VILNIAUS UNIVERSITETAS

GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

IEVA PETKEVIČIŪTĖ

(Mikrobiologijos bakalauro studijų programa)

Bakalauro baigiamasis darbas

PRIEŠMIKROBINIS LANTANO JUNGINIŲ POVEIKIS ODOS PATOGENAMS

Darbo vadovas: j. asist. Kotryna Čekuolytė

_____

Studentas _____

Vilnius, 2024

TURINYS

SANTRUMPOS 3
ĮVADAS 4
1. LITERATŪROS APŽVALGA 6
1.1 Odos mikrobiota 6
1.2 Odos ligų sąsaja su odos mikrobiota 9
1.2.1 *Staphylococcus aureus* 10
1.2.2 *Streptococcus pyogenes* 11
1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa* 12
1.3 Antimikrobiniai junginiai 13
1.3.1 Lantano nitratas 14
1.3.2 Lantano nitrato heksahidratas 15
2. MEDŽIAGOS IR METODAI 17
2.1 Darbe naudota įranga ir priemonės 17
2.2 Darbe naudoti mikroorganizmų kamienai 17
2.3 Darbe naudotos medžiagos 17
2.4 Darbe naudotos kultivavimo terpės ir tirpalai 18
2.5 Metodai 18
2.5.1 Minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas 18
2.5.2 Lantano junginių daromo poveikio bakterijų augimui vertinimas laike 18
2.5.3 Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių poveikio įvertinimas 20
4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 21
4.1 Minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas 21
4.2 Lantano junginių daromo poveikio bakterijų augimui vertinimas laike 24
4.2 Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių poveikio įvertinimas 28
IŠVADOS 33
SANTRAUKA 34
SUMMARY 35
LITERATŪROS SĄRAŠAS 36

SANTRUMPOS

rRNR – ribosominė ribonukleorūgštis

ATP – adenozin-trifosfatas

FDA – Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration*)

OT – optinis tankis

aps/min – apsisukimai per minutę

MIK – minimali inhibicinė koncentracija

MBK – minimali bakteriocidinė koncentracija

LB – Luria – Bertani mitybinė terpė

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

ĮVADAS

Žmogaus oda – tai didžiausias žmogaus organas, tapęs buveine mikroorganizmams, prisitaikiusiems metabolizuoti odoje esančias maistines medžiagas (Byrd et al., 2018). Šie mikroorganizmai žinomi kaip odos mikrobiota. Mikrobiota padeda užtikrinti tinkamą odos apsauginės funkcijos atlikimą – konkuruoja su patogenais dėl vietos ant odos bei sintetina patogenų augimą slopinančius ar net stabdančius junginius (Swaney, Kalan, 2021). Įvairūs veiksniai, tokie kaip amžius, asmens priežiūros priemonės, gyvenimo sąlygos ar dieta, turi įtakos žmogaus odos mikrobiotos įvairovei (Grice and Segre, 2011). Pastebėta, jog skirtingas mikroorganizmų santykio pasiskirstymas lemia skirtingas odos būkles, o mikroorganizmų disbiozė ant odos yra siejama su dermatologiniais sutrikimais, tokiais kaip atopininis dermatitas (Bay and Ring, 2022; Byrd et al., 2018).

Atsiradusi odos mikrobiotos disbiozė, pažeidimai odoje ar bendrai nusilpęs imunitetas sukuria tinkamas sąlygas patogenų įsikūrimui bei odos ligų vystymuisi (Grice, Segre, 2011). *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* bei *Pseudomonas aeruginosa* – tai bakterijos, kurios dėl savo gebėjimo sukelti odos infekcines ligas yra priskiriamos odos patogenams (Chiller et al., 2001). Šių patogeninių bakterijų sukeliamos odos ligos tampa itin didele našta ne tik sveikatos priežiūros sistemoms visame pasaulyje, bet žmonių kasdieniam gyvenimui (Byrd et al., 2018; Lacey et al., 2023; Wu et al., 2011). Be to, didėjantis bakterijų atsparumas odos ligų – šių patogeninių bakterijų sukeliamų infekcijų – gydymą daro vis sudėtingesnį (Chahine et al., 2022; Wu et al., 2011). Tokios problemos reikalauja efektyvių naujų antimikrobinių medžiagų ar gydymo metodų paieškų, siekiant užtikrinti efektyvią patogenų kontrolę.

Alternatyvūs gydymo metodai, įskaitant metalų nanodaleles ar kompleksinius junginius, tampa puikiu pasirinkimu, siekiant kovoti su atsparumą įgijusiais bakterijų kamienais (Medici et al., 2016). Lantano nitratas ir lantano nitrato heksahidratas – tai druskos, kurių antimikrobinio potencialo tyrimai vis dažniau sutinkami mokslinėje literatūroje. Teigiami lantano nitrato bei iš lantano nitrato heksahidrato susintetintų junginių antimikrobiniai tyrimų rezultatai prieš patogenines bakterijas rodo šių junginių aukštą antimikrobinį potencialą (Gao et al., 2021; Liu et al., 2008; Shalaby et al., 2022; Vedenkin et al., 2019). Odos ligų bei atsparių bakterijų kamienų gausa bei našta visuomenei rodo didelį poreikį tyrinėti galimą lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato antimikrobinį potencialą.

Darbo tikslas:

- Nustatyti lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato priešmikrobinį poveikį odos patogenams: *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes ir Pseudomonas aeruginosa*.

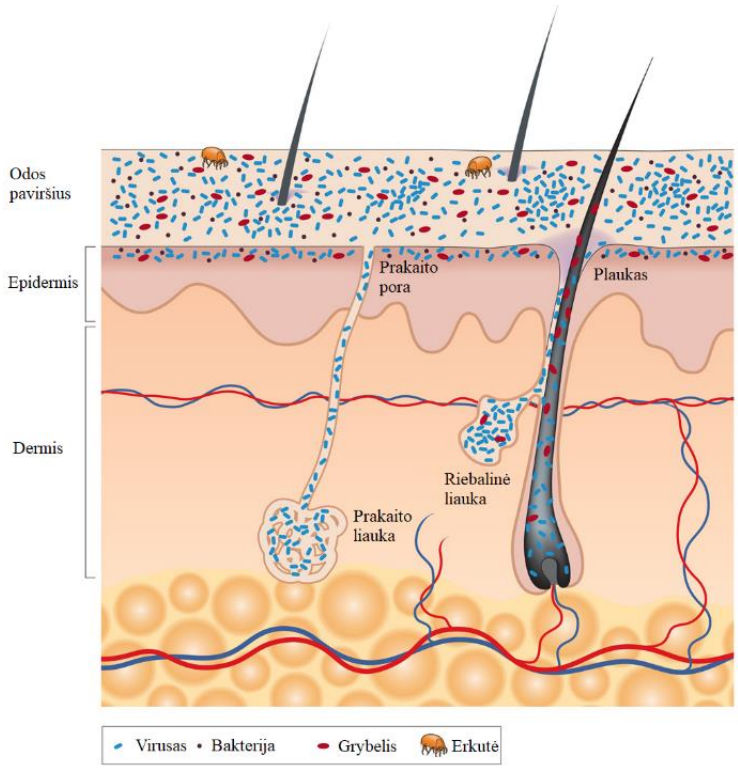
Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato minimalias bakteriocidines koncentracijas (MBK): *S. aureus*, *S. pyogenes* ir *P. aeruginosa*
2. Įvertinti lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato poveikį *S. aureus*, *S. pyogenes* ir *P. aeruginosa* augimui
3. Ištirti sinergisitinį elektroporacijos ir lantano nitrato bei lantano nitrato heksahidrato poveikį *S. aureus*, *S. pyogenes* ir *P. aeruginosa*

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Odos mikrobiota

Oda – didžiausias organas, kuris sudaro net 20 % visos kūno masės (Reuter-Rice, Bolick, 2011). Šis organas yra kolonizuotas daugybės skirtingų mikroorganizmų, įskaitant bakterijas, virusus, grybelius ir erkutes (Grice, Segre, 2011). Visi mikroorganizmai, randami ant odos paviršiaus, bendrai suvokiami kaip odos mikrobiota (Byrd et al., 2018). Moksliniuose straipsniuose odos paviršiaus plotas prilyginamas maždaug 2 m^2, tačiau, kai pagrindinis tyrimo objektas yra mikrobiota, svarbu atkreipti dėmesį, kad oda nėra lygus paviršius (Gallo, 2017; Kong, Segre, 2012). Atsižvelgiant į tokius nelygumus, kaip riebalų liaukos ar plaukų folikulai, R. L. Gallo atliko skaičiavimus, kurie parodo, kad odos paviršiaus plotas, kuris gali būti kolonizuotas mikroorganizmų, yra daugiau nei 10 kartų didesnis už tą, kuris įprastai sutinkamas mokslinėje literatūroje (Gallo, 2017). Ši informacija yra itin svarbi, norint suvokti ant odos paviršiaus gyvenančių mikroorganizmų daromos įtakos mastą. Grice ir Segre (2011) moksliniame straipsnyje sukurta iliustracija puikiai atvaizduoja galimą mikroorganizmų pasiskirstymą tiek odos paviršiuje, tiek gilesniuose jos sluoksniuose, t. y., dermyje ir epidermyje išsidėsčiusiuose plaukų folikuluose ir riebalų liaukose (1.1 pav.).



1.1 pav. Schema, atspindinti odos skerspjūvio histologiją kartu su odos sluoksniuose esančiais mikroorganizmais (Grice, Segre, 2011)

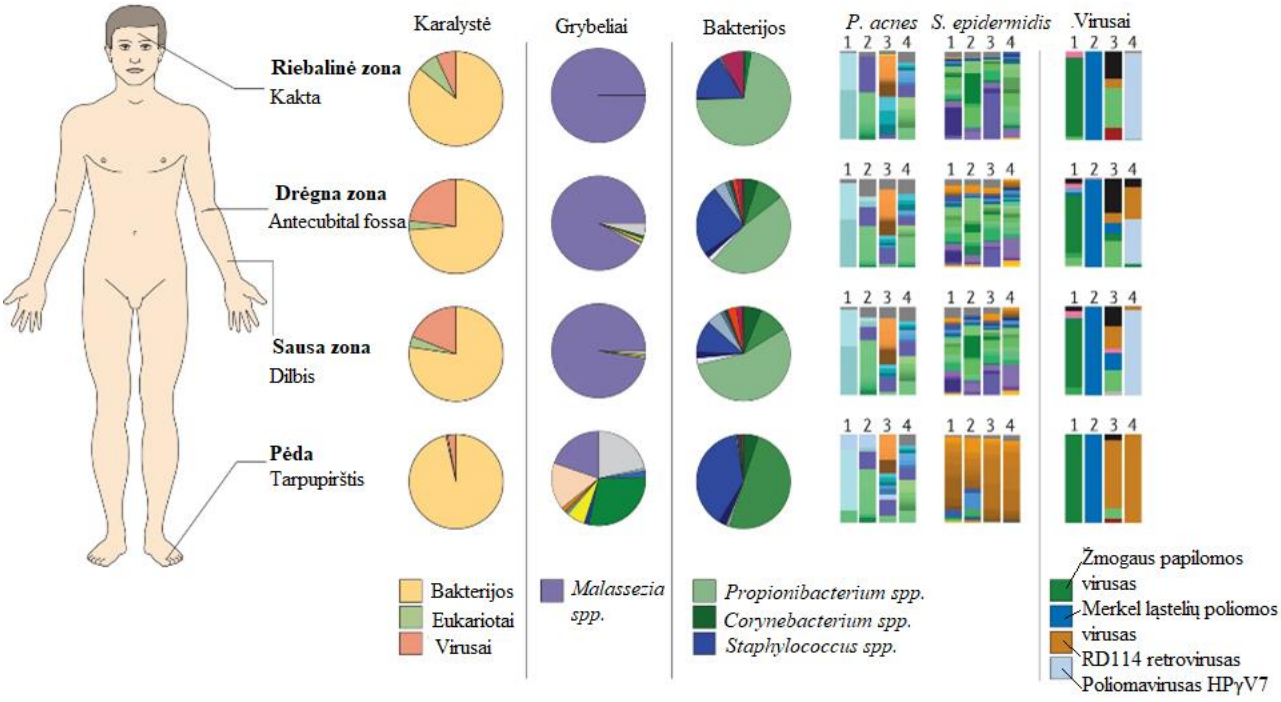
Ankščiau, norint nustatyti odos mikrobiotos sudėtį, buvo naudojami kultyvavimo metodai, pasitelkiant tepinėlius nuo odos, gautus naudojant lazdeles su medvilniniu tamponėliu (Evans, Stevens, 1976). Pagrindinė kliūtis, iškylanti naudojant tokį metodą, – jis neatskleidžia visos mikroorganizmų įvairovės ir pasiskirstymo, nes apima tik lengvai, standartinėmis laboratorinėmis sąlygomis auginamas rūšis, o nekultivuojamos arba išrankesnių augimo sąlygų reikalaujančios rūšys ar kamienai lieka neaptikti (Byrd et al., 2018; Kong, Segre, 2012). Su laiku, didėjant skirtingų tyrimų rezultatų skaičiui, iškelta idėja, kad lengviausiai kultivuojami odos mikroorganizmai, kurie būtent atsispindi mikrobiologiniuose testuose, nebūtinai yra tie, kurių gausa ar daroma įtaka yra didžiausia. Tai supratus, pasitelkiami molekuliniai metodai, kurie atspindi mikroorganizmų įvairovę, remiantis 16S rRNR geno sekos analize (Dethlefsen et al., 2007; Kong, Segre, 2012). 16S rRNR genas žinomas dėl savo konservatyvių sričių, kurios vaidina svarbų vaidmenį skirtingų mikroorganizmų genetinių sekų palyginime bei filogenetinio ryšio nustatyme, ir variabilių sričių, kurios svarbios filogenetinėms analizėms – skirtumams tarp genčių ar rūšių nustatyti (Turnbaugh et al., 2007). Pasitelkus genominius metodus odos mikrobiotai tirti, nustatyta žymiai didesnė mikroorganizmų įvairovė, lyginant su kultyvavimo metodų metu gautais rezultatais (Kong, Segre, 2012).

Odos mikrobiotą gali sudaryti mažiausiai dvi mikroorganizmų populiacijos: nuolatinė ir laikinoji. Nuolatinę sudaro mikroorganizmai, kurie kolonizuoja odą iškart po kūdikio gimimo ir yra reguliariai randami ant odos paviršiaus (Chiller et al., 2001; Ruocco et al., 2007). Pašalinus tokius mikroorganizmus, paprastai jie atsikuria per 24 – 72 valandas. Dažniausiai nuolatiniai mikroorganizmai yra laikomi komensaliniais (Kong, Segre, 2012). Komensaliniai mikroorganizmai – tai tokie mikroorganizmai, kurių poveikis yra teigiamas arba neutralus (Chiller et al., 2001; Swaney, Kalan, 2021). Komensaliniai mikroorganizmai glaudžiai susiję su imunine sistema, o tai padeda jiems išlaikyti simbiotinį ryšį tarp mikroorganizmo ir šeimininko. Susidariusi simbiozė padeda komensaliniams mikroorganizmams išvengti šeimininko uždegiminio atsako ir tuo pačiu prisideda prie organizmo funkcionalaus odos barjero išlaikymo (Swaney, Kalan, 2021). *Staphylococcus epidermidis* ir *Cutibacterium acnes* (ankščiau vadinta *Proprionibacterium acnes*) yra pagrindiniai mikroorganizmai, priskiriami nuolatinei odos mikroorganizmų populiacijai. Tuo tarpu laikinieji mikroorganizmai ant odos paviršiaus randami tik tam tikrą laiko tarpą (nuo valandos iki kelių dienų), jie nesidaugina bei dažniausiai ant odos patenka iš išorinės aplinkos (Ruocco et al., 2007). Laikini mikroorganizmai lemia odos mikrobiotos skirtumus tarp individų (Grice, Segre, 2011; Kong, Segre, 2012).

Odos mikrobiotos sudėčiai įtaką daro įvairios fiziologinės odos charakteristikos, tokios kaip drėgmės ar sebumo kiekis odoje (Byrd et al., 2018). Mikrobiotą sudarančių mikroorganizmų

pasiskirstymui taip pat itin svarbūs išoriniai faktoriai, tokie kaip šeimininko gyvenamosios aplinkos klimatas, gyvenimo būdas; vidiniai faktoriai: genotipas, lytis, amžius, imuninė sistema (Grice, Segre, 2011). Tokių faktorių bendra sudėtis nulemia, kokie mikroorganizmai bus randami ant odos ir koks bus jų pasiskirstymo santykis (Kong, Segre, 2012).

Remiantis skirtingų mokslininkų straipsniuose aprašytais odos mikroorganizmų 16s rRNR geno sekoskaitos rezultatais, Byrd et al. (2018) straipsnyje buvo sukurta iliustracija, atspindinti odos mikroorganizmų pasiskirstymą skirtingose kūno vietose (1.2 pav.) (Byrd et al., 2018).



1.2 pav. Odos mikrobiotos sudėtis 4 skirtingose kūno odos zonose (kaktoje, *antecubital fossa*, dilbyje ir tarpupirštyje), atspindinčiose skirtingas mikroaplinkas (riebalinė, drėgna, sausa vietos ir pėda). Paveikslėlyje pavaizduotas santykinis mikrobiotos pasiskirstymas tarp karalysčių, grybelių bei bakterijų rūšių, įvardinant tik užimančias didžiausią dalį. Stulpelinėmis diagramomis pavaizduotas skirtingas *P. acnes* (pervadinta į *Cutibacterium acnes*), *S. epidermidis* kamienų pasiskirstymas, kur panašiomis spalvomis vaizduojamas glaudus kamienų sąryšis. Paskutinėje stulpelinių diagramų linijoje (virusai) vaizduojamas odoje randamų virusų pasiskirstymas (Byrd et al. 2018).

1.2 paveikslėlyje esančios skritulinės diagramos parodo, kad nepaisant odos fiziologinių charakteristikų, pagal karalystes didžiausią odo mikrobiotos dalį sudaro bakterijos, iš kurių riebalinėse odos vietose dominuoja *Propionibacterium* spp., o drėgnose *Staphylococcus* spp. ir *Corynebacterium* spp. Dažniausiai ant odos sutinkamas virusas yra žmogaus papilomos virusas. Iš eukariotams priklausančių mikroorganizmų, svarbų vaidmenį atlieka *Demodex* erkutės, mikroskopiniai

nariuotakojai, kurie randami riebalinėse srityse, o didžioji dalis odoje randamų grybelių priklauso *Malassezia* genčiai (Kong, Segre, 2012).

Išanalizavus mikroorganizmų, randamų odoje, gausą ir pasiskirstymą, svarbu išsiaiškinti, koks yra galimas jų vaidmuo. Svarbiausia odos funkcija – apsauginė. Odos mikrobiota prisideda prie odos barjero vientisumo išlaikymo (Swaney, Kalan, 2021). Viena iš svarbiausių funkcijų, atliekamų nuolatinių odos mikroorganizmų – kova su patogenais (Kong, Segre, 2012). Ši kova gali būti dvejopa: tiesioginė ir netiesioginė (Swaney, Kalan, 2021). Tiesioginė: odą kolonizavusios bakterijos yra žinomos dėl savo išskiriamų bakteriocinų – antimikrobinių peptidų (Kong, Segre, 2012). Netiesioginė kova suvokiama kaip mikroorganizmų konkurencija su patogenais dėl vietos, maistinių medžiagų bei kitokių išteklių (Swaney, Kalan, 2021). Taip pat moksliniuose straipsniuose rašoma, jog odos mikrobiota prisideda prie žaizdų gijimo, gamina vitaminus, skatina epidermio diferenciaciją, kas irgi prisideda prie odos kaip barjero palaikymo (Findley, Grice, 2014; Swaney, Kalan, 2021).

Mokslinėje literatūroje aprašyti atradimai apie žmogaus odos mikrobiotą padeda ne tik atskleisti, kokia didelė mikroorganizmų įvairovė gali būti randama ant odos paviršiaus, bet ir prisideda prie odą kolonizavusių mikroorganizmų daromos įtakos žmogui supratimo.

1.2 Odos ligų sąsaja su odos mikrobiota

Daugybė veiksnių, tokių kaip naudojamos kosmetikos priemonės, ilgas buvimas saulėje (ultravioletinių spindulių poveikis), antibiotikų vartojimas ir pan., gali turėti įtakos odos mikrobiotos sudėčiai. Įprastai tokie veiksniai, darantys įtaką šeimininko ir jį kolonizavusių mikroorganizmų santykiui, skirstomi į endogeninius (genetinius) ir egzogeninius (išorinius, pavyzdžiui, higienos priemonės) (Grice, Segre, 2011). Pakitusi mikrobiotos sudėtis gali būti siejama su odos sutrikimais ar net infekcijomis. Išskiriami trys būdai, kaip odą kolonizavę mikroorganizmai gali prisidėti prie odos sutrikimų: pirmasis – atsiradusi mikrobiotos disbiozė, antrasis – laikinieji patogeniški mikroorganizmai, trečiasis – komensaliniai / nuolatiniai mikroorganizmai kaip odos infekcijos sukėlėjai (Grice, Segre, 2011; Kong, Segre, 2012). Svarbu išsiaiškinti, kaip kiekviena iš šių trijų skirtingų situacijų gali susidaryti.

Pirmasis būdas remiasi susidariusia odos mikrobiotos disbioze – atsiradusiu mikroorganizmų pokyčiu ant odos, t. y., subalansuotos odos mikrobiotos praradimu (Bay, Ring, 2022; Byrd et al., 2018). Komensalinis odos mikroorganizmas *Staphylococcus epidermidis* yra žinomas dėl savo antimikrobinio poveikio prieš *Staphylococcus aureus*. Bakterija sintetina serino proteazę, kuri naikina *S. aureus* bioplėveles bei antimikrobinius peptidus, kurie tiesiogiai žudo *S. aureus* (Bay, Ring, 2022; Iwase et al., 2010). Nors *S. aureus* bakterija įprastai randama ant odos, padidėjęs jos kiekis yra siejamas su odos

infekcijomis ir ligomis, pavyzdžiui, atopiniu dermatitu (Bay, Ring, 2022; Tuazon, 1984). Ankščiau įvardinti išoriniai ir vidiniai veiksniai gali keisti santykinę mikrobiotos sudėtį ir lemti *S. epidermidis* sumažėjimą, todėl padidėja *S. aureus* ir vystosi odos infekcijos bei ligos (Bay, Ring, 2022).

Antrasis būdas susijęs su odos infekcija, kurioje dalyvauja iš aplinkos patekęs patogenas. Vienas iš galimų pavyzdžių yra bakterija *Vibrio vulnificus*. Ši bakterija įprastai randama šiltuose pakrančių vandenyse. Maudantis tokiame vandenyje, užtenka nedidelių įbrėžimų ar žaizdelių, esančių ant odos, kad susidarytų tinkamos sąlygos *V. vulnificus* infekcijai. Bakterijos sukelta odos infekcija pasireiškia odos jautrumu, paraudimu bei pūslelėmis (Coerdt, Khachemoune, 2021).

Trečiasis būdas susijęs su komensalinių odos mikroorganizmų patogeniškumo atsiradimu. Atsiradus odos pažeidimams arba nusilpus imunitetui, nuolatinei odos mikrobiotai priklausantis mikroorganizmas *S. epidermidis* pradeda intensyviai daugintis, formuoti bioplėveles ir taip stabdyti žaizdos gijimą ar net sukelti odos infekcijas (Kong, Segre, 2012; Swaney, Kalan, 2021). Moksliniuose straipsniuose rašoma, kad komensalinės bakterijos gali tapti odos patogenais, nes jų patogeniškumas priklauso būtent nuo odos gebėjimo atlikti apsauginę funkciją, t.y., apsaugoti šeimininką nuo galimų infekcijų (Bay, Ring, 2022).

Visi trys būdai paaiškina, kaip ant odos gyvenantys mikroorganizmai gali ne tik padėti odai atlikti apsauginę funkciją, bet ir priešingai – pabloginti jos būklę. Aptikus bei identifikavus mikroorganizmą, kuris gali daryti įtaką odos infekcijai ar ligai, svarbu nustatyti ir jo veikimo pobūdį.

1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus – tai gramteigiama, apvalios formos bei gelsvas kolonijas formuojanti bakterija (Cogen et al., 2008). Ši bakterija ne tik priklauso nuolatinei odos mikrobiotai, tačiau taip pat yra labai svarbus odos patogenas (Kong, Segre, 2012). *S. aureus* patogeniškumas svyruoja nuo lengvų ir savaime praeinančių odos infekcijų iki invazinių ir net keliančių pavojų gyvybei (Cogen et al., 2008). Bakterija yra asocijuojama su chronine odos liga – atopiniu dermatitu (kitaip žinoma kaip egzema). Egzemos atsiradimas siejamas su daugybe faktorių, įskaitant genų mutacijas, susijusias su baltymu filagrinu, bei imunine sistema, tačiau taip pat ir su pakitimais odos mikrobiotoje. Kong et al. (2012) atliktame tyrime buvo pastebėta, kad *S. aureus* kiekio gausa atopinio dermatito paūmėjimo metu yra didesnė, nei pradiniame ligos etape (Kong et al., 2012). Moksliniame straipsnyje taip pat aprašoma, jog teigiami ligos gydymo rezultatai tiesiogiai koreliuoja su *S. aureus* gausos ant odos sumažėjimu. Be to, yra nustatyta, kad atopinio dermatito pažeistoje odoje yra sumažėjusi odos mikrobiotos įvairovė, kas lemia mažesnę antimikrobinių baltymų gamybą, atliekamą odos mikrobiotai priklausančių bakterijų,

pavyzdžiui, *S. epidermidis* ar *C. acnes*. Tokie odos mikrobiotos pakitimai lemia mažesnę *S. aureus* invazijos kontrolę ir didesnį bakterijos santykinį kiekį ant odos (Bay, Ring, 2022).

Kodėl svarbu šnekėti apie atopinį dermatitą? Remiantis 2022 pasauline atopinio dermatito ataskaita, net 223 milijonai žmonių gyvena su šia liga bei kenčia nuo jos sukeliamų nepatogumų kiekvienoje gyvenimo situacijoje (International Eczema Council, 2022). Reikalinga paminėti, jog ataskaitoje rašoma, kad ši liga iki šiol nėra pagydoma, o gyvenimą apsunkinančius simptomus bandoma sumažinti pasitelkiant emolientų terapiją, paskatinančių veiksnių supratimą bei vengimą ar net pasitelkiant antibiotikus bei antiseptinius produktus. Byrd et al (2018) straipsnyje minima, jog daugybės atliekamų nepriklausomų tyrimų tikslas yra naujų terapijų, veikiančių prieš *S. aureus*, paieška, siekiant pakeisti šiuo metu naudojamus plataus spektro antimikrobinius preparatus (Byrd et al., 2018).

1.2.2 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes – tai gramteigiama, β-hemolizinė (atlieka pilną raudonųjų kraujo kūnelių lizę) bei ovalias kolonijas formuojanti bakterija (Bryant, Stevens, 2015). Ši bakterija dėl savo gebėjimo prisikabinti, augti ir įsiskverbti į odą yra žinoma kaip odos patogenas (Chiller et al., 2001). Įprastai *S. pyogenes* nėra laikomas nuolatinei odos mikrobiotai priklausančiu mikroorganizmu, tačiau mokslinėse publikacijose galima rasti informacijos, jog ši bakterija besimptomiškai nešiojama gerklėje net 15 % mokyklinio amžiaus vaikų (Chiller et al., 2001). *S. pyogenes* siejama su įvairiomis žmogaus infekcijomis, nuo lengvų ir dažnai sutinkamų, tokių kaip odos infekcijos ir faringitas (ryklės gleivinės ir pogleivio uždegimas), iki sunkių, invazinių ir rečiau pasitaikančių, tokių kaip sepsis, nekrozinis fascitas ar streptokokinis toksinio šoko sindromas (Walker et al., 2014).

Pasauliniu mastu *S. pyogenes* yra atsakinga net už 33 milijonus sunkių ligos atvejų ir daugiau nei 600 000 mirčių per metus (Lacey et al., 2023). Bakterijos sukeliama odos infekcija – impetinga (angl. *impetigo*) dažniausiai prasideda per tiesioginį sąlytį su kitų asmenų užkrėstais odos pažeidimas. *S. pyogenes* sugeba kolonizuoti odą bei per mažus odos pažeidimus įsiskverbti į epitelį ir taip prisidėti prie tolimesnio odos pažeidimo vystymosi (Ruocco et al., 2007). Odos infekcija pasireiškia pustulėmis, kurios vis didėja, kol plyšta ir susiformuoja stori, gelsvai rudos spalvos šašai (Walker et al., 2014). Visame pasaulyje net 162 milijonai vaikų serga impetinga. Lacey et al. atliktos genominės analizės rezultatai teigia, kad besimptomiai žmonės, gerklėje nešiojantys *S. pyogenes,* gali būti bakterijos rezervuaras endeminėms odos infekcijoms (Lacey et al., 2023). Ligų ir net mirčių mastas, su kuriomis yra siejama *S. pyogenes*, veda prie išvados, jog tinkamų antimikrobinių medžiagų, kurios užkirstų kelią tokių infekcijų plitimui ir būklės prastėjimui, paieška yra itin svarbi šių dienų pasaulyje.

1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa – gramneigiama, lazdelės formos, gleives formuojanti bei plačiai skirtingose aplinkose paplitusi bakterija (Spernovasilis et al., 2021; Wu et al., 2011). Dėl daugybės skirtingų virulentiškumo faktorių, tokių kaip gebėjimas formuoti bioplėveles ar net kolonizuoti tarpląstelines ertmes, siekiant išvengti šeimininko imuninės sistemos bei antimikrobinių medžiagų, *P. aeruginosa* dažnai priskiriama oportunistiniams patogenams (Spernovasilis et al., 2021; Wu et al., 2011). Nors bakterija yra plačiai paplitusi skirtingose aplinkose, kolonizacija dažniau pastebima žmonėse, kuriems buvo atliekamas gydymas antibakteriniais preparatais ar turintiems nusilpusį imunitetą, odos pažeidimus (Mena, Gerba, 2009). *P. aeruginosa* gali būti priskiriama ir laikinajai odos mikrobiotai tuomet, kai oda yra pažeista, t.y., ant odos yra žaizda, nudegimas ir pan. (Garcia et al., 2018). Bakterija plačiai žinoma dėl jos keliamo pavojaus ligoninėse, t.y., vandens rezervuarų užteršimo, perdavimo per sveikatos priežiūros darbuotojų rankas bei dėl sukeliamų ausų bei akių infekcijų, kurios atsiranda per kontaktą su užterštais vandenimis, įprastai baseinuose ar kubiluose (Mena, Gerba, 2009; Wu et al., 2011). Apskaičiuota, jog maždaug 7,1 – 7,3 % visų su sveikatos priežiūra susijusių infekcijų yra siejamos būtent su *P. aeruginosa* (Reynolds, Kollef, 2021). *P. aeruginosa* infekcijos ant odos gali svyruoti nuo paviršutiniškų (pirminė infekcija, dėl bakterijos atsiradimo ant odos) iki gilesnių (antrinė infekcija, dėl *P. aeruginosa* bakteremijos – bakterijų buvimo kraujyje). Pirminėms infekcijoms yra priskiriamas žalio nago sindromas, tarpupirščių infekcija (angl. *toe webspaces*), folikulitas ir ausų uždegimai. Tuo tarpu gyvybei pavojingai *P. aeruginosa* bakteremijai priskiriami poodiniai mazgeliai, gangreninė ektima bei gangreninis celiulitas (Wu et al., 2011).

Kodėl ši bakterija kelia tiek problemų žmonijai? Pirmiausia, *P. aeruginosa* yra žinoma dėl savo gebėjimo ne tik išgyventi, bet ir daugintis aplinkoje, kurioje yra labai skurdus kiekis maistinių medžiagų, pavyzdžiui, krano vandenyje (Mena, Gerba, 2009). Problemų sukelia ir didėjantis atsparių įvairiems antimikrobiniams junginiams, tokiems kaip β-laktamai, *P. aeruginosa* kamienų skaičius. Nors pirminės odos infekcijos įprastai sėkmingai suvaldomos, tačiau antrinių infekcijų, keliančių pavojų gyvybei, valdymas yra sudėtingesnis ir kelia daugiau iššūkių. Kadangi šios bakterijos sukeliamų infekcijų gydymui tinkamo preparato pasirinkimą lemia daugybę veiksnių: infekcijos sunkumas, rizikos veiksniai, imuniteto stiprumas ir pan., naujų antimikrobinių junginių paieška, lemianti platesnį preparatų pasirinkimą, tampa itin svarbi (Wu et al., 2011).

1.3 Antimikrobiniai junginiai

Viena iš didžiausių šių laikų problemų – atsparumo antibiotikams didėjimas, dėl kurio sunkėja bakterijų sukeliamų infekcijų gydymas bei didėja mirčių skaičius (Chahine et al., 2022). Nepaisant to, bėgant metams naujų antibiotikų atradimas itin sulėtėjo. Auksiniame antibiotikų atradimo periode (nuo 1950 iki 1970) buvo atrasta net pusė iki dabar naudojamų vaistų, o per paskutinius 11 metų (nuo 2010 iki 2021) FDA patvirtino tik 17 naujų sisteminių antibiotikų (Chahine et al., 2022; Davies, 2006; Moellering, 2011). Svarbu paminėti, kad nuo auksinio antibiotikų atradimo laikotarpio iki pat 2023 nebuvo atrasta nei viena nauja antibiotikų klasė (Aminov, 2010). Tačiau 2024 metų pradžia prasidėjo su daug vilčių teikiančia žinia apie naujos antibiotikų klasės – makrociklinių peptidų – atradimą. Nors net pagrindinis naujos antibiotikų klasės atstovas zosurabalpinas dar reikalauja daugybės tyrimų iki jo panaudojimo žmonėms, naujų antimikrobinių junginių atradimas yra gyvybiškai svarbus kovai su bakterinėmis infekcijomis (Wong et al., 2024).

Keletas antibiotikų alternatyvų, kurios gali būti pasitelktos bakterijų sukeliamų ligų gydymui, yra fagų terapija, endo ir egzo lizinai bei bakteriocinai. Fagų terapija yra žinoma dėl savo specifiškumo taikiniui, kuris gali būti privalumas, bet tuo pat metu ir trūkumas – kai bakteriofagų panaudojimas apribojamas dėl jų neveiksmingumo, pavyzdžiui, prieš kelis bakterijos porūšius. Endo ir egzo lizinai tampa puikiu pasirinkimu siekiant mažesnio specifiškumo, lyginant su bakteriofagais, ir kovojant su gramteigiamomis bakterijomis. Problema iškyla tuomet, kai taikinys yra gramneigiamos bakterijos, nes tik nedidelis kiekis endo ir egzo lizinų rodo veiksmingumą prieš gramneigiamas bakterijas (Allen et al., 2014). Bakteriocinai yra vertinami dėl jų specifiškumo ir veiksmingumo mažomis koncentracijomis, tačiau jų efektyvumas dažnai apribojamas stabilumo skirtingose aplinkose trūkumu (Meade et al., 2020). Kiekvienas alternatyvus pasirinkimas turi savų privalumų ir trūkumų, todėl didesnė antimikrobinių junginių įvairovė lemia platesnį pasirinkimą, kas padeda efektyviau išgydyti skirtingų bakterijų sukeliamas ligas.

Daugelį metų neorganinės molekulės buvo pasitelkiamos įvairių ligų gydymui. Senovės civilizacijose metalų junginiai buvo pasitelkiami terapiniais tikslais, o šiomis dienomis, pavyzdžiui, platina, vaidina svarbų vaidmenį vėžio terapijoje (Gao et al., 2021). Siekiant išspręsti antibiotikams atsparių bakterijų problemą, kuriami nauji bakterinių infekcijų gydymo metodai, todėl neorganinių molekulių potencialo tyrimas tampa vis dažnesnis. Pavyzdžiui, nustatyta, jog sidabro junginiai yra veiksmingi prieš grybelius ir antibiotikams atsparias bakterijas (Medici et al., 2016). Arslan et al. (2009) tyrimo rezultatai parodė, jog tiakarbamido ligandų ir nikelio bei vario kompleksiniai junginiai turi

slopinamąjį poveikį prieš gramteigiamas, gramneigiamas bakterijas bei *Candida* genčiai priklausančias mieles (Arslan et al., 2009).

Metalams priklausantys lantanidai bei jų dariniai bėgant metams sulaukia vis daugiau dėmesio dėl galimo jų pritaikomumo įvairiose srityse, pavyzdžiui, medicinoje, organinėje sintezėje, pramoniniuose procesuose ir pan. Grynų lantanidų naudojimą pramonėje riboja didelė jų kaina ir klampumas, tačiau dėl patrauklių lantanidų savybių kliūtis siekiama apeiti naudojant tirpiklius, tokius kaip vanduo ar alkoholis (Migliorati et al., 2021). Moksliniuose tyrimuose aprašomas biologinis lantano junginių saugumas bei aktyvumas lemia mokslininkų susidomėjimą dėl galimo plataus lantano junginių panaudojimo (Gao et al., 2021).

1.3.1 Lantano nitratas

Latano nitratas ($La(NO_3)_3$) – tai druska, kurios sėkmingas antibakterinis aktyvumas prieš skirtingas bakterijas yra aprašomas moksliniuose darbuose (Liu et al., 2008; Vedenkin et al., 2019). Liu et al. (2008) atliktame tyrime nustatyta, jog didėjant lantano koncentracijai, drastiškai mažėja bakterijos *Escherichia coli* B išgyvenamumas ant kietos terpės, o koncentracijai pasiekus 300 mg/L bakterija yra nužudoma (Liu et al., 2008). Lantano nitrato daromas poveikis bakterijoms tirtas ir sudėtingesniuose eksperimentuose, pavyzdžiui, pasitelkiant peles. Viename eksperimente pelėms buvo atlikta skirtingos koncentracijos lantano nitrato injekcija, po kurios pelės papildomai užkrėstos infektyviu *Shigella flexneri* 2a kamienu. Rezultatai rodo, jog lantano nitrato injekcija padeda sumažinti pelių mirtingumą, o kuo didesnė lantano nitrato koncentracija – tuo pelių išgyvenamumas yra didesnis (Vedenkin et al., 2019). Parodyta ir neinvazyvi lantano nitrato panaudojimo galimybė. Gelis, kurio sudėtyje yra $La(NO_3)_3$, buvo tepamas ant pelių odos prieš atliekant *S. flexneri* 2a arba *Klebsiella pneumoniae* injekciją į pelių pilvo ertmę. Tokio gelio išorinis panaudojimas padidino pelių išgyvenamumą net iki 100 %, esant *S. flexneri* infekcijai, ir 30–50 %, esant *K. pneumoniae* infekcijai (Vedenkin et al., 2019). Teigiami lantano nitrato antibakteriniai poveikiai prieš skirtingas bakterijas kelia daug vilčių apie galimą platesnį šio junginio panaudojimą.

Tikslus lantano nitrato poveikis, kurio dėka pasiekiamas bakterijų augimo slopinimas ar nužudymas, nėra aprašytas. Atlikti termokinetikos tyrimai parodė, jog didelės lantano nitrato koncentracijos padidina šilumos išsiskyrimą bakterinių ląstelių augimo metu (Liu et al., 2008). Remiantis gautais rezultatais, mokslininkai iškėlė teoriją, jog slopinamasis lantano nitrato poveikis gali būti aiškinamas per energijos metabolizmo – ATP – sintezės slopinimą. Lantano jonai pakeičia kalcio ir magnio jonus, esančius bakterijos ląstelės sienelėje, todėl yra padidinamas ląstelės membranos

pralaidumas. Dėl atsiradusio pralaidumo protonai yra praleidžiami pro ląstelės membraną ir sumažėja elektrocheminis gradientas, kas lemia sumažėjusią ar net sustojusią ATP sintezę. Bakterijos ląstelėje esanti energija išsiskiria kaip šiluma, o dėl ATP trūkumo bakterijų augimas yra stabdomas (Liu et al., 2008).

Prieš svarstant bet kokio junginio naudojimą, taip pat svarbu įvertinti to junginio galimą pašalinį ir nepageidaujamą poveikį. Tyrimuose bandoma nustatyti galimus genotoksinius, mutageninius ir teratogeninius lantano nitrato keliamus efektus. Qianqian et al. (2023) aliktame tyrime nebuvo įrodymų apie galimą lantano nitrato mutageninį ir teratogeninį poveikį, kai $La(NO_3)_3$ koncentracija buvo mažesnė nei 36 mg/kg (efektai buvo tirti ant pelių) (Qianqian et al., 2023). Pasitelkiant *in vitro* ir *in vivo* testus, tokius kaip Ames testą bakterijoms bei kaulų čiulpų mikrobranduolių ir chromosomų aberacijos tyrimus pelėms (735 – 855 mg/kg), gauti rezultatai neparodė nei mutacininio, nei genotoksinio lantano nitrato poveikio (Yang et al., 2016). Be jau aprašytų teigiamų rezultatų, yra tyrimų, kurių rezultatai parodo ir priešingą lantano nitrato poveikį. Nustatyta, jog pelių per burną vartojamas lantano nitratas sukelia toksišką poveikį imuninei sistemai, taip sutrikdydamas imuninės sistemos ir vietinių limfmazgių veiklą (Meng-Meng et al., 2020).

Apžvelgti tyrimai rodo, jog lantano nitratas dėl savo antimikrobinio poveikio bakterijoms turi daug perspektyvaus panaudojimo galimybių, tačiau ne visiškai aiškus $La(NO_3)_3$ daromas poveikis gyviems organizmams reikalauja gilesnės analizės.

1.3.2 Lantano nitrato heksahidratas

Lantano nitrato heksahidratas ($La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) – tai druska, kuri moksliniuose tyrimuose dažnai naudojama kaip lantano šaltinis įvairiems lantano junginiams ar naujiems kompleksams sintetinti (Gao et al., 2021; Senthilkumar et al., 2023; Shalaby et al., 2022). Vienas iš pavyzdžių, kuriuose kaip lantano prekursorius buvo naudotas $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, yra La(III) komplekso sintezė, pasitelkiant lantano nitrato heksahidratą, salicilio rūgštį ir 1,10-fenantrolino monohidratą. Susintetintas La(III) kompleksas pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš *S. aureus* ir *E. coli*, o MIK (minimali inhibicinė koncentracija) buvo vos 32 μM (Gao et al., 2021). Lantano nitrato heksahidratas taip pat gali būti panaudotas lantano oksido nanodalelių sintezei. Shalaby et al. (2022) atliktame tyrime pastebėtas lantano oksido nano dalelių antibakterinis poveikis prieš *Bacillus cereus, Enterococcus faecalis, P. aeruginosa*, *Salmonella typhimrium.* Priešingai, inhibicinės zonos nebuvo užfiksuotos, naudojant lantano oksido nano daleles prieš *S. aureus*, *E. coli* (Shalaby et al., 2022). Panaudojant lantano nitrato heksahidratą kaip vieną iš sintezei reikalingų medžiagų, buvo atlikta ir cinko lantano oksido nanodalelių (ZnLnO) sintezė. ZnLnO dalelių antibakterinis aktyvumas nustatytas prieš *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* bei

Bacillus subtilis (Senthilkumar et al., 2023). Nors ir yra tiriamas skirtingų iš lantano nitrato heksahidrato naujai susintetintų lantano junginių galimas antibakterinis poveikis, mokslinių tyrimų, kuriuose būtų tirtas pačio $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ galimas antibakterinis poveikis, vis dar nėra.

Informacijos moksliniuose straipsniuose apie galimą pašalinį lantano nitrato heksahidrato poveikį taip pat mažai. Han et al. (2022) savo tyrimo metu nustatinėjo lantano nitrato heksahidrato poveikį *Caenorhabditis elegans* nematodams. Skirtingų stadijų L1 (pirma lervos stadija) ir L4 (ketvirta lervos stadija) *C. alegans* mirtinos $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ koncentracijos atitinkamai siekė 91,163 mg/L ir 648 mg/L. Lantano nitrato heksahidratas sukėlė augimo slopinimą, elgesio defektus, L4 stadijoje nustatytas reaktyvių deguonies formų (ROS) gamybos padidėjimas (Han et al., 2022; Mok et al., 2015). Tyrinėtas ir aukščiau aprašyto La(III) komplekso saugumo profilis, pasitelkiant peles kaip gyvūnų modelį. Nustatyta, jog iš lantano nitrato heksahidrato susintetinto La(III) komplekso LD50 (dozė, kuri sukelia mirtį 50 % tirtos populiacijos) vertė yra 308,9 mg/kg. Kadangi bakteriocidinė dozė dviem kartais mažesnė, padaryta išvada, jog tokio komplekso toksiškumas – vidutinis, todėl La(III) kompleksas galėtų būti svarstomas kaip antibakterinių preparatų kandidatas (Gao et al., 2021).

Tyrimų, tiesiogiai susijusių su lantano nitrato heksahidrato poveikiu bakterijų augimui, stoka bei matomas antibakterinis iš $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ susintetintų junginių veiksmingumas parodo neužpildytą, tačiau potencialo turinčią tyrimų nišą.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Darbe naudota įranga ir priemonės

Įranga:

- Autoklavas „AMA260NT Astell“
- Analitinės svarstyklės „KERN ADB“
- Laminarinė traukos spinta „Scanlaf Mars“
- Termostatas - purtyklė „GLF“
- Termostatas - „BINDER“
- Vorteksas „Scientific Industries“
- Spektofotometras „Eppendorf“
- Centrifūga „Eppendorf“
- Elektroporatorius „Vilnius Tech“

Priemonės:

- Sterilūs švirkštų filtrai (porų dydis 0,22 µm, membranos skersmuo 0,33 mm) „Roth“
- Mechaninės pipetės „Eppendorf“

2.2 Darbe naudoti mikroorganizmų kamienai

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213™)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12384™)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853™)

2.3 Darbe naudotos medžiagos

- Peptonas „Roth“
- Natrio chloridas „Merck“
- Mielių ekstraktas „Roth“
- Agaras „Roth“
- D-Sorbitolis „Roth“
- Lantano nitratas
- Lantano nitratas heksahidratas

2.4 Darbe naudotos kultivavimo terpės ir tirpalai

- Luria – Bertani (LB) terpė: 1 % peptono, 0,5 % NaCl, 0,5 % mielių ekstrakto (agarizuotai terpei – 1,5 % agaro). Terpė autoklavuojama 20 min., 121 °C.
- 1 M sorbitolio tirpalas: 100 mL tirpalo 1 M koncentracijos reikia 18,218 g D-sorbitolio. D-sorbitolis ištirpinamas 100 mL dejonizuoto vandens. Gautas tirpalas autoklavuojamas 15 min., 112 °C.

2.5 Metodai

2.5.1 Minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas

Naktinė, vieno iš trijų darbe naudotų bakterijų kamienų (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*), kultūra auginama skystoje LB terpėje 14 val., 37 °C, aeruojant 130 aps./min. Spektofotometru nustatomas naktinės kultūros optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui (OT_{600}). Atliekamas 1 OT_{600} naktinės kultūros plovimas D-sorbitoliu. D-sorbitoliu suspenduota ląstelių kultūra plaunama 3 kartus, ją centrifūguojant 3 min., 6000 aps/min greičiu.

Pasiruošiami lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato atitinkamos koncentracijos tirpalai. Tirpalai yra filtruojami naudojant švirkštą per filtrus į sterilius indelius. Tirpalai, gauti naudojant 20 min. 121 °C, 1 atm autoklavuotą vandenį, yra skiedžiami, siekiant gauti reikiamas tarpines koncentracijas.

Į plokštelėje esančius šulinėlius pilama po 100 µL paruoštos bakterijų kultūros ir po 100 µL tinkamos koncentracijos lantano nitrato arba lantano nitrato heksahidrato tirpalo. Į kontrolinį šulinėlį pilama 100 µL bakterijų kultūros ir 100 µL D-sorbitolio. Plokštelė dedama 4 val. ir 24 val. inkubacijai į termostatą prie 35 °C.

Po 4 val. ir 24 val. inkubacijos plokštelė išimama ir po 5 µL iš kiekvieno šulinėlio išsėjama ant kietos LB terpės. Lėkštelės su užsėta kieta LB terpe dedamos į termostatą 20 val, 35 °C. Gauti rezultatai po 20 val. užfiksuojami nuotraukomis. Minimali bakteriocidinė koncentracija nustatoma tuomet, kai pradinio inokuliato gyvybingumas yra sumažinamas 99,9 %, todėl vizualiai nebėra matoma kolonijų formavimo (Rodríguez-Melcón et al., 2022). Visi eksperimentai atliekami tris kartus.

2.5.2 Lantano junginių daromo poveikio bakterijų augimui vertinimas laike

<u>*P. aeruginosa* augimo kreivės sudarymas</u>

Naktinė *P. aeruginosa* kultūra auginama skystoje LB terpėje 14 val., 37 °C, aeruojant 130 aps./min. Nauji mėgintuvėliai su skysta LB terpe papildomi atitinkamu kiekiu lantano nitrato arba

lantano nitrato heksahidrato tirpalo, kad būtų pasiekta reikiama koncentracija (lantano nitrato – 125 mg/mL, lantano nitrato heksahidrato – 250 mg/mL). Kontroliniai mėgintuvėliai paliekami tik su skysta LB terpe. Spektofotometru nustatomas naktinės kultūros optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui (OT_{600}). Po reikiamą kiekį (apskaičiuotą pasitelkiant formulę $c_1V_1=c_2V_2$, kur c atitinka optinį tankį, o V – tūrį) 0,03 OT_{600} naktinės kultūros užsėjama į mėgintuvėlius, papildytus lantano nitratu, lantano nitrato heksahidratu arba be jokios veikliosios medžiagos (kontrolė). Tiriamosios kultūros auginamos tokiomis pat sąlygomis: 37 °C, 130 aps./min. Bakterijų augimas (optinis tankis) fiksuojamas spektrofotometru OT_{600} kas 1 valandą iki kol bus pasiekiama stacionari fazė. Iš 3 pusiau nepriklausomų kultūrų gautų optinio tankio rezultatų išvedami vidurkiai, pagal kuriuos braižomas bendras augimo grafikas, naudojant „Microsoft Excel“ programą. Kiekvienam duomenų taškui grafike apskaičiuojami puspločiai (angl. *half-widht*), siekiant įvertinti duomenų vertės kitimą. Puspločiai grafike pavaizduojami vertikaliomis linijomis (angl. *error bars*).

S. aureus ir *S. pyogenes* augimo kreivių sudarymas

Naktinė *S. aureus* arba *S. pyogenes* kultūra auginama skystoje LB terpėje 14 val., 37 °C, aeruojant 130 aps./min. Spektofotometru nustatomas naktinės kultūros optinis tankis, esant 600 nm bangos ilgiui (OT_{600}). Po 100 µL 0,03 OT_{600} naktinės kultūros perkeliama į 9 šulinėlius (3 kontroliniai, 3 veikiami lantano nitratu, 3 veikiami lantano nitrato heksahidratu), esančius plokštelėje. Kontroliniai mėginiai papildomi 100 µL skystos LB terpės. Mėginiai, veikiami lantano nitratu arba lantano nitrato heksahidratu, papildomi skysta LB terpe bei atitinkamu kiekiu lantano nitrato arba lantano nitrato heksahidrato tirpalo, kad bendras tūris sudarytų 100 µL. Paruošta plokštelė dedama į termostatą prie 35 °C. Kas valandą (pradedant 0 val.) 5 µL iš kiekvieno šulinėlio yra skiedžiami skysta LB terpe (atliekami serijiniai skiedimai) bei atliekamas jų išėjimas ant kietos LB terpės. Rezultatams gauti yra skaičiuojami kolonijas formuojantys vienetai (KFV). Suskaičiuoti KFV padauginami iš atlikto skiedimo (siekiant gauti realų kolonijų skaičių). Gauti realūs kolonijų skaičiai verčiami į dešimtainį logaritmą (log_{10}) ir pagal log_{10}(KFV) vidurkį, gautą iš trijų pusiau nepriklausomų pakartojimų rezultatų, braižomas augimo grafikas, naudojant „Microsoft Excel“ programą. Kiekvienam duomenų taškui grafike apskaičiuojami puspločiai (angl. *half-widht*), siekiant įvertinti duomenų vertės kitimą. Puspločiai grafike pavaizduojami vertikaliomis linijomis (angl. *error bars*).

Statistinė analizė atliekama pasitelkiant „Microsoft Excel“ programą. Siekiant įvertinti, ar tiriamųjų duomenų skirtumai statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinių duomenų, taikomas dviejų

nepriklausomų imčių Stjudento T testas (naudota funkcija „TTEST“). Statistinis reikšmingumas nustatomas, esant $p < 0,05$.

2.5.3 Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių poveikio įvertinimas

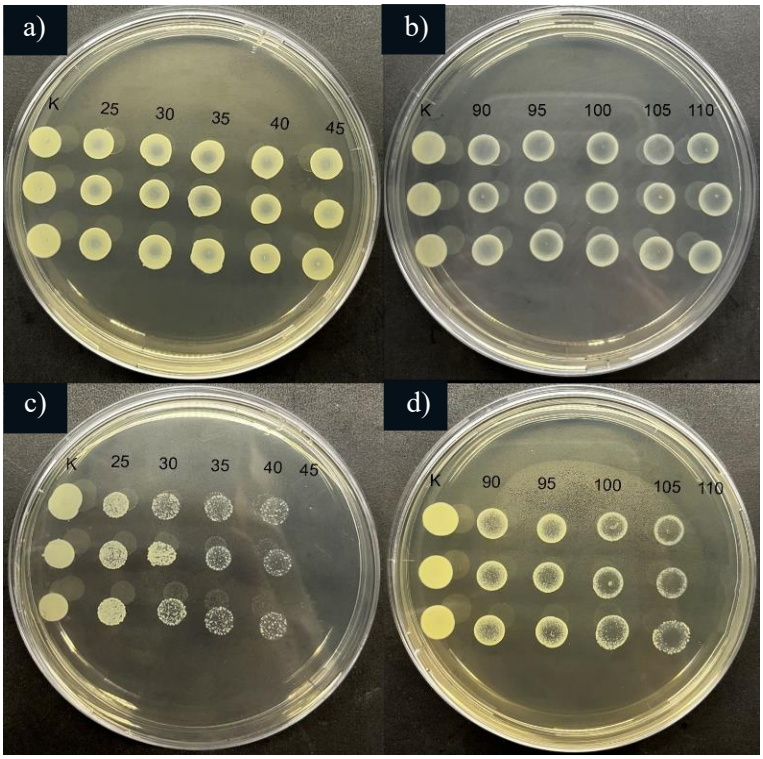
Naktinės *S. aureus, S. pyogenes, P. aeruginosa* kultūros auginamos skystoje LB terpėje 14 val., 37 °C, aeruojant 130 aps./min. Atliekamas 0,5 OT_{600} naktinės kultūros plovimas D-sorbitoliu. D-sorbitoliu suspenduota ląstelių kultūra plaunama 3 kartus, ją centrifūguojant 3 min, 6000 aps/min greičiu. Į kiuvetę pilamas atitinkamas kiekis išplautos ląstelių kultūros ir lantano nitrato arba lantano nitrato heksahidrato tirpalų, jog galutinis tūris būtų 70 µl. Kiuvetėje lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato koncentracijos atitinkamai lygios: *P. aeruginosa* 62,5 µg/mL ir 125 µg/mL, *S. aureus* 45 mg/mL ir 110 mg/mL, *S. pyogenes* 25 mg/mL ir 105 mg/mL. Kontrolinis mėginys – įtampa ir veikliąja medžiaga nepaveiktos bakterijų ląstelės. Elektroporacija atliekama vienu 100 µs impulsu, esant 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 kV/cm įtampai. Kiuvetės paliekamos 10 min. Po 10 min kiuvetėje esantis mišinys perkeliamas ir išsėjamas ant kietos LB tepės. Agarizuotos lėkštelės perkeliamos į 35 °C termostatą, 24 val. Po 24 val. skaičiuojami KFV. Remiantis kontrolinių mėginių rezultatais, procentiškai apskaičiuojamas elektroporacijos ir lantano nitrato / lantano nitrato heksahidrato sinergistinis poveikis.

Skaičiavimai, grafikų braižymai atliekami pasitelkiant „Microsoft Excel“ programą. Kiekvienai diagramai apskaičiuojamas pusplotis (angl. *half-width*) siekiant įvertinti duomenų vertės kitimą. Pusplotis grafike pavaizduojamas vertikaliomis linijomis (angl. *error bars*). Statistinė analizė atliekama pasitelkiant „Microsoft Excel“ programą. Siekiant įvertinti, ar tiriamųjų duomenų skirtumai statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kontrolinių duomenų, taikomas dviejų nepriklausomų imčių Stjudento T testas (naudota funkcija „TTEST“). Statistinis reikšmingumas nustatomas, esant $p < 0,05$.

4. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

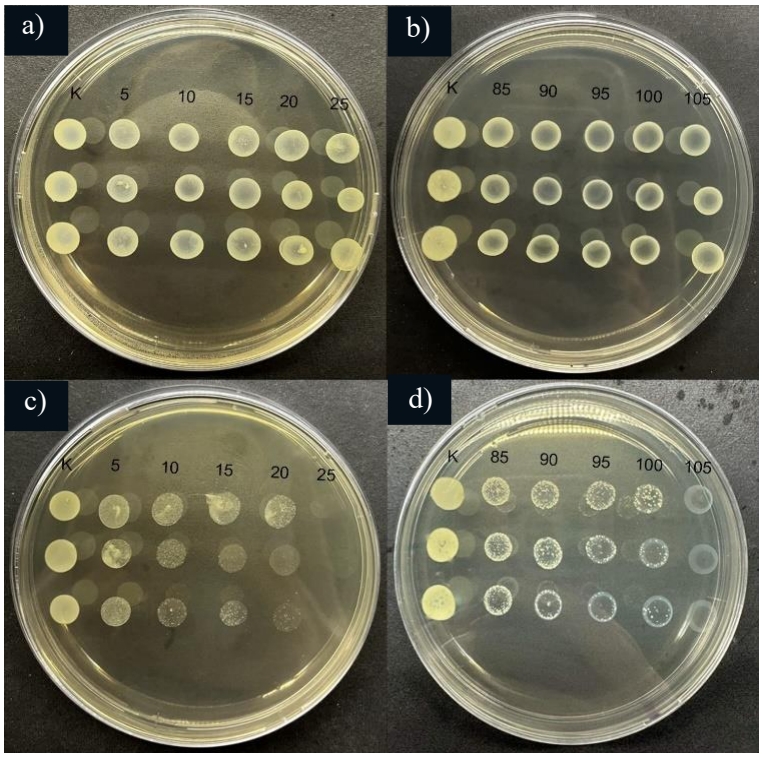
4.1 Minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas

Siekiant nustatyti, kokia lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato koncentracija yra reikalinga visiškam *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* nužudymui, buvo atliktas minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymo tyrimas. Po gramteigiamos bakterijos *S. aureus* 4 val. inkubacijos su lantano nitratu ir lantano nitrato heksahidratu vizualiai nebuvo pastebėtas antibakterinis junginių poveikis (4.1.1 pav. a ir b). Po 24 val. inkubacijos nustatytos lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato nustatytos MBK atitinkamai lygios ≤ 45 mg/mL (4.1.1 pav. c) ir ≤ 110 mg/mL (4.1.1 pav. d).



4.1.1 pav. *S. aureus* minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas. Pirmoji eilutė (K) vaizduoja kontrolinius mėginius, o skaičiais nurodomos koncentracijos mg/mL. a) *S. aureus* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitratu po 4 val. inkubacijos b) *S. aureus* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitrato heksahidratu po 4 val. inkubacijos c) *S. aureus* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitratu po 24 val. inkubacijos d) *S. aureus* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitrato heksahidratu po 24 val. inkubacijos

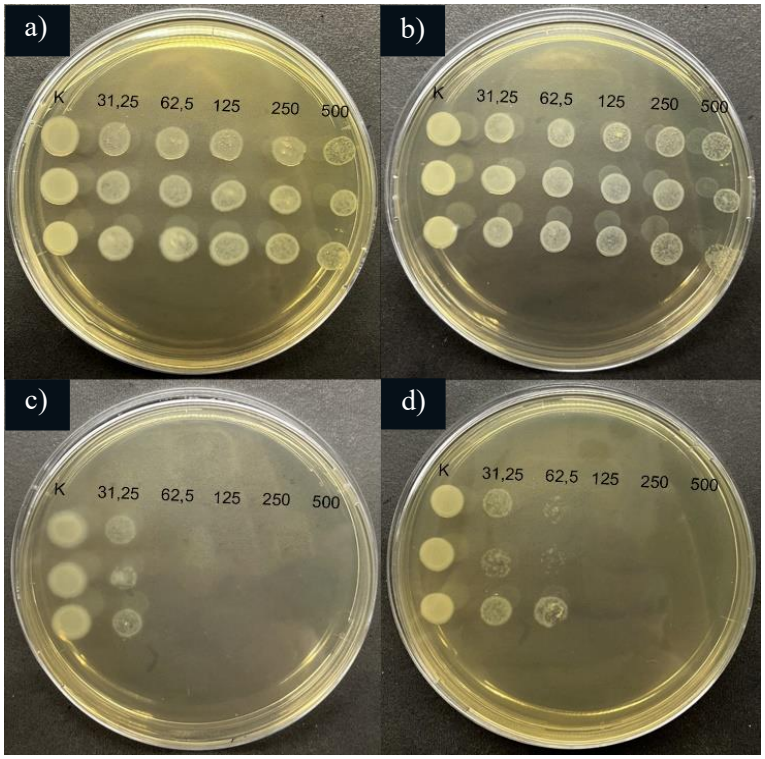
S. pyogenes MBK tyrimo rezultatai po 4 val. inkubacijos su abiem lantano junginiais taip pat neparodė augimą slopinančio poveikio (4.1.2 pav. a ir b). Tačiau po 24 val. inkubacijos su lantano nitratu bei lantano nitrato heksahidratu buvo nustatytos MBK. Lantano nitrato MBK ≤ 25 mg/mL (4.1.2 pav. c), o lantano nitrato heksahidrato ≤ 105 mg/mL (4.1.2 pav. d).



4.1.2 pav. *S. pyogenes* minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas. Pirmoji eilutė (K) vaizduoja kontrolinius mėginius, o skaičiais nurodomos koncentracijos mg/mL. a) *S. pyogenes* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitratu po 4 val. inkubacijos b) *S. pyogenes* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitrato heksahidratu po 4 val. inkubacijos c) *S. pyogenes* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitratu po 24 val. inkubacijos d) *S. pyogenes* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitrato heksahidratu po 24 val. inkubacijos

Gramneigiama bakterija *P. aeruginosa* pasižymėjo didžiausiu jautrumu lantano junginiams. Po 4 val. inkubacijos su lantano nitratu arba lantano nitrato heksahidratu užfiksuotas augimo slopinimas esant 500 µg/mL junginių koncentracijai (4.1.3 pav. a ir b). Pilnai augimo inhibicijai po 24 val. inkubacijos buvo reikalinga ≤ 65 µg/mL (4.1.3 pav. c) lantano nitrato ir ≤ 125 µg/mL (4.1.3 pav. d) lantano nitrato heksahidrato koncentracijos.

Gramteigiamų bakterijų pilnam augimo slopinimui reikalingos koncentracijos buvo bent 384 kartus didesnės nei gramneigiamos bakterijos. Šie skirtumai galėjo atsirasti dėl skirtumų ląstelės sienelėje. Gramneigiamos bakterijos turi citoplazminę membraną, ploną peptidoglikano sluoksnį bei iš lipopolisacharidų (LPS) sudarytą išorinę membraną, o gramteigiamoms bakterijoms būdinga citoplazminė membrana ir storas peptidoglikano sluoksnis (Silhavy et al., 2010). Pagal Liu et al (2008) iškeltą teoriją, jog lantano nitratas veikia sienelės struktūrą – pakeičia, t.y., padidina ląstelės membranos pralaidumą, galima iškelti teoriją, kad storesnis peptidoglikano sluoksnis labiau padeda apsisaugoti nuo lantano nitrato daromo neigiamo poveikio bakterinės ląstelės gyvybingumui nei dvi gramneigiamą bakterinę ląstelę gaubiančios membranos (Liu et al., 2008).



4.1.3 pav. *P. aeruginosa* minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas. Pirmoji eilutė (K) vaizduoja kontrolinius mėginius, o skaičiais nurodomos koncentracijos µg/mL. a) *P. aeruginosa* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitratu po 4 val. inkubacijos b) *P. aeruginosa* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitrato heksahidratu po 4 val. inkubacijos c) *P. aeruginosa* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitratu po 24 val. inkubacijos d) *P. aeruginosa* MBK tyrimo rezultatai su lantano nitrato heksahidratu po 24 val. inkubacijos

Tyrimų, kuriuose būtų atliktas lantano nitrato minimalios bakteriocidinės koncentracijos nustatymas prieš šiame tyrime naudotas bakterijų rūšis, mokslinėje literatūroje nėra. 2019 metais atlikto tyrimo rezultatai rodo, jog 3 mg/mL lantano nitrato injekcija pelėms, prieš gramneigiamos bakterijos – *S. flexneri* 2a infekciją, sumažino bakterijos išgyvenamumą pelėje 90% (Vedenkin et al., 2019). Kitų mokslininkų atliktame tyrime gramneigiamos bakterijos *E. coli* B pilnai inhibicijai buvo reikalinga net 300 mg/mL lantano nitrato koncentracija (Liu et al., 2008). Tuo tarpu šiame tyrime naudotos gramneigiamos bakterijos *P. aeruginosa* bakteriocidinė lantano nitrato koncentracija siekė vos 65 µg/mL. Tokie rezultatai rodo didelį *P. aeruginosa* jautrumą lantano nitratui. Tyrimų, kuriuose būtų tirtas lantano nitrato poveikis prieš gramteigiamas bakterijas, publikuotų rezultatų nėra. Išsamios mokslinės literatūros analizės metu nebuvo rasta tyrimų, kuriuose anksčiau būtų tirtas tiesioginis lantano nitrato heksahidrato antimikrobinis poveikis prieš bakterijas, todėl galima teigti, kad šis tyrimas yra pirmasis.

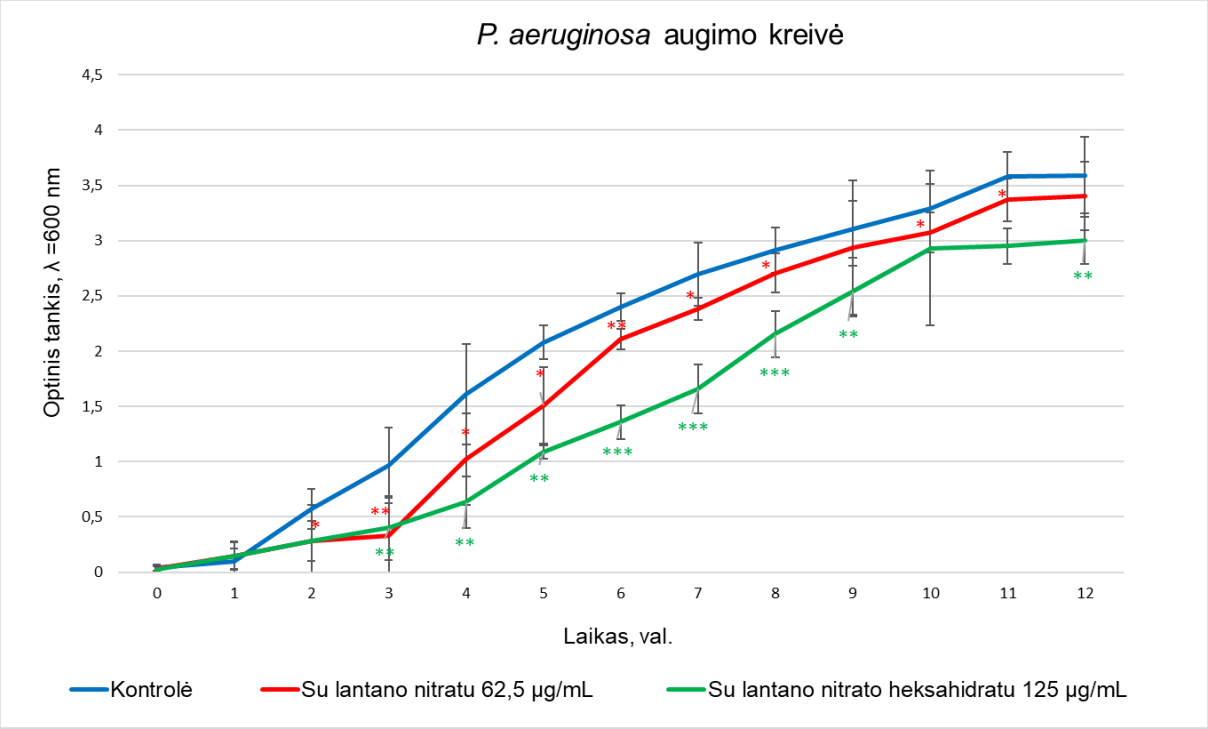
Siekiant atlikti gautų gramteigiamų bakterijų MBK palyginimą su anksčiau aprašytais mokslinėje literatūroje, atlikta literatūros apie antibiotikų minimalias bakteriocidines koncentracijas prieš *S. aureus*

ir *S. pyogenes* analizė. Morrissey ir kitų (2019) mokslinio tyrimo rezultatai rodo, jog siekiant sumažinti *S. aureus* augimą 90%, reikalinga 0,25 mg/L (0,00025 mg/mL) antibiotiko ozenoksacino koncentracija. Tuo tarpu *S. pyogenes* rodo dar didesnį jautrumą ozenoksacinui – MIK90 siekia vos 0,03 mg/L (0,00003 mg/mL) (Morrissey et al., 2019). Lyginant literatūroje aprašytas *S. aureus* ir *S. pyogenes* augimą slopinančias koncentracijas su šiame darbe gautomis MBK, kurios svyruoja nuo 45 mg/mL iki 110 mg/mL, galima daryti išvadą, jog darbe naudotos bakterijų rūšys yra mažiau jautrios lantano junginiams nei antibiotikui ozenoksacinui.

4.2 Lantano junginių daromo poveikio bakterijų augimui vertinimas laike

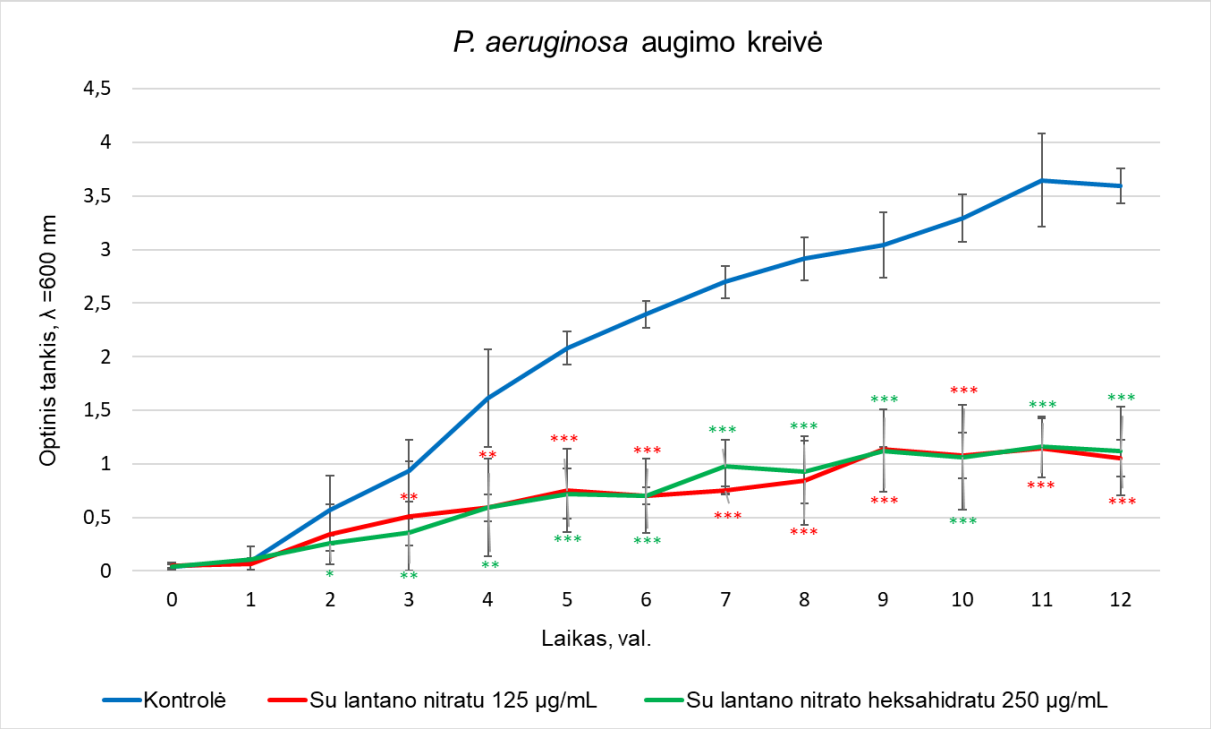
Siekiant nustatyti lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato daromo poveikio pasirinktoms bakterijų rūšims dinamiką, buvo atliktas augimo kreivių nustatymo tyrimas. Norima nustatyti, kurią augimo valandą antimikrobinių savybių turintys junginiai pradeda daryti statistiškai reikšmingą poveikį bakterijų augimui ir kaip tai lemia tolimesnį mikroorganizmų augimą. Remiantis nustatytomis MBK, lyginamas bakterijų augimo modelis su ir be veikliosios medžiagos. Kiekvienos bakterijų rūšies augimo kreivė matuojama tol, kol kontroliniame mėginyje pasiekiama stacionari augimo fazė.

P. aeruginosa augimo kreivės sudarymui pasitelktas optinio tankio, esant 600 nm bangos ilgiui, matavimas kas valandą. Gautas augimo grafikas vaizduojamas 4.2.1 paveiksle. Statistiškai reikšmingas 62,5 µg/mL lantano nitrato slopinimas *P. aeruginosa* augimui pasireiškia antrą augimo valandą. Reikšmingas 125 µg/mL lantano nitrato heksahidrato slopinamasis poveikis stebimas trečią bakterijos augimo valandą. 4.2.1 paveiksle vaizduojamos augimo kreivės atspindi 62,5 µg/mL lantano nitrato ir 125 µg/mL lantano nitrato heksahidrato bakteriostatinį poveikį *P. aeruginosa* augimui. Tokį poveikį patvirtina matomas reikšmingas *P. aeruginosa* augimo slopinimas, lyginant su kontroline grupe, tačiau vis tiek fiksuojamas bakterijų skaičiaus augimas (Rudilla et al., 2018). Nors tyrime buvo naudotos nustatytos MBK, bakteriocidinis lantano junginių poveikis bakterijai augant LB terpėje nebuvo užfiksuotas. Kitų mokslininkų atliktų tyrimų rezultatai rodo, jog skirtingos mitybinės terpės gali daryti įtaką MIK, todėl atitinkamai ir MBK, pokyčiui. Didesnis maistinių medžiagų kiekis terpėje lemia tiesiškai didėjančią MIK (Štumpf et al., 2023). Šio tyrimo atveju MBK nustatymo metu buvo naudotas D-sorbitolis, o augimo kreivių metodo metu – maisto medžiagomis praturtinta mitybinė LB terpė. Tokie pokyčiai galėjo lemti tai, jog nebuvo užfiksuotas bakteriocidinis lantano junginių poveikis *P. aeuginosa* augimui.



4.2.1 pav. *P. aeruginosa* augimo grafikas, remiantis optinio tankio matavimu. Mėlyna spalva – kontrolė *P. aeruginosa* LB terpėje, raudona – *P. aeruginosa* LB terpėje su 62,5 µg/mL lantano nitrato, žalia – *P. aeruginosa* LB terpėje su 125 µg/mL lantano nitrato heksahidrato. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Raudonos žvaigždutės nurodo p vertes, lyginant kontrolę su lantano nitratu veiktomis ląstelėmis, o žalios – kontrolę su lantano nitrato heksahidratu.

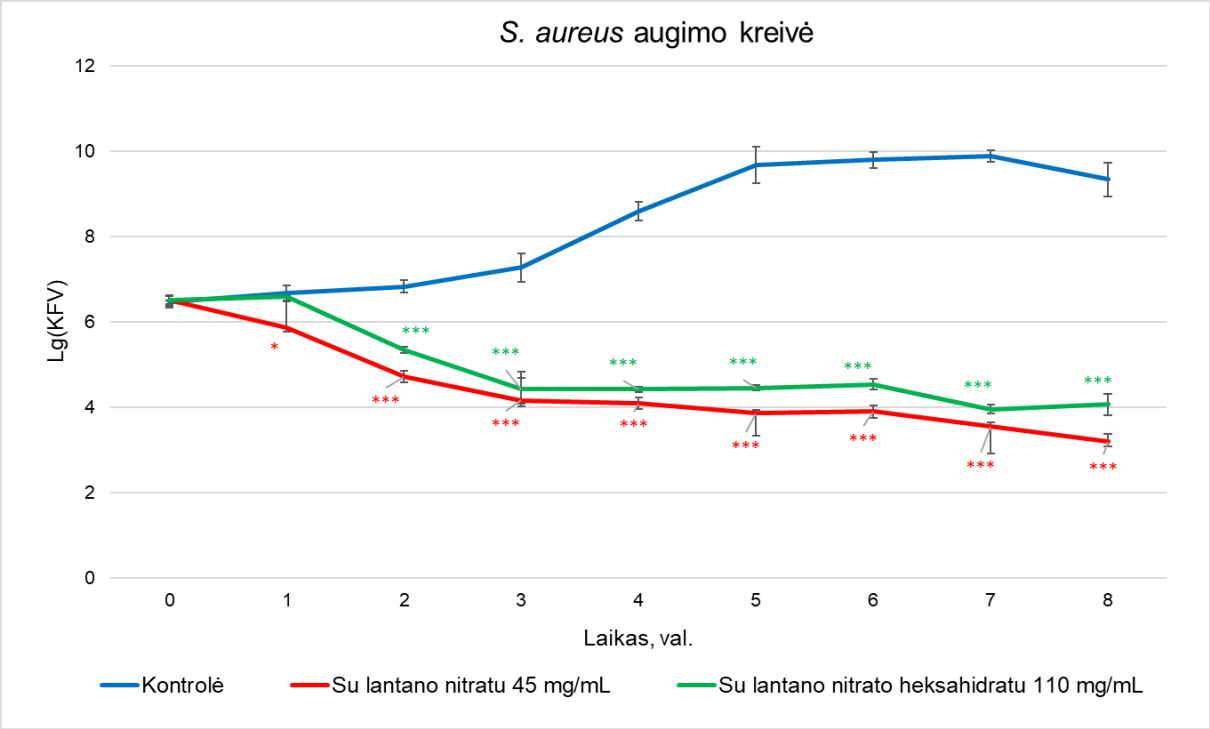
Siekiant patikrinti šią teoriją, atliktas optinio tankio matavimas su dvigubai didesnėmis koncentracijomis nei buvo nustatytos minimalios bakteriocidinės koncentracijos tyrimo metu. 4.2.2 pav. matoma, jog bakteriją veikiant 250 µg/mL lantano nitrato heksahidrato, statistiškai reikšmingas slopinimas pasireiškia jau po pirmų dviejų valandų augimo. *P. aeruginosa* veikiant 125 µg/mL lantano nitrato, statistiškai reikšmingas slopinimas pasireiškia po 3 valandų. Iš grafiko galima matyti, jog esant abiejų lantano junginių poveikiui, *P. aeuginosa* augimas sustabdomas maždaug ties 9 augimo valanda. Spektofotometras remiasi šviesos adsorbcija, todėl prietaisas neleidžia įvertinti bakterijų gyvybingumo, matavimo metu yra fiksuojamos tiek gyvos, tiek negyvos ląsteles, taip pat ir jų nuolaužos (Costa et al., 2021). Galima interpretuoti, jog 4.2.2 pav. yra stebimas numanomas lantano junginių bakteriocidinis poveikis.



4.2.2 pav. *P. aeruginosa* augimo grafikas, remiantis optinio tankio matavimu. Mėlyna spalva – kontrolė *P. aeruginosa* LB terpėje, raudona – *P. aeruginosa* LB terpėje su 125 µg/mL lantano nitrato, žalia – *P. aeruginosa* LB terpėje su 250 µg/mL lantano nitrato heksahidrato. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Raudonos žvaigždutės nurodo p vertes lyginant kontrolę su lantano nitratu veiktomis ląstelėmis, o žalios – kontrolę su lantano nitrato heksahidratu.

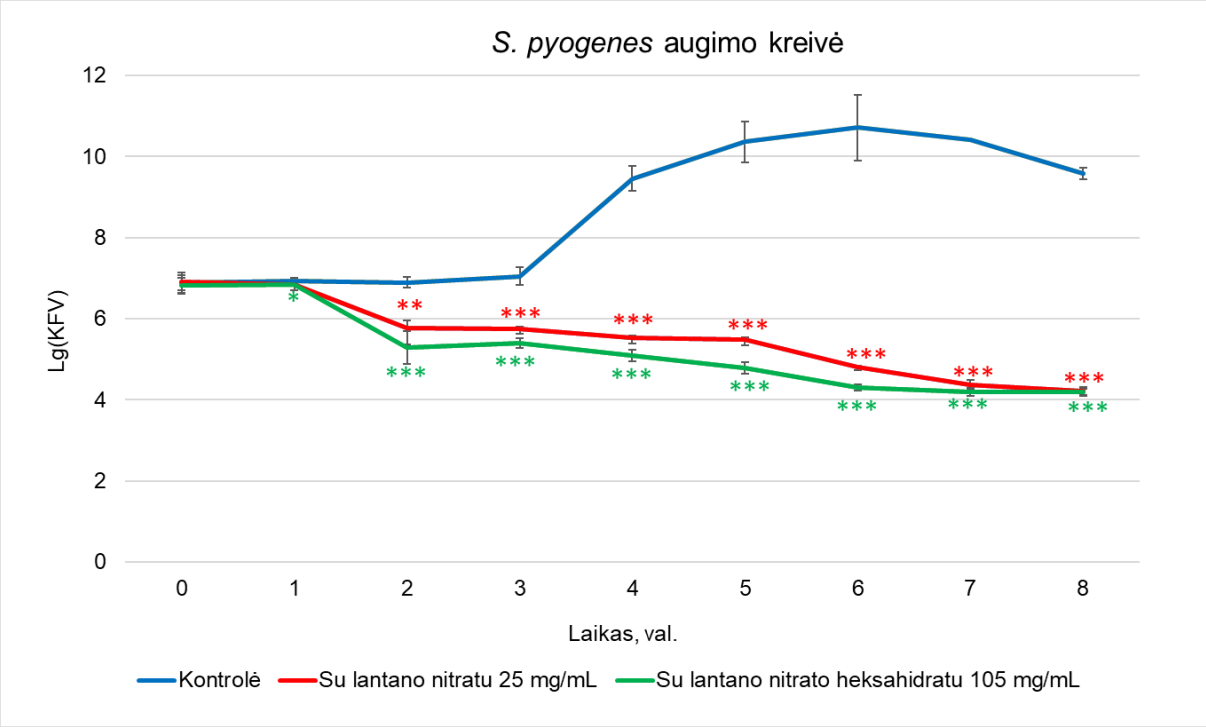
Optinio tankio matavimas nebuvo pasitelktas *S. aureus* ir *S. pyogenes* augimo kreivės sudarymui, nes nustatytos MBK buvo didesnės nei *P. aeruginosa* atveju, kas sumažino abiejų tyrime naudotų junginių tirpumą LB terpėje. Sumažėjęs tirpumas lemia netolygią šviesos absorbciją, todėl iškreipia optinio tankio rezultatus (Gore, 2000).

S. aureus augimo kreivės sudarymui buvo atliekamas išsėjimo metodas, kuomet bakterijos auginamos mažame tūryje, esant veikliosios medžiagos poveikiui. Kas valandą atliekami išsėjimai ant agarizuotos terpės ir kolonijas formuojančių vienetų skaičiavimas. Gauti rezultatai vaizduojami 4.2.3 paveiksle. Statistiškai reikšmingas 45 mg/mL lantano nitrato slopinimas pasireiškia po 1 valandos augimo, o 110 mg/mL lantano nitrato heksahidrato – po 2 valandų. Per 8 augimo valandas kontrolinis mėginys pasiekia žūties fazę, o antimikrobinėmis medžiagomis veikiamų gyvybingų bakterijų skaičius mažėja – matomas bakteriocidinis poveikis, tačiau nepasiekia pilno nužudymo.



4.2.3 pav. *S. aureus* augimo grafikas, sudarytas remiantis $\log_{10}$(KFV). Mėlyna linija yra kontrolė – *S. aureus* augimas LB terpėje, raudona linija – *S. aureus* augimas LB terpėje su 125 µL/mL lantano nitrato, žalia linija – *S. aureus* augimas LB terpėje su 110 mg/mL lantano nitrato heksahidrato. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Raudonos žvaigždutės nurodo p vertes lyginant kontrolę su lantano nitratu veiktomis ląstelėmis, o žalios – kontrolę su lantano nitrato heksahidratu.

S. pyogenes augimo kreivė sudaryta tuo pačiu metodu kaip ir *S. aureus*. Lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato poveikis *S. pyogenes* augimui atsispindi 4.2.4 paveiksle. Jau pirmą augimo valandą pasireiškia statistiškai reikšmingas 25 mg/mL lantano nitrato poveikis, o 105 mg/mL lantano nitrato heksahidrato – antrąją augimo valandą. Gyvybingų bakterinių ląstelių skaičiaus mažėjimas rodo bakteriocidinį lantano junginių poveikį, tačiau per 8 matavimo valandas nepasiekiamas visiškas *S. pyogenes* nužudymas.



4.2.4 pav. *S. pyogenes* augimo grafikas, sudarytas remiantis $\log_{10}$(KFV). Mėlyna linija – kontrolė – *S. pyogenes* augimas LB terpėje, raudona linija – *S. pyogenes* augimas LB terpėje su 25 mg/mL lantano nitrato, žalia linija – *S. pyogenes* augimas LB terpėje su 105 mg/mL lantano nitrato heksahidrato. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Raudonos žvaigždutės nurodo p vertes lyginant kontrolę su lantano nitratu veiktomis ląstelėmis, o žalios – kontrolę su lantano nitrato heksahidratu.

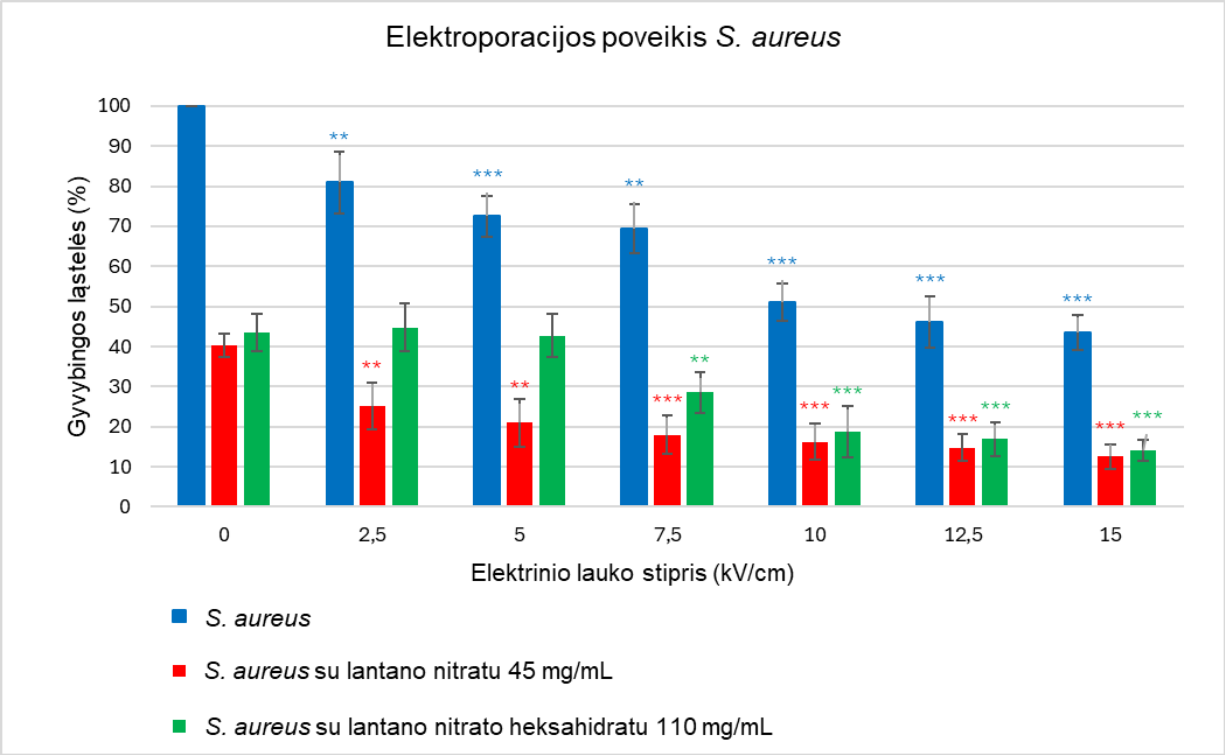
Atliktų tyrimų rezultatai rodo, jog antimikrobinis lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato poveikis prieš *S. aureus*, *S. pyogenes* ir *P. aeruginosa* pasireiškia per pirmas augimo valandas. Kontroliniams mėginiams pasiekus stacionarę faze, bakteriocidinis antimikrobinių junginių poveikis nepasireiškia, tačiau yra fiksuojamas itin stiprus ir statistiškai reikšmingas augimo slopinimas. Mokslinėje literatūroje tyrimų, kuriuose būtų atliktas panašus dinaminio lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato poveikio tyrimas, nebuvo rasta.

4.2 Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių poveikio įvertinimas

Atliktas sinergistinio elektroporacijos ir lantano nitrato bei lantano nitrato heksahidrato poveikio tyrimas, siekiant nustatyti, ar elektroporacija turi įtakos lantano junginių antimikrobiniam poveikiui. Tyrimas atliktas su gautomis lantano junginių MBK. Rezultatai pateikiami apskaičiavus išgyvenusių ląstelių kiekį procentais, lyginant su kontroliniu mėginiu.

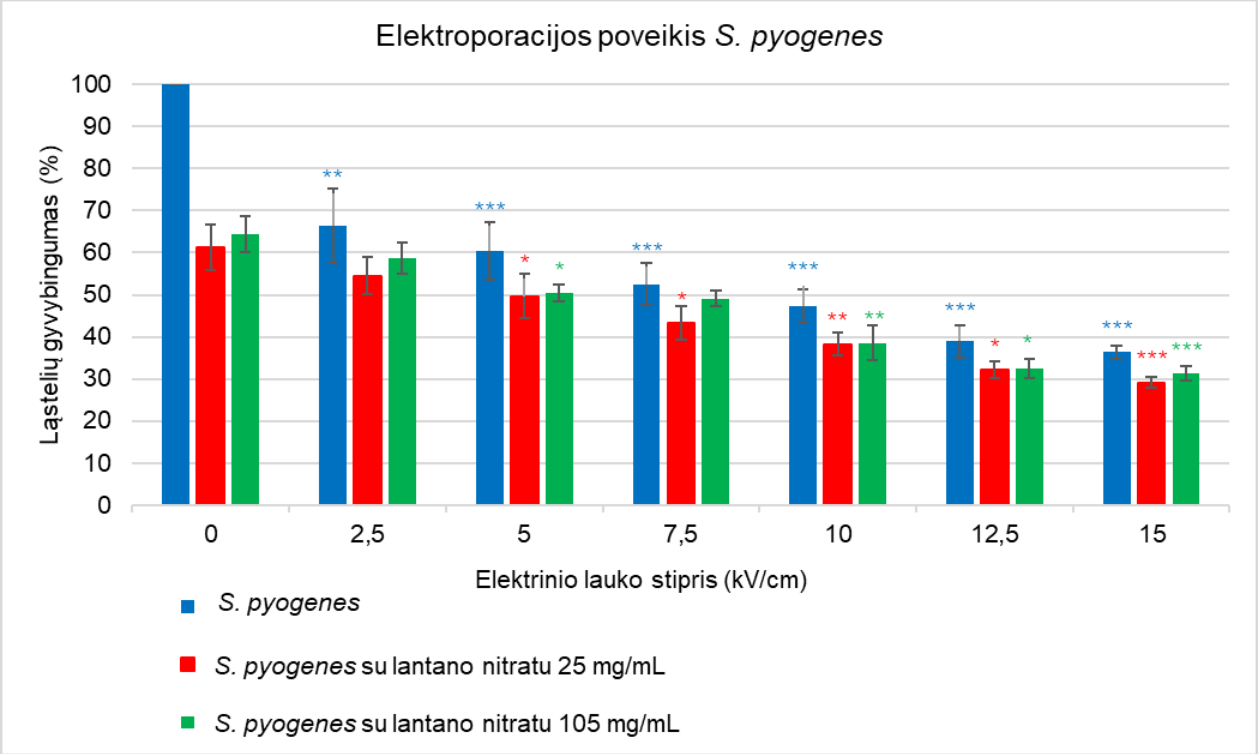
Elektroporacijos bei lantano junginių poveikis *S. aureus* ląstelių gyvybingumui vaizduojamas 4.2.1 paveiksle. 4.2.1 paveiksle galima matyti, jog didėjant įtampai gyvybingų *S. aureus* ląstelių kiekis mažėja. *S. aureus* statistiškai reikšmingas sinergistinis lantano nitrato ir elektroporacijos poveikis

pasireiškia iškart – esant 2,5 kV/cm įtampai. Su lantano nitrato heksahidratu statistiškai reikšmingas pokytis atsiranda tik su 7,5 kV/cm įtampa. Didžiausias poveikis matomas esant 15 kV/cm įtampai ir lantano junginių poveikiui: su 45 mg/mL lantano nitratu gyvybingų ląstelių skaičius sumažėja (87,86 ± 2,94) %, o su 110 mg/mL lantano nitrato heksahidratu – (85,96 ± 2,64) %.



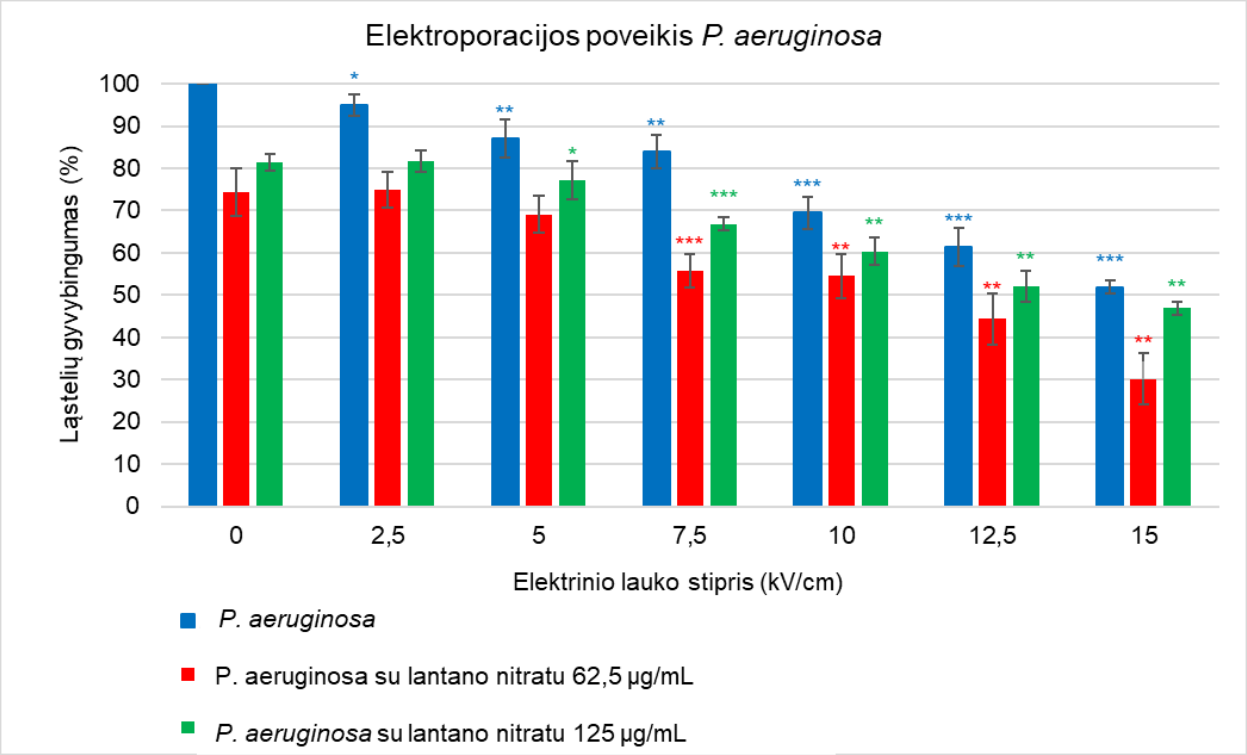
4.2.1 pav. Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių: lantano nitrato bei lantano nitrato heksahidrato poveikis *S. aureus*. Kontrolė – lantano junginiais ir elektroporacija neveiktos *S. aureus* ląstelės. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Žalios žvaigždutės nurodo p reikšmes lyginant elektroporacija ir lantano nitratu veiktas ląsteles su tik elektroporacija bei tik su lantano junginiais veiktomis ląstelėmis. Mėlynos žvaigždutės nurodo p reikšmes lyginant kontrolę su elektroporacija veiktomis ląstelėmis. Raudonos žvaigždutės rodo p reikšmes lyginant elektroporacija ir lantano nitrato heksahidratu veiktas ląsteles su tik elektroporacija bei tik su lantano nitrato heksahidratu veiktomis ląstelėmis.

S. pyogenes atveju taip pat pastebimas gyvybingų ląstelių skaičiaus mažėjimas, didėjant elektrinio lauko stipriui (4.2.2 pav). Statistiškai reikšmingas elektroporacijos ir lantano nitrato heksahidrato poveikis pasireiškia esant 5 kV/cm įtampai. Su lantano nitratu statistiškai reikšmingas sinergistinis poveikis su elektroporacija fiksuojamas irgi esant 5 kV/cm įtampai. Taip pat pastebima tendencija, jog didėjant įtampai, mažėja gyvybingų ląstelių skaičius. Didžiausias gyvybingų ląstelių sumažėjimas stebimas esant 15 kV/cm įtampai: su 25 mg/mL lantano nitratu (70,83 ± 1,37) %, o su 105 mg/mL lantano nitrato heksahidratu (68,67 ± 1,61) %.



4.2.2 pav. Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių: lantano nitrato bei lantano nitrato heksahidrato poveikis *S. pyogenes*. Kontrolė – lantano junginiais ir elektroporacija neveiktos *S. pyogenes* ląstelės. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Žalios žvaigždutės nurodo p reikšmes lyginant elektroporacija ir lantano nitratu veiktas ląsteles su tik elektroporacija bei tik su lantano junginiais veiktomis ląstelėmis. Mėlynos žvaigždutės nurodo p reikšmes lyginant kontrolę su elektroporacija veiktomis ląstelėmis. Raudonos žvaigždutės rodo p reikšmes lyginant elektroporacija ir lantano nitrato heksahidratu veiktas ląsteles su tik elektroporacija bei tik su lantano nitrato heksahidratu veiktomis ląstelėmis.

Tyrimo su *P. aeruginosa* metu neužfiksuojamas toks didelis gyvybingų ląstelių skaičiaus sumažėjimas, ląsteles veikiant tik įtampa (4.2.3 pav.). Statistiškai reikšmingas gyvybingų ląstelių skaičiaus sumažėjimas su lantano nitrato heksahidratu stebimas esant 5 kV/cm, o su lantano nitratu – esant 7,5 kV/cm elektrinio lauko stipriui. Su *P. aeruginosa* stipriausias slopinimas, kitaip nei su *S. aureus* ar *S. pyogenes*, fiksuojamas esant 7,5 kV/cm: su 62,5 µg/mL lantano nitratu gyvybingų ląstelių skaičius sumažėja (44,19 ± 4,00) %, o su 125 µg/mL lantano nitrato heksahidratu (33,14 ± 1,47) %.



4.2.3 pav. Sinergistinio elektroporacijos ir lantano junginių: lantano nitrato bei lantano nitrato heksahidrato poveikis *P. aeruginosa*. Kontrolė – lantano junginiais ir elektroporacija neveiktos *P. aeruginosa* ląstelės. p reikšmės *<0,05; **<0,05; ***<0,005. Žalios žvaigždutės nurodo p reikšmes lyginant elektroporacija ir lantano nitratu veiktas ląsteles su tik elektroporacija bei tik su lantano junginiais veiktomis ląstelėmis. Mėlynos žvaigždutės nurodo p reikšmes lyginant kontrolę su elektroporacija veiktomis ląstelėmis. Raudonos žvaigždutės rodo p reikšmes lyginant elektroporacija ir lantano nitrato heksahidratu veiktas ląsteles su tik elektroporacija bei tik su lantano nitrato heksahidratu veiktomis ląstelėmis.

Bendrai didžiausias elektroporacijos poveikis bakterinių ląstelių gyvybingumui užfiksuotas su gramteigiamomis bakterijomis: *S. aureus* ir *S. pyogenes*. Gramneigiamoms bakterijoms priskiriama *P. aeruginosa* pasižymėjo mažesniu jautrumu elektrinio lauko poveikiui. Visų bakterijų atveju didžiausias ląstelių gyvybingumo sumažinimas stebimas esant 15 kV/cm įtampai bei lantano nitratui. Kadangi bakterines ląsteles veikiant elektroporacijos ir vieno iš lantano junginių deriniu buvo pastebėtas didesnis ląstelių gyvybingumo sumažėjimas nei veikiant kiekvienu veiksniu atskirai, galima teigti, jog elektroporacija ir lantano junginiai veikia sinergistiškai prieš bakterijų ląsteles. Stipriausias sinergistinis lantano junginių bei elektroporacijos poveikis su *S. aureus* ir *S. pyogenes* stebimas esant 15 kV/cm, o su *P. aeruginosa* – esant 7,5 kV/cm įtampai.

Kitų mokslininkų atliktų darbų rezultatai taip pat patvirtina, jog trumpų elektros impulsų panaudojimas gali sustiprinti antibiotikų antimikrobinį poveikį prieš bakterijas (Chittams-Miles et al., n.d.). Tokio sinergistinio poveikio atsiradimas ne tik efektyviai sumažina bakterinių ląstelių

gyvybingumą, bet ir gali sumažinti reikalingą minimalią antibakterinio junginio bakteriocidinę koncentraciją. Atliktame elektroporacijos tyrime naudoti elektrinio lauko stipriai, svyruojantys nuo 2,5 kV/cm iki 15 kV/cm, yra didesni nei įprastai sutinkami tradiciniuose žaizdų gijimo tyrimuose (Kloth, 2014). Kitų mokslininkų atliktame tyrime naudojant 500 V įtampą ir 3 Hz dažnį ne tik buvo pasiekta efektyvi *P. aeruginosa* dezinfekcija, bet ir sumažinti uždegiminiai požymiai žaizduose (Wu et al., 2021). Tokie rezultatai rodo galimą platesnį antibakterinio lantano junginių bei elektroporacijos derinio poveikį. Siekiant praktiškai pritaikyti šio darbo metu gautus rezultatus, reikalingi tolimesni lantano junginių toksiškumo bei didesnės elektros įtampos poveikio žmogui tyrimai.

IŠVADOS

1. Nustatytos lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato minimalios bacteriocidinės koncentracijos (MBK) atitinkamai lygios: *S. aureus:* 45 mg/mL ir 110 mg/mL, *S. pyogenes*: 25 mg/mL ir 105 mg/mL bei *P. aeruginosa:* 62,5 µg/mL ir 125 µg/mL.
2. Odos patogenines bakterijas: *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* veikiant lantano nitratu arba lantano nitrato heksahidratu, užfiksuotas augimo dinamikos pokytis.
    a. Lantano nitrato sukelta reikšminga augimo inhibicija stebima po 1 val. prieš *S. aureus*, po 2 val. prieš *S. pyogenes* ir po 3 val. prieš *P. aeuginosa* nuo bakterijų augimo pradžios.
    b. Lantano nitrato heksahidrato sukelta reikšminga augimo inhibicija stebima po 1 val. prieš *S. pyogenes*, po 2 val. prieš *S. aureus* bei *P. aeruginosa* nuo bakterijų augimo pradžios.
3. Stipriausias sinergistinis lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato bei elektroporacijos poveikis su *S. aureus* ir *S. pyogenes* nustatytas esant 15 kV/cm, o su *P. aeruginosa* esant 7,5 kV/cm įtampai.

SANTRAUKA

Ieva Petkevičiūtė

Priešmikrobinis lantano junginių poveikis odos patogenams

Žmogaus oda – tai didžiausias organas ir pirminis apsaugos barjeras, kuris padeda apsaugoti organizmą nuo išorinių veiksnių. Su efektyvios apsauginės funkcijos atlikimu tiesiogiai susiję ir odą kolonizavę mikroorganizmai – mikrobiota. Dėl įvairių priežasčių atsiradusi odą kolonizavusių mikroorganizmų disbiozė bei patogeninių mikroorganizmų įsikūrimas daro neigiamą įtaką odos būklei. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* bei *Streptococcus pyogenes* – su daugybe odos ligų siejami patogenai. Jų patogeniškumas kelia naštą ne tik atskiriems individams, bet ir sveikatos priežiūros sistemoms. Didelis sukeliamų infekcinių odos ligų skaičius bei vis didėjantis šių bakterijų atsparumas antibiotikams tampa dideliu iššūkiu šių dienų pasaulyje. Siekiant užtikrinti efektyvią patogenų kontrolę, alternatyvių priešmikrobinių medžiagų paieška tampa vis svarbesnė. Alternatyvūs gydymo metodai, įskaitant metalų nanodaleles ar kompleksinius junginius, tampa puikiu pasirinkimu, siekiant kovoti su atsparumą įgijusiais bakterijų kamienais. Lantano nitratas ir lantano nitrato heksahidratas – tai druskos, kurių teigiami antimikrobinio potencialo tyrimai prieš patogenines bakterijas vis dažniau sutinkami mokslinėje literatūroje.

Baigiamojo darbo metu atlikti lantano nitrato bei lantano nitrato heksahidrato potencialaus antimikrobinio poveikio tyrimai. Po 24 valandų inkubacijos nustatytos abiejų lantano junginių minimalios bakteriocidinės koncentracijos prieš tris odos patogenines bakterijas: *S. aureus*, *S. pyogenes* bei *P. aeruginosa*. Minimalios bakteriocidinės koncentracijos svyruoja nuo 62,5 µg/mL iki 110 mg/mL, priklausomai nuo mikroorganizmo ir naudoto junginio. Tolimesnių tyrimų metu tirtas lantano junginių poveikis bakterijų augimo dinamikai. Pastebėta, jog statistiškai reikšmingas slopinamasis junginių poveikis fiksuojamas jau pirmomis augimo valandomis. Siekiant įvertinti platesnį lantano junginių panaudojimo potencialą, atliktas sinergistinio elektroporacijos bei lantano nitrato ir lantano nitrato heksahidrato poveikio tyrimas. Nustatyta, jog elektroporacijos bei lantano junginių panaudojimas turi sinergistinį poveikį prieš visas tyrimo metu tirtas patogenines bakterijas.

SUMMARY

Ieva Petkevičiūtė

Antimicrobial effect of lanthanum compounds on skin pathogens

Human skin is the largest organ and primary protective barrier that helps protect the body from external factors. The microorganisms colonizing the skin – the microbiota – are directly related to the performance of an effective protective function. Dysbiosis of the microorganisms colonizing the skin occurs due to various reasons and, along with the establishment of pathogenic microorganisms, negatively impacts the skin's conditions. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* are pathogens associated with many skin diseases. Their pathogenicity imposes a burden not only on individuals but also on healthcare systems. The high number of infectious skin diseases caused and the increasing resistance of these bacteria to antibiotics present a severe challenge in today's world. In order to ensure effective control of pathogens, the search for alternative antimicrobial agents is becoming increasingly important. Alternative treatment methods, including metal nanoparticles or complex compounds, are becoming an excellent option to combat resistant bacterial strains. Lanthanum nitrate and lanthanum nitrate hexahydrate are salts whose positive antimicrobial potential studies against pathogenic bacteria are increasingly found in scientific literature.

During the final work, studies of the potential antimicrobial effect of lanthanum nitrate and lanthanum nitrate hexahydrate were carried out. After 24 hours of incubation, the minimum bactericidal concentrations of both lanthanum compounds were determined against three skin pathogenic bacteria: *S. aureus*, *S. pyogenes* and *P. aeruginosa*. Minimum bactericidal concentrations range from 62.5 µg/mL to 110 mg/mL, depending on the microorganism and compound used. During further studies, the effect of lanthanum compounds on the dynamics of bacterial growth was investigated. A statistically significant inhibitory effect of the compounds was recorded already in the first hours of growth. In order to evaluate the wider potential of using lanthanum compounds, a study of the synergistic effect of electroporation and lanthanum nitrate and lanthanum nitrate hexahydrate was carried out. It was established that electroporation and the use of lanthanum compounds have a synergistic effect against all the pathogenic bacteria studied in the research.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Allen, H.K., Trachsel, J., Looft, T., Casey, T.A., 2014. Finding alternatives to antibiotics. Annals of the New York Academy of Sciences 1323, 91–100. https://doi.org/10.1111/nyas.12468
2. Aminov, R.I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Front Microbiol 1, 134. https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134
3. Arslan, H., Duran, N., Borekci, G., Ozer, C.K., Akbay, C., 2009. Antimicrobial Activity of Some Thiourea Derivatives and Their Nickel and Copper Complexes. Molecules 14, 519. https://doi.org/10.3390/molecules14010519
4. Bay, L., Ring, H.C., 2022. Human skin microbiota in health and disease. APMIS 130, 706–718. https://doi.org/10.1111/apm.13201
5. Bryant, A.E., Stevens, D.L., 2015. 199 - Streptococcus pyogenes, in: Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition). W.B. Saunders, Philadelphia, 2285-2299.e4. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00199-5
6. Byrd, A.L., Belkaid, Y., Segre, J.A., 2018. The human skin microbiome. Nat Rev Microbiol 16, 143–155. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157
7. Chahine, E.B., Dougherty, J.A., Thornby, K.-A., Guirguis, E.H., 2022. Antibiotic Approvals in the Last Decade: Are We Keeping Up With Resistance? Ann Pharmacother 56, 441–462. https://doi.org/10.1177/10600280211031390
8. Chiller, K., Selkin, B.A., Murakawa, G.J., 2001. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 6, 170–174. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x
9. Chittams-Miles, A.E., Malik, A., Purcell, E.B., Muratori, C., n.d. Nanosecond pulsed electric fields increase antibiotic susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microbiol Spectr 12, e02992-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.02992-23
10. Coerdt, K.M., Khachemoune, A., 2021. Vibrio vulnificus: Review of Mild to Life-threatening Skin Infections. Cutis 107. https://doi.org/10.12788/cutis.0183
11. Cogen, A.L., Nizet, V., Gallo, R.L., 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? Br J Dermatol 158, 442–455. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x
12. Costa, P., Gomes, A.T.P.C., Braz, M., Pereira, C., Almeida, A., 2021. Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor Escherichia coli and Salmonella Typhimurium Inactivation Mediated by Phages. Antibiotics 10, 974. https://doi.org/10.3390/antibiotics10080974
13. Davies, J., 2006. Where have All the Antibiotics Gone? Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology 17, 287–290. https://doi.org/10.1155/2006/707296
14. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D.A., 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. Nature 449, 811–818. https://doi.org/10.1038/nature06245

15. Evans, C.A., Stevens, R.J., 1976. Differential quantitation of surface and subsurface bacteria of normal skin by the combined use of the cotton swab and the scrub methods. J Clin Microbiol 3, 576–581. https://doi.org/10.1128/jcm.3.6.576-581.1976

16. Findley, K., Grice, E.A., 2014. The Skin Microbiome: A Focus on Pathogens and Their Association with Skin Disease. PLoS Pathog 10, e1004436. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004436

17. Gallo, R.L., 2017. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. J Invest Dermatol 137, 1213–1214. https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045

18. Gao, S., Huang, M., Sun, Z., Li, D., Xie, C., Feng, L., Liu, S., Zheng, K., Pang, Q., 2021. A new mixed-ligand lanthanum(III) complex with salicylic acid and 1,10-phenanthroline: Synthesis, characterization, antibacterial activity, and underlying mechanism. Journal of Molecular Structure 1225, 129096. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129096

19. Garcia, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J.-C., Si-Tahar, M., Bernard, F.-X., Bodet, C., 2018. Pseudomonas aeruginosa flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. Virulence 9, 1163–1175. https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1480830

20. International Eczema Council., 2022. Global Report on Atopic Dermatitis 2022. Prieiga per internetą: https://www.eczemacouncil.org/assets/docs/global-report-on-atopic-dermatitis-2022.pdf [žiūrėta 2023-04-12].

21. Gore, M.G., 2000. Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach. Oxford University Press.

22. Grice, E.A., Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol 9, 244–253. https://doi.org/10.1038/nrmicro2537

23. Han, G., Jing, H., Zhang, W., Zhang, N., Li, Z., Zhang, G., Gao, S., Ning, J., Li, G., 2022. Effects of lanthanum nitrate on behavioral disorder, neuronal damage and gene expression in different developmental stages of *Caenorhabditis elegans*. Toxicology 465, 153012. https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.153012

24. Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y., 2010. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. Nature 465, 346–349. https://doi.org/10.1038/nature09074

25. Kloth, L.C., 2014. Electrical Stimulation Technologies for Wound Healing. Advances in Wound Care 3, 81–90. https://doi.org/10.1089/wound.2013.0459

26. Kong, H.H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E.A., Beatson, M.A., Nomicos, E., Polley, E.C., Komarow, H.D., Murray, P.R., Turner, M.L., Segre, J.A., 2012. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. Genome Res 22, 850–859. https://doi.org/10.1101/gr.131029.111

27. Kong, H.H., Segre, J.A., 2012. Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. Journal of Investigative Dermatology 132, 933–939. https://doi.org/10.1038/jid.2011.417

28. Lacey, J.A., Marcato, A.J., Chisholm, R.H., Campbell, P.T., Zachreson, C., Price, D.J., James, T.B., Morris, J.M., Gorrie, C.L., McDonald, M.I., Bowen, A.C., Giffard, P.M., Holt, D.C., Currie, B.J., Carapetis, J.R., Andrews, R.M., Davies, M.R., Geard, N., McVernon, J., Tong,

S.Y.C., 2023. Evaluating the role of asymptomatic throat carriage of Streptococcus pyogenes in impetigo transmission in remote Aboriginal communities in Northern Territory, Australia: a retrospective genomic analysis. The Lancet Microbe 4, e524–e533. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00068-X

29. Liu, G., Ran, Z., Wang, H., Liu, Y., Shen, P., Lu, Y., 2008. Study on eruption of heat for Escherichia coli B aroused by lanthanum nitrate and its mechanism. Front. Chem. China 3, 70–75. https://doi.org/10.1007/s11458-008-0010-7

30. Meade, E., Slattery, M.A., Garvey, M., 2020. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? Antibiotics (Basel) 9, 32. https://doi.org/10.3390/antibiotics9010032

31. Medici, S., Peana, M., Crisponi, G., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Remelli, M., Zoroddu, M.A., 2016. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. Coordination Chemistry Reviews, A Special Issue in Honor of Professor Henryk Kozlowski 327–328, 349–359. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.05.015

32. Mena, K.D., Gerba, C.P., 2009. Risk Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Water, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer US, Boston, MA, 71–115. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3

33. Meng-meng T., Jian-hong G.E., Kai-xin C. a. O., Ze-kang L.I., Xiao-yun W., Qianqian X., Jian-jun J., Xue-tao W.E.I., 2020. Effects of lanthanum nitrate on immune function and cell pathology in adult female mice. jeom 37, 447–452. https://doi.org/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19739

34. Migliorati, V., Gibiino, A., Lapi, A., Busato, M., D'Angelo, P., 2021. On the Coordination Chemistry of the lanthanum(III) Nitrate Salt in EAN/MeOH Mixtures. Inorg. Chem. 60, 10674–10685. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01375

35. Moellering, R.C., 2011. Discovering new antimicrobial agents. International Journal of Antimicrobial Agents 37, 2–9. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.08.018

36. Mok, D.Z.L., Sternberg, P.W., Inoue, T., 2015. Morphologically defined sub-stages of C. elegans vulval development in the fourth larval stage. BMC Developmental Biology 15, 26. https://doi.org/10.1186/s12861-015-0076-7

37. Morrissey, I., Cantón, R., Vila, J., Gargallo-Viola, D., Zsolt, I., Garcia-Castillo, M., López, Y., 2019. Microbiological profile of ozenoxacin. Future Microbiology 14, 773–787. https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0089

38. Qianqian, X., Qingyun, L.I.U., Chenping, K., Qinghe, M., Jianjun, J., Xiaohua, Y., Lanqin, S., Weidong, H. a. O., 2023. Toxicological experiments-based evaluation on mutagenicity and teratogenicity of lanthanum nitrate. zgggws 39, 1304–1310. https://doi.org/10.11847/zgggws1140660

39. Reuter-Rice, Bolick, B., 2011. Pediatric Acute Care. Jones & Bartlett Publishers.

40. Reynolds, D., Kollef, M., 2021. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. Drugs 81, 2117–2131. https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6

41. Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Capita, R., 2022. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of Listeria monocytogenes. Biology 11, 46. https://doi.org/10.3390/biology11010046

42. Rudilla, H., Merlos, A., Sans, E., Fusté, E., Sierra, J., Zalacain-Vicuña, A., Vinuesa, T., Vinas, M., 2018. New and old tools to evaluate new antimicrobial peptides. AIMS Journal 4, 522.

43. Ruocco, E., Donnarumma, G., Baroni, A., Tufano, M.A., 2007. Bacterial and Viral Skin Diseases. Dermatologic Clinics, Cutaneous Receptors: Clinical Implications and Therapeutic Relevance 25, 663–676. https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.008

44. Senthilkumar, G., Sakthivelu, A., Abdur Rahman, M., Parameswari, P., 2023. Enhancement of antibacterial and anticancer properties lanthanum insight into zinc oxide nanoparticles prepared via coprecipitation process. Inorganic Chemistry Communications 155, 111081. https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111081

45. Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M., El-Raheem, W.M.A., Hanafy, E.A., 2022. Biological activities and antioxidant potential of different biosynthesized nanoparticles of Moringa oleifera. Sci Rep 12, 18400. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23164-2

46. Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414

47. Spernovasilis, N., Psichogiou, M., Poulakou, G., 2021. Skin manifestations of Pseudomonas aeruginosa infections. Current Opinion in Infectious Diseases 34, 72. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000717

48. Štumpf, S., Hostnik, G., Langerholc, T., Pintarič, M., Kolenc, Z., Bren, U., 2023. The Influence of Chestnut Extract and Its Components on Antibacterial Activity against Staphylococcus aureus. Plants 12, 2043. https://doi.org/10.3390/plants12102043

49. Swaney, M.H., Kalan, L.R., 2021. Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms. Infect Immun 89, e00695-20. https://doi.org/10.1128/IAI.00695-20

50. Tuazon, C.U., 1984. Skin and skin structure infections in the patient at risk: Carrier state of staphylococcus aureus. The American Journal of Medicine, Impact of the Patient at Risk on Current and Future Antimicrobial Therapy 76, 166–171. https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90260-2

51. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The Human Microbiome Project. Nature 449, 804–810. https://doi.org/10.1038/nature06244

52. Vedenkin, A.S., Vtyurina, D.N., Grigorieva, E.A., Litvin, A.A., Mikhaleva, M.G., Nikolaeva, T.N., Pronin, A.V., Stovbun, S.V., 2019. Protective Properties of Lanthanum Nitrate against Pathogens with Various Morphological and Functional Properties. Bull Exp Biol Med 167, 50–52. https://doi.org/10.1007/s10517-019-04458-4

53. Walker, M.J., Barnett, T.C., McArthur, J.D., Cole, J.N., Gillen, C.M., Henningham, A., Sriprakash, K.S., Sanderson-Smith, M.L., Nizet, V., 2014. Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A Streptococcus. Clinical Microbiology Reviews 27, 264–301. https://doi.org/10.1128/cmr.00101-13

54. Wong, F., Zheng, E.J., Valeri, J.A., Donghia, N.M., Anahtar, M.N., Omori, S., Li, A., Cubillos-Ruiz, A., Krishnan, A., Jin, W., Manson, A.L., Friedrichs, J., Helbig, R., Hajian, B., Fiejtek, D.K., Wagner, F.F., Soutter, H.H., Earl, A.M., Stokes, J.M., Renner, L.D., Collins, J.J., 2024. Discovery of a structural class of antibiotics with explainable deep learning. Nature 626, 177–185. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06887-8

55. Wu, D.C., Chan, W.W., Metelitsa, A.I., Fiorillo, L., Lin, A.N., 2011. Pseudomonas Skin Infection. Am J Clin Dermatol 12, 157–169. https://doi.org/10.2165/11539770-000000000-00000

56. Wu, M., Rubin, A.E., Dai, T., Schloss, R., Usta, O.B., Golberg, A., Yarmush, M., 2021. High-Voltage, Pulsed Electric Fields Eliminate Pseudomonas aeruginosa Stable Infection in a Mouse Burn Model. Adv Wound Care (New Rochelle) 10, 477–489. https://doi.org/10.1089/wound.2019.1147

57. Yang, H., Zhang, X., Liu, H., Cui, W., Zhang, Q., Li, Y., Yu, Z., Jia, X., 2016. Lanthanum nitrate genotoxicity evaluation: Ames test, mouse micronucleus assay, and chromosome aberration test. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 810, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.09.008