos įtampos impulsų parametrus.

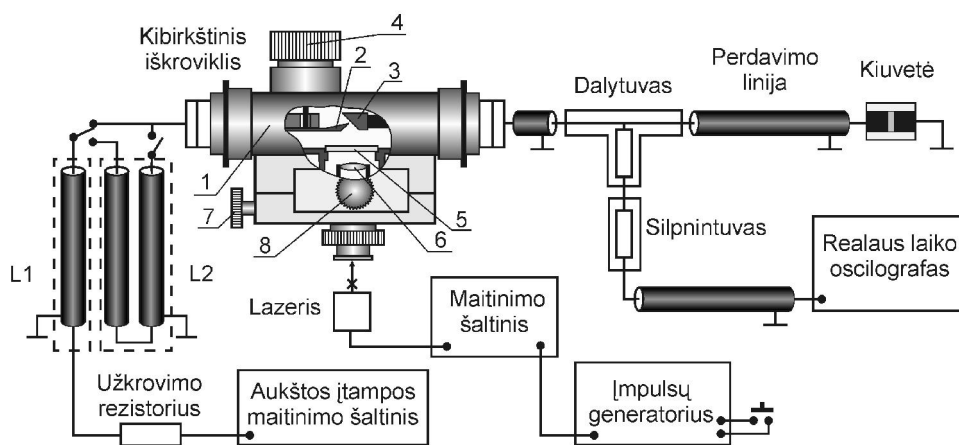
Mikrosekundžių trukmės impulsų generatoriaus veikimo principas yra toks: 120 μF kondensatorius pakraunamas per balastinį rezistorių R6 iki įtampos, nustatytos AĮ šaltinyje. TTL impulsų generatorius sukuria 5 V kintančios trukmės impulsą. Impulso trukmė atitinka impulso, išeinančio iš aukštos įtampos impulsus formuojančios grandinės, trukmę. Užtūros valdiklis HCPL3120 (Avago Technologies, JAV) yra speciali integruota grandinė, valdanti IGBT, kuris gali atlaikyti iki 1200 V kolektoriaus – emiterio įtampos ir 1 ms trukmės impulsus, kurių maksimali amplitudė 114 A. Užtūros valdiklio įvesties grandinė yra optiškai izoliuota. Atidarymo signalas (+15 V) ir uždarymo signalas (-5 V) yra perduodami IGBT (1MBH25D-120, Fuji Electric, Japonija) užtvarui. Atidarius IGBT, įtampa nukreipiama į 120 μL tūrio komercinę kiuvetę (Lonza, Vokietija), kurioje atstumas tarp polimerinių elektrodų yra 1 mm. Žemo induktyvumo impulsų kondensatorius naudojamas sukurti stataus kilimo impulsus.

Impulso elektrinis laukas skaičiuojamas pagal formulę: $E_p = V_p/d$; kur d yra atstumas tarp elektrodų (1 mm); V_p įtampa kiuvetėje, kuri paskaičiuojama pagal šią

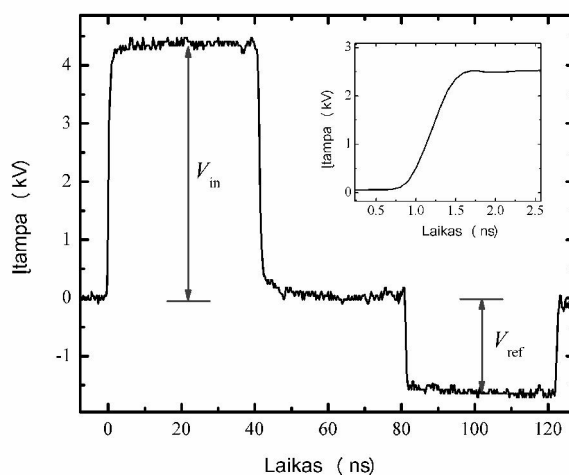
formulę:
$$V_p = V_s - \frac{V_{Osc}}{R_{Sh}} \cdot (R_{Sh} + R_B)$$
 (Pav. 2.3.), kur V_s – yra nustatyta šaltinio įtampa, V_{Osc} – išmatuota oscilografu impulso amplitudė; R_{Sh} – šuntuojamosios varžos reikšmė ir R_B – balastinės varžos induktyvumas. Mielės buvo veikiamos vienkartiniais stačiakampio formos 5, 10, 50, 100 ir 150 μs trukmės skirtingos amplitudės elektriniais impulsais, kurių maksimalus elektrinis laukas buvo iki 10 kV/cm.

2.5.2. Nanosekundžių trukmės impulsų generatorius

Šiame darbe naudota nanosekundžių trukmės impulsų generavimo sistema, kurios schema pateikiama 2.4. pav. Šią sistemą sudaro: optiškai valdomas iškroviklis (tipas RGL-2, Rusija), lazeris (1062 nm, 450 ps trukmės ir 1 mJ impulso energija), lazerio maitinimo šaltinis (STA-01, STANDA, Lietuva), elektrinių impulsų generatorius 25 V amplitudės su kintamu nuo 1 μ s iki 1 ms impulsu (tipas G5-54), impulsą formuojantis koaksialinis kondensatorius ($L1$ ir $L2$ galintis formuoti 10 ns; 40 ns; 60 ns ir 92 ns impulsus), didelės galios kintamos įtampos (nuo 2,5 kV iki 25 kV) šaltinis, galios daliklis (1: 86), 75 Ω perdavimo linija, elektroporacijos kiuvetė, transformatorius iš 75 Ω į 50 Ω , slopintuvas (40 dB) ir 6 GHz DPO 70604 Tektronix realaus laiko oscilografas. Optiškai valdomas iškroviklis buvo



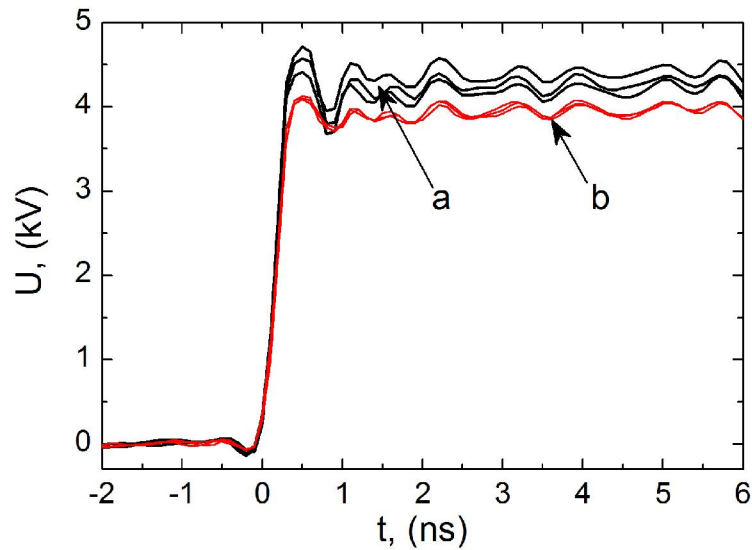
2.4. pav. Stačiakampių 60 ns trukmės elektrinių impulsų generavimo ir matavimo schema, panaudojant dujinį kibirkštinį. Optiniu būdu valdomas kibirkštinis iškroviklis RGL-2: 1. RGL-2 jungiklio korpusas. 2. Anodas. 3. Atstumo tarp elektrodų reguliavimo rankenėlė. 4. Išlydžio proceso stebėjimo langelis. 5. Gaubtas. 6. Katodas. 7. Derinimo įrenginys. 8. Lęšis. 9. Šviesos langelis. $L1$ ir $L2$ užkrovimo linijos.



2.5. pav. Tipinė nanosekundžių trukmės impulso forma. Įsiuve pavaizduotas priekinis impulso frontas

sužadinamas ps lazerio impulsu, tokiu būdu paleidžiamas impulsas. Tipinė šiuo generatoriumi gaunama impulso forma vaizduojama 2.5. pav. Kritęs ir atsispindėjęs impulsai buvo fiksuojami realaus laiko oscilografu. Įtampa, buvusi tarp kiuvetės elektrodų, yra šių impulsų amplitudžių suma: $V = V_{in} + V_{ref}$. Pasikartojantiems 175 kV /cm elektrinio lauko stiprio impulsams buvo sugeneruojama 10 tokios pat amplitudės impulsų su 1 Hz pasikartojimo dažniu. Elektroporacijos tyrimo metu norimam elektriniam laukui iki 200 kV/cm pasiekti ląstelių suspensija buvo supilama į specialią kiuvetę (2.7. pav.). Tyrimui buvo pasirinkti elektriniai impulsai, kurių amplitudė siekė 12,5 kV, o trukmė 60 ns.

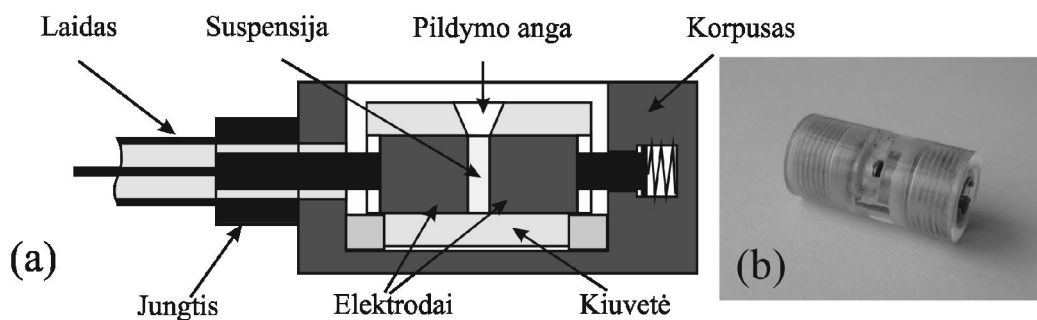
Taip pat buvo atlikti iškroviklio palyginamieji bandymai sužadinant iškroviklį lazeriu ar savaiminiu pramušimu. Priklausomai nuo sužadinimo būdo kito impulso amplitudė (U) (2.6. pav.). Savaiminio pramušimo atveju nanosekundinio impulso amplitudė kito apie 10 % nuo visos impulso amplitudės (2.6. pav. a). Optiškai lazeriu sužadinus impulsą buvo gautos 0,8 % amplitudės fluktuacijos nuo visos impulso amplitudės. Tokiu būdu gali būti sumažinamos kritinio elektrinio lauko paklaidos, kas ypač aktualu tiriant nanosekundžių trukmės impulsų poveikį.



2.6. pav. Impulso amplitudės fluktuacijos priklausomai nuo iškroviklio sužadinimo būdo. a – sužadinama savaiminiu pramušimu; b – sužadinama lazerio impulsu.

2.5.3. Mielių elektroporacijai sukonstruota kiuvetė

Siekiant optimalių rezultatų buvo sukonstruota kiuvetė (2.7. pav.), kuri buvo naudojama mielių elektroporacijoje. Jos dizainas leido pasiekti iki $2 \cdot 10^5$ V/cm elektrinio lauko stiprį 0,04 mL suspensijos tūryje. Cilindro formos, nerūdijančiojo plieno kiuvetės elektrodai yra 6 mm diametro. Tuo atveju, kai



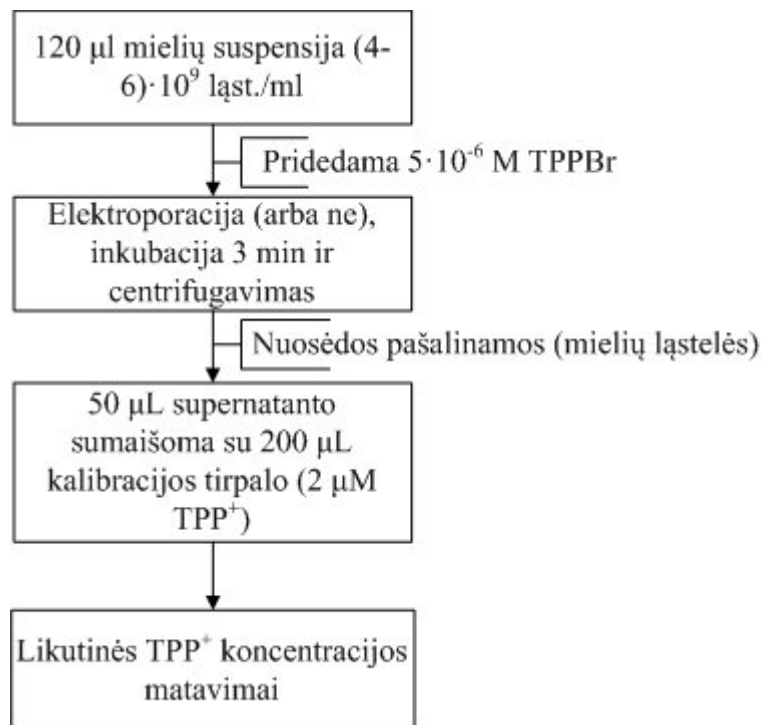
2.7. pav. Kiuvetės naudotos mielių elektroporacijos eksperimentuose schema (a) ir nuotrauka (b).

atstumas tarp elektrodų yra 1 mm, biologinio substrato varža siekia kelis šimtus omų.

2.6. Mielių ląstelių pralaidumo tyrimų metodikos

2.6.1. Ląstelių suspensijos paruošimas elektroporacijai ir tetrafenilfosfonio jonų kaupimo matavimas

Elektroporacijoje naudotos mielių ląstelės buvo auginamos iki ankstyvos eksponentinės augimo fazės. Po to perplaunamos distiliuotu vandeniu ir pakartotinai suspenduojamos 1 mL elektroporacijos buferio (1 M sorbitolio, 20 mM TRIS, pH 7,4 (4 °C)) (EPB). Galutinė mielių koncentracija buvo išlaikyta $4 - 6 \times 10^9$ ląstelių/mL. Elektroporacija buvo vykdoma 120 μ L EPB prieš pat elektroporaciją pridedant tetrafenilfosfonio bromido (TPPBr) iki 5×10^{-6} M galutinės koncentracijos (2.8. pav.). Po elektrinio lauko poveikio ir 3



2.8. pav. TPP⁺ matavimų eksperimento atlikimo schema.

min. inkubacijos mielių ląstelės buvo nusodintos, o supernatantas buvo naudojamas likutinei TPP⁺ jonų koncentracijai įvertinti. 50 μL supernatanto ([TPP⁺]_{supernatanto}) sumaišoma su 200 μL kalibracinio 2·10⁻⁶ M koncentracijos TPP⁺ tirpalu, siekiant padidinti tiriamojo mėginio kiekį. Gaunama pradinė TPP⁺ koncentracija ([TPP⁺]_{pradinė} = N_s) = 2,6·10⁻⁶ M. Lygiai taip pat buvo ruošiami kontroliniai mėginiai (be poveikio) bei mėginiai skirti tirti TPP⁺ absorbcijos mielėse kinetikai. Mielių absorbuotas TPP⁺ kiekis (N) buvo apskaičiuojamas: $N = [TPP^+]_{pradinė} - [TPP^+]_{supernatanto}$, tai yra $N = N_s - N_{supernatanto}$. Matavimuose buvo naudojami tetrafenilfosfonui atrankūs elektrodai (Zimkus ir Chaustova 2004). Elektrodo potencialų skirtumas buvo nustatomas WTW 526 jonometru (WTW, Weilheim, Vokietija) sujungtu su kompiuteriu. Duomenų įrašymui, analizei bei mielių absorbuoto TPP⁺ kiekio skaičiavimams buvo naudojamas PicoLog (Pico Technologies, DB) programinis paketas.

Taip pat buvo tiriama TPP⁺ absorbcijos mielėse kinetika, t.y. buvo siekiama iširti ar impulsinis elektrinis laukas (IEL) gali pakeisti TPP⁺ akumuliacijos lygį ir nustatyti ar IEL keičia TPP⁺ absorbcijos greitį. Šiam tikslui matavimai buvo atliekami paveikus impulsiniu 150 μs trukmės 4,8 kV/cm elektrinio lauko stipriu ir imant mėginius skirtingais laiko intervalais bei po poveikio inkubuojant kambario temperatūroje. Kontroliniuose – nepaveiktuose mėginiuose analizuojamas sukauptas TPP⁺ kiekis tokiais pat laiko intervalais, kaip tiriant IEL poveikį.

2.6.2. Fluorescencinė mikroskopija

Siekiant nustatyti elektroporacijos efektyvumą, mielių ląstelės buvo du kartus perplaunamos EPB buferiu ir sukoncentruojamos iki $1,5 \times 10^8$ ląstelių 100 μL tame pačiame buferyje. Tuomet buvo pridama 400 μM kalceino mėlio AM (modifikuoto kalceino mėlynojo, kuriam ląstelė yra pralaidi) fluorescuojančio dažo. Šis dažas absorbuoja 360 nm, o spinduliuoja 449 nm

ilgio bangos šviesą. Po 30 min. inkubacijos tamsoje ir kambario temperatūroje, ląstelės buvo stebimos BX51TF (Olympus, Japonija) fluorescentiniu mikroskopu su tinkamu filtrų kubu. Buvo fotografuojama „Evolution QEI Monochrome“ (Media Cybernetics, JAV) kamera, naudojant „Image Pro Express v.6“ (Media Cybernetics, JAV) programinę įrangą. Buvo skaičiuojamos fluorescuojančios impulsiniu elektriniu lauku paveiktos mielių ląstelės. Elektroporacijos efektyvumas buvo skaičiuojamas kaip skirtumas tarp fluorescuojančių ir nefluorescuojančių mielių ląstelių ir buvo išreikštas procentais. Kiekvieno eksperimento metu buvo suskaičiuojama bent šimtas ląstelių.

2.7. Elektrinių impulsų poveikio mielių gyvybingumui įvertinimas

Gyvybingumo nustatymui mėginiai buvo imami prieš ir po elektroporacijos. Mielių proliferacijos tyrimas buvo atliktas pagal mikrobinių ląstelių gyvybingumo rinkinio, sukurto 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio natrio druskos (WST - 8) pagrindu (Dojindo, Kumamoto, Japonija) gamintojo rekomendacijas su keliais pakeitimais. Buvo naudojama SC terpė su Glu (bespalvė mielių azoto pagrindu sukurta terpė) (Sigma – Aldrich Co. LLC). Po 4 val. trukusios mielių ląstelių inkubacijos buvo atlikti absorbcijos matavimai esant 460 nm bangos ilgiui ir naudojant mikroplokštelių skaitytuvą Tecan Sunrise (Tecan, Šveicarija). Rezultatai pateikiami iš 3 eksperimentinių bandymų.

Mielių ląstelių dauginimosi efektyvumas buvo skaičiuojamas paskleidžiant 100 μ L tinkamo skiedimo (10^{-6} kolonijas formuojančių vienetų/mL) ląstelių suspensijas ant YPD agarų lėkštelių. Lėkštelės buvo inkubuojamos 4 dienas 30 °C temperatūroje. Buvo skaičiuojamos kolonijos, kurias suformavo išgyvenusios ląstelės, paveikus jas IEL. Rezultatai išreiškiami dešimtainiu redukcijos santykiu: $n = \log N_0 / N_f$, kur N_0 yra nepaveiktų

IEL mielių kolonijų skaičius; N_f yra išgyvenusių mielių kolonijų skaičius jas paveikus IEL. Rezultatai pateikiami iš 3 eksperimentinių bandymų.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

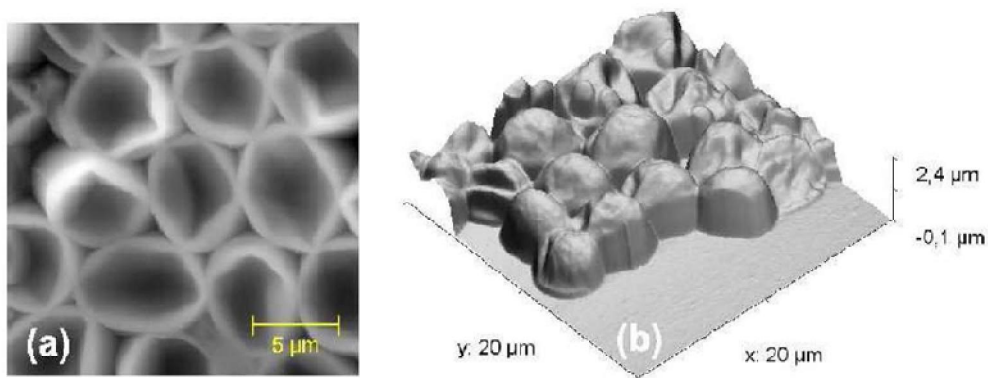
3.1. Chemiškai modifikuotų mielių ląstelių tamprumo tyrimai

Mielės yra plačiai naudojamos moksliniuose tyrimuose kaip modelinis organizmas tiriant ląstelių mechanines savybes. Be to mielės turėdamos kompleksinę sienelės struktūrą yra patrauklus objektas kuriant ląstelių ir ląstelių sienelės mechaninių savybių matematinius modelius (Mercade-Prieto ir kt., 2013). AJM yra vienas iš plačiausiai taikomų mechaninių savybių tyrimo metodų ląstelių tamprumo eksperimentuose (Carl ir Schillers 2008). Kaip jau minėta anksčiau literatūros apžvalgoje, AJM gali būti naudojamas diagnostikoje, todėl vis labiau ieškoma šio metodo taikymo sričių.

Šiame skyriuje bus aptariami rezultatai gauti mielių ląstelių vaizdinimo AJM tyrimų metu bei nustatant tamprumo savybes paveikus jas cheminėmis medžiagomis, kurios dažniausiai naudojamos mielių transformacijoje ir bioanalizėje.

3.1.1. Mielių imobilizuotų ant paviršiaus vaizdinimas AJM

Darbe *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės buvo tiriamos atominių jėgų mikroskopu Bioscope II sujungtu su optiniu - fluorescenciniu mikroskopu Olympus IX71. Optinis mikroskopas yra kaip pagalbinis prietaisas naudojamas AJM matavimų metu pradiniam tyrimų objekto įvertinimui ir matavimo pozicijos parinkimui.



3.1. pav. Mielių imobilizuotų ant stiklo topografiniai vaizdai gauti AJM veikiančio kontaktiniu režimu. (a) Perdžiūvusių mielių vaizdas. (b) Mielių 3D projekcija.

Paskleistos ir išdžiovintos mielių ląstelės ant stiklo paviršiaus buvo inkubuojamos 30 – 120 min. kambario temperatūroje, siekiant visiško tirpiklio (DV) išgaravimo. Analizuojant paviršių AJM dirbančio kontaktiniu režimu buvo vizualiai stebima mielių ląstelių adhezija ant stiklo paviršiaus. Iš rezultatų (3.1. pav.) galime teigti, kad toks imobilizavimo metodas buvo tinkamas, t.y. mielių ląstelių adhezija buvo pakankama šiai AJM analizei. Tačiau, šis mielių imobilizavimo ant paviršiaus metodas turėjo daug trūkumų. Vienas svarbiausių trūkumų buvo tai, kad matavimų metu mielės griečiau nei per 1 val. ore perdžiūdavo (3.1. pav. a) ir eksperimentas būdavo nutraukiamas. Be to, nekontroliuojamas drėgmės netekimas galėjo pakenkti sienelės vientisumui, ką demonstruoja 3.1. paveiksle (b) nuotrauka, kurioje matyti, kad mielių diametras iš vidutiniškai 5,0 μm (Bui ir kt., 2008) sumažėjo iki 2,4 μm . Toks drėgmės netekimas nepriklausomai nuo cheminių medžiagų ar elektrinio lauko panaudojimo sienelei modifikuoti gali iškreipti tyrimų rezultatus. Todėl buvo ieškoma kitų mielių imobilizavimo būdų leidžiančių tirti mielių tamprumo pakyčius fiziologinėje aplinkoje.

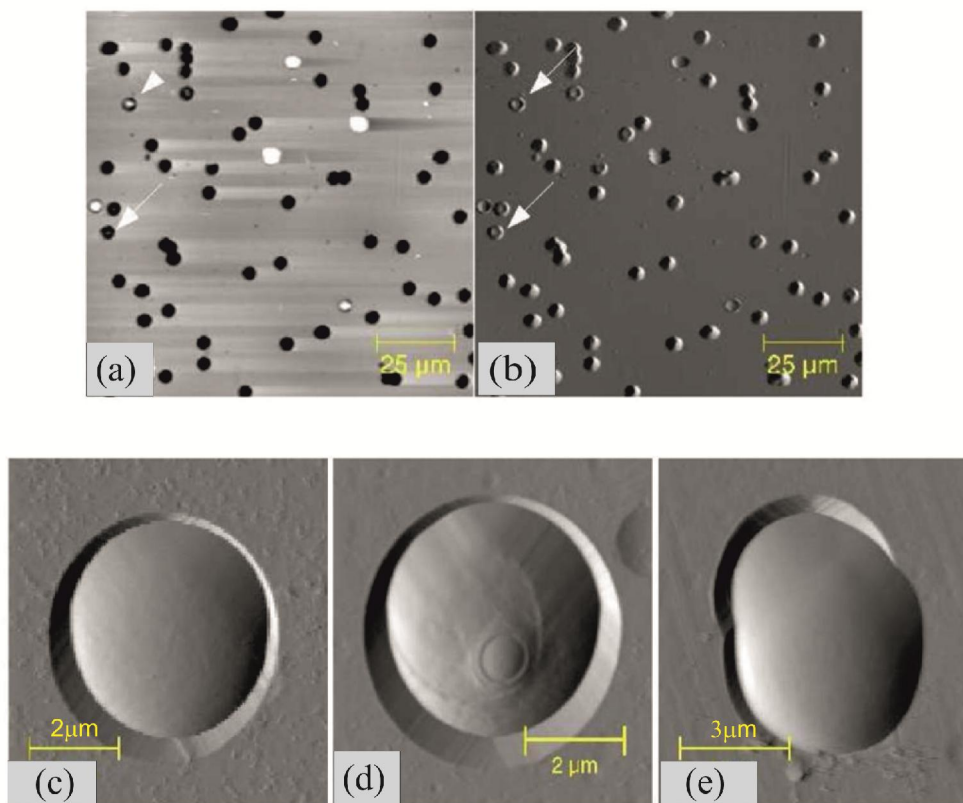
AJM leidžia nagrinėti bandinio topografiją, morfologines ir struktūrines savybes bei lokalius ląstelių mechaninių savybių pokyčius. AJM skiriamoji

geba yra daug didesnė negu optinio mikroskopo, o atskirais atvejais net gali viršyti skenuojančio elektroninio mikroskopo skiriamąją gebą. Bet lyginant su SEM, AJM gali būti naudojamas ne tik vakuume, bet ir kitose terpėse, tokiose kaip vanduo. Tai itin svarbu tiriant biologinius objektus. AJM skiriamoji geba priklauso nuo zondo ar/ir adatos savybių ir gali viršyti 1 nm (yra mokslinių straipsnių aprašančių tyrimus, kuriuose buvo pasiekta skiriamoji geba siekianti atominį lygmenį) (Hansma ir Hoh 1994). Priklausomai nuo zondo konstrukcijos ir medžiagos, kuria yra padengiamos adatos, galima matuoti ne tik ląstelių topografiją, bet ir įvertinti elektrines, magnetines, elastines bandinio paviršiaus savybes.

3.1.2. Mielių imobilizacija membranoje ir vaizdinimas AJM

Techninės AJM Bioscope II galimybės leidžia atlikti medžiagų matavimus dideliame matavimo plote ($175 \mu\text{m} \times 175 \mu\text{m}$), taip pat galima atlikti matavimus skystyje, kas yra labai svarbu tiriant ląstelių mechanines savybes. Atliekant matavimus vandeninėje terpėje yra papildomai kompensuojami AJM trūkumai, tokie kaip skiriamosios gebos sumažėjimas dėl adatos elektrostatiškų sąveikų su bandiniu ir kontakto metu atsirandančių kapiliarinių jėgų ekranavimo. Todėl buvo pasirinktas mielių ląstelių imobilizavimo į membraną būdas, kuris leido atlikti matavimus AJM vandeninėje terpėje. Mielių suspensiją filtruojant per ISOPORE membraną ląstelės įstrigdavo membranos porose ir dėl trinties jėgų laikydavosi matavimų metu (3.2. pav.). Buvo tiriamos morfologinės mielių ląstelių savybės.

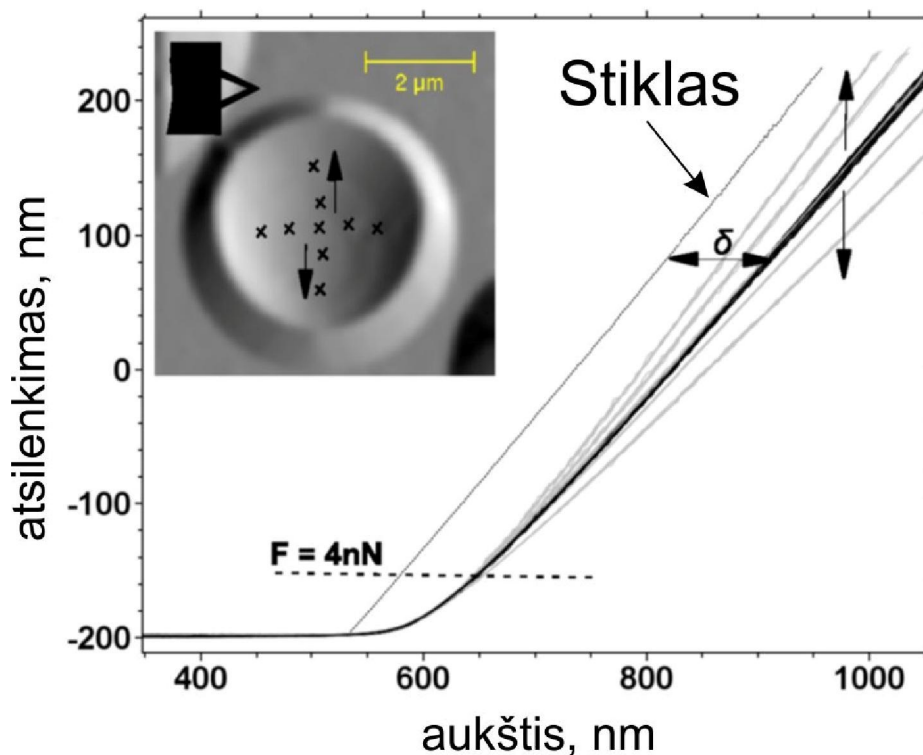
Po mielių imobilizavimo ISOPORE membranose nuskenavus tam tikrą membranų plotą ir aptikus įstrigusias ląsteles dar labai svarbu buvo surasti tinkamą mielių ląstelės padėtį poroje (3.2. pav. c, d, e). Kaip matyti iš AJM nuotraukų, jeigu membranų pora yra netaisyklingos formos, ląstelė lengvai adaptuojasi, priimdama netaisyklingą formą (3.2. pav. e). Toks ląstelės formos pasikeitimas gali iškreipti mechanines savybes. Be to, po mielių dauginimosi proceso ant ląstelės išlieka dauginimosi randas (3.2. pav. d). Yra žinoma, kad rando vietoje susikaupęs chitinas lemia padidėjusį tamprumą. Šiuo



3.2. pav. Membranų porose imobilizuotų mielių ląstelių vaizdai gauti atlikus tyrimus AJM dirbančiu virpančio zondo režimu. (a) membranų su imobilizuotomis ląstelėmis topografinis ir (b) nukrypimo nuo rezonansinio dažnio vaizdas. Rodyklėmis parodyta membranose imobilizuotos mielių ląstelės. (c) Ląstelė, kurios paviršius yra lygus. (d) Ląstelė su dalinimosi randu. (e) Ląstelė netaisyklingos membranų poroje įgijusi jos formą.

atveju Young'o modulis padidėja nuo įprastai mielių ląstelėms būdingo $0,6 \pm 0,4$ MPa iki $6,1 \pm 2,4$ MPa (Touhami ir kt., 2003). Todėl tolimesniems tamprumo tyrimams buvo pasirinktos tik lygios ir taisyklingos formos mielių ląstelės (3.2. pav. c).

Tiriant membranoje imobilizuotų mielių mechaninį atsaką pastebėta, kad priklausomai nuo tyrimams pasirinktos ląstelės vietos skiriasi rezultatai (3.3. pav.).



3.3. pav. Gembės atsilenkimo priklausomybė nuo aukščio priklausomai nuo pasirinktos matavimo vietos ir gembės padėties. Nuotrauka vaizduoja gembės padėtį matavimų metu. Taip pat pažymėtos vietos kuriose atlikti tamprumo matavimai. Pilki eksperimentiniai tamprumo duomenys atitinka vertikalius taškus pažymėtus nuotraukoje rodyklėmis. Juoda kreivė atitinka tamprumo rezultatus gautus pasirinkus matavimo vietas horizontaliai. F – slenkstinė jėga.

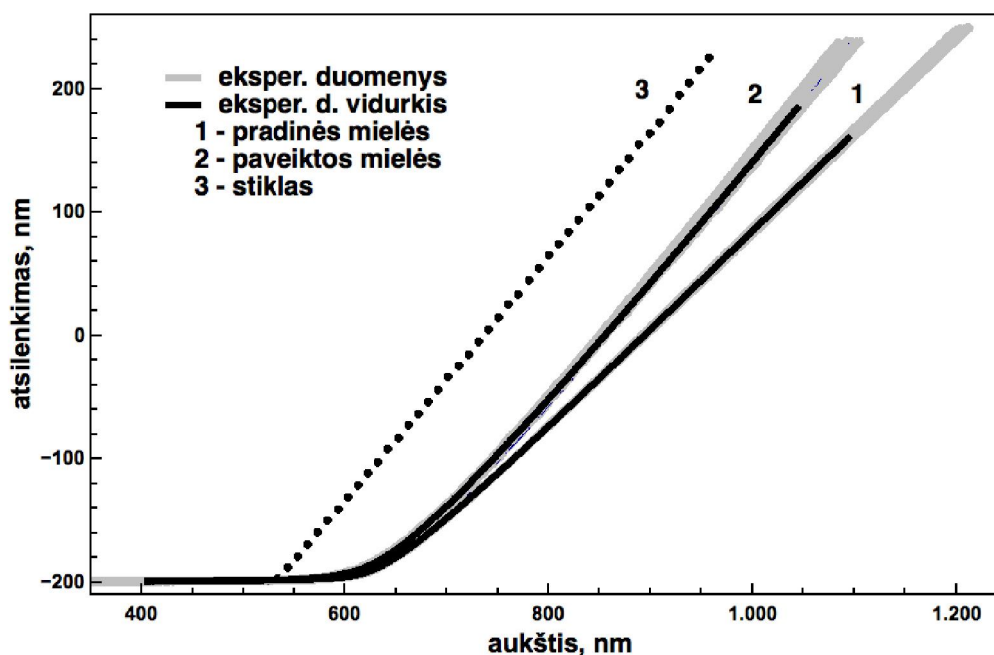
Keičiant tyrimams pasirinktą ląstelės vietą vertikaliai gembės atžvilgiu (3.3. pav. rodyklės) pastebėta, kad esant tai pačiai spaudimo jėgai (iki 36 nN) ir viršijus slenkstinę 4 nN jėgą bei tolstant nuo centrinio matavimų taško mielių ląstelės pasižymėdavo didesniu ar mažesniu tamprumu (3.3. pav. pilkos kreivės). Bet atlikus eksperimentus horizontaliai gembės atžvilgiu (3.3. pav. juodos kreivės) tokių rezultatų pasiskirstymo nepastebėta.

Buvo nustatyta, kad tokiems skirtingiems rezultatams daugiausiai turėjo įtakos adatos sąveika su elipsės formos ląstelių paviršiumi. Adatai įsispaudus į ląstelės paviršiaus vietas, kurios yra vertikalios gembės atžvilgiu (2.2. pav. 2 ir 3 taškai ir 3.3. pav. pilkos kreivės), gembė pasisuka. O nuo gembės atspindėtas lazerio spindulys pakeičia kelią dėl pasisukimo krypties, todėl jėgos kreivė gali kilti ar kristi taip iškreipdama ląstelių tamprumo duomenis. Dėl to, siekiant patikimesnių rezultatų, visiems toliau atliktiems mielių tamprumo tyrimams bei jų analizei buvo pasirinkti eksperimentiniai duomenys gauti tiriant tik viršutinėje ląstelių paviršiaus dalyje esančias sritis.

3.1.3. DTT įtaka mielių ląstelių tamprumui ir sienelės šiurkštumui

Prieš atliekant mielių ląstelių tamprumo matavimus, naudojantis Sader metodu, buvo patikrinamas gembės tamprumo koeficientas k . Atliktų patikrinimų duomenys sutapo su gamintojo specifikacijoje nurodytu koeficientu ir buvo 0,1 N/m.

Tiriant membranoje imobilizuotų nepaveiktų (pradinių) mielių tamprumą (3.4. pav. 1, pilkos kreivės), bei analizuojant tris skirtingas mielių ląsteles aukščiausioje ląstelės vietoje penkis kartus, gembės atsilenkimo (kas proporciškai jėgai, veikiančiai zondą) – aukščio kreivės išsidėsto vienoje kreivių šeimoje. Be to jas apdorojus gaunama jėgos – aukščio kreivė (3.4. pav. 1, juoda kreivė) atitinkanti nepaveiktų mielių tamprumą. Taip pat analizuojamos ir po transformacijos, t.y. DTT ir Li^+ jonais paveiktos ir membranoje imobilizuotos

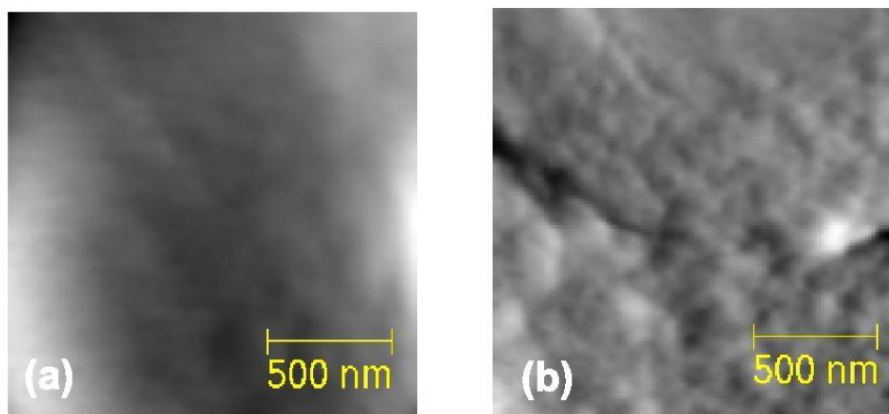


3.4. pav. Gembės atsilenkimo priklausomybės nuo aukščio kreivės gautos tiriant membranoje imobilizuotų nepaveiktų (1) bei Li^+ ir DTT paveiktų (2) mielių tamprumą. Pilkos kreivės yra eksperimentiniai duomenys gauti matuojant mažiausiai penkis kartus vienoje aukščiausioje mielės vietoje. Juodos kreivės vaizduoja eksperimentinių duomenų vidurkius. Juodais taškai pažymėti stiklo tamprumo duomenys (3).

mielių ląstelės (3.4. pav. 2, pilkos kreivės). Kaip ir prieš tai nagrinėtų nepaveiktų mielių ląstelių atveju apdorojus eksperimentinius duomenis gaunama viena jėgos – aukščio kreivė (3.4. pav. 2, juoda kreivė).

Visi duomenys lyginami pagal stiklinės plokštelės (objektinio stiklo) jėgos – aukščio kreivę, kuri mūsų eksperimentų atveju buvo kaip netamprios (kietos) medžiagos kreivė (3.4. pav. 3). Gauti eksperimentiniai rezultatai rodo, kad cheminėmis medžiagomis paveiktos mielių ląstelės pasižymėjo mažesniu tamprumu lyginant su nepaveiktomis ląstelėmis.

Paveikus mielių ląsteles medžiagomis, kurių pagalba yra siekiama padidinti sienelės pralaidumą, bei įvertinus tamprumo pakyčius, AJM pagalba buvo atlikti ir mielių sienelės šiurkštumo tyrimai (3.5. pav.). Nustatyta, kad šių medžiagų poveikyje mielių sienelės šiurkštumas padidėjo.



3.5. pav. Polikarbonatinėje membranoje imobilizuotų nepaveiktų (a) bei Li^+ ir DTT paveiktų (b) mielių sienelės paviršiaus topografija.

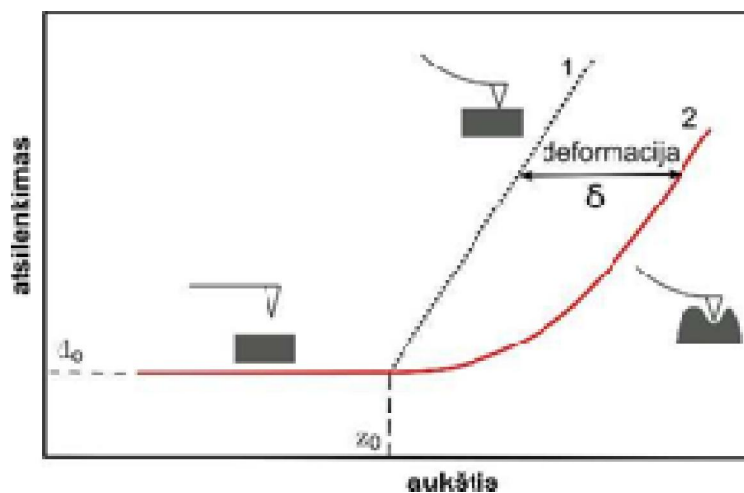
Literatūroje yra duomenų įrodančių, kad mielių tamprumas gali kisti priklausomai nuo pasirinktų mielių kamieno augimo stadijos (Dague ir kt., 2010) ir nuo pasirinkto tirpalo (Bui ir kt., 2008), tačiau, kad eksperimentinius duomenis būtų galima sulygtinti, reikia atlikti mielių tamprumo modulio – Young'o modulio skaičiavimus. Yra žinoma, kad DTT suardo mielių sienelėse esančius disulfidinius ryšius tarp glikozilintų sienelės baltymų (De Nobel ir kt., 1989). Ličio katijonų poveikis mielių sieniei taip pat buvo tirtas naudojant AJM, tačiau įtakos mielių sienelės šiurkštumui nebuvo aptikta (Chen ir kt., 2008). Šių eksperimentų metu buvo įrodyta ličio svarba DNR praėjimo per sienelę, o ne sienelės mechaninėms savybėms. Todėl iš mūsų atliktų tyrimų, galima daryti prielaidą, kad didžiausią įtaką šiurkštumui galėjo turėti DTT. DTT veikdamas sienelės baltymų tarpusavio ryšius pakeitė kompaktišką sienelės struktūrą, dėl to padidėjo jos šiurkštumas. Šią išvadą pagrindžia ir atlikti tyrimai, kurių metu buvo įrodyta, kad *mnn9Δ* mutantų sienelės (šių mielių mutantų sienelėje yra mažiau manozilintų sienelės baltymų) taip pat pasižymėjo vienu didžiausių šiurkštumų (Dague ir kt., 2010).

3.1.4. Mielių tamprumo modulio skaičiavimai

Tam, kad iš atliktų tamprumo matavimų būtų galima apskaičiuoti tamprumo modulį buvo pasirinktas Sneddon'o modelis, nes deformacija buvo pakankamai didelė, o matavimai buvo atlikti, kai zondas juda tik vertikaliai (z ašyje). Deformacijos skaičiavimo principas yra pavaizduoti 3.6. paveiksle.

Zondas nuleidžiamas ir gembė pradeda atsilenkti, kai adata pasiekia bandinio paviršių (z_0 pradinis kontakto taškas). Jeigu bandinys yra kietas, gembės atsilenkimo priklausomybė nuo zondo aukščio pasikeitimo yra tiesinė (3.6. pav. 1 kreivė).

Kai bandinys minkštas zondo gembės atsilenkimas nėra toks didelis, nes adata papildomai įspaudžia minkštą bandinį, todėl gembės atsilenkimo priklausomybė nuo zondo aukščio nėra tiesinė (3.6. pav. 2 kreivė).



3.6. pav. Mielų mechaninių savybių nustatymo principas. Išmatuojamos jėgos-atstumo kreivės zondo aukščio nėra kietam (1) ir minkštam bandiniams (2).

Tiriant minkštą bandinį vertikalus zondo judėjimas (z) pasiskirsto tarp gembės atsilenkimo ir bandinio deformacijos (d). Atėmus kieto bandinio jėgos – atstumo kreivę iš minkšto bandinio kreivės gaunama minkšto bandinio deformacija δ . Žinant gembės tamprumo koeficientą (nurodomas gamintojo) randama jėga (F) veikianti bandinį (Huko dėsnis):

$$F = k \cdot \Delta d \quad (3.1)$$

kur Δd yra gembės atsilenkimo pokytis. Mielių ląstelės deformacija apskaičiuojama naudojant duomenis atspindėtus jėgos-atstumo kreivėje:

$$\delta = (z - z_0) - (d - d_0) \quad (3.2)$$

kur z yra gembės pozicija, z_0 ir d_0 yra pradinio kontakto taškas, d – gembės atsilenkimas.

Adatai liečiant minkštą pavyzdį, gembės sukurta jėga išspaudžia mielę ir gembės įlinkis sumažėja. Sneddon'o modelis yra paskaičiuotas kūgio formos kontaktui (Sneddon 1965) (1.5. pav.):

$$F = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \frac{1}{\tan(\alpha)} \cdot \delta^2 \quad (3.3)$$

kur E yra Young'o modulis, ν yra Poisson'o koeficientas ir α yra kūgio viršūnės puskampis.

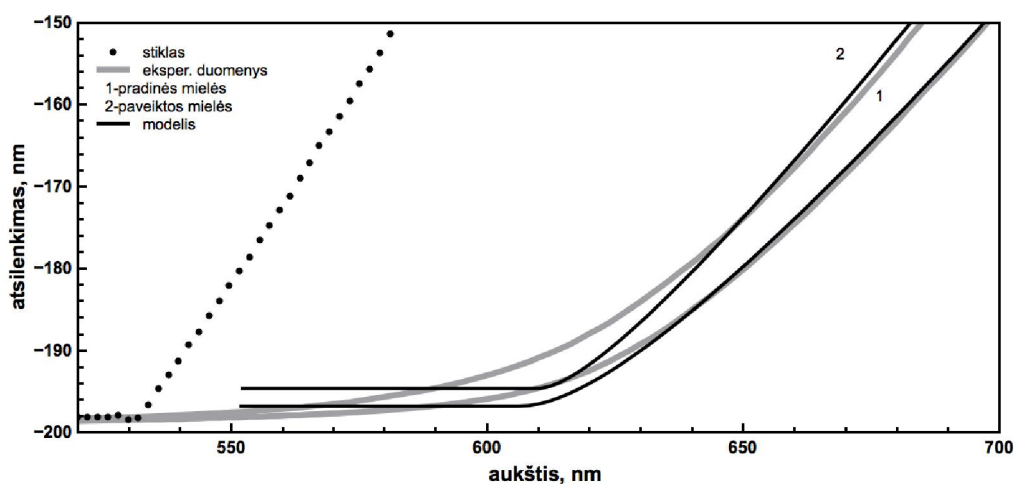
Modeliavimui buvo naudojama formulė (3.1), kurioje mechaninė jėga buvo keičiama Sneddon'o formule (3.3), o deformacija – formule (3.2) (Rico ir kt., 2005). Tai leido modeliuoti eksperimentinius duomenis be papildomų eksperimentinių kreivių pertvarkymų. Puasono koeficientas ν buvo prilyginamas 0,5 kaip yra rekomenduojama mokslinėje literatūroje (Touhami ir kt., 2003; Bui ir kt., 2008; Carl ir Schillers 2008). Zondo gembės tamprumo koeficientas k buvo patikrintas gembės terminių svyravimų metodu. Adatos puskampis α naudojamas, kaip nurodyta zondo gamintojo specifikacijoje.

Tamprumas yra fizikinė medžiagos savybė, priklausanti nuo medžiagos iš kurios yra sudarytas objektas. Jeigu tiriamas objektas turi tam tikrą formą jo tamprumo savybės charakterizuojamos tokiu fizikiniu dydžiu, kaip standumas. Deformacija vadinama tampriąja, kai objektas paveiktas mechaniškai atgauna pradinę formą ir pradinius matmenis. Tokiu atveju deformacija yra tiesiogiai proporcinga jėgai, kuria yra veikiamas objektas. Vienalytėms nekristalinėms medžiagoms deformacija yra visiškai charakterizuojama dviem koeficientais: Young'o moduliu E ir Poisson'o koeficientu ν .

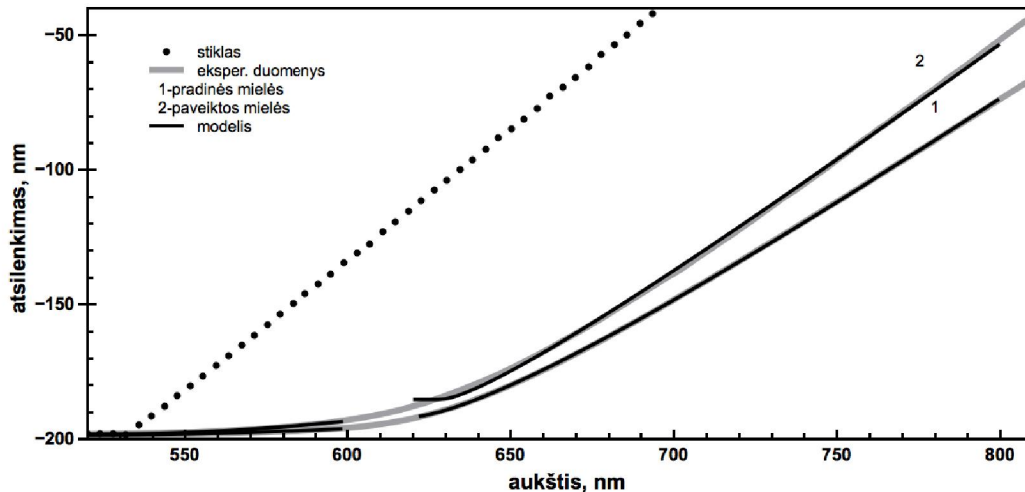
3.1.5. Mielių ląstelių Young'o modulio analizė

Tam, kad iš eksperimentinių rezultatų būtų galima nustatyti Young'o modulius be duomenų perskaičiavimo iš gembės atsilenkimo priklausomybės nuo zondo aukščio į jėgos priklausomybę nuo deformacijos, duomenys buvo pertvarkomi naudojant laisvai prieinamą Leveburg'o-Marquardt'o optimizavimo algoritmą. Pertvarkius duomenis ir modeliuojant naudojant 3.1 formulę gaunamas Young'o modulis E ir pradinio kontakto taškas (z_0 ir d_0).

Iš eksperimentinių duomenų (3.7. pav. pilkos kreivės) matyti, kad didėjant apkrovai palengva didėja ir deformacija, tačiau modeliuojant naudojant Sneddon'o modelį (3.7. pav. juodos kreivės) aptiktas nesutapimas su eksperimentiniais duomenimis plačiame eksperimentinių duomenų ruože, t.y. nuo 550 iki 650 nm, kai deformacija yra sąlyginai nedidelė. Didinant deformaciją (daugiau nei 650 nm) modelis aprašo gautus eksperimentinius duomenis geriau. Tai būtų galima aiškinti tuo, kad naudojamas modelis netinka



3.7. pav. Eksperimentinių duomenų (pilka kreivė) palyginimas su modeliavimui naudojamu Sneddon'o modeliu (juoda kreivė). 1 – pradinės mielės ląstelės; 2 – chemiškai paveiktos mielės. Juodais taškais pažymėta stiklo tamprumo duomenys.



3.8. pav. Eksperimentiniai rezultatai, kai duomenys modeliuojami atskirai taikant Sneddon'o modelį mažos (500 – 600 nm) ir didelės (620 – 800 nm) deformacijos sritims.

esant mažai deformacijai arba nehomogeniškai sienelės struktūrai aprašyti.

Ieškant optimalių modeliavimo sąlygų išskyrėme tris modeliuojamas sritis (3.8. pav.): mažos deformacijos (500 – 600 nm), didelės deformacijos (620 – 800 nm) ir abi dalis apimančios (550 – 800 nm). Aukščio skalei kylant iki 600 nm, deformacija kinta labai lėtai, o po to – greitai. Visai kreivei taikytas Sneddon'o modelis neatitinka eksperimentinių rezultatų regione nuo 600 nm iki 620 nm, tai yra adatos kontakto su mielės paviršiumi taškas – kontakto taškas. Taip pat panaši problema iškyla ir kitiems autoriams tiriantiems AJM mielių ląsteles (Rico ir kt., 2005; Carl ir Schillers 2008). Kontakto taško nustatymas biologiniams bandiniams yra komplikotas (Rico ir kt., 2005).

2 lentelėje išvardinti du Young'o moduliai apskaičiuoti nepaveiktoms ir paveiktoms ląstelėms kiekvienai iš tiriamų deformacijos sričių. Tiriant tamprumo pokyčius mažos deformacijos srityje, skirtumai yra ženklūs lyginant nepaveiktų mielių - $E = 0,12 \pm 0,82$ MPa, ir paveiktų mielių - $E = 0,32 \pm$

0,12 MPa Young'o modulius su didelės deformacijos sritimi, kur atitinkamai nepaveiktų mielių $E = 1,00 \pm 0,04$ MPa ir paveiktų $2,14 \pm 0,1$ MPa.

2 lentelė. Young'o modulio vertės priklausomai nuo tiriamos gembės atsilenkimo srities.

<i>Modeliuojama sritis, nm</i>	<i>500-600</i>	<i>620-800</i>	<i>550-800</i>
E (nepaveiktos mielių ląstelės), MPa	$0,12 \pm 0,82$	$1,00 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,17$
E (paveiktos mielių ląstelės), MPa	$0,32 \pm 0,12$	$2,14 \pm 0,1$	$1,93 \pm 0,48$

Literatūroje mielių ląstelių Young'o modulis yra skaičiuojamas naudojant (3.3) lygtį (Bui ir kt., 2008) ir, kaip tikėtasi, (adatos puskampis α yra 36°) apskaičiuotos reikšmės yra mažesnės: tamprumo modulis dejonizuotame vandenyje ir fosfatiniame buferyje, atitinkamai yra $0,15 \pm 0,02$ ir $0,24 \pm 0,03$ MPa. Kiti autoriai naudodami kiek kitokį Young'o modulio modeliavimo būdą, lygtyje (3.3) vietoj $1/\tan(\alpha)$ vartodami tik $\tan(\alpha)$ natrio acetato buferyje nustatė tamprumo modulį lygų $0,7 \pm 0,2$ MPa (David ir kt., 2008). Young'o modulio matavimo vertės NaCl tirpale ir DV yra atitinkamai $1,12 \pm 0,02$ MPa (Svaldo Lanero ir kt., 2006) ir $0,6 \pm 0,4$ MPa (Touhami ir kt., 2003). Skirtingais metodais apskaičiuoti Young'o moduliai gali labai skirtis nuo 0,7 MPa, tiriant AJM fiziologinėmis sąlygomis, iki 110 MPa spaudžiant visą ląstelę tarp dviejų plokštumų. Taigi, galime daryti išvadą, kad didelės deformacijos srityse gauti tamprumo moduliai sutampa su literatūroje pateiktais. Kaip buvo nustatyta Lanero Svaldo su bendraautoriais tyrime, gauti nepaveiktų ląstelių Young'o moduliai išlieka panašūs ir yra maždaug 1 MPa (Svaldo Lanero ir kt., 2006).

Mielių sienelė yra kompleksinė struktūra, tačiau dėl paprastumo dažnai yra laikoma, kad ji yra sudaryta iš dviejų sluoksnių: viršutinio, kurį sudaro manozilinti sienelės baltymai ir apatinio, sudaryto iš gliukanų ir chitino, kurie

pasižymi dideliu mechaniniu atsparumu (Klis ir kt., 2006; Levin 2011; Mercade-Prieto ir kt., 2013). Yra žinoma, kad DTT veikdamas monozilintų sienelės baltymų tarpusavio ryšius keičia sienelės pralaidumą (De Nobel ir kt., 1989). Todėl galime daryti prielaidą, kad DTT pašalina viršutinį sienelės sluoksnį arba labai jį suardo ir tada yra veikiamas tik stangrus apatinis sluoksnis, todėl gaunamas Young'o modulio padidėjimas nuo $E = 0,12 \pm 0,82$ MPa nepaveiktų mielių iki $E = 0,32 \pm 0,12$ MPa paveiktų mielių. Šią prielaidą grindžia mokslininkų išvados modeliuojant dvisluoksnę mielių sienelę baigtinių elementų metodu (Mercade-Prieto ir kt., 2013). Kita vertus, Young'o modulio skaičiavimams naudojamame modelyje nėra įvertinamas efektyvus kontakto plotas, kuris gali smarkiai padidėti esant minkštai sieniei ar jai suminkštėjus DTT poveikyje, o tai nenumatyta (3.3) lygtyje ir dėl to gali padidėti Young'o modulio reikšmės. Be to, negalima atmesti ir fakto, kad DTT gali aktyvinti mielių CWI signalinį kelią per endoplazminį retikulumą (Levin 2011) arba keisdamas sienelės šiurkštumą gali aktyvinti mielės sienelėje esančius mechaninius sensorius (Heinisch ir kt., 2012). Dėl šių priežasčių gali pakisti ląstelės mechaninis tamprumas, tačiau šioms prielaidoms patvirtinti reikia atlikti papildomus eksperimentus.

Apibendrinant, mielių ląstelių sienelė yra mechaniškai ir chemiškai atspari sudėtinga struktūra. Sienelė sudaryta iš gliukanų, kur yra integruoti polisacharidai su kitais komponentais, tokiais kaip baltymai, lipidai, chitinas ir neorganinis fosfatas. Ląstelės sienelės storis gali siekti iki 200 nm, ir sienelė sudaro žymią mielės skersmens dalį. Mechanines ląstelės sienelės savybes galima lokaliai tirti nestipriai spaudžiant atominės jėgos mikroskopo zonu su mažu skersmens adata. Cheminių medžiagų, kurios keistų sienelės pralaidumą, poveikis ląstelės sieniei tebėra intensyviai tiriamas siekiant padidinti biokatalizės išeią, padidinti ląstelių suardymo efektyvumą ar pagerinti VLJ jautrumą.

Mechaninių mielės sienelės savybių tyrimai yra labai tikslūs, tačiau šiuo metu naudojami AJM neleidžia greitai ar vienu metu atlikti daug matavimų. Be

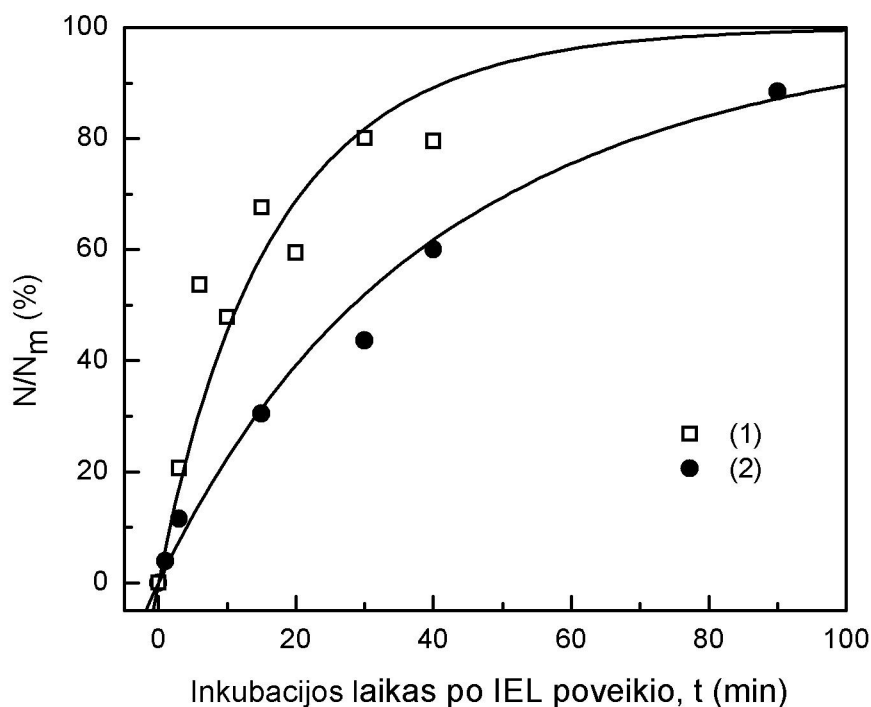
to po atliktų matavimų, ląstelių nebegalima naudoti tolimesniuose tyrimuose. Todėl ieškoma naujų mielių sienelės pralaidumo poveikio bei analizės metodų. Vienas iš perspektyviausių sienelės poveikio metodų galėtų būti impulsinis elektrinis laukas.

3.2. Impulsinio elektrinio lauko įtaka mielių ląstelių pralaidumui ir gyvybingumui

Yra manoma, kad impulsinio elektrinio lauko (IEL) poveikyje ląstelių membranoje susidarant hidrofilinėms poroms padidėja membranos pralaidumas paprastai nelaidžioms medžiagoms. Taip pat barjerine funkcija pasižymi ir mikroorganizmų sienelė. Ar impulsinis elektrinis laukas gali ir kaip pakeičia sienelės pralaidumą bei kaip tai įtakoja ląstelių gyvybingumą lig šiol nėra aišku. Todėl šiame skyriuje bus nagrinėjami rezultatai gauti tiriant mielių pralaidumo bei gyvybingumo pokyčius, veikiant jas skirtingos impulsų trukmės ir amplitudės elektriniu lauku.

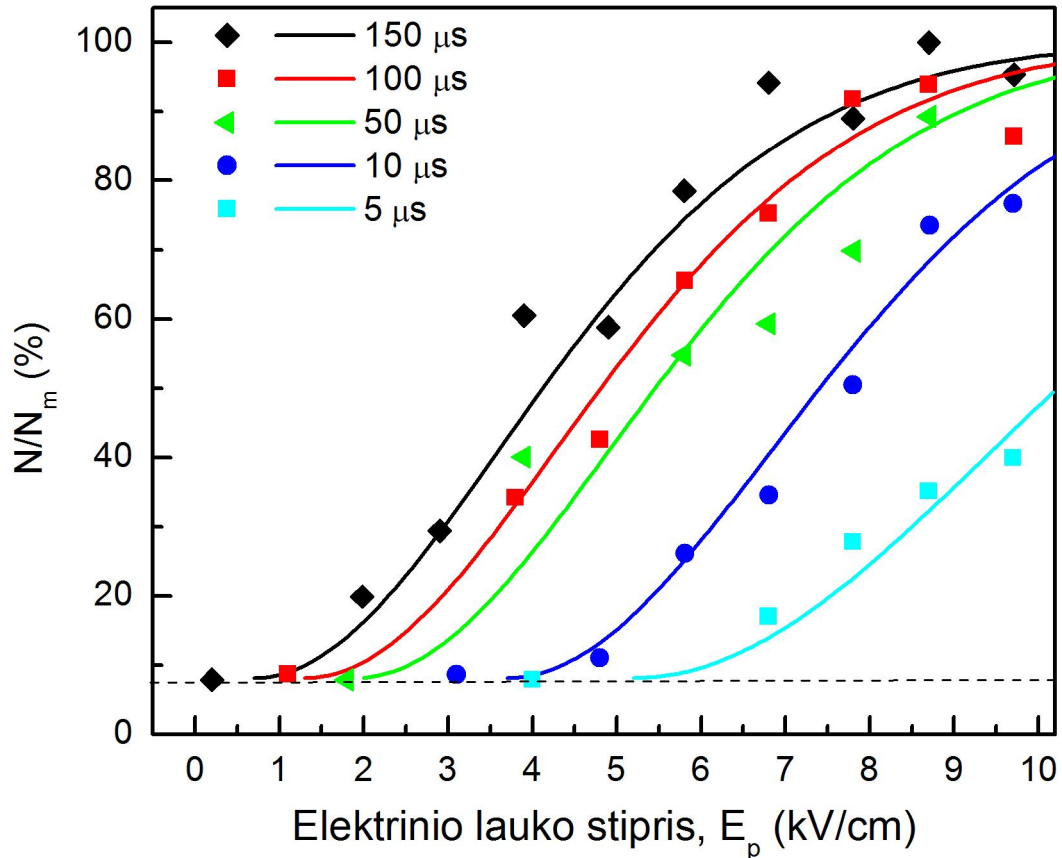
3.2.1. Mikrosekundžių trukmės didelės galios impulsų poveikis mielių ląstelių pralaidumui

TPP⁺ susikaupimo lygis mielių ląstelėse priklauso nuo inkubacijos su lipofiliniais katijonais trukmės, o maksimalus susikaupimo lygis, t.y. įsisotinimas gali būti pasiektas net po 30 – 120 min. Įsisotinimo laikas priklauso nuo naudojamo buferio ir mielių kamienų (Ballarin-Denti ir kt., 1994; Zimkus ir Chaustova 2003). Paveiksle 3.9. pateikti eksperimentiniai duomenys (taškai) rodo, jog elektriniu lauku paveiktos mielių ląstelės greičiau sukaupia TPP⁺, nei nepaveiktos. Mielėse ląstelėse sukauptas TPP⁺ kiekis buvo išreiškiamas santykiu $(N/N_m) \times 100\%$, kur N_m yra maksimalus TPP⁺ jonų kiekis, kuris gali būti sukauptas mielių ląstelėse (įsisotinimo lygis), palaikant pradinę TPP⁺ koncentraciją (N_s) didesnę nei N_m . Kaip matyti iš 3.9 paveikslo mielės



3.9. pav. TPP⁺ absorbcijos mielėse kinetika: (1) 150 μs trukmės 4,8 kV/cm impulsiniu elektriniu lauku paveiktų ir (2) nepaveiktų mielių. Koreliacijos koeficientas $R^2 = 0,989$

paveiktos 4.8 kV/cm stiprio stačiakampio formos elektrinio lauko impulsu, kurio trukmė buvo 150 μs, 90 % sukaupimo lygį pasiekė per 40 min. Nepaveiktos mielės, nors ir absorbuoja lipofilinius katijonus, tačiau pasiekti tą patį 90 % susikaupimo lygį joms prireikė 100 min. Reikia pažymėti, kad IEL poveikis mielių ląstelėms iš esmės nepakeičia TPP⁺ susikaupimo lygio, t.y. įsisotinimo lygmuo išlieka toks pat tiek nepaveiktoms, tiek ir elektriniu lauku paveiktoms ląstelėms.



3.10. pav. Mielių TPP⁺ absorbcijos priklausomybė nuo elektrinio lauko stiprio. Eksperimentiniai duomenys (taškai) rodo priklausomybę tarp elektrinio lauko stiprio ir TPP⁺ absorbcijos, esant skirtingos trukmės impulsams. Punktyrinė linija demonstruoja TPP⁺ kiekį sukauptą iki poveikio pradžios.

Norint ištirti kaip elektrinis laukas veikia TPP⁺ kaupimo greitį mielėse, naudojant TPP⁺ katijonams atrankų elektrodą buvo išmatuojama likutinė TPP⁺ koncentraciją tiriamajame tirpale (EPB buferyje) po to kai mielės buvo išlaikomos fiksuotą laiko tarpą šiame tirpale. Mielių suspensija buvo veikiamą pavieniais stačiakampio formos 5, 10, 50, 100 ir 150 μ s trukmės impulsais, esant skirtingo stiprio elektriniam laukui. Eksperimentiniai duomenys yra pavaizduoti 3.10. paveiksle. TPP⁺ susikaupimas buvo matuojamas praėjus 3 min. po poveikio elektriniu lauku. Kaip matyti iš 3.10 paveikslo TPP⁺ absorbcija (eksperimentų duomenys – taškai) priklauso nuo elektrinio lauko stiprio ir impulso trukmės. TPP⁺ kaupimo procesas pagreitėja pasiekus

slenkstinę elektrinio lauko vertę (E_{th}). E_{th} – tai toks elektrinio lauko stipris, kurį viršijus TPP⁺ absorbcijos greitis mielėse pradeda priklausyti nuo elektrinio lauko stiprio. Slenkstinio lauko nustatymas labai priklauso nuo pasirinktos naudoti tyrimo metodikos jautrumo. E_{th} yra impulso trukmės (t_p) funkcija ir mažėja didinant t_p . Pastovus 9 % TPP⁺ koncentracijos pokytis 3.10. paveiksle pavaizduotas punktyrine linija yra sąlygotas pradinio sukaupimo iki kol (apie 1 min.) suspensija yra paveikiama elektriniu lauku. Esant 150 μ s impulso trukmei TPP⁺ absorbcija įsisotina pasiekus 9 kV/cm elektrinio lauko stiprio ribą. Mažinant elektrinio impulso trukmę, esant tam pačiam elektrinio lauko stipriui, TPP⁺ sukaupimas krenta, todėl 5 μ s trukmės impulsu pasiekus net 9,7 kV/cm elektrinio lauko stiprį TPP⁺ sukaupimas tesiekia tik 40 %.

Yra žinoma, kad temperatūros padidėjimas suspensijoje gali iššaukti ląstelės pralaidumo pakyčius, todėl norint įvertinti galimą maksimalią kiuvetės turinio temperatūros padidėjimą dėl *Joule* kaitimo, buvo panaudotas homogeninis adiabatinis temperatūros išaugimo ΔT skaičiavimo artinys:

$$\Delta T = \frac{U^2 \cdot t_p}{R \cdot c_p \cdot m}; \quad (3.4)$$

čia U – įtampa tarp kiuvetės elektrodų, t_p – stačiakampio formos impulso trukmė, R – kiuvetės turinio varža ($\approx 300 \Omega$), c_p – savitoji vandens šiluma (4181,3 J/kg·K), m – kiuvetės turinio masė ($2,825 \times 10^{-5}$ kg). Skaičiavimų gautų naudojant formulę (3.4) rezultatai pateikiami 3 lentelėje.

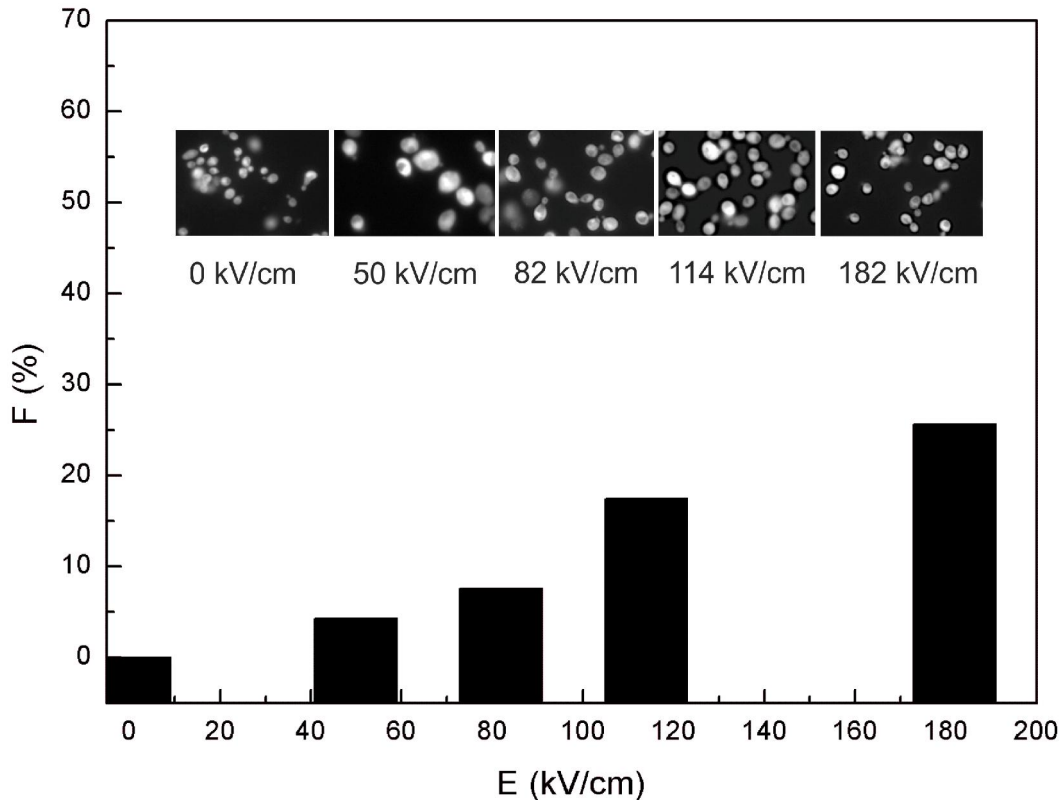
3 lentelė. Maksimalus kiuvetės turinio (120 μ l) temperatūros pokytis esant didžiausiai eksperimentuose naudotai įtampai ir skirtingoms impulso trukmėms.

U, (kV)	t_p (μ s)	ΔT (K)
0,9	150	3,80
0,9	100	2,53
0,9	50	1,26
0,9	10	0,25
0,9	5	0,126

Kaip matyti iš šios lentelės, maksimalus įkaitimas (3,8 K) įvyksta esant 150 μ s trukmės impulsui, nors $\Delta T = 3,8$ K gali būti šiek tiek padidinta vertė dėl šilumos nuvedimo neįskaitymo formulėje (3.4). Mažinant impulso trukmę ΔT ženkliai sumažėja ir kai $t_p = 5$ μ s, $\Delta T = 0,126$ K.

3.2.2. Nanosekundžių trukmės didelės galios impulsų poveikis mielių ląstelių pralaidumui

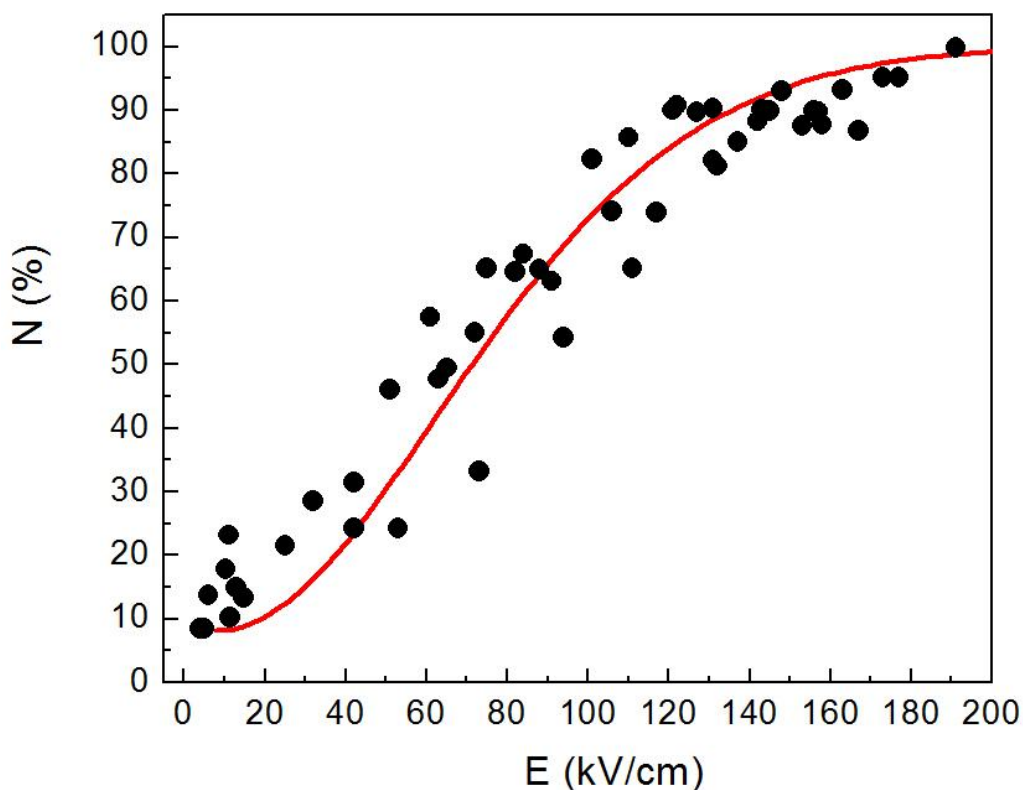
Tiriant vienkartinių 60 nanosekundžių trukmės didelės galios (iki 200 kV/cm) impulsų poveikį mielių ląstelių pralaidumui nustatyta, kad labai nežymiai keičiasi mielių plazminės membranos pralaidumas kalceino mėliui (molekulinė masė 321,28) (3.11. pav. stulpeliai). Reikia pažymėti, kad šis dažas gali būti sukaupiamas tik gyvų ląstelių. Kalceino mėlio difuzija iš ląstelės traktuojama kaip hidrofilinės poros susidarymas plaminėje membranoje. Pasiekta maksimali 26,68 % elektroporuotų ląstelių frakcija, veikiant ląsteles 182 kV/cm IEL. Todėl galime daryti išvadą, kad šis metodas nėra pakankamai jautrus elektroporuotų ląstelių frakcijai įvertinti, naudojant nanosekundžių trukmės impulsus. Dėl to, buvo nutarta panaudoti ankščiau



3.11. pav. Mielių ląstelių plazminių membranų pralaidumo kalceino mėliui priklausomybė nuo vienkartinių 60 nanosekundžių trukmės didelės galios impulsų. $F (\%) = F_e - F_k \times 100\%$. F_e – fluorescuojančių ląstelių frakcija paveikus elektriniu lauku; F_k – fluorescuojančių ląstelių frakcija be elektrinio lauko poveikio. Tirta nemažiau kaip 100 ląsteliu trijų eksperimentų metu.

aprašytą metodiką, paremta TPP^+ absorbcijos mielėse pakitimu veikiant jas elektriniu lauku.

Pritaikius šį elektrocheminį TPP^+ koncentracijos analizės metodą buvo nustatyta, kad didinant elektrinio lauko stiprį, kaip ir mikrosekundžių trukmės impulsų atveju, didėja elektriniu lauku sustiprinta TPP^+ absorbcija mielėse (3.12. pav.). Esant 60 ns impulso trukmei absorbcijos procesas pradeda priklausyti nuo elektrinio lauko, kai elektrinio lauko stipris pasiekia 8 kV/cm. Toliau didinant šį stiprį TPP^+ absorbcija mielėse auga ir pasiekia $\approx 90\%$ viršijus 140 kV/cm elektrinio lauko stiprį. Kaip parodyta 3.12. paveiksle,



3.12. pav. Mielėse absorbuoto TPP⁺ kiekio N ($N/N_m \times 100\%$) pokytis veikiant didelės galios elektrinio lauko stiprio E (kV/cm) nanosekundžių trukmės $t_p = 60$ ns stačiakampio formos impulsais. Matavimai atlikti praėjus 3 min. po poveikio. Taškai vaizduoja 5 nepriklausomus eksperimentus. Vientisa linija aprašanti eksperimentinius duomenis gauta naudojant (3.9) formulę.

veikiant mieles 60 ns trukmės impulsu galima pasiekti beveik 100% TPP⁺ sukaupimo lygį. Šiuo atveju elektrinio lauko stipris kiuvetėje siekė 190 kV/cm. Tai atitiko 19 kV įtampą tarp kiuvetės elektrodų. Naudojant formulę (3.4) buvo nustatyta, jog 60 ns trukmės elektrinio impulso poveikyje šiuo atveju visas kiuvetės turinys pašyla tik 0,61 K. Todėl buvo padaryta išvada, jog šiluminiai efektai tiek kelių dešimčių μ s, tiek ir ns trukmės impulsų atveju negali daryti reikšmingos įtakos tyrimų rezultatams.

3.2.3. Teorinė eksperimentinių elektropermeabilizacijos tyrimų analizė

Norint nustatyti slenkstinio elektrinio lauko vertes ir apskaičiuoti kinetinius koeficientus bei parametrus, aprašančius TPP⁺ absorbcijos greičio priklausomybę nuo elektrinio lauko, šiame darbe buvo sukurtas modelis paremtas dalelių difuzijos reiškiniu laikant, kad TPP⁺ yra absorbuojamas mielių ląstelių.

Eksperimentinis mielių TPP⁺ absorbcijos tyrimas parodė, kad mielių TPP⁺ kaupimas pasikeičia jas paveikus IEL – TPP⁺ koncentracija buferyje pasikeičia net kelis kartus. Buvo matuojamas likusio TPP⁺ kiekis tirpale po poveikio IEL ir 3 min. inkubacijos su ląstelėmis. Šiuo atveju, TPP⁺ absorbcijos kinetika gali būti apibūdinta naudojant antro laipsnio reakcijos kinetinę lygtį, kurioje atsižvelgiama į buferyje esančios TPP⁺ koncentracijos pokytį, kuris kinta absorbcijos proceso metu (riboto šaltinio sąlygos). Tai galima apibūdinti šia lygtimi: (Neumann ir kt., 1996; Stirke ir kt., 2012):

$$\frac{dN}{dt} = k_a (N_m - N)(N_s - N). \quad (3.5)$$

čia N yra mielių absorbuotas TPP⁺ molekulių kiekis tūrio vienetu (koncentracija); N_m didžiausia šių molekulių koncentracija, kokia gali būti sukaupta mielėse; N_s yra pradinė TPP⁺ koncentracija buferio tirpale absorbcijos proceso pradžioje; k_a yra kinetinis koeficientas rodantis negrįžtamo absorbcijos proceso (absorbcijos ir desorbcijos greičių skirtumas teigiamas dydis) greitį.

Kai $N_m/N_s < 1$, (3.5) lygties sprendinys yra:

$$N = N_m \frac{1 - \exp[N_s (R-1)k_a t]}{1 - R \cdot \exp[N_s (R-1)k_a t]}. \quad (3.6)$$

čia: $R = N_m/N_s$; t yra absorbcijos proceso trukmė.

Ištisinės linijos 3.9. paveiksle, kuriame pavaizduoti eksperimentinio mielių TPP⁺ absorbcijos kinetikos tyrimo rezultatai, neveikiant jas elektriniu lauku ir

veikiant 4,8 kV/cm 150 μ s trukmės IEL yra gautos naudojant (3.6) formulę. Elektriniu lauku nepaveiktų ir paveiktų ląstelių TPP⁺ sukauptimo mielėse kinetikos charakteringieji laikai $\tau_c=1/[N_s(R-1)k_a]$ yra atitinkamai 48,6 min. ir 19,8 min.

Norint gauti matematinę išraišką, parodančią kaip TPP⁺ sukauptimas priklauso nuo elektrinio lauko buvo padaryta prielaida, kad koeficientas k_a , kuris parodo absorbcijos greitį, priklauso nuo papildomos energijos (W), kuri buvo perduota mielėms, jas veikiant elektriniu impulsu (Neumann ir kt., 1996), kai elektrinio lauko stipris viršija slenkstinį elektrinį lauką. Ši energija yra proporcinga $t_p \cdot (E-E_{th})^2$, kur E yra elektrinio lauko, kuriuo buvo veikiamos mielių ląstelės, stipris, E_{th} yra slenkstinis elektrinio lauko stipris, kuriam esant TPP⁺ absorbcijos pradeda priklausyti nuo elektrinio lauko stiprio. Jeigu stačiakampio impulso trukmė t_p yra mažesnė už charakteringą biologinio objekto (šiuo atveju gali būti ir mielių agregatas) užsikrovimo trukmę (t_{ch}), tai elektrinio lauko, kuris veikia ląstelę stipris, priklausys nuo impulso trukmės ir jo sukuriama maksimalaus lauko kiuvetėje (E_p):

$$E = f \cdot E_p \left[1 - \exp\left(\frac{-t_p}{t_{ch}}\right) \right] \quad (3.7)$$

čia $E_p=V/d$, kur V – maksimali stačiakampio impulso įtampa, d – atstumas tarp kiuvetės elektrodų, o f – biologinio objekto formos faktorius, kuris gali kisti nuo 0,75 (sferai) iki 1,5 (pailgam elipsoidui). Tokia pačią matematinę išraišką turės ir slenkstinis elektrinio lauko stipris E_{th} , kai $E_p=E_{thp}$. Šiuo atveju E_{thp} yra elektrinio lauko stipris kiuvetėje, kuriam esant biologinis objektas yra paveikiamas E_{th} vertės lauku. Reikia pažymėti, jog $E = E_p$ ir $E_{th}=E_{thp}$, kai $t_p \gg t_{ch}$, todėl narys $[1-\exp(-t_p/t_{ch})]$ formulėje (3.7) yra ≈ 1 , kai elektrinių impulsų trukmė siekia kelias dešimtis mikrosekundžių. Tačiau mikrosekundžių ir ypatingai nanosekundžių ruože jo įtaka tampa pakankamai svarbi, nes skirtumas tarp E ir E_p , bei E_{th} ir E_{thp} ženkliai padidėja. Tokiu atveju pažymint $\Delta E=E-E_{th}$ ir panaudojus (3.7) formulę gauname, kad koeficientas k_a nuo elektrinio lauko stiprio priklausys taip (Pavlin ir kt., 2007):

$$k_a = k_{a0} + b \cdot \Delta E^2, \text{ kur } \Delta E = f \cdot (E_p - E_{thp}) \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t_p}{t_{ch}}\right) \right] \quad (3.8)$$

čia k_{a0} atitinka tokį absorbcijos greitį, kai $E = E_{th}$; b yra konstanta, kuri parodo kaip TPP⁺ molekulių absorbcijos greitis kinta mieles veikiant elektriniu lauku. Ši konstanta gali priklausyti nuo mielių kamieno bei temperatūros ar kitų veiksnių. Nustatytu laiko momentu τ (tyrimuose τ buvo lygi 3 min.), N/N_m (%) = $f(E)$ priklausomybę galima apskaičiuoti apjungus (3.7) ir (3.8) lygtis:

$$\frac{N}{N_m} \cdot 100\% = \frac{1 - A \exp B \cdot (E_p - E_{thp})^2}{1 - R \cdot A \exp B \cdot (E_p - E_{thp})^2} \quad (3.9)$$

Čia:

$$A = \exp[N_s \cdot (R-1) \cdot k_{a0} \tau]. \quad (3.10)$$

$$B = f^2 \cdot B_0 \cdot \left[1 - \exp\left(\frac{-t_p}{t_{ch}}\right) \right]^2, \text{ kur } B_0 = N_s \cdot (R-1) \cdot b \tau \quad (3.11)$$

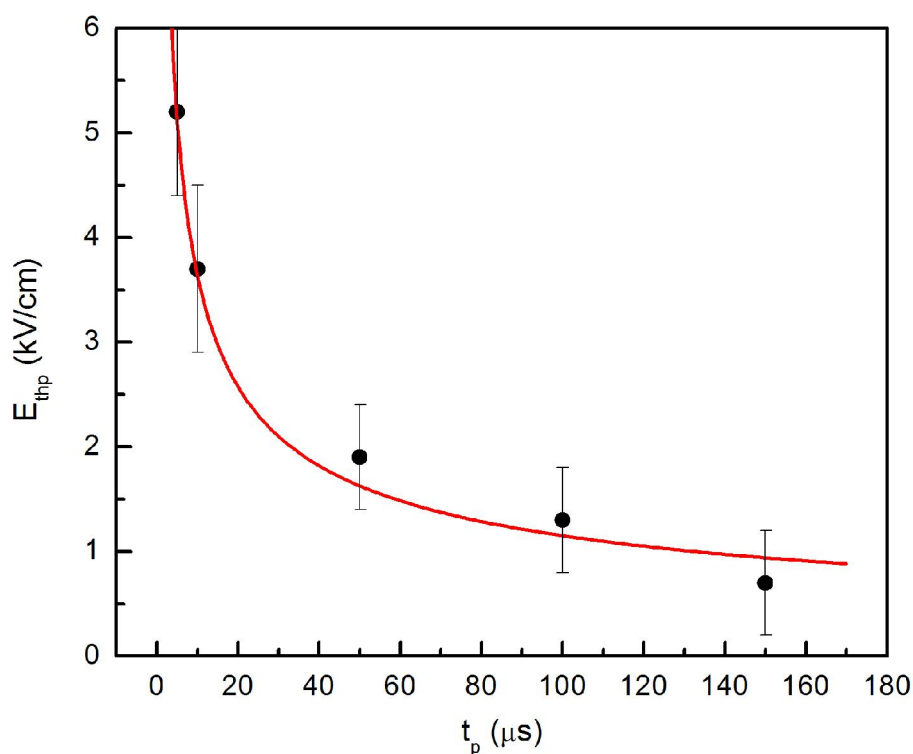
Kiekybiniam elektriniu lauku stimuliuotos permeabilizacijos efektyvumo vertinimui tikslinga įvesti parametą apibrėžiamą kaip santykį $\beta = k_a/k_{a0}$. Naudojant formulės (3.8), (3.10) ir (3.11) gauname kaip β priklauso nuo elektrinio lauko stiprio:

$$\beta = 1 + \frac{B}{\ln A} \cdot (E_p - E_{thp})^2 \quad (3.12)$$

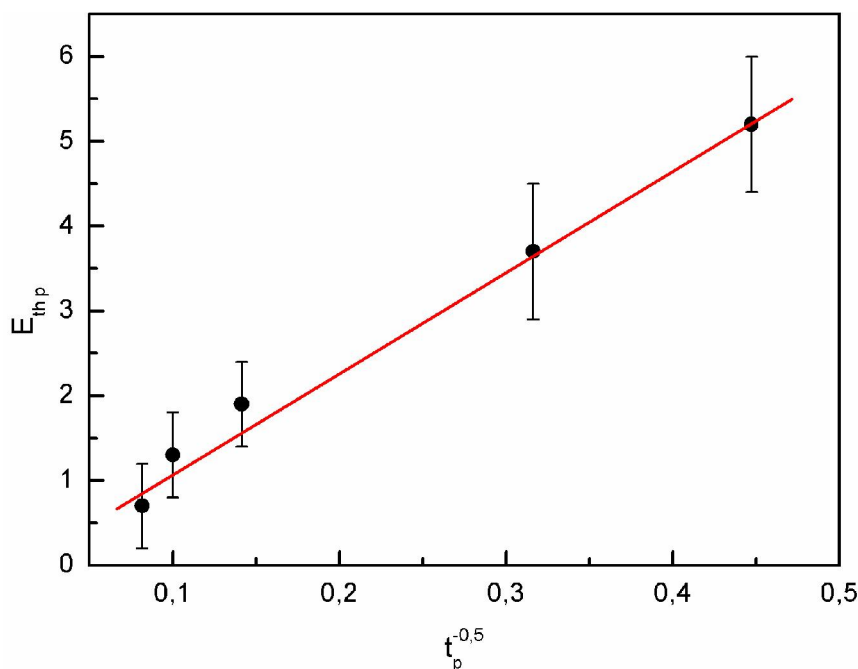
Norint apskaičiuoti koeficientą β reikia rasti konstantas A ir B , kurios yra gaunamos eksperimentinius duomenis aprašant (3.9) formule.

3.2.4. Eksperimentinių mielių pralaidumo tyrimų, naudojant mikrosekundinius elektrinius impulsus, analizė

Paveiksle (3.10. pav.) pavaizduotas eksperimentiškai užfiksuotas mielių ląstelių absorbuoto TPP⁺ sukaupimas ($N/N_m \times 100\%$) jas paveikus skirtingos trukmės ir amplitudės elektriniais impulsais. Likęs po IEL poveikio TPP⁺ kiekis tirpale buvo matuojamas fiksuotu laiko momentu (3 min. po inkubavimo su ląstelėmis). Kreivės vaizduoja modeliavimo rezultatus naudojant (3.9) formulę. Kaip matome, pasiūlytas modelis pakankamai gerai aprašo eksperimentinius duomenis (aproksimacijos neapibrėžtumo koeficientas R^2 kito 0,899 – 0,973 ribose). Tai rodo, kad elektriniu lauku stimuliuotos mielių TPP⁺ absorbcijos padidėjimas priklauso nuo $t_p \times (E_p - E_{thp})^2$, t. y. nuo energijos, kuri papildomai suteikiama mielių ląstelėms kai yra pasiekiamas slenkstinis elektrinis laukas. Iš 3.10. paveiksle pateiktų duomenų buvo nustatyta, jog šio lauko stipris (E_{thp}) yra atvirkštinė impulso trukmės (t_p) kvadratinės šaknies funkcija (3.13. pav.), tai irgi patvirtina šią prielaidą. Atlikta duomenų analizė patvirtino šią prielaidą (3.14. pav.). Šis rezultatas taip pat sutampa su anksčiau



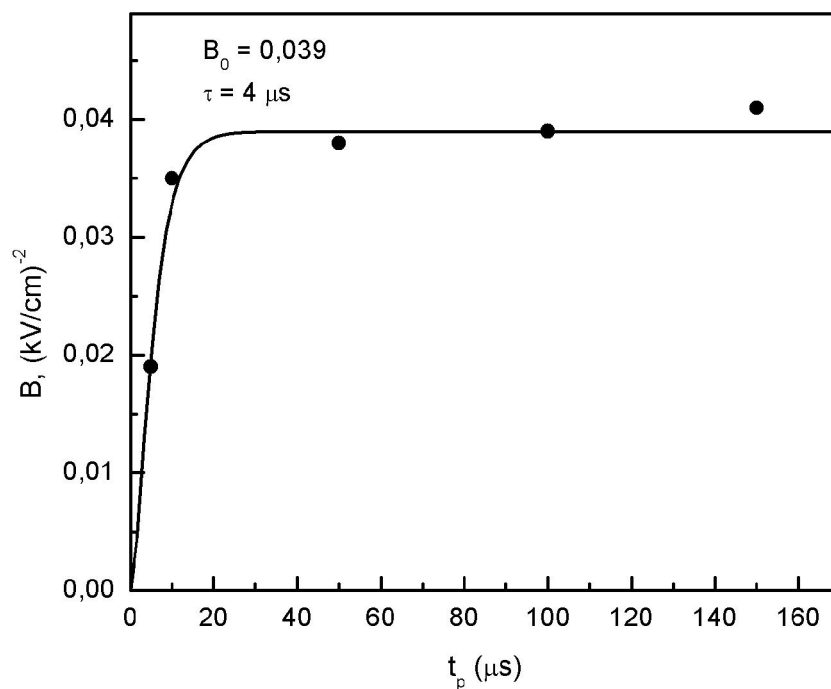
3.13. pav. Kritinio elektrinio lauko (E_{thp}) priklausomybė nuo impulso trukmės (t_p).



3.14. pav. Kritinio elektrinio lauko priklausomybė nuo $t_p^{-0.5}$.

atliktais ir publikuotais kitų autorių darbais, tačiau jų darbuose buvo naudoti ilgesni ms trukmės impulsai (Neumann 1992; Neumann ir kt., 1996).

Atlikus eksperimentinių duomenų B parametro priklausomybės nuo impulso trukmės (t_p) analizę buvo nustatyta, jog esant trumpiems impulsams parametras B didėja ir tampa pastovus kai jų trukmė viršija 20 μ s. Kaip matyti iš 3.15. paveikslo, B vs. t_p priklausomybę gerai aproksimuoja 3.11 formulė, kai $t_{ch} = 4 \mu$ s, o $B_0 = 0,039$. Parametras B priklauso nuo TPP^+ koncentracijos, absorbcijos greičio, ir ląstelių inkubavimo laiko (τ) (žr. 3.11 lygtį). Taip pat, atlikus IEL veikiamų biologinių objektų vidutinio skersmens (D) skaičiavimus, naudojant formulę $D = 2 \times t_{ch} / \rho_{ef} \times C_m$, kur ρ_{ef} yra specifinė mielių suspensijos varža (ji buvo $\approx 300 \Omega \cdot \text{cm}$), C_m plazminės membranos ploto vieneto talpa ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) (Schoenbach ir kt., 2004), gauta jog $D \approx 26 \mu\text{m}$. Tai parodo, kad impulsinis elektrinis laukas permealizuoja agregatus, kuriuos sudaro kelios mielių ląstelės. Šią prielaidą patvirtina 3.18. paveikslas, terpėje suspenduotų mielių, fluorescentinis vaizdas.



3.15. pav. Parametro B priklausomybė nuo impulso trukmės (taškai). Kreivė gauta aprašant taškus formule (3.11). $R^2 = 0.962$.

Panaudojus (3.12) formulę buvo apskaičiuotas elektriniu lauku stimuliuotos permeabilizacijos efektyvumas (β), esant 90% maksimalaus galimos TPP^+ absorbcijos mielėse. Buvo gauta, kad, kintant elektrinio impulso trukmei nuo 10 μs iki 150 μs , β yra pastovus ir apytikriai lygus 32. Kas reiškia, jog esant tai pačiai TPP^+ koncentracijai buferyje elektriniu lauku stimuliuotos absorbcijos greitis padidėja 32 kartus.

3.2.5. Eksperimentinių permeabilizacijos tyrimų, naudojant nanosekundinius elektrinius impulsus, analizė

Buvo nustatyta, kad eksperimentiniai permeabilizacijos duomenys gauti mieles veikiant nanosekundžių (60 ns) trukmės impulsais gali būti gerai aprašomi naudojant tokį pat modelį, kuris buvo naudojamas mikrosekundžių

trukmės impulsų poveikiui analizuoti. Modeliavimo rezultatus atvaizduoja ištisinė linija 3.12. paveiksle gauta naudojant formulę (3.9) (koreliacijos koeficientas R^2 kito 0,899 – 0,973 ribose). Atlikta analizė rodo, kad ir nanosekundinių impulsų atveju mielių ląstelių TPP⁺ absorbcijos efektyvumas yra proporcingas $t_p \times (E_p - E_{thp})^2$, t.y. papildomai impulso energijai, kai $E_p > E_{thp}$. Šiuo atveju 90% TPP⁺ sukauptas pasiekiamas per 3 min. kai koeficientas β charakterizuojantis absorbcijos greitį padidėja apie 35 kartus. Pasinaudojus (3.11) formulę galima įvertinti charakteringą biologinio objekto (mielės ląstelės ar mielių sankaupos) užsikrovimo laiką (t_{ch}). Iš (3.11) gauname, kad:

$$t_{ch} = -\frac{t_p}{\ln\left(1 - \sqrt{\frac{B}{B_0}}\right)} \quad (3.13)$$

Laikydami, kad B_0 nepriklauso nuo impulso trukmės ir lygus 0,039 (3.15. pav.), o B nustatytas modeliuojant eksperimentinius duomenis pateiktus 3.12. pav. naudojant formulę (3.9) yra lygus $1,2 \times 10^{-4}$, gauname, kad $t_{ch} = 0,954$ μ s. Tai 4 kartus mažiau lyginant su t_{ch} gautu iš μ s trukmės impulsų eksperimentų. Šis skirtumas yra nesunkiai paaiškinamas, jeigu įskaityti tai, jog ns trukmės impulsų atveju yra selektyviai užkraunamos agregatų viduje esančios mielių ląstelės. Ši ns impulsų savybė buvo plačiai aptarta darbe (Schoenbach ir kt., 2004). Charakteringas elektriniu lauku užkraunamų biologinių objektų dydis veikiant juos 60 ns trukmės impulsai būtų 6-7 μ m. Tai atitiktų vienos mielių ląstelės skersmenį.

3.2.6. Elektriniu lauku stimuliuotos TPP⁺ skvarbos mechanizmas

Atlikti eksperimentinių duomenų priklausomybės nuo energijos tyrimai (3.12. pav.) leidžia teigti, kad TPP⁺ kaupimo pokyčiai atsiradę po poveikio mikrosekundžių trukmės impulsu yra tiesiogiai susiję su plazminės membranos elektroporacija (Neumann 1992). Dėl IEL poveikio, plazminėje membranoje susidaro poros per kurias išeina baltymai, jonai ir kiti viduląsteliniai junginiai

(Liu ir kt., 2011), o ląstelės sienelės krūvis pasikeičia ir tuo pačiu yra sumažinamas barjeras TPP⁺. IEL poveikis mielių ląstelių sienelių krūviui buvo parodytas anksčiau (Tomov ir Tsoneva 1989). Prielaidą, kad mielių ląstelių sienelės paveikus impulsiniu elektriniu lauku sukiamas jų pralaidumas TPP⁺ katijonams, patvirtina gauti tyrimo rezultatai. Šis procesas gali būti kontroliuojamas nustatant impulsinio elektrinio lauko amplitudę ir impulsų trukmę. Mikromolinės lipofilinių TPP⁺ katijonų koncentracijos buvo naudojamos vertinti skirtingų mikrobinių organizmų membranų potencialus (Zimkus ir kt., 2006; Daugelavicius ir kt., 2010). TPP⁺ labai lengvai pereina plazminės membranos barjerą, o pastovios koncentracijos yra pasiekiamos per 1 – 2 min.

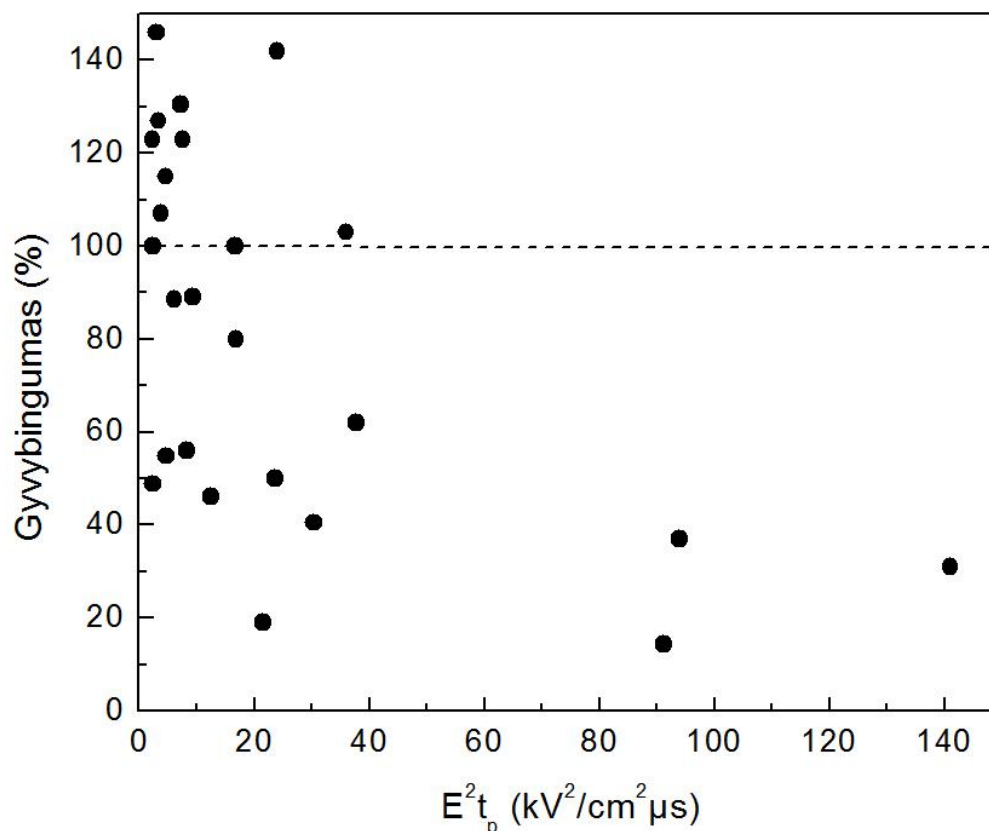
Šio metodo taikymo reikšmingiausias neigiamas aspektas yra tai, kad matuojant sienoje apgaubtų mikroorganizmų (tokių kaip mielės) membranų potencialą, TPP⁺ kaupimas mielių ląstelėse vyksta labai lėtai. Dėl to gali pasireikšti adaptacinis proceso mechanizmas, kurio metu TPP⁺ pašalinamas iš ląstelės (Ballarin-Denti ir kt., 1994). Kaip parodyta 3.9. pav., pastovi būklė nebuvo pasiekta net po 40 min. inkubacijos. Gauti rezultatai sutampa su kitų tyrėjų eksperimentų duomenimis, kai pastovi būklė pasiekama po 15 – 120 min. (Ballarin-Denti ir kt., 1994; Chaustova ir kt., 2008). Dėl teigiamai įkrautos mielių ląstelių sienelės išorės tokie hidrofobiniai dariniai kaip TPP⁺ negali įsiterpti (Zimkus ir kt., 2006). Taigi, mes pademonstravome TPP⁺ koncentracijos matavimo metodo pritaikomumą tiriant mielių ląstelių sienelių pralaidumą, jas paveikus IEL.

3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių gyvybingumui vykdant elektroporaciją

Yra žinoma, kad elektrinis laukas sukelia negrįžtamą poveikį (negrįžtama elektroporacija) ląstelių membranoms (Lee ir kt., 2010). Todėl labai svarbu ištirti eksperimentuose naudojamų elektrinio lauko parametru

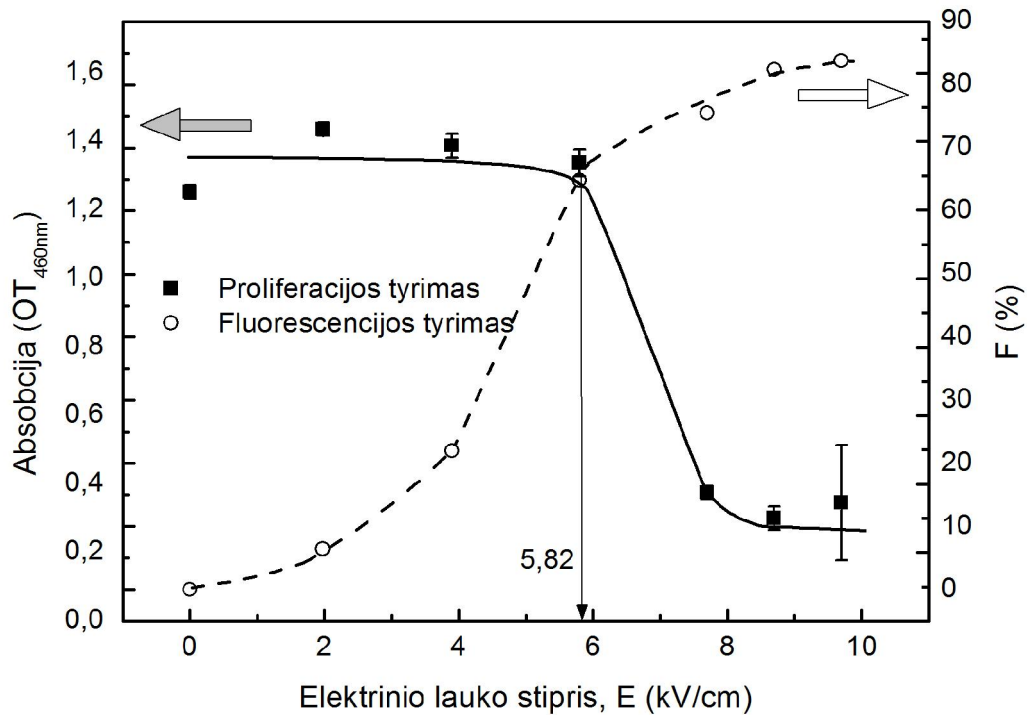
įtaką mielių gyvybingumui. Šiam tikslui buvo naudojami du skirtingi tyrimų metodai: kolonijų formavimo efektyvumo ir spektrofotometrinis mielių dauginimosi nustatymo metodai. Tiriant skirtingos trukmės ir amplitudės IEL poveikį mielių kolonijų formavimosi efektyvumui ant standžių terpių aptikta didelė rezultatų sklaida (3.16. pav.). Eksperimentui aiškinti pasitelkta prielaida, kad mielių mirtingumas susijęs su mielių ląstelės sugerta energija ($W \approx k \cdot E^2 t_p$). Prie tam tikrų elektrinio lauko parametrų (kai $W < 40 \text{ kV}^2/\text{cm}^2 \cdot \mu\text{s}$) buvo aptikta daugiau kolonijų (virš 40%), nei kontroliniuose mėginiuose. Mielių ląstelės natūraliai agreguojasi, sudarydamos agregatus iš kelių ląstelių (El Zakhem ir kt., 2006), ypač eksponentinėje augimo fazėje, todėl vertinant pradinį (kas atitinka 100% gyvybingumą) mielių suspensijos ląstelių skaičių (šviesiniu mikroskopu) daromos paklaidos. Galima daryti prielaidą, kad kolonijas formuojančių vienetų pagausėjimas (tai pasireiškia didesniu apskaičiuotu kolonijų skaičiumi) yra veikiau susijęs su natūralių mielių agregatų išskaidymu, o viršijus $W \approx 40 \text{ kV}^2/\text{cm}^2 \cdot \mu\text{s}$ ribą galimi du procesai: žūtis, dėl negrįžtamos elektroporacijos ar/ir agregacija, dėl sulipusių ląstelių sumažėja kolonijas formuojančių vienetų skaičius. Agregacijos prielaidą patvirtina ir atlikti stebėjimai mikroskopu (žr. 3.18. pav.).

Panašūs kolonijų formavimosi efektyvumo (KFE) padidėjimai iki 30% ant standžių terpių buvo aptikti ir kituose darbuose, kuriuose naudojo 8 ms bipolinius pasikartojančius impulsus ir 0,75 kV/cm elektrinio lauko stiprį (Fologea ir kt., 1998). Be to, agregacijos reiškinys taip pat buvo pastebėtas paveikus mielių ląsteles 10 μs 100 impulsų sekomis ir esant 3,5 kV/cm elektrinio lauko stipriui (El Zakhem ir kt., 2006). Tačiau šio poveikio mechanizmo paaiškinimo iki šiol nėra.



3.16. pav. Mielių gyvybingumo priklausomybė nuo sugerto energijos kiekio. Gyvybingumas nustatytas naudojant kolonijų formavimo efektyvumo metodą. Punktyrinė linija vaizduoja 100% gyvybingumo ribą. Virš šios linijos yra traktuojama, kad gyvybingumas padidėjo.

Mikroorganizmų dauginimosi įvertinimas naudojant WST-8 substrato absorbcijos (460nm) intensyvumo kitimas yra patogus įrankis tirti mielių dauginimąsi ar metabolinį aktyvumą. Be to nustatyta, kad absorbcija yra tiesiškai proporcinga mielių ląstelių kiekiui (Tsukatani ir kt., 2008). Todėl naudojant kiekybinį dauginimosi nustatymo metodą buvo tiriama IEL įtaką mielių gyvybingumui (3.17. pav. proliferacijos tyrimas). Spektrofotometrinis dauginimosi vertinimas pasirinktas, nes kolonijų formavimo efektyvumo tyrimas ant standžių terpių dėl kolonijas formuojančių vienetų kaitos davė didelę rezultatų sklaidą.



3.17. pav. Mielių ląstelių paveiktų IEL pralaidumo fluorescenciniams dažams (kalceino mėliui AM) ir metabolinio aktyvumo tyrimas. Pralaidumas dažams, žymimas F (%), buvo tiriamas naudojant fluorescencinę mikroskopiją, o mielių metabolinis aktyvumas buvo nustatomas naudojant mielių proliferacijos rinkinį, mieles inkubuojant minimalioje sintetinėje dekstrozės terpėje bei atliekant 3 nepriklausomus eksperimentus. Visi eksperimentai buvo atlikti keičiant elektrinio lauko stiprį esant 150 μ s impulso trukmei. Rodyklė rodo mielių gyvybingumo slenkstį.

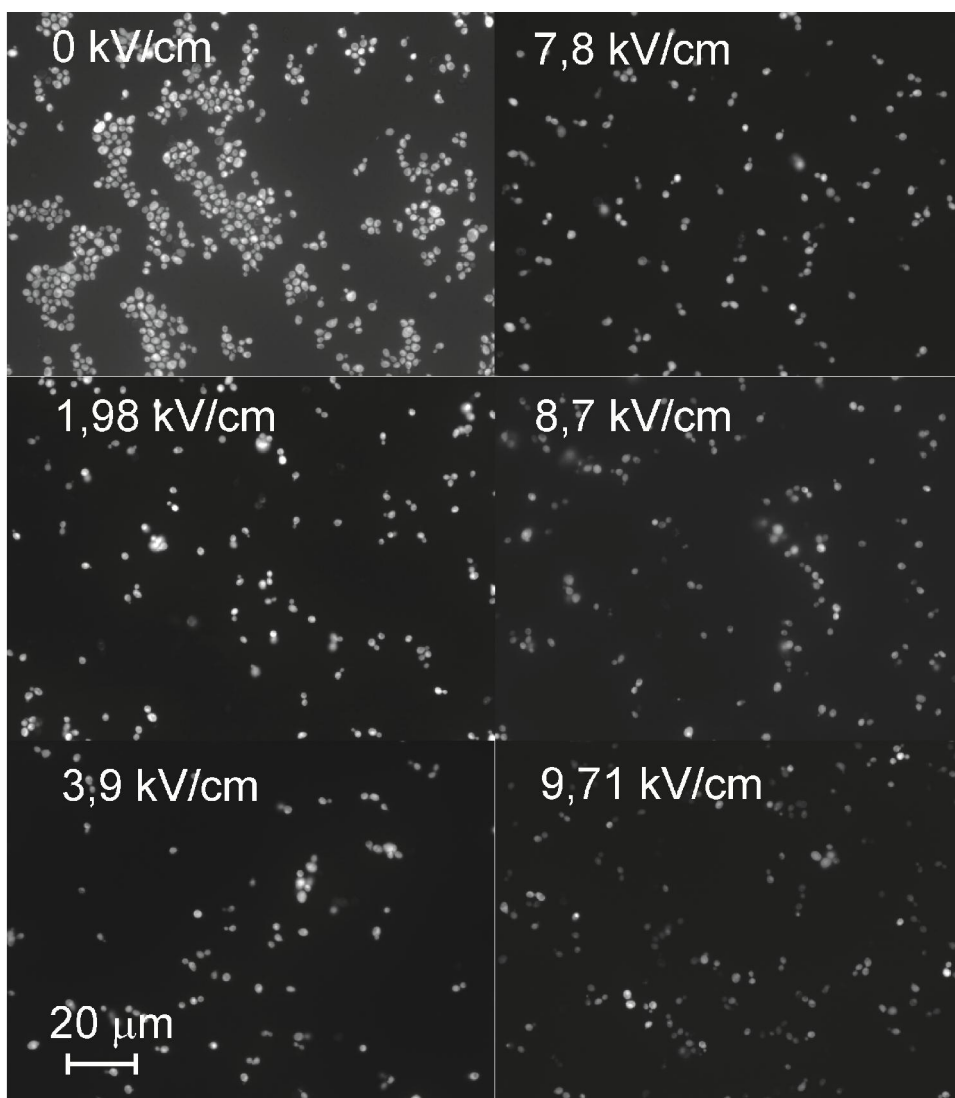
Po 4 val. inkubavimo 30° C temperatūroje nepaveiktos mielių ląstelės gali substratą konvertuoti į oranžinės spalvos junginį formaziną, pasiekiant optinį tankį iki $1,3 \pm 0,2$ OT vienetų (3.17. pav., vientisa linija). Taip buvo tiriamas *S. cerevisiae* jautrumas IEL. Didinant elektrinio lauko stiprį iki 5,82 kV/cm ir veikiant pavieniais 150 μ s trukmės impulsais gauta, kad toks poveikis ląstelių dauginimuisi ar metaboliniam aktyvumui įtakos neturėjo. Šis taškas yra mielių *S. cerevisiae* SEY6210 gyvybingumo slenkstis. Padidinus elektrinio lauko impulsų stiprį iki 10 kV/cm, absorbcija sumažėja iki maždaug

$0,3 \pm 0,02$ OT vienetų. Optinis tankis sumažėjo dėl mielių ląstelių žūtis ar metabolizmo sulėtėjimo, kuriuos sukėlė IEL.

Būtina pažymėti, jog gyvybingumo tyrimai naudojant $150 \mu\text{s}$ trukmės elektrinius impulsus parodė, kad elektriniu lauku stimuliuotų mielių ląstelių TPP^+ pralaidumo maksimalus 75 % padidėjimas β siekia 18,4 karto, išlaikant mielių nepakitusį 100% gyvybingumą, lyginant su nepaveiktomis IEL mielių ląstelėmis.

3.3.1. Porų susidarymas mielių plazminėje membranoje

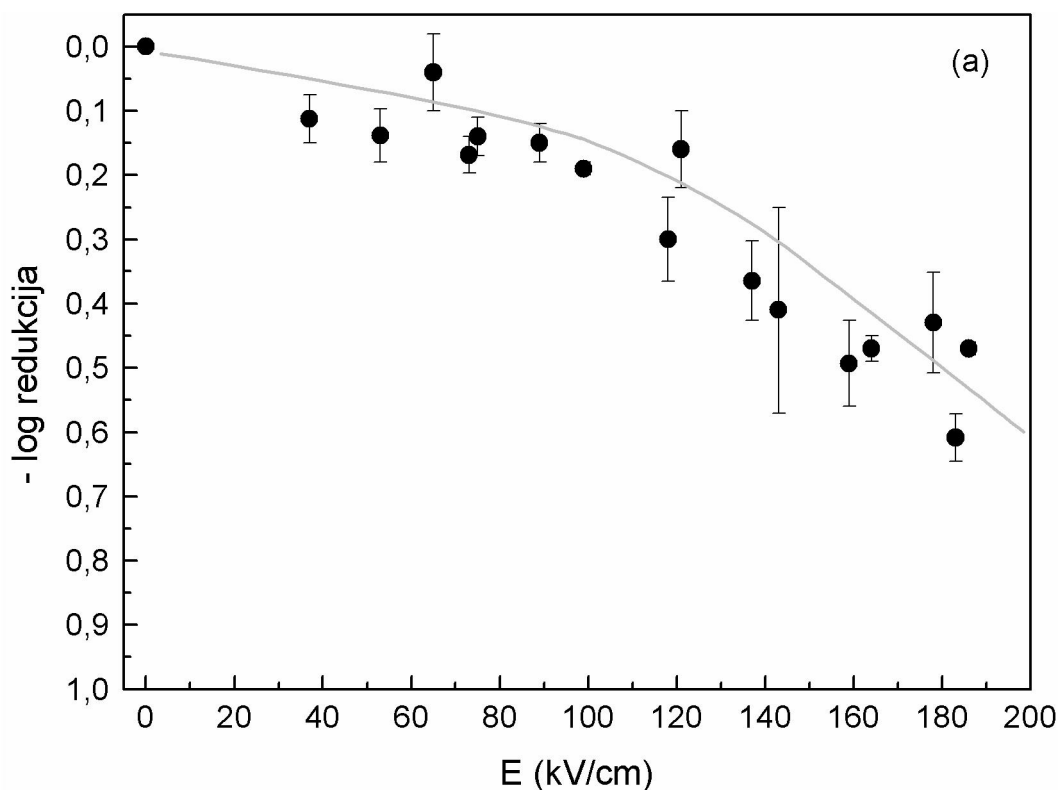
Yra žinoma, kad IEL paveikus mielių ląsteles plazminėje membranoje gali susiformuoti laikinos (arba ne) hidrofiliinės poros (Bartoletti ir kt., 1989). Norint sužinoti ar IEL sukuria vandeninius kelius jonų ir molekulių judėjimui į ląstelės vidų, buvo naudojamas fluorescuojantis kalceino mėlis AM, kurio difuzija į ląsteles priklauso nuo ląstelės membrininio potencialo. Todėl buvo pasirinktas tirti mielių membranų pralaidumą. Didinant elektrinio lauko stiprį, kai impulso trukmė $150 \mu\text{s}$, dažo difuzija iš ląstelių intensyvėja ir nekinta viršijus $9,0 \text{ kV/cm}$ elektrinio lauko stiprį. Taigi, apie 90 % mielių ląstelių populiacijos tampa pralaidžios kalceino mėliui ir tai koreliuoja su TPP^+ susikaupimu ląstelėse (3.17. pav. (punktyrinė linija) ir 3.18. pav.).



3.18. pav. Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos, vertinant kalceino mėlio difuzijos intensyvumą paveikus mielių plazminių membranų pralaidumą 150 μ s trukmės impulsais.

3.3.2. Nanosekundžių trukmės impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių gyvybingumui

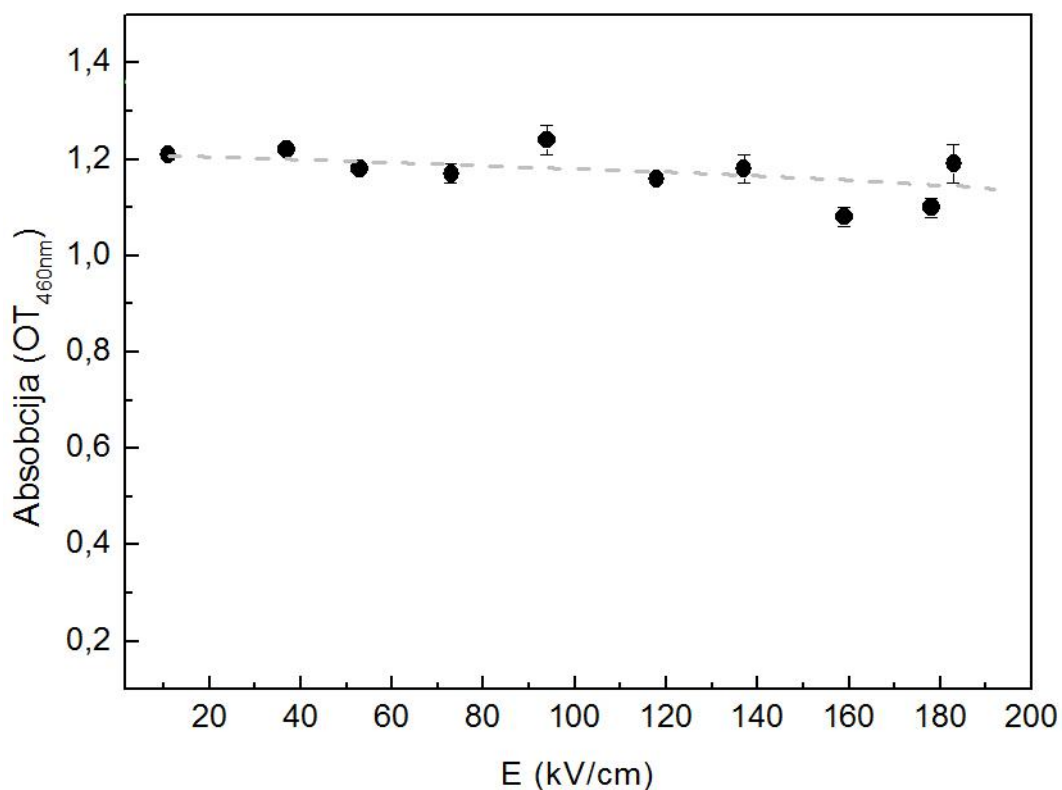
Siekiant ištirti stačiakampio formos, didelės galios, 60 ns trukmės impulsų poveikį mielių gyvybingumui buvo naudoti, du kiekybiniai gyvybingumo nustatymo metodai. Paveikus IEL ir įvertinus kolonijų skaičiaus kitimas KFE, kuris buvo perskaičiuojamas į dešimtainį žūties santykį –



3.19. pav. Impulsinio 60 nanosekundžių trukmės elektrinio lauko poveikis mielių ląstelių gyvybingumui, tiriant ląstelių gebėjimą daugintis ir formuoti kolonijas ant standžios terpės (KFE) po 4 dienų auginimo ant YPD terpės 30 °C. Visuose eksperimentuose atlikti trys nepriklausomi tyrimai.

$\log N_f/N_0$ nustatyta, kad didinant elektrinio lauko stiprį po keturių dienų dešimtainis žūties santykis sumažėja iki 0,6 ciklų (3.19. pav.). Todėl galime daryti išvadą, kad IEL poveikis neturi įtakos gyvybingumui. Be to palyginus su literatūroje skelbiamais mielių gyvybingumo tyrimų rezultatais, kai veikiama 20 μ s trukmės eksponentinės impulso formos 12,5 kV/cm amplitudės IEL, tirtų mielių gyvybingumas sumažėjo iki 6 ciklų (Molinari ir kt., 2004).

Tiriant mielių metabolinio aktyvumo pokyčius po keturių valandų, paveikus elektriniu lauku, gyvybingumo sumažėjimas nepasireiškia (3.20. pav.), priešingai nei tiriant 150 μ s trukmės impulsų poveikį mielių ląstelėms, kurių gyvybingumas sumažėjo iki 0,3 OT vienetų padidinus elektrinio lauko stiprį iki 10 kV/cm (Pav. 3.17.). Kitaip tariant, nanosekundžių trukmės impulsų poveikio mielių ląstelių metaboliniam aktyvumui nenustatyta, net kai



3.20. pav. 60 nanosekundžių trukmės impulsinio elektrinio lauko poveikis mielių ląstelių metaboliniam aktyvumui po 4 val. inkubavimo SC terpėje 30 °C temperatūroje. Visuose eksperimentuose atlikti trys nepriklausomi tyrimai.

impulsinio elektrinio lauko stipris siekia 190 kV/cm. Šiuo atveju esant TPP⁺ sukaupimo lygiui iki 98%, mielių ląstelėse TPP⁺ absorbcijos sparta padidėjo iki 65 kartus, lyginant su nepaveiktomis mielių ląstelėmis.

Galime daryti išvadą, kad mielių ląstelių kolonijų formavimo efektyvumas nežymiai krenta (po 4 dienų) ir priklauso nuo elektrinio lauko stiprio, tuo tarpu metabolinis aktyvumas (po 4 valandų) išlieka nepakitęs. Tokių rezultatų mechanizmą būtų galima aiškinti pasitelkiant literatūroje aprašomus eksperimentus su gyvūninėmis ląstelėmis, nes yra žinoma, kad nanosekundžių trukmės impulsai gali sukelti apoptozę (Vernier ir kt., 2003) ar padidina reaktyvių deguonies formų kiekį terpėje (Pakhomova ir kt., 2012). Be to mielėse yra pastebėta, kad padidėja už oksidacinį stresą atsakingų baltymų ekspresija (Tanino ir kt., 2012). Galime daryti prielaidą, kad mieles paveikus

nanosekundžių trukmės IEL gali būti indukuojamas programuojamos mirties signalas. Tačiau šiai prielaidai pagrįsti reikia atlikti papildomus eksperimentus.

Tiriant IEL poveikį mielių membranų ir sienelių pralaidumui nustatyta, kad impulso trukmių diapazone nuo mikrosekundžių iki nanosekundžių stebima tiesinė TPP⁺ absorbcijos greičio priklausomybė nuo impulso energijos. Tokie rezultatai leidžia teigti, kad mielių sienelės barjeras TPP⁺ molekulėms yra sumažinamas dėka vykstančios plazminės membranos elektroporacijos, kurios metu iš ląstelės išėjusios medžiagos keičia sienelės barjerines savybes.

Lyginant 150 μ s ir 60 ns trukmės impulsų poveikį absorbcijos spartai, galima teigti, jog, nepažeidžiant mielių gyvybingumo, 60 ns impulsų atveju TPP⁺ molekulių absorbcijos spartos padidėjimas yra 3,5 karto didesnis negu mieles veikiant 150 μ s impulsais. Taigi, mielių ląsteles paveikus 60 ns trukmės impulsais TPP⁺ absorbcija pagreitėja 65 kartus lyginant su nepaveiktomis elektriniu lauku mielių ląstelėmis. Be to nanosekundinių impulsų poveikis leidžia pasiekti beveik 100 % TPP⁺ sulaupimo lygį. Tokie tyrimų rezultatai rodo, kad IEL galėtų būti naudojamas padidinti bio-jutiklių spartą, bio-kuro celių ir bio-katalizės efektyvumą, nepakenkiant ląstelės gyvybingumui dėl laikinų membranos ir sienelės barjerinių funkcijų sumažinimo.

IŠVADOS

1. Paveikus *Saccharomyces cerevisiae* mieles DDT padidėja ląstelės mechaninis tamprumas. Šis reiškinys sąlygotas daugiasluoksnės ląstelės struktūros, kurioje dėl DDT cheminio poveikio sienelės baltymų disulfidiniams ryšiams sumažėja mielės sienelės tamprumas.
2. Mielių mechanines savybes galima aprašyti Sneddon'o modeliu. Naudojant šį modelį buvo gauti šie tamprumo moduliai: esant mažai deformacijai nepaveiktų mielių Young'o moduliai buvo $0,12 \pm 0,82$ MPa ir paveiktų mielių $0,32 \pm 0,12$ MPa. Didelės deformacijos srityje Young'o moduliai nepaveiktų mielių buvo $1,00 \pm 0,04$ MPa ir paveiktų – $2,14 \pm 0,1$ MPa.
3. Mikrosekundžių trukmės stiprus impulsinis elektrinis laukas padidina mielių ląstelės sienelės pralaidumą TPP⁺ jonams. TPP⁺ pralaidumo priklausomybę nuo elektrinio lauko stiprio aprašo kinetinė lygtis, kurioje įskaitoma, jog asociacijos koeficientas yra parabolinė elektrinio lauko stiprio funkcija. Tai rodo, kad pralaidumo efektyvumas priklauso nuo papildomos elektrinio lauko impulso energijos, kuri suteikiama mielių ląstelėms, kai elektrinio impulso amplitudė viršija slenkstinį elektrinį lauką.
4. Elektrocheminis TPP⁺ jonų absorbcijos greičio matavimo metodas leidžia nustatyti sienelės pralaidumo padidėjimą veikiant mielių ląsteles nanosekundžių trukmės didelės galios elektriniais impulsais, neturinčiais įtakos mielių gyvybingumui. Taip pat kaip ir mikrosekundžių trukmės atveju pralaidumo efektyvumas priklauso nuo impulso energijos. Charakteringas mielių ląstelių elektrinio užsikrovimo laikas, veikiant jas mikrosekundžių trukmės impulsais, yra 4 μs. Tai rodo, kad tokių elektrinių impulsų metu užkraunami dariniai susidedantys iš kelių mielių ląstelių. Jų dydis yra apie 26 μm. Tačiau veikiant

ląsteles ns trukmės impulsais šis charakteringas laikas yra 0,9 μ s. Tai rodo elektrinis laukas selektyviai veikia atskiras agregate esančias dalis užkraudamas 6-7 μ m skersmens atskiras mielių ląsteles.

5. Veikiant nanosekundžių impulsais nestebimi mielių ląstelių gyvybingumo pokyčiai. Tačiau mikrosekundžių impulsai, sukuriantys elektrinį lauką didesnę nei 6 kV/cm, iššaukia ženklų gyvybingumo sumažėjimą (iki 60%).
6. Naudojant nano- bei mikro- sekundžių trukmės impulsus sukuriamas elektrinis lauko stipris iki 200 kV/cm padidina mielių sienelės pralaidumą polinei molekulei, tokiai kaip TPP⁺. Išlaikant 100% mielių ląstelių gyvybingumą naudojant 150 μ s trukmės impulsus galima iki 18,4 karto padidinti TPP⁺ molekulių absorbcijos mielėse spartą, o naudojant 60 ns trukmės impulsus ši sparta išauga iki 65 kartų. Tai leidžia impulsinę elektropermeabilizaciją mielėse panaudoti biologinių jutiklių veikimo spartos padidinimui.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Publikacijos recenzuojamuose žurnaluose:

1. Suchodolskis A., **Stirke A.**, Timonina A., Ramanaviciene A., Ramanavicius A. (2011). Baker's yeast transformation studies by Atomic Force Microscopy. *Advanced Science Letters* **4**: 171-173.
2. Suchodolskis, A., Feiza, V., **Stirke, A.**, Timonina, A., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., (2011). Elastic properties of chemically modified baker's yeast cells studied by AFM. *Surface and Interface Analysis* **43**(13): 1636-1640.
3. **A. Stirke**, A. Zimkus, S. Balevicius, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, V. Stankevic, N. Zurauskiene, L. Chaustova. (2012). Effects of nanosecond high power pulsed electric field on yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall permeability. *IEEE Proceedings on 4th Euro-Asian Pulsed Power Conference 19th International Conference of High-Power Particle Beams*: 161-164.
4. S. Balevičius, N. Žurauskienė, V. Stankevič, **A. Stirke**, A. Bitinaitė, R. Saulė, G. Saulis, R. Maciulevičienė, E. Šatkovskis. (2012). System for nanoporation of biological cells based on optically triggered high voltage spark-gap switch. *IEEE Proceedings on 4th Euro-Asian Pulsed Power Conference 19th International Conference on High-Power Particle Beams*: 151-154.
5. S. Balevičius, N. Žurauskienė, V. Stankevič, **A. Stirke**, A. Bitinaitė, R. Saulė, G. Saulis, R. Maciulevičienė, E. Šatkovskis. (2013). System for nanoporation of biological cells based on optically triggered high-voltage spark-gap switch. *IEEE Plasma Science* (priimta, spaudoje). DOI 10.1109/TPS.2013.2280376.
6. **Stirke A.**, Zimkus A, Ramanaviciene A, Balevicius S, Zurauskiene N, Saulis G, Chaustova L, Stankevic V, Ramanavicius A. (2013). Electric field-induced effects on yeast cell wall permeabilization. *Bioelectromagnetics* (priimta).

Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės:

1. Ramanavicius A., Ramanaviciene A., Suchodolskis A., **Stirke A.**, Makaraviciute A. (2010) Atomic Force Microscopy study of living baker's yeast cells". *The Pittsburgh Conference PITTCON 2010*, February 28 - March 5, Orlando, JAV. 1380-2. Stendinis pranešimas.
2. A. Suchodolskis, **A. Stirkė**, L. Mikoliunaitė, A. Ramanavičienė, A. Ramanavičius, A. Timonina. (2011). Atominės jėgos mikroskopijos ypatumai matuojant gyvųjų ląstelių mechanines savybes. 39-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos Konferencija (LNFK-39), 2011 spalio 5-7, Vilnius. Žodinis pranešimas.

3. **A. Stirkė**, A. Zimkus, V. Stankevič, A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė. (2012). Mikrosekundinių didelė galios impulsų poveikis mielių (*Saccharomyces cerevisiae*) membranos ir sienelės laidumui. II- jaunųjų mokslininkų konferencija, 2012 vasario 14d., Vilnius. Žodinis pranešimas.
4. Vaitkuvienė A., Suchodolskis A., Ramanavicius **A.**, **Stirke** A., Mikoliūnaitė L., Ramanaviciene A. (2012). Investigation of transformed cells by atomic force microscopy. PITTCON 2012, March 11-15, Orlando, JAV. 510-5P. Stendinis pranešimas.
5. **Stirke A.**, Zimkus A., Saulis G., Ramanavicius A., Balevicius S., Zurauskienė N., Stankevic V. (2012). The effects of high power pulses on pathogen fungus: application to biodefence. ISL – symposium „Electric engineering“ March 21-22 2012. Prancūzija. Žodinis pranešimas.
6. **A. Stirke**, A. Zimkus, S. Balevicius, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, V. Stankevic, N. Zurauskienė, L. Chaustova. (2012). Effects of nanosecond high power pulsed electric field on yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall permeability. *Euro-Asian Pulsed Power Conference 19th International Conference of High-Power Particle Beams*. September 30 - October 4, 2012, Karlsruhe, Vokietija. Stendinis pranešimas.
7. S. Balevičius, N. Žurauskienė, V. Stankevič, **A. Stirke**, A. Bitinaitė, R. Saulė, G. Saulis, R. Maciulevičienė, E. Šatkovskis. (2012). System for nanoporation of biological cells based on optically triggered high-voltage spark-gap switch. *4th Euro-Asian Pulsed Power Conference 19th International Conference on High-Power Particle Beams*. September 30 - October 4, 2012, Karlsruhe, Vokietija. Stendinis pranešimas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Andersen, D. C. ir L. Krummen (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13**(2): 117-123.
- Anton-Leberre, V., E. Haanappel, N. Marsaud, L. Trouilh, L. Benbadis, H. Boucherie, S. Massou ir J. M. François (2010). Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics* **31**(1): 28-38.
- Aouida, M., O. Tounekti, O. Belhadj ir L. M. Mir (2003). Comparative roles of the cell wall and cell membrane in limiting uptake of xenobiotic molecules by *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(6): 2012-2014.
- Ballarin-Denti, A., C. L. Slayman ir H. Kuroda (1994). Small lipid-soluble cations are not membrane voltage probes for *Neurospora* or *Saccharomyces*. *Biochim Biophys Acta* **1190**(1): 43-56.
- Barattin, R. ir N. Voyer (2008). Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. *Chemical Communications*(13): 1513-1532.
- Bartoletti, D., G. Harrison ir J. Weaver (1989). The number of molecules taken up by electroporated cells: quantitative determination. *FEBS Lett (EUH)* **256**(1-2): 4-10.
- Batista Napotnik, T., Y. H. Wu, M. A. Gundersen, D. Miklavcic ir P. T. Vernier (2012). Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics* **33**(3): 257-264.
- Beebe, S. J., P. M. Fox, L. J. Rec, E. L. Willis ir K. H. Schoenbach (2003). Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *FASEB J* **17**(11): 1493-1495.
- Bernhardt, J. ir H. Pauly (1973). On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Radiation and Environmental Biophysics* **10**(1): 89-98.
- Boal, D. ir D. H. Boal (2012). *Mechanics of the Cell*, Cambridge University Press.
- Botstein, D. ir G. R. Fink (2011). *Yeast: an experimental organism for 21st century biology*. *Genetics* **189**(3): 695-704.
- Brajtburg, J., W. G. Powderly, G. S. Kobayashi ir G. Medoff (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **34**(2): 183-188.
- Breitenbach, M., S. M. Jazwinski ir P. Laun (2012). *Aging Research in Yeast*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, Springer Netherlands.
- Brown, G. C. ir C. E. Cooper (1995). *Bioenergetics: a practical approach*, Oxford University Press, USA.
- Brückner, S. ir H.-U. Mösch (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **36**(1): 25-58.
- Buhlmann, P., E. Pretsch ir E. Bakker (1998). Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chemical Reviews* **98**(4): 1593-1688.
- Bui, V. C., Y. U. Kim ir S. S. Choi (2008). Physical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Surface and Interface Analysis* **40**(10): 1323-1327.
- Cánovas, M., T. Torroglosa, H.-P. Kleber ir J. L. Iborra (2003). Effect of salt stress on crotonobetaine and D(+)-carnitine biotransformation into L(-)-carnitine by

- resting cells of *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology* **43**(4): 259-268.
- Carl, P. ir H. Schillers (2008). Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **457**(2): 551-559.
- Castrillo, J. I. ir S. G. Oliver (2011). *Yeast Systems Biology*. UK, Humana Press.
- Chaustova, L., V. Miliukienė, A. Zimkus ir V. Razumas (2008). Metabolic state and cell cycle as determinants of facilitated uptake of genetic information by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Central European Journal of Biology* **3**(4): 417-421.
- Chen, J. ir J. Stubbe (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Cancer* **5**: 102-112.
- Chen, P., H.-H. Liu, R. Cui, Z.-L. Zhang, D.-W. Pang, Z.-X. Xie, H.-Z. Zheng, Z.-X. Lu ir H. Tong (2008). Visualized investigation of yeast transformation induced with Li⁺ and polyethylene glycol. *Talanta* **77**(1): 262-268.
- Chen, R. (2007). Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(4): 730-738.
- Corte, L., P. Rellini, L. Roscini, F. Fatichenti ir G. Cardinali (2010). Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study. *Analytica Chimica Acta* **659**(1-2): 258-265.
- Dague, E., R. Bitar, H. Ranchon, F. Durand, H. M. Yken ir J. M. François (2010). An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast* **27**(8): 673-684.
- Dague, E., Y. Gilbert, C. Verbelen, G. Andre, D. Alsteens ir Y. F. Dufrêne (2007). Towards a nanoscale view of fungal surfaces. *Yeast* **24**(4): 229-237.
- Dallies, N., J. François ir V. Paquet (1998). A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(14): 1297-1306.
- Daugelavicius, R., A. Buivydas, A. Sencilo ir D. H. Bamford (2010). Assessment of the activity of RND-type multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* using tetraphenylphosphonium ions. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36**(3): 234-238.
- David, A., D. Vincent, E. Kevin Mc, W. Linda, J. G. Hermann ir F. D. Yves (2008). Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. *Nanotechnology* **19**(38): 384005.
- De Nobel, J. G. ir J. A. Barnett (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: A brief essay-review. *Yeast* **7**(4): 313-323.
- De Nobel, J. G., C. Dijkers, E. Hooijberg ir F. M. Klis (1989). Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. *Journal of General Microbiology* **135**(7): 2077-2084.
- Debono, M. ir R. S. Gordee (1994). Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annual Review of Microbiology* **48**(1): 471-497.
- Delorme, E. (1989). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology* **55**(9): 2242-2246.
- Eing, C., S. Bonnet, M. Pacher, H. Puchta ir W. Frey (2009). Effects of nanosecond pulsed electric field exposure on *Arabidopsis thaliana*. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **16**(5): 1322-1328.

- El Zakhem, H., J. L. Lanoiselle, N. I. Lebovka, M. Nonus ir E. Vorobiev (2006). Behavior of yeast cells in aqueous suspension affected by pulsed electric field. *Journal of Colloid and Interface Science* **300**(2): 553-563.
- El Zakhem, H., J. L. Lanoiselle, N. I. Lebovka, M. Nonus ir E. Vorobiev (2006). The early stages of *Saccharomyces cerevisiae* yeast suspensions damage in moderate pulsed electric fields. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **47**(2): 189-197.
- Feldmann, H. (2005). Yeast molecular biology. Retrieved 07 24, 2012, from http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/.
- Filyak, Y., N. Finiuk, N. Mitina, O. Bilyk, V. Titorenko, O. Hrydzhuk, A. Zaichenko ir R. Stoika (2013). A novel method for genetic transformation of yeast cells using oligoelectrolyte polymeric nanoscale carriers. *BioTechniques* **54**(1): 35-43.
- Flewelling, R. F. ir W. L. Hubbell (1986). Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles. *Biophysical Journal* **49**(2): 531-540.
- Fologea, D., T. Vassu-Dimov, I. Stoica, O. Csutak ir M. Radu (1998). Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **46**(2): 285-287.
- Frey, W., J. A. White, R. O. Price, P. F. Blackmore, R. P. Joshi, R. Nuccitelli, S. J. Beebe, K. H. Schoenbach ir J. F. Kolb (2006). Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure. *Biophys J* **90**(10): 3608-3615.
- Ganeva, V., B. Galutzov ir J. Teissi (1995). Electric field mediated loading of macromolecules in intact yeast cells is critically controlled at the wall level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1240**(2): 229-236.
- Ganeva, V., B. Galutzov ir J. Teissi (2003). High yield electroextraction of proteins from yeast by a flow process. *Analytical Biochemistry* **315**(1): 77-84.
- Garjonyte, R., V. Melvydas ir A. Malinauskas (2009). Amperometric biosensors for lactic acid based on baker's and wine yeast. *Microchimica Acta* **164**(1-2): 177-183.
- Ghannoum, M. A. ir L. B. Rice (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **12**(4): 501-517.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin ir S. G. Oliver (1996). Life with 6000 Genes. *Science* **274**(5287): 546-567.
- Goossens, K. ir R. Willaert (2010). Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **32**(11): 1571-1585.
- Hansma, H. G. ir J. H. Hoh (1994). Biomolecular Imaging with the atomic force microscope. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**(1): 115-140.
- Heinisch, J. J., P. N. Lipke, A. Beaussart, S. El Kirat Chatel, V. Dupres, D. Alsteens ir Y. F. Dufrêne (2012). Atomic force microscopy – looking at mechanosensors on the cell surface. *Journal of Cell Science* **125**(18): 4189-4195.
- Higgins, M. J., T. Fukuma ir S. P. Jarvis (2006). AFM in Liquid. *Imaging & Microscopy* **8**(3): 47-49.

- Hill, J., K. A. I. G. Donald ir D. E. Griffiths (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research* **19**(20): 5791.
- Hobbie, R. K. ir E. V. Mielczarek (1998). Intermediate physics for medicine and biology. *Physics Today* **51**(10): 81-82.
- Iorio, E., A. Torosantucci, C. Bromuro, P. Chiani, A. Ferretti, M. Giannini, A. Cassone ir F. Podo (2008). Candida albicans cell wall comprises a branched β -d-(1,6)-glucan with β -d-(1,3)-side chains. *Carbohydrate Research* **343**(6): 1050-1061.
- Isoai, A., H. Kimura, A. Reichert, K. Schörgendorfer, K. Nikaido, H. Tohda, Y. Giga-Hama, N. Mutoh ir H. Kumagai (2002). Production of D-amino acid oxidase (DAO) of *Trigonopsis variabilis* in *Schizosaccharomyces pombe* and the characterization of biocatalysts prepared with recombinant cells. *Biotechnology and Bioengineering* **80**(1): 22-32.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata ir A. Kimura (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* **153**(1): 163-168.
- Yu, Z., X. Zhang, P. Ren, M. Zhang ir J. Qian (2012). Therapeutic potential of irreversible electroporation in sarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* **12**(2): 177-184.
- Janmey, P. A. ir C. A. McCulloch (2007). Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**(1): 1-34.
- Kanbe, T., K. Utsunomiya ir A. Ishiguro (1997). A crossreactivity at the immunoglobulin E level of the cell wall mannoproteins of *Candida albicans* with other pathogenic *Candida* and airborne yeast species. *Clinical & Experimental Allergy* **27**(12): 1449-1457.
- Kano, H. ir H.-o. Hamaguchi (2005). Vibrationally resonant imaging of a single living cell by supercontinuum-based multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy. *Optics Express* **13**(4): 1322-1327.
- Kasas, S. ir G. Dietler (2008). Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **456**(1): 13-27.
- Kasas, S. ir A. Ikai (1995). A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophysical Journal* **68**(5): 1678-1680.
- Kawai, S., W. Hashimoto ir K. Murata (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: Methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered Bugs* **1**(6): 395-403.
- Kelly, D. ir S. Kelly (2003). Rewiring yeast for drug synthesis. *Nature Biotechnology* **21**(2): 133-134.
- Klis, F. M., A. Boorsma ir P. W. De Groot (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**(3): 185-202.
- Klis, F. M., M. de Jong, S. Brul ir P. W. de Groot (2007). Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. *Yeast* **24**(4): 253-258.
- Klis, F. M., P. Mol, K. Hellingwerf ir S. Brul (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **26**(3): 239-256.
- Kubal, B. S. ir S. F. D'Souza (2004). Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg white using glutaraldehyde. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **59**(1): 61-64.
- Lee, E. W., S. Thai ir S. T. Kee (2010). Irreversible electroporation: a novel image-guided cancer therapy. *Gut Liver* **4**(Suppl. 1): S99-S104.

- Lee, Y. J., C. S. Kim ir D. K. Oh (2004). Lactulose production by β -galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**(6): 787-793.
- Lesage, G. ir H. Bussey (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**(2): 317-343.
- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**(4): 1145-1175.
- Lipke, P. N. ir R. Ovalle (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* **180**(15): 3735-3740.
- Liu, D., N. I. Lebovka ir E. Vorobiev (2011). Impact of electric pulse treatment on selective extraction of intracellular compounds from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Food and Bioprocess Technology* **6**(2): 576-584.
- Liu, Y., H. Hama, Y. Fujita, A. Kondo, Y. Inoue, A. Kimura ir H. Fukuda (1999). Production of S-lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols. *Biotechnology and Bioengineering* **64**(1): 54-60.
- Martínez, J. L., L. Liu, D. Petranovic ir J. Nielsen (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology* **23**(6): 965-971.
- McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller ir M. R. Hilleman (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**(5947): 178-180.
- Mercade-Prieto, R., C. R. Thomas ir Z. Zhang (2013). Mechanical double layer model for *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eur Biophys J* **42**(8): 613-620.
- Min, J.-J., S. Biswal, C. Deroose ir S. S. Gambhir (2004). Tetraphenylphosphonium as a novel molecular probe for imaging tumors. *Journal of Nuclear Medicine* **45**(4): 636-643.
- Molinari, P., A. M. R. Pílosof ir R. J. Jagus (2004). Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices, by pulsed electric fields. *Food Research International* **37**(8): 793-798.
- Morotomi-Yano, K., S. Oyadomari, H. Akiyama ir K.-i. Yano (2012). Nanosecond pulsed electric fields act as a novel cellular stress that induces translational suppression accompanied by eIF2 α phosphorylation and 4E-BP1 dephosphorylation. *Experimental Cell Research* **318**(14): 1733-1744.
- Morotomi-Yano, K., Y. Uemura, S. Katsuki, H. Akiyama ir K. Yano (2011). Activation of the JNK pathway by nanosecond pulsed electric fields. *Biochem Biophys Res Commun* **408**(3): 471-476.
- Muraji, M., W. Tatebe, T. Konishi, T. Fujii ir H. Berg (1993). Effect of electrical energy on the electropermeabilization of yeast cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **31**(1): 77-84.
- Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **189**(3): 737-765.
- Neumann, E. (1992). Membrane electroporation and direct gene transfer. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **28**(1): 247-267.
- Neumann, E., S. Kakorin ir K. Toensing (1999). Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem Bioenerg* **48**(1): 3-16.
- Neumann, E., S. Kakorin ir K. Toensing (2000). Principles of membrane electroporation and transport of macromolecules. *Methods Mol Med* **37**: 1-35.

- Neumann, E., S. Kakorin, I. Tsoneva, B. Nikolova ir T. Tomov (1996). Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophysical Journal* **71**(2): 868-877.
- Odds, F. C., A. J. P. Brown ir N. A. R. Gow (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology* **11**(6): 272-279.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**(3): 775-818.
- Pakhomova, O. N., V. A. Khorokhorina, A. M. Bowman, R. Rodaite-Riseviciene, G. Saulis, S. Xiao ir A. G. Pakhomov (2012). Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Arch Biochem Biophys* **527**(1): 55-64.
- Pavlin, M., V. Leben ir D. Miklavčič (2007). Electroporation in dense cell suspension - Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**(1): 12-23.
- Potter, H. ir R. Heller (2010). Transfection by electroporation. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 9**: Unit9 3.
- Reberšek, M. ir D. Miklavčič (2011). Advantages and Disadvantages of Different Concepts of Electroporation Pulse Generation. *AUTOMATIKA* **52**(1): 12-19.
- Reddy, A. ir F. Maley (1993). Dithiothreitol improves the efficiency of yeast transformation. *Analytical biochemistry* **208**(1): 211-212.
- Rhymes, M. R. ir K. A. Smart (2001). Effect of storage conditions on the flocculation and cell wall characteristics of an ale brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **59**(1): 32-38.
- Rico, F., P. Roca-Cusachs, N. Gavara, R. Farre, M. Rotger ir D. Navajas (2005). Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **72**(2 Pt 1): 021914.
- Rotenberg, H. (1997). Biomembranes (Selected Methods in Enzymology). San Diego, Acad Press Inc.
- Sakugawa, T., N. Aoki, H. Akiyama, I. Kazuo, M. Watanabe, A. Kouda ir K. Suematsu (2012). A method of cyanobacteria treatment using underwater pulsed streamer like discharge. *Proceedings of 4th Euro-Asian Pulsed Power Conference*.
- Sale, A. J. H. ir W. A. Hamilton (1967). Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **148**(3): 781-788.
- Sambrook, J. ir D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saulis, G. (2008). Laštelių elektroporacija: istorija ir mechanizmas. *Kaunas: "Lututė"*: 360.
- Saulis, G. ir R. Praneviciute (2005). Determination of cell electroporation in small-volume samples by using a mini potassium-selective electrode. *Analytical Biochemistry* **345**(2): 340-342.
- Schoenbach, K. H., R. P. Joshi, J. F. Kolb, C. Nianyong ir M. Stacey (2004). Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proceedings of the IEEE* **92**(7): 1122 - 1137
- Smith, A. E., Z. Zhang ir C. R. Thomas (2000). Wall material properties of yeast cells: Part 1. Cell measurements and compression experiments. *Chemical Engineering Science* **55**(11): 2031-2041.

- Sneddon, I. N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science* **3**(1): 47-57.
- Stacey, M., P. Fox, S. Buescher ir J. Kolb (2011). Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival. *Bioelectrochemistry* **82**(2): 131-134.
- Stacey, M., J. Stickley, P. Fox, V. Statler, K. Schoenbach, S. J. Beebe ir S. Buescher (2003). Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis. *Mutat Res* **542**(1-2): 65-75.
- Stanhill, A., N. Schick ir D. Engelberg (1999). The yeast ras/cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response. *Mol Cell Biol* **19**(11): 7529-7538.
- Stenson, J. D. (2008). Investigating the Mechanical Properties of Yeast Cells. Dissertation, The University of Birmingham.
- Stirke, A., A. Zimkus, S. Balevicius, V. Stankevicius, N. Zurauskiene, L. Chaustova, A. Ramanaviciene ir A. Ramanavicius (2012). Effects of a nanosecond high power pulsed electric field on yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall permeability. *Proceedings of 4th Euro-Asian Pulsed Power Conference*.
- Su, L., W. Jia, C. Hou ir Y. Lei (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **26**(5): 1788-1799.
- Suchodolskis, A., V. Feiza, A. Stirke, A. Timonina, A. Ramanaviciene ir A. Ramanavicius (2011). Elastic properties of chemically modified baker's yeast cells studied by AFM. *Surface and Interface Analysis* **43**(13): 1636-1640.
- Svaldo Lanero, T., O. Cavalleri, S. Krol, R. Rolandi ir A. Gliozzi (2006). Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *J Biotechnol* **124**(4): 723-731.
- Tanino, T., S. Sato, M. Oshige ir T. Ohshima (2012). Analysis of the stress response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* toward pulsed electric field. *Journal of Electrostatics* **70**(2): 212-216.
- Titushkin, I. ir M. Cho (2009). Regulation of cell cytoskeleton and membrane mechanics by electric field: role of linker proteins. *Biophysical journal* **96**(2): 717-728.
- Tomov, T. C. ir I. C. Tsoneva (1989). Changes in the surface charge of cells induced by electrical pulses. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **276**(2): 127-133.
- Touhami, A., B. Hoffmann, A. Vasella, F. A. Denis ir Y. F. Dufrêne (2003). Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions. *Microbiology* **149**(10): 2873-2878.
- Tsai-Fu, W., T. Sheng-Yu ir H. Jin-Chyuan (2004). Generation of pulsed electric fields for processing microbes. *Plasma Science, IEEE Transactions on* **32**(4): 1551-1562.
- Tsukatani, T., H. Suenaga, T. Higuchi, T. Akao, M. Ishiyama, K. Ezoe ir K. Matsumoto (2008). Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods* **75**(1): 109-116.
- Vacata, V., A. t. Kotyk ir K. Sigler (1981). Membrane potential in yeast cells measured by direct and indirect methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **643**(1): 265-268.

- Van Holle, A., M. Machado ir E. Soares (2012). Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* re-evaluation of the role of cell surface charge and hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**(3): 1221-1229.
- Veelders, M., S. Brückner, D. Ott, C. Unverzagt, H.-U. Mösch ir L.-O. Essen (2010). Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(52): 22511-22516.
- Vernier, P. T., L. Aimin Li Marcu, C. M. Craft ir M. A. Gundersen (2003). Ultrashort pulsed electric fields induce membrane phospholipid translocation and caspase activation: differential sensitivities of Jurkat T lymphoblasts and rat glioma C6 cells. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **10**(5): 795 - 809
- Vernier, P. T., Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft ir M. A. Gundersen (2004). Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts. *FEBS Lett* **572**(1-3): 103-108.
- Verstrepen, K. J. ir F. M. Klis (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology* **60**(1): 5-15.
- Weaver, J. C., G. I. Harrison, J. G. Bliss, J. R. Mourant ir K. T. Powell (1988). Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast. *FEBS Lett* **229**(1): 30-34.
- White, J. ir G. Walker (2011). Influence of cell surface characteristics on adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to the biomaterial hydroxylapatite. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**(2): 201-209.
- White, J. A., P. F. Blackmore, K. H. Schoenbach ir S. J. Beebe (2004). Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *Journal of Biological Chemistry* **279**(22): 22964-22972.
- Zeng, Q., F. Qiu ir L. Yuan (2008). Production of artemisinin by genetically-modified microbes. *Biotechnol Lett* **30**(4): 581-592.
- Zimkus, A., L. Caustova ir V. Razumas (2006). Effect of lithium and sodium cations on the permeability of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells to tetraphenylphosphonium ions. *Biologija* **2**: 47-49.
- Zimkus, A. ir L. Chaustova (2003). The permeability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains with different cell wall architecture to lipophilic cation tetraphenylphosphonium and their transformation capability. *Biologija* **3**: 42-44.
- Zimkus, A. ir L. Chaustova (2004). Application of the liquid membrane combination of the tetraphenylphosphonium selective electrode for an assay of permeability properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Chemija* **15**(2): 27-30.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovams prof. habil. dr. Arūnui Ramanavičiui ir doc. dr. Almirai Ramanavičienei už pagalbą ruošiant disertaciją ir atliekant eksperimentus.

Esu labai dėkingas prof. habil. dr. Sauliui Balevičiui už pagalbą atliekant eksperimentus su didelės galios impulsų generatoriais. Taip už pagalbą ir diskusijas padėjusias kiekybiškai įvertinti eksperimentų duomenis.

Dėkoju prof. habil. dr. Nerijai Žūrauskienei už suteiktą galimybę ir pagalbą atlikti elektroporacijos tyrimus jos vadovaujamoje Didelės galios impulsų laboratorijoje. Taip pat doc. dr. Voitech Stenkevič už pagalbą atliekant ir optimizuojant mikro ir nanosekundžių trukmės impulsų generavimo įrangą, kuri buvo naudojama šiame darbe.

Dėkingas dr. Artūriui Suchodolskiui ir dokt. Linai Mikoliūnaitei už pagalbą ir mokslines diskusijas dirbant ir atliekant eksperimentus su atominių jėgų mikroskopu.

Esu dėkingas doc. dr. Aurelijui Zimkui suteikusiam galimybę šiame darbe naudoti jo sukurtą tetrafenilfosfoniui selektyvų elektrodą. Taip pat dr. Larisai Chaustovai už mokslines diskusijas bei mielių kamieną naudotą darbe.

Dėkoju studentei Uršulei Miknevičiutei už pagalbą ruošiant disertaciją.

Esu dėkingas Lietuvos Mokslo Tarybai už finansinę paramą.

Tyrimai buvo atliekami iš dalies remiant Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūrai pagal Fizikos ir technologijų mokslo centre vykdomą projektą “GYVŪJŲ LAŠTELIŲ NANOELEKTROPORATORIUS (BIONANOPORE)” Nr. 31V-33.

Be mano žmonos Bytautės ir artimųjų asmeninės pagalbos ir palaikymo šios disertacijos iš vis nebūtų.