

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Biofizikos studijų programos II kurso magistrantė

Justina VAITIEKUTĖ

Magistrinis darbas

**Membranas laidinančių medžiagų ir daugiavaisčio
atsparumo siurblių slopiklių poveikis bakterijų sąveikai su
TPP⁺ jonais**

Darbo vadovas:

Prof. Rimantas Daugelavičius

Vilnius 2008

**Membranas laidinančių medžiagų ir daugiavaisčio
atsparumo siurblių slopiklių poveikis bakterijų sąveikai su
TPP⁺ jonais**

DARBAS ATLIKTAS

Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje, Membranų biochemijos
laboratorijoje

Justina VAITIEKUTĖ

Darbo vadovas:

Prof. R. DAUGELAVIČIUS

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1 Bakterijų apvalkalėlis.....	6
1.1.1 Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlis	6
1.1.2 Gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėlis	7
1.1.3 Mikobakterijų apvalkalėlis.....	8
1.2 Bakterijų atsparumas antibiotikams.....	10
1.2.1 Gramneigiamųjų ir gramteigiamųjų bakterijų atsparumas antibiotikams.....	10
1.2.2 Mikobakterijų atsparumas antibiotikams.....	12
1.3 Antibiotikus išstumiantys siurbliai	13
1.3.1 ABC didšeimė.....	14
1.3.2 MF šeima	15
1.3.3 SMR šeima.....	16
1.3.4 RND šeima.....	16
1.3.5 MATE šeima.....	16
1.4 Antimikrobiniai peptidai.....	17
1.4.1 Peptidas pVEC.....	18
1.4.2 Polimiksinas B	19
1.5 Išmetimo siurblių slopikliai	20
1.5.1 Chlorpromazinas	21
1.5.2 Rezerpinas.....	22
2 MEDŽIAGOS IR METODAI.....	24
2.1 Reagentai ir mikroorganizmai.....	24
2.2 Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas.....	25
2.3 Darbo metodai.....	26
2.3.1 <i>E. coli</i> ląstelių auginimas	26
2.3.2 Ląstelių suspensijos ruošimas	26
2.3.3 Ląstelių dorojimas EDTA	27
2.3.4 <i>B. subtilis</i> bakterijų auginimas.....	27
2.3.5 Ląstelių suspensijos ruošimas	27
2.3.6 <i>M. smegmatis</i> bakterijų auginimas.....	27

2.3.7 Ląstelių suspensijos ruošimas	28
2.3.8 Potenciometriniai matavimai	28
2.3.9 Minimalios slopinančiosios koncentracijos nustatymas mikroskiedimų metodu.....	28
3 REZULTATAI.....	29
3.1 Peptidų poveikis gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėliui.....	29
3.2 Peptido pVEC poveikis gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėliui.....	33
3.3 Peptido pVEC poveikis mikobakterijų apvalkalėliui.....	34
3.4 Polimiksino B įtaka <i>M. smegmatis</i> ląstelėms	38
3.5 Slopiklių sąveika su <i>M. smegmatis</i> DVA siurbliais	40
3.5.1 Chlorpromazino sąveika su <i>M. smegmatis</i> ląstelių apvalkalėliu	40
3.5.2 Chlorpromazino poveikis <i>M. smegmatis</i> ląstelių jautrumui ampicilinui	42
3.5.3 Rezerpino sąveika su <i>M. smegmatis</i> ląstelių apvalkalėliui	43
3.5.4 Naujai susintetintų mikobakterijų siurblių slopiklių poveikis <i>M. smegmatis</i> ląstelėms	44
IŠVADOS	45
SANTRAUKA	46
SUMMARY	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS	48
PRIEDAS	54

SANTRUMPOS

CPZ	- chlorpromazinas
DVA	- daugiavaistis atsparumas
DMSO	- dimetilsulfoksidas
EDTA	- etilendiamintetracto rūgštis
GD	- gramicidinas D
IM	- išorinė membrana
LB	- Liuria-Bertani terpė
LPS	- lipopolisacharidai
LPP	- į ląsteles prasiskverbiantys peptidai
LS	- ląstelės sienelė
MIC	- mažiausia inhibuojanti koncentracija
PCB ⁻	- fenildikarbaundekaborano anijonas
PG	- peptidoglikanas
PM	- plazminė membrana
PMB	- polimiksinas B
RES	- rezerpinas
SGDP	- šeimininko gynybos sistemoje dalyvaujantys peptidai
TPP ⁺	- tetrafenilfosfonio katijonas
Tris	- tris(hidroksimetil)aminometanas

ĮVADAS

Šiuolaikinėje medicinoje rimta problema – bakterinės infekcijos, kurių sukėlėjai yra atsparūs vaistams. Atliekama daug tyrimų siekiant išsiaiškinti bakterijų atsparumo vaistams mechanizmus ir priežastis. Ieškant efektyvių gydymo būdų, bandoma ieškoti antibiotikų analogų ir modifikuotų darinių, kurie pasižymėtų mažu giminingumu daugiavaisčio atsparumo (DVA) siurbliams, bei kuriamos medžiagos, slopinančios DVA siurblių veiklą.

Tiriant bakterijų DVA, yra labai svarbu atrasti greitus ir efektyvius metodus DVA siurblių aktyvumui nustatyti bei jų efektyvumui klinikiniuose kamieniuose įvertinti. Šiems tikslams pasiekti yra naudojama keletas metodų, matuojant ir stebint fluorescencinių medžiagų (etidžio, akriflavino, pirofino Y ir kt.) arba kitų žymeklių (antibiotikų, tetrafenilfosfonio (TPP⁺) jonų) srautus tarp ląstelės ir matavimo terpės.

Lipofiliniai katijonai, tokie kaip TPP⁺ jonai, yra vieni iš populiariausių junginių membranos įtampos ($\Delta\psi$) bakterijose vertinimui. TPP⁺ jonai lengvai prasiskverbia pro ląstelių membranų hidrofobinį sluoksnį ir greitai pasiskirsto tarp citoplazmos ir ląstelės supančios terpės pagal elektrinio potencialo skirtumą. Tačiau yra žinoma, jog TPP⁺ jonų susikaupimas ląstelių citozolyje priklauso ne tik nuo elektrinio potencialo, bet ir nuo plazminėje membranoje (PM) esančių siurblių veiklos, išstumiančių šį katijoną atgal į inkubavimo terpę (Midgley, 1986). Be to, gramneigiamųjų bakterijų atveju šių katijonų kaupimasis ląstelėse gali atspindėti ląstelių išorinės membranos (IM) laidumo pokyčius (Daugelavičius ir kt., 1997).

Taigi, TPP⁺ jonai yra universalus net kelių bakterijų apvalkalėlio parametrų indikatorius, naudingas vertinant įvairių junginių, pvz., antibiotikų, DVA siurblių slopiklių, sąveiką su ląstelių apvalkalėliu, jų poveikį PM įtampai ar DVA siurblių veiklai.

Šio darbo tikslas buvo ištirti antimikrobinių medžiagų ir daugiavaisčio atsparumo siurblių slopiklių poveikį bakterijų sąveikai su TPP⁺ jonais. Šiam tikslui pasiekti reikėjo:

1. Ištirti į ląsteles prasiskverbiančių peptidų įtaką gramteigiamųjų ir gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlių laidumui;
2. Įvertinti TPP⁺ jonų sąveiką su *M. smegmatis* bakterijomis ir įvertinti membranas laidinančių junginių įtaką šiai sąveikai;
3. Ištirti DVA siurblių slopiklių įtaką TPP⁺ jonų pasiskirstymui tarp *M. smegmatis* ląstelių ir jas supančios terpės.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Bakterijų apvalkalėlis

Nepaisant to, kad bakterijos yra primityvūs organizmai, jos turi gerai išvystytą ląstelės sienelę, kuri yra atsakinga už daugelį organizmo išlikimui svarbių funkcijų. Daugelis ląstelės sienelės savybių yra būdingos tik bakterijoms, jų neturi nei eukariotinės ląstelės, nei archėjos.

Viena iš bakterinės sienelės sudedamųjų dalių yra peptidoglikano (PG) sluoksnis, kuris yra randamas iš karto už PM. PG lemia ląstelės formą ir yra atsakingas už ląstelės formos tvirtumo palaikymą. Jis yra laidus mažoms molekulėms, todėl nėra atsakingas už pralaidumo barjero palaikymą. Barjerinę funkciją ląstelės apvalkalėlyje atlieka tiek ląstelių PM, tiek ir IM gramneigiamųjų ir mikobakterijų atveju.

Lipidinėje terpėje netirpių medžiagų pernaša pro bakterijų IM vyksta per vandeniui užpildytus baltymus – porinus. O pro ląstelių PM medžiagų pernaša gali būti pasyvi, pagal koncentracijos gradientą (difuzija ir palengvintoji pernaša), ir aktyvi, prieš koncentracijos gradientą, panaudojant universalius energijos šaltinius arba jonų gradientą, bei endocitozė ir egzocitozė. Visi membraniniai baltymai, lemiantys jos laidumą, skirstomi į tris klases: siurbliai, jonų, antibiotikų ir kitų medžiagų pernašai prieš koncentracijos gradientą panaudojantys ATP energiją; nešikliai, vykstantys pernašą pagal koncentracijos gradientą, ir kanalai – jonams atrankios poros membranoje. Šios pernašos sistemos užtikrina ląstelės homeostazės palaikymą, sukuria joninius gradientus bei šalina kenksmingas medžiagas.

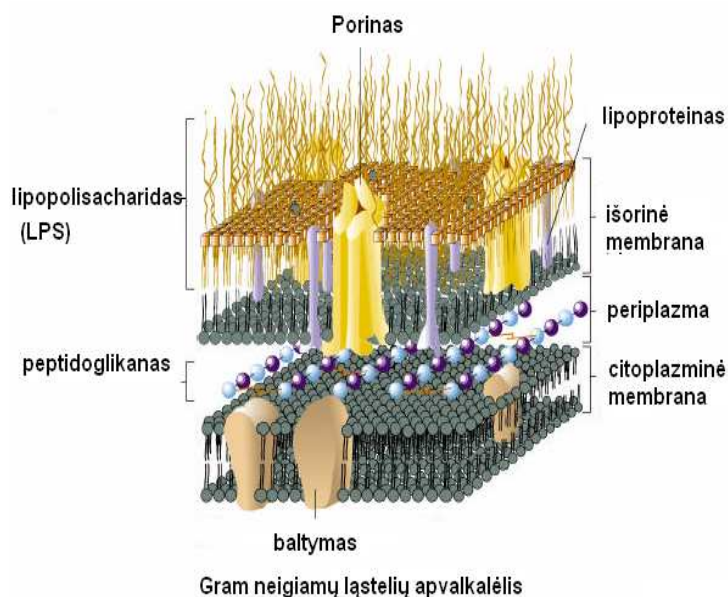
1.1.1 Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlis

Gramneigiamųjų bakterijų ląstelės apvalkalėlį sudaro dvi membranos (1.1 pav.): vidinė- PM ir IM. Tarp šių membranų yra periplazminė ertmė, kurioje išsidėstęs dažniausiai vienas peptidoglikano sluoksnis.

PM iš abiejų pusių yra sudaryta iš fosfolipidų sluoksnio su įsiterpusiais periferiniais ir integraliaisiais baltymais. Ji formuoja barjerą tarp PM ir periplazmos. IM sudaro barjerą, kuris daro ląstelę atsparią detergentams ir antibiotikams. IM yra asimetrinė: iš vidinės pusės sudaryta iš fosfolipidų, fosfatidiletanolaminų ir lipoproteinų, kurie jungia IM su periplazma (Marvin ir kt., 1989), o išorėje ją sudaro lipopolisacharidai (LPS). LPS sudaryti iš trijų dalių:

lipido A, šerdies ir O-polisacharido. Būtent LPS atpalaiduoti iš membranos ir patekę į organizmo aplinką aktyvuoja imuninės sistemos reakcijas (Doerrler, 2006).

Gramneigiamųjų bakterijų IM pasižymi tuo, kad yra stipriai anijoninė, todėl linkusi prisijungti aplinkoje esančius katijonus. Manoma, kad IM barjerines savybes lemia divalenčių metalų jonai - Mg^{2+} ir Ca^{2+} , kuriuos pašalinus iš ląstelės aplinkos, LPS vientisumas yra suardomas ir nuo IM gali atsiskirti LPS bei membraniniai baltymai. Dėl šių IM struktūros pokyčių pasikeičia bakterijų sienelės laidumas (Beverige ir Koval, 1981).

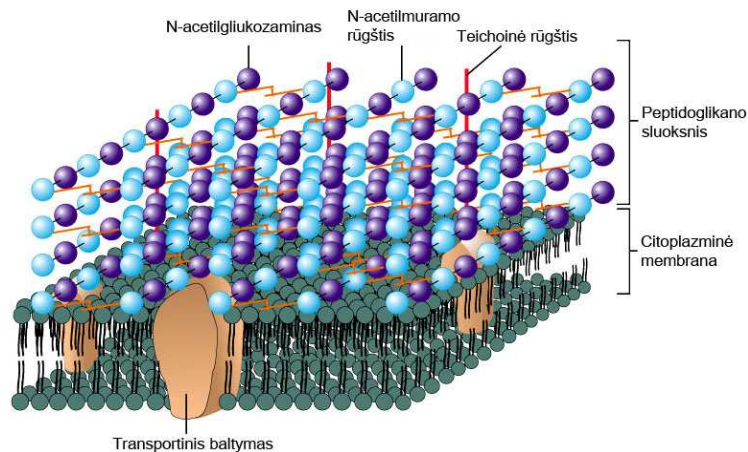


1.1 pav. Gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėlis.

Į IM yra įsiterpę membraniniai baltymai, kurie skirstomi į tris grupes: stambieji pagrindiniai baltymai (Ia, Ib, TolG ir lipoproteinus), kurie perveria membraną arba jungia ją su PG sluoksniu, smulkius minorinius baltymus (Beverige ir Koval, 1981) ir porinai (OmpA, OmpC, OmpF, PhoE) (Nikaido, 2003). Visų šių baltymų kiekis membranoje priklauso nuo bakterijų augimo sąlygų: temperatūros, terpės sudėties ar pH.

1.1.2 Gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėlis

Gramteigiamųjų bakterijų sienelė yra sudaryta iš PM ir storo, daugiasluoksnio PG sluoksnio, kuriame įsitvirtinę baltymai, teichoinės ir lipoteichoinės rūgštys bei polisacharidai (1.2 pav.).



1.2 pav. Gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėlis.

PG formuoja trijų dimensijų tinklą, kuris supa ląstelę ir lemia jos struktūrinį integralumą, reikalingą ląstelės išgyvenimui. Tinklo tvirtumas yra nulemtas pakaitomis einančių disacharidų polimerų - N-acetilmuramo (MurNAc) ir N-acetilgliukozamino (GlcNAc) liekanų. Dėl šios priežasties visas bakterijos paviršius yra padengtas viena kovalentiškai uždara molekule.

Be peptidoglikano ląstelės sienelę sudaro ir antriniai ląstelės sienelės polimerai – teichoinės rūgštys ir lipoteichoinės rūgštys. Teichoinės rūgštys yra kovalentiškai prijungtos prie PG sluoksnio ir lemia ląstelės sienelės neigiamą krūvį, o lipoteichoinės rūgštys yra atsakingos už PG susijungimą su ląstelės PM.

Gramteigiamųjų bakterijų vienintelį pralaidumo barjerą sudaro iš fosfolipidų sudaryta ląstelės PM su joje įsiterpusiais baltymais, kurie ir lemia jos atrankumą.

1.1.3 Mikobakterijų apvalkalėlis

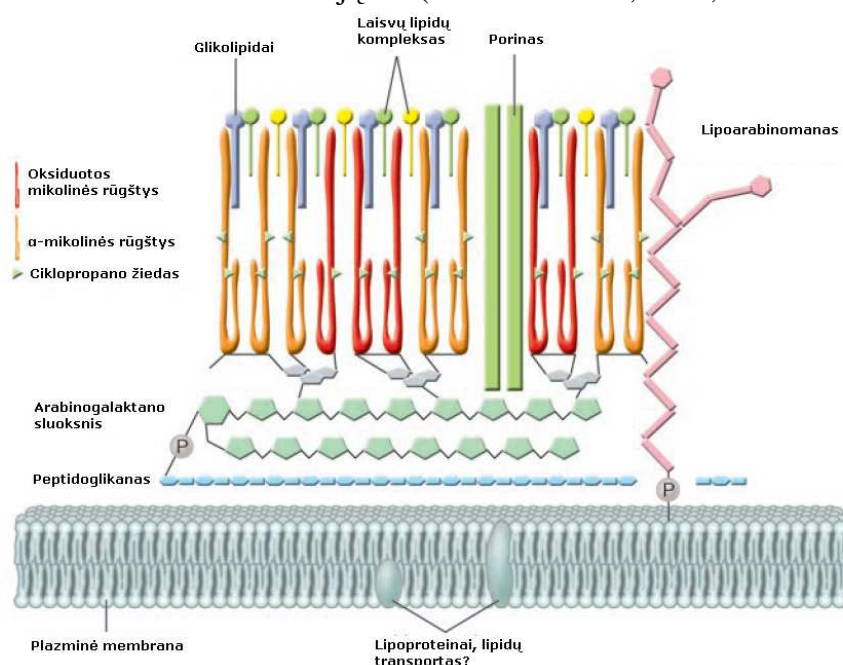
Mikobakterijos, nors ir priklauso gramteigiamųjų bakterijų klasei, tačiau savo apvalkalėlio struktūra yra labiau panašios į gramneigiamąsias bakterijas. Jos pasižymi ypatinga ląstelės sienelės struktūra, kurią sudaro išorinis ir vidinis sienelės sluoksniai, esantys virš ląstelės PM (1.3 pav.) (Brennan, 2003).

Struktūros, sudarančios ląstelės sienelę, lemia mikobakterijų fenotipą, kolonijų morfologiją, biofilų formavimąsi, atsparumą antibiotikams ir virulentiškumą (Chen ir kt., 2006). Ląstelės sienelė sudaro ypatingai efektyvų pralaidumo barjerą daugeliui kenksmingų medžiagų ir iš dalies lemia vidinį ląstelės atsparumą daugeliui vaistų.

Pirmasis mikobakterijų ląstelės sienelės struktūros modelis buvo pasiūlytas Minnikin (1982). Nuo to laiko iki šiandien mikobakterijų ląstelės sienelės struktūra yra mokslininkų tyrimų objektas, kadangi yra žinoma, jog biologinis sienelės komponentų

aktyvumas reikšmingai veikia ligos procesą, o lipidai, izoliuoti iš ląstelės apvalkalėlio, gali sukelti imuninės sistemos atsakus labai panašius į tuos, kuriuos sukelia *M. tuberculosis* infekcija (Karakousis ir kt., 2004).

Ląstelės apvalkalėlis yra sudarytas iš tipinės PM, kurią supa ląstelės sienelės sluoksnis su kapsule, būdinga patogininėms mikobakterijų rūšims. Sienelė sudaryta iš vieno peptidoglikano sluoksnio kovalentiškai susijungusio su arabinogalaktanų sluoksniu. Prie arabinogalaktanų sluoksnio yra kovalentiškai prisijungusios mikolinės rūgštys - ilgos grandinės riebalų rūgštys (jas sudaro iki 90 anglies atomų), taip pat įvairūs lipidai ir poras formuojantys baltymai (Niederweis, 2003). Ląstelė sienelė yra neįprasta tuo, jog yra turtinga lipidų, kurie sudaro iki 60% ląstelės sienelės svorio (įskaitant mikolines rūgštis). Šie lipidai sudaro sluoksnį, panašų į gramneigiamųjų bakterijų IM, o tai nėra būdinga gramteigiamosioms bakterijoms, todėl šis sluoksnis vadinamas mikobakterijų IM (Hoffmann ir kt., 2008; Zuber ir kt., 2008).



1.3 pav. Mikobakterijų apvalkalėlio struktūra.

Taigi ląstelės sienelę sudaro išorinis lipidų bisluoksnis: vidinis lapelis sudarytas daugiausia iš mikolinių rūgščių, kurios statmenos PM ir bent dalinai kovalentine jungtimi prisijungusios prie arabinogalaktano sluoksnio; išorinis lapelis, yra manoma, sudarytas iš įvairių glikolipidų, fosfolipidų ir rūšiai būdingų lipidų, tokių kaip glikopeptidolipidų, sulfolipidų ir kt. (Liu ir kt., 1996), kurie gali veikti kaip antigenai arba būti toksiški. Kadangi kai kurie IM lipidai yra hidrofobiniai, ląstelės skystoje terpėje yra linkusios agreguoti.

1.2 Bakterijų atsparumas antibiotikams

Bakterijų DVA yra susijęs su keletu mechanizmų: vaisto inaktyvavimu arba modifikavimu ląstelės fermentais, vaisto taikinio pakeitimu, sumažėjusiu vaisto susikaupimu ląstelėje dėka ląstelės sienelės laidumo sumažėjimo arba vaistų išstūmimo siurblių veiklos (Li ir Nikaido, 2004, Nelson 2002). Bakterinis atsparumas gali būti vidinis ląstelės bruožas (natūralus) arba gali būti atsitiktinių mutacijų arba egzogeninių atsparumo genų veiklos rezultatas. Jeigu bakterija pasižymi vidiniu vaistų atsparumu, tai visi tos rūšies organizmai pasižymės atsparumu tiems antibiotikams, nedalyvaujant jokiems egzogeniniams faktoriams. Pavyzdžiui, visos mikoplazmos yra atsparios β -laktamams, kadangi jų sienelėje nėra PG sluoksnio, kaip ir daugelis enterobakterijų rūšių yra mažai jautrios hidrofobiniams vaistams, tokiems kaip makrolidai, kadangi jie sunkiai prasiskverbia pro bakterijų IM.

Anksčiau buvo manoma, kad vidinis bakterijų atsparumas vaistams yra susijęs su vaisto taikinio nebuvimu arba mažu ląstelės sienelės laidumu tam vaistui. Šiuo metu atsiranda vis daugiau įrodymų, kad tai daugiausiai susiję su esamų arba indukuojamų išmetimo siurblių veikla (Nikaido 2001).

Antibiotikai savo ruožtu gali indukuoti arba reguliuoti išmetimo siurblių ekspresiją, veikiant genų transkripcijos reguliavimo sistemas. Taip pat galima ir siurblių peregspresavimo strategija, kurią lemia reguliavimo sistemos genų mutacijos: tai gali lemti tiek vidinį, tiek natūralų bakterijų atsparumą.

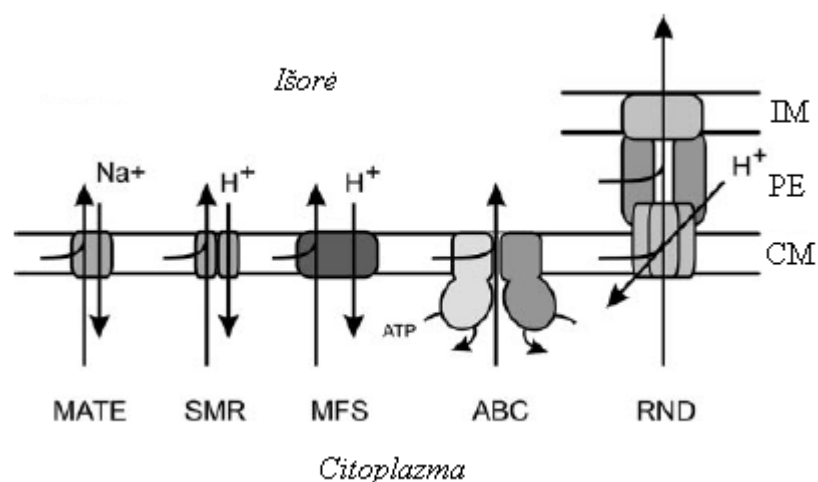
Nuo tada, kai pirmą kartą buvo parodyta, kad vaistų atsparumas bakterijose yra susijęs su pompų veikla, buvo aptikta daugybė patogeninių bakterijų kamienų, kurie išvystė DVA fenotipus. Tokiose bakterijose kai kurie siurbliai atlieka tam tikrų pavienių antibiotikų išmetimą, tačiau didžioji dalis yra polispecifiniai ir išstumia didelį spektrą struktūriškai negiminingų antibiotikų. Dėl šios priežasties bakterijos išvengia antibiotikų terapinio poveikio ir verčia mokslininkus ieškoti naujų šioms pompoms neatpažįstamų arba jų veiklą slopinančių medžiagų.

1.2.1 Gramneigiamųjų ir grameigiamųjų bakterijų atsparumas antibiotikams

Gramneigiamosios bakterijos yra labiau atsparios detergentams, antibiotikams, dažams ar chemoterapiniams vaistams nei grameigiamosios bakterijos. Jų didesnę atsparumą sąlygoja IM, kurios grameigiamosios bakterijos neturi. Tačiau vien tuo paaiškinti gramneigiamųjų ląstelių atsparumo vaistams negalima, greičiausiai šiuose procesuose

dalyvauja ir plataus specifiškumo DVA siurbliai, kurie yra randami ir bakterijų PM. Kaip vienas iš tokių geriausiai žinomų siurblių plazmidėse koduojamas TetA siurblys *E. coli* bakterijose, užtikrinantis tetraciklino išstūmimą iš ląstelės (Guay ir kt., 1994), tokio siurblio atitikmuo *B. subtilis* bakterijose yra Bmr siurblys.

Siurbliai, išstumiantys antibiotikus iš ląstelių, gali būti specifiški substratui arba dalyvauti pernašoje kaip dauginės antibiotikų pernašos sistemos (Nikaido, 1998). Tačiau didžioji dalis apsauginių sistemų nėra atrankios substratui (1.1 lentelė), todėl iš ląstelės gali būti išstumiami beveik visų klasių antibiotikai (Lomovskaya ir Watkins, 2001).



1.4 pav. Vaistus išmetančių siurblių schemas gramneigiamųjų ir gramteigiamųjų bakterijų ląstelėse. Vaistai gramteigiamosiose bakterijose yra išstumiami tiesiai į aplinką, o gramneigiamosiose - į periplazminę ertmę arba tiesiai iš citoplazmos už ląstelės ribų (Lubelski ir kt., 2007).

DVA išmetimo siurbliai gramteigiamosiose bakterijose vaistus išmeta per ląstelės PM tiesiai į aplinką (Nikaido, 1998). O gramneigiamosiose bakterijose antibiotikų pernašos sistemos skiriasi savo mechanizmais: vienos jų antibiotikus išstumia tik pro ląstelės PM, tačiau tai neužtikrina pakankamos apsaugos, nes dideliems atsparumo lygiams pasiekti reikalingas didelis apykaitos tempas (Nikaido, 1998). Kitos pernašos sistemos yra daugiakomponentės, sudarytos iš trijų baltymų, perveriančių ir IM, ir PM: pernašos baltymai translokuoti PM ir IM, o šiuos abu kanalus jungia periplazmoje esantis jungiantysis baltymas, kuris ir užtikrina tiesioginę medžiagos pernašą iš ląstelės citozolio į aplinką. Kartu veidamos šios DVA sistemos, net ir esant didelei toksinų koncentracijai ląstelių aplinkoje, sudaro sąlygas bakterijoms išgyventi (Pumbwe ir Piddock, 2002).

1.2.2 Mikobakterijų atsparumas antibiotikams

Tuberkuliozė išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių pasaulyje, nepaisant prieinamų vaistų ir vakcinos Bacillus Calmette-Guerin (BCG) prieš ligos sukėlėją. To priežastis tuberkuliozės sukėlėjo *Mycobacterium tuberculosis* bakterijų savybė išgyventi net ir latentinėje formoje šeimininko granulomoje, nesukeliant jokių pastebimų ligos požymių, o vėliau reaktyvuoti ir sukelti aktyvią ligą. Kita problema, su kuria susiduriama, tai mikobakterijų DVA: buvo pastebėta, kad *M. tuberculosis* bakterijos yra atsparios visiems pirmos eilės tuberkuliozės vaistams ir daugeliui antros eilės tuberkuliozės vaistų (pvz., fluorochinolonams). Be to, vis dažniau sutinkama atsparumu pasižyminčių klinikinių mikobakterijų kamienų.

Mikobakterijų DVA pirmiausia priklauso nuo mažo mikobakterinės sienelės laidumo, dėka lipidinės sienelės sudėties ir sudėtingos struktūros. Šis mažas išorinio lipidinio sluoksnio laidumas, kuris riboja vaisto patekimą į ląstelę yra vienas iš lemiamų faktorių, susijusių su mikobakterijų atsparumu (Brennan, 2003; Niederweis, 2003).

Mikolinės rūgštys, kurios sudaro 30-40% sauso ląstelės apvalkalėlio svorio (Rastogi ir kt., 2001), yra kompleksinės α -alkil- β -hidroksil riebalų rūgštys, kurias sudaro iki 90 anglies atomų. Mikolinės rūgštys yra standžiai supakuotos, kvazi-kristaliniam faziniam būvyje ir lemia mažą išorinio lipidinio sluoksnio takumą su fazinio perėjimo temperatūra maždaug ties 70 °C (Liu ir kt., 1996). Mikolinės rūgštys kartu su laisvaisiais išorinio lapelio lipidais sudaro asimetrinį dvisluoksnį, o šie lipidai savo ruožtu lemia hidrofobinį ląstelės paviršių, dėka kurio ląstelės skystoje terpėje agreguoja. Dėl šių išorinio lipidinio sluoksnio ir riebalų rūgščių savybių prasiskverbti iki ląstelės PM yra sunku net lipofilinėms molekulėms (Liu ir kt., 1996; Wang ir kt., 2000). Šis mikolinių rūgščių lemiamas pralaidumo barjeras taip pat saugo ląsteles nuo aplinkos sukkelto streso ir lemia ligos gajumą infekcijos metu.

Jei hidrofobinės molekulės turi vienintelį kelią difunduoti per vaškinę, hidrofobinę ir netakę mikobakterijų IM, tai hidrofilinės medžiagos keliauja per porinus, vandeniui užpildytus baltymus. MspA porinas *M. smegmatis* bakterijose yra oktametrisis porinas (Faller ir kt., 2004), pralaidus nedidelėms hidrofilinėms 600-700 Da medžiagoms (Stahl ir kt., 2001; Engelhart ir kt., 2002). Tačiau šis formuoja tik vieną kanalą, o tokių porinų kanalų tankis mikobakterijose yra maždaug 50 kartų mažesnis lyginant su porinų suformuotų kanalų (žinant, kad tipiniai porinai gramneigiamųjų bakterijų išorinėje membranoje formuoja tris kanalus)

tankiu *E. coli* bakterijose (Engelhart ir kt., 2002). Tai yra vienas iš faktorių, kodėl pirminis lipidinio dvisluoksnio barjeras yra toks efektyvus.

Tačiau be išorinio lipidinio dvisluoksnio pralaidumo barjero yra žinomas ir aktyvus vaistų išmetimas iš ląstelių panaudojant išmetimo siurblius. Ilgą laiką chromosomų genu mutacijos, kurioms susikaupus, ląstelės tampa atsparios daugeliui vaistų, buvo laikomos vieninteliu gentiškai paaiškinamu DVA *M. tuberculosis* bakterijose (Ramaswamy ir kt., 1998). Tačiau genomo sekų analizė parodė, kad mikobakterijos turi ir, kaip manoma, išmetimo siurblių funkciją atliekančius baltymus, kurių vaidmuo natūraliame ar įgytame atsparume ilgą laiką buvo neaiškūs.

Pirmasis antibiotikų išmetimo siurblys buvo aptiktas greitai augančiose *M. smegmatis* bakterijose (Takiff ir kt. 1996). Šis atradimas iškėlė klausimą, ar tokių siurblių gali būti ir lėtai augančiose patogeninėse mikobakterijose: tokių siurblių padidėjęs aktyvumas ar jų sintezės aktyvavimas kaip atsakas į prailgintą antimikobakterinių medžiagų poveikį gali lemti padidėjusį organizmo atsparumą terapijoje naudojamiems vaistams.

Pradėjus ieškoti tokių siurblių, jų buvo aptikta ir daugiau: LfrA siurblys susijęs su atsparumu fluorochinolonams ir TetV siurblys lemiantis atsparumą tetraciklinui buvo nustatyti *M. smegmatis* mikobakterijose, P55 (*M. bovis*) ir TapA (*M. fortuitum*) siurbliai susiję su atsparumu tetraciklinui ir aminoglikozidams, *M. tuberculosis* mikobakterijose tokie siurbliai kaip MmR (susijęs su atsparumu fluorochinolonams), DrrAB nespecifinis išmetimo siurblys ir kiti, priklausantys visoms penkioms išmetimo siurblių šeimoms. Tačiau daugelis iš aptiktų siurblių pasižymi tik mažu ar daliniu atsparumu skirtingiems vaistams, todėl reikalinga dar daugiau tyrimų, siekiant išsiaiškinti jų vaidmenį DVA generavime.

1.3 Antibiotikus išstumiantys siurbliai

Pagal aminorūgščių sekų panašumą, spėjama veikimo mechanizmą ir antrinę struktūrą, substratų išmetimui naudojamą energiją ir atrankumą jam, antibiotikų siurbliai skirstomi į penkias šeimas: ABC didšeimė (ATP surišanti kasetė, *angl.* ATP-Binding Cassette), pernašai naudojanti ATP hidrolizės energiją, MFS (didžioji nukreipiamoji, *angl.* Major Facilitator Superfamily), SMR (mažoji dauginio atsparumo vaistams, *angl.* Small Multidrug Resistance), MATE (dauginio vaistų ir toksinių junginių išmetimo, *angl.* Multidrug and Toxin Compound Extrusion) ir RND (atsparumo-pumpuravimosi-ląstelės daliėjimosi, *angl.* Resistance Nodulation-Cell Division) šeimos, pernašai naudojančios protonovaros jėgą (1 lentelė). ABC ir

MFS šeimoms priklausantys baltymai yra plačiausiai paplitusios pernašos sistemos prokariotuose.

E. coli ląstelės genome randama daugiau nei 37 genai, koduojantys vaistų išmetimo siurblius, kurie apima 19 MFS, 3 SMR, 7 RND, 7 ABC ir 1 MATE siurblius (Nishino ir Yamaguchi, 2001).

1.1 lentelė. Bakterijų siurblių klasifikacija (Lomovskaya ir Watkins, 2001).

Šeima	Energijos šaltinis	Substarto specifiškumas	Amino rūgščių liekanų skaičius	Membraną veriančių domenų skaičius
ABC didšeimė	ATP hidrolizė	Specifinis ir nespecifinis (jonoforai, etidžio bromidas, alkaloidai, fosfolipidai)	skirtingas	6 ar 12
SMR šeima	Protonovaros jėga	Nespecifinis (antibiotikai, antiseptikai, TPP ⁺ , etidžio bromidas)	~110	4
MFS didšeimė	Protonovaros jėga	Specifinis ir nespecifinis (antibiotikai, katijoniniai dažai, TPP ⁺)	400-600	12-14
MATE Šeima	Protonovaros jėga	Nespecifinis (dažai, aminoglikozidai)	>1000	12
RND Šeima	Protonovaros jėga	Nespecifinis (detergentai, katijoniniai dažai, antibiotikai)	>1000	12

1.3.1 ABC didšeimė

Ši transportinių baltymų šeima yra labiausiai paplitusi gamtoje ir medžiagų pernašai naudoja ATP hidrolizės energiją. ABC šeimos baltymai atlieka įvairių medžiagų pernašos arba

sekrecijos funkcijas: pradėdant jonais ir baigiant mažomis molekulėmis, tokiomis kaip aminorūgštys, sacharidai, ksenobiotikai, vitaminai, peptidai, polisacharidai ar net baltymai. Dėl plataus spektro pernešamų medžiagų ABC baltymai dalyvauja maisto pasisavinime, , atliekų iš ląstelės šalinime, bakterijų imuninėje apsaugoje, lipidų transporte, osmosiniame strese ir makromolekulių transportavime bei apsaugant nuo ksenobiotikų (Lomovskaya ir Watkins, 2001; Borges-Wamsley ir kt., 2003; Lubelski ir kt., 2007).

ABC baltymai sudaryti iš keturių domenų: du nukleotidus surišantys domenai ir du transmembraniniai domenai, kurie sujungti į vieną baltymą. Nukleotidus surišantys domenai yra konservatyvios aminorūgščių sekos, o transmembraniniai segmentai varijuoja tarp rūšių (Lubelski ir kt., 2007).

Daugelis ABC baltymų yra gana specifiški substratui, tačiau bakteriniai siurbliai yra polispecifiški ir gali pernešti įvairius negiminingus junginius.

Labai nedaug ABC didšeimės siurbių, dalyvaujančių DVA moduliavime, yra atrasta gramneigiamosiose bakterijose (Li ir Nikaido, 2004). Iš ABC baltymų, atrastų *E. coli* bakterijose, nė vienas nedalyvauja DVA indukavime kaip plataus specifiškumo pernašos sistemos: paprastai šie siurbliai yra atrankūs vienai medžiagai. Tačiau gramteigiamosiose bakterijose ABC didšeimės baltymai vaidina svarbų vaidmenį DVA palaikyme (Lubelski ir kt., 2007).

1.3.2 MF šeima

Didžiosios nukreipiamosios (MF) transportinių baltymų šeimos atstovai dalyvauja antibiotikų, Krebso ciklo tarpinių junginių, fosfatų ir oligosacharidų sąnašoje, priešnašoje ir viennašoje. Šios šeimos baltymų atstovų randama nuo bakterijų iki aukštesniųjų eukariotų ir jie dalyvauja antrinėje aktyvioje pernašoje: pernašai naudoja protonovaros jėgą. Geriausiai žinomi atstovai *E. coli* bakterijose TetA(B) siurbliai, kurie yra tetraciklino pernešėjai ir dalyvauja priešnašoje: vieną tetraciklino ir divalenčio katijono kompleksą mainydami į protoną (Guay ir kt., 1994; Paulsen ir kt., 1996; Borges-Walmsley ir kt., 2003). Geriausiai ištirti MF šeimos atstovai žmogaus ląstelėse – GLUT siurbliai, pernešantys gliukozę.

Už minėtų medžiagų pernašą (išskyrus antibiotikus) atsakingų baltymų struktūra yra panaši – juos sudaro 12 transmembraninių segmentų, o už DVA atsakingus baltymus pagal struktūrą galima suskirstyti į dvi grupes – 12 arba 14 transmembraninių segmentų turinčius baltymus.

1.3.3 SMR šeima

Mažiausi pernašos baltymai priklauso SMR šeimai. Paprastai šiuos baltymus sudaro apie 110 aminorūgščių, kurių grandinė perveria membraną 4 kartus, o funkcionalus baltymas tampa susijungus trims domenams. Šių siurblių išnešamų substratų spektras ribotas: jie perneša teigiamą krūvį turinčias medžiagas – organinius katijonus, amonio junginius ir įvairius dažus – per gramneigiamųjų bakterijų PM į periplazminę ertmę.

Geriausiai žinomi baltymai, dalyvaujantys DVA generavime *E. coli* bakterijose, EmrE siurbliai. Jie išneša iš ląstelės monovalentinius katijonus (pvz., etidį, proflaviną, metilo Violetą, TPP⁺ ir kt.) mainydami juos į vieną protoną (Paulsen ir kt., 1996; Nelson, 2002).

1.3.4 RND šeima

RND šeimos atstovai lyginant su MFS ir SMR šeimomis perneša labai plataus spektro medžiagas iš ląstelės: lipofilinius ir amfifilinius antibiotikus, chemoterapinius agentus, metabolizmo inhibitorius. Šios medžiagos gali būti įkrautos teigiamai, neigiamai ar visai neturėti krūvio, tačiau vis tiek bus atpažintos šios pernašos sistemos. Vieninteliai aminoglikozidai, kurie visi yra hidrofiliiniai, nepriklauso šiai gausiai pernešamų medžiagų grupei. Dėl to yra manoma, kad pernešamos medžiagos turi būti nors dalinai įsiterpusios į PM tam, kad būtų atpažintos RND šeimos pernašos sistemų (Nikaido, 1998).

RND šeimos baltymai savo struktūra skiriasi nuo kitų baltymų, mat jie sudaro kompleksą iš baltymų, įsiterpusių į gramneigiamųjų bakterijų IM ir PM. Juos sudaro OMF ir MFP segmentai, tad medžiagos gali būti pernešamos iš ląstelės citoplazmos tiesiai už ląstelės ribų. Tokių kompleksinių siurblių yra žinoma ir ABC šeimos baltymų tarpe.

Detaliausiai ištirtas RND šeimos baltymų kompleksas *E. coli* bakterijose AcrAB-TolC pernašos sistema. Pastebėta, kad patalpinus ląstelę į nepalankias sąlygas, aplinkoje esant pavojingų medžiagų skatinama šio baltymo sintezė, todėl manoma, kad tai yra viena iš pagrindinių DVA sistemų gramneigiamosiose bakterijose (Okusu ir kt., 1996).

1.3.5 MATE šeima

MATE baltymų šeima yra atrasta vėliausiai, todėl apie ją yra surinkta mažiausiai duomenų. Savo dydžių MATE šeimos baltymai yra panašūs į MF šeimos baltymus, tačiau jų struktūra iš esmės skiriasi. Juos sudaro 12 transmembraninių segmentų, o pernašai yra

naudojama Na⁺ arba protonovaros jėga. Šie baltymai apsaugo ląsteles nuo katijoninių junginių (Borges-Walmsley ir kt., 2003).

E. coli bakterijų PM yra rastas baltymas, priklausantis MATE šeimai – YdhE baltymas, taip pat atsakingas už ląstelės atsparumą katijoniniams junginiams.

1.4 Antimikrobiniai peptidai

Antimikrobiniai peptidai dalyvauja įgimtos imuninės sistemos reakcijose žmogaus ir kitų žinduolių organizme, tačiau taip pat randami ir primityvesniuose organizmuose: bestuburiuose, vabzdžiuose, mikroorganizmuose, taip pat augaluose. Žinduolių antimikrobiniai peptidai pasižymi savybe sunaikinti mikrobus tiesiogiai ir stimuliuoti įgimtą bei adaptyvią organizmo apsaugos sistemas, todėl dar kitaip vadinami polipeptidais, dalyvaujančiais imuninės sistemos gynybinėse reakcijose (SGDP) (*angl.* HDPs – *host defense peptides*). Jų taikynys gramteigiamosios ir gramneigiamosios bakterijos, grybai ir virusai su apvalkalėliu, kai kurie peptidai pasižymi atrankumu ir vėžinėms ląstelėms (Hancock ir Chapple, 1999).

SGDP pasižymi didele dydžio bei formos įvairove, tačiau turi keletą bendrų pagrindinių savybių: jie veikia mikrobinių ląstelių membranos komponentus, dažniausiai membranos lipidus, ir sąveikaudami su mikrobinėmis membranomis į jas prasiskverbia ir pažeidžia, arba suformuoja kanalus, pro kuriuos gali patekti įvairios molekulės bei patys peptidai (Hancock ir Chapple, 1999). Tuo paaiškinama jų sąveiką su gramneigiamųjų bakterijų IM, kadangi peptidai yra katijoniniai, jų dėka vyksta elektrostatinė sąveika su neigiamai įkrautu mikrobinės ląstelės paviršiumi, o hidrofilinės ir hidrofobinės dalys integruojasi į ląstelės PM. Be to, šie antimikrobiniai peptidai gali veikti ir kaip antibiotikai, ir kaip signalinės molekulės (Crovella ir kt., 2005; Zelezetsky ir Tossi, 2006).

Nors ir antimikrobiniai peptidai pasižymi didele struktūros tipų įvairove, labiausiai paplitę yra du tipai:

- Maži (16-40 aminorūgščių), linijiniai peptidai, kurie sąveikauja su mikrobinių ląstelių paviršiumi ir užima α -spiralės konformaciją. Tai katijoniniai peptidai, pasižymintys amfifilinėmis savybėmis. Jie randami visuose organizmuose: nuo bakterijų iki žinduolių, ir yra plačiai paplitę. Daugelio žinduolių leukocituose randama katelicidino, pasižyminčio antimikrobinėmis savybėmis (Hancock ir Lehrer, 1998).
- β -klosčių struktūros kompaktiški peptidai, į kurių sudėtį įeina cisteino aminorūgštys. Jie yra stabilizuoti dviem ar daugiau disulfidinių tiltelių ir kitaip dar

vadinami defenciniais (žinomi α ir β defencinai, randami neutrofiluose, epitelinėse ląstelėse ir leukocituose (Hancock ir Lehrer, 1998; Hancock ir Chapple, 1999)). Jie pasižymi antimikrobinėmis savybėmis kovojant su grybeliais, virusais ir bakterijomis. Randami vabzdžiuose, augaluose ir žinduoliuose.

Tačiau šių dviejų tipų antimikrobinų peptidų konformacija nėra lemiamas veiksnys jų antimikrobiniam aktyvumui. Varijuojančios aminorūgščių sekos turi daugiau įtakos jų poveikiui ląstelėms *in vitro* (Crovella ir kt., 2005).

Taip pat kaip ir antimikrobinų peptidų aminorūgščių seka ar konfirmacijos pokyčiai, taip ir fizikinės ir cheminės savybės, amfifiliškumas, hidrofobiškumas ar katijoniškumas, gali turėti ryškų efektą šių peptidų biologiniam aktyvumui, jų poveikio stiprumui, aktyvumo spektrui ir atrankumui (Zelezetsky ir kt., 2005).

1.4.1 Peptidas pVEC

Į ląsteles prasiskverbiantys peptidai (LPP, angl. *cell-penetrating peptides*) – tai katijoninės prigimties, dažniausiai amfifiliniai peptidai, kuriuos sudaro nuo 5 iki 40 aminorūgščių seka. Jie struktūriškai panašūs į antimikrobinus peptidus, kurie atlieka imuninės sistemos gynybinę funkciją.

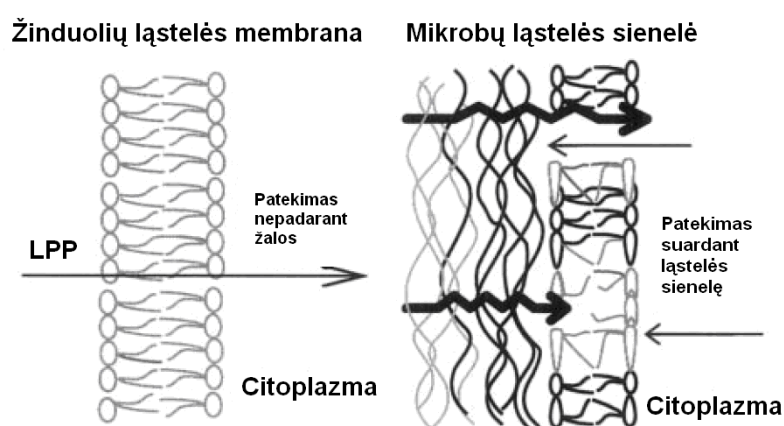
LPP variuoja dydžiu, aminorūgščių seka ir krūviu, tačiau turi vieną bendrą savybę: greitai translokuojasi ląstelės PM ir gali atlikti medžiagų pernešimo funkciją į ląstelės citozolį arba branduolį (Lindgren ir kt., 2000). Be to, kai kurie organizmai LPP naudoja kaip antimikrobinę savisaugos priemonę. Tokie peptidai patekę į ląstelę veikia tiesiogiai DNR ar RNR arba sudaro ląstelės PM poras, dėl kurių susiformavimo ląstelės suyra (Lundberg ir Langel, 2003). Antimikrobinėmis savybėmis pasižymintys LPP gali negrįžtamai paveikti bakterijas, nepažeisdami žinduolių ląstelių (Nekhotiaeva ir kt., 2004).

Pagal kilmę yra išskiriamos trys pagrindinės LPP grupės (El-Andalloussi ir kt., 2005):

- iš baltymų kilę peptidai, kurių pagrindiniai atstovai peptidai Tat, penetratinas ir pVEC. Jie kilę iš natūraliai egzistuojančių baltymų ir gali būti vadinami transdukciniu baltymų domenais;
- chimeriniai peptidai, sudaryti iš dviejų aminorūgščių sekų, kurios kilusios iš dviejų skirtingų baltymų. Tokių peptidų atstovai TP ir MPG;
- sintetiniai peptidai, kurių pagrindiniai komponentai poliargininų šeima ir modeliniai amfifiliniai peptidai.

Iki šiol nėra aiškus mechanizmas, kurio dėka LPP patenka į ląstelę, tačiau yra įrodymų, kad egzistuoja du peptidų į ląsteles patekimo būdai - nuo energijos priklausomas ir nuo energijos nepriklausomas.

Ląsteles pralaidinantis peptidas pVEC į žinduolių ląsteles gali pernešti kitas medžiagas tokias kaip streptavidinas, biotinas ar fluoresceinas (Elmqvist ir kt., 2001), tačiau jis taip pat pasižymi ir antimikrobinėmis savybėmis. Daugelis LPP į žinduolių ląsteles prasiskverbia nedarydami žalos jų membranai, tačiau mikroorganizmų ląstelių membranos savo sudėtimi visiškai skiriasi nuo žinduolių ląstelių membranų, todėl šie LPP padeda įvairioms medžiagoms patekti į ląstelę ir tai gali sąlygoti ląstelės žūtį (1.5 pav.).



1.5 pav. Ląstelių membranos sąveika su LPP. Rodyklės parodo patekimo į ląstelę LPP kryptį (Nekhotiaeva ir kt., 2004).

Yra žinoma, kad peptidas pVEC inhibuoja gramteigiamųjų *B. megaterium* ir gramneigiamųjų *E. coli* bakterijų (Palm ir kt., 2006) bei storiausią biomembraną turinčių mikobakterijų *M. smegmatis* (Nekhotiaeva ir kt., 2004) augimą, tačiau mielių sienelė yra atspari jo poveikiui (Palm ir kt., 2006).

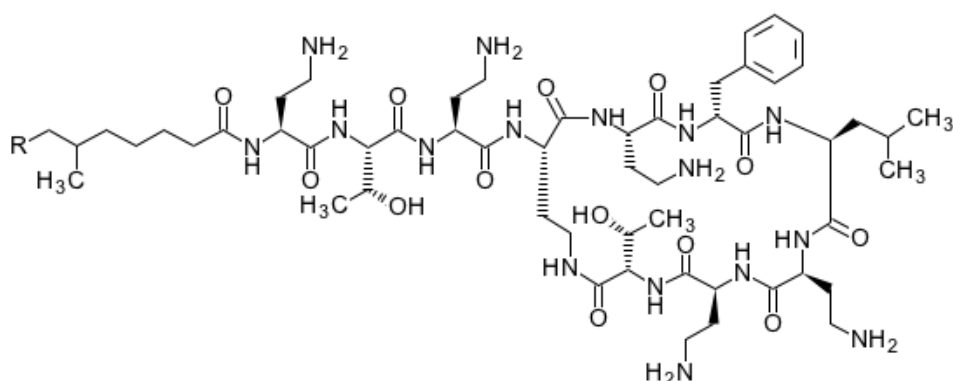
1.4.2 Polimiksinas B

Polimiksinai priklauso klasei antibiotikų, kurie buvo atrasti maždaug prieš 60 metų. Jie yra dekapeptidai, amfifilinės ir polikatijoninės molekulės, pasižyminčios antimikrobinio veikimu prieš beveik visas gramneigiamąsias bakterijas net esant mažoms mikromoliarinėms koncentracijoms (Storm ir kt., 1977).

Yra penki pagrindiniai polimiksinai (A, B, C, D ir E), bet tik du polimiksinai B ir E (kolistinas) buvo naudojami klinikinėje praktikoje. Šie polimiksinai apie du dešimtmečius buvo naudojami pacientams su įvairiomis gramneigiamųjų bakterijų infekcijomis įvairiose

kūno vietose gydyti. Tačiau dėl toksiškumo ir stipraus poveikio kepenims ir nervų sistemai, jų naudojimas apie 1980 metus buvo nutrauktas. Išskyrus pacientams su cistine fibroze, kuriems polimiksinas buvo naudojamas kaip intraveninis vaistas, ir kvėpuojamojo trakto infekcijų prevencijai ir gydymui kaip inhaliuojamasis vaistas (Falagas ir Michalopoulos, 2005).

Didėjant infekcinėms epidemijoms, sukeltoms *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ar *K. pneumoniae* bakterijų, kurios pasižymi DVA, polimiksinas kai kuriose pasaulio vietose pradėtas vėl vartoti kaip intraveninis vaistas. Be to, kai kurie tyrimai parodė, kad jis nėra labiau toksiškas ar mažiau efektyvus, nei kiti antimikrobiniai preparatai (Falagas ir Kasiakou, 2005).



1.6 pav. Polimiksino B struktūra.

Polimiksino B (PMB) veikimas pasižymi tuo, kad jo antimikrobinis veikimas susideda iš dviejų stadijų. Pirmiausia antibiotikas išstumia iš gramneigiamųjų bakterijų ląstelės paviršiaus LPS stabilizuojančius divalencius katijonus, dėl to pasikeičia LPS užimama padėtis IM atžvilgiu. Tuo pačiu pasikeičia ląstelės sienelės laidumas hidrofobinėms medžiagoms. Yra duomenų, kad užtenka PMB prisijungti prie ląstelės IM tam, kad būtų užblokuotas *E. coli* bakterijų kvėpavimas ir augimas (La Porte ir kt., 1977). Antras žingsnis – jo prasiskverbimas iki ląstelės PM ir porų ląstelės apvalkalėlyje suformavimas, dėl ko yra depoliarizuojama ląstelės PM ir ląstelė žūva. Tačiau yra žinoma, kad ląstelės PM depoliarizacija nebūtina tam, kad ląstelė žūtų, kadangi bakterijų augimas yra inhibuojamas esant daug mažesnėms antibiotiko koncentracijoms nei sukeliama jų PM depoliarizacija (Daugelavičius ir kt., 2000).

1.5 Išmetimo siurblių slopikliai

Su bakterijų vaistų išmetimo siurbliais galima kovoti ne tik ieškant naujų vaistų, naujų siurbliams neatpažįstamų medžiagų, bet ir kitais būdais. Reikia pastebėti, kad vaistų išmetimo siurbliai yra mažiau jautrūs naujesniems vaistams, senesniųjų klasikinių vaistų analogams.

Pirmoji strategija kovojant su siurbliais – tai jų baltyminės struktūros blokavimas, panaudojant neutralizuojančius antikūnus arba veikiant tiesiogiai į siurblius koduojančius genus. Antra, plačiau naudojama strategija – vaistų išmetimo siurblių slopiklių vystymas. Tokie DVA siurblių slopikliai galėtų būti naudojami ir veikti išvien su specifiniais antibiotikais. Šie slopikliai gali veikti siurblius dviem būdais, dėl to skirstomi į dvi slopiklių grupes pagal veikimo mechanizmą:

- nespecifiškai veikiantys siurblių slopikliai, išsklaidantys siurblio veiklai reikalingą energijos gradientą;
- specifiškai veikiantys siurblių slopikliai, blokuojantys, inaktyvuojantys arba pakeičiantys DVA siurblių topologiją slopikliai (Bambeke ir kt., 2006; Mahamoud ir kt., 2007).

Tiesiogiai vaistų išmetimo siurblius veikiančius slopiklius galima skirstyti į dvi grupes:

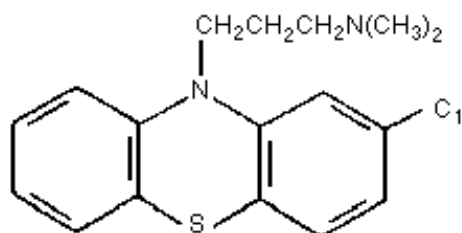
- medicinoje naudojamų antibiotikų analogai, kurie pasižymi mažu antimikrobiniu efektu, tačiau sumažina tų antibiotikų išmetimą iš ląstelės;
- struktūriškai su antibiotikais nesusiję slopikliai, kurie gali būti atsakingi net ir už nespecifinių siurblių, išmetančių įvairių klasių antibiotikus, inaktyvavimą (Bambeke ir kt., 2006).

Problema, su kuria susiduriama, siekiant medicinoje pasinaudoti tokiais siurblių slopikliais, tai efektyvios koncentracijos. Paprastai jos viršija saugią koncentraciją, kuri nebūtų toksiška pačiam organizmui. Tačiau vien parodymas *in vitro*, kad slopikliai gali inaktyvuoti DVA siurblius, paskatino naujų, eukariotinėms ląstelėms nepavojingų slopiklių paiešką.

1.5.1 Chlorpromazinas

Chlorpromazinas yra sintetinis vaistas, kuris priklauso fenotiazinų klasei, tačiau yra, priešingai nei kiti šios klasės atstovai, bespalvis. Atradus chlorpromaziną ir jam tapus prieinamam, 1957 metais jis pradėtas plačiai naudoti kaip vaistas nuo psichozijų ir kai kurių neurozių. Tačiau vėliau buvo pastebėta, kad jis pasižymi ir antimikrobinėmis savybėmis ir buvo pradėtas naudoti net tokių ligų kaip tuberkuliozės gydyme (Amaral ir kt., 2007). Vėliau buvo pastebėtas ir kitų fenotiazinų efektyvumas prieš šią ligą. Tačiau supratus, kad mikobakterijas inhibuojančios koncentracijos yra didesnės nei gali būti naudojamos medicinoje dėl stipraus šalutinio poveikio organizmui, jo kaip vaisto buvo atsisakyta.

Chlorpromazinas yra katijoninė amfifilinė molekulė, kuri įsiterpusi į vidinį PM lipidinio sluoksnio lapelį sukelia membranos topologijos pakitimus bei gali būti DVA siurblių substratas. Yra parodyta, kad chlorpromazinas kaip ir kiti fenotiazinai blokuoja kalio jonų pasisavinimą, slopindami nuo kalio jonų priklausomas ATPazes tiek bakterijose, tiek žinduolių ląstelėse. Be to, fenotiazinai patekę į ląstelę įsiterpia į DNR spiralės nukleotidus ir taip slopina su DNR susijusius procesus (Amaral ir kt., 2007).

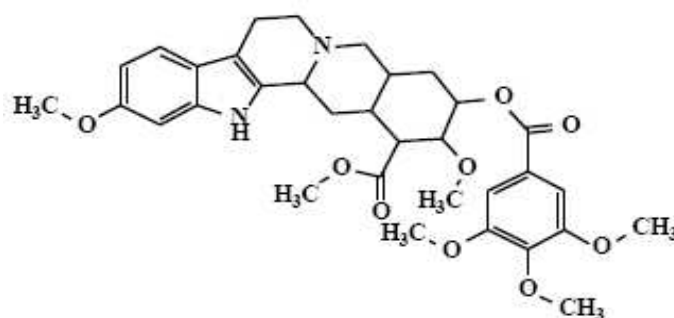


1.7 pav. Chlorpromazino struktūra.

Yra bakterijų, kurios atsparios fenotiazinams. Jų atsparumas gali būti susijęs tiek su DVA siurbliais, tiek su kitais nuo antibiotikų poveikio saugančiais vidiniais procesais. Yra žinoma, kad fenotiazinai yra *E. coli* bakterijų AcrAB siurblio substratai (Amaral ir kt., 2007).

1.5.2 Rezerpinas

Rezerpinas yra natūralus alkaloidas, išskirtas iš augalo *Rauwolfia vomitoria* šaknų. Medicinoje jis naudojamas kaip vaistas, mažinantis kraujospūdį. Šio slopiklio aktyvumas pirmiausia buvo parodytas veikiant juo tetraciklino išmetimo siurblių Bmr *B. subtilis* bakterijose. Buvo įrodyta, kad rezerpinas šį siurblių veikia tiesiogiai prisijungdamas prie jo (Stavri ir kt., 2007).



1.8 pav. Rezerpino struktūra.

Vėliau buvo atrasta, kad šis siurblių slopiklis veikia ir daugelį kitų ne tik ABC didšeimei priklausančių DVA siurblių, nuo NorA (MFS) iki p-glikoproteino (ABC) (Hsieh ir kt., 1998).

Tačiau net ir būdamas efektyvus slopiklis rezerpinas negali būti naudojamas medicinoje dėl ypač stipraus šalutinio poveikio. Dėl šios priežasties yra ieškoma struktūrinių šio alkaloido analogų bei naujų junginių.

2 MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Reagentai ir mikroorganizmai

Mielių ekstraktas	- Oxoid
Triptonas Bacto	- Oxoid
Mitybinis agaras	- Reachim (Vladivostokas, Rusija)
Agaras	- Reachim (Vladivostokas, Rusija)
NaCl	- Roth
TRIS/HCl	- Fluka
NaH ₂ PO ₄	- Lachema
Glicerolis	- Roth
Ampicilinas	- Roth
Tetraciklinas	- Serva
Chloramfenikolis	- Roth
Polimiksinas B	- Sigma
Gramicidinas D	- Sigma
Lizocimas	- Sigma
EDTA	- Serva
Tetrafenilfosfonio chloridas	- Serva
Clorpromazinas	- Sigma
Rezerpinas	- Sigma
DMSO	- Roth
Fenildikarbaundekaborano kalio druska	- susintetintas dr.A.Beganskienės, VU Chemijos fakultete
Terpė 7H9	- Difco
Papildas OADC	- Difco
Lowenstein-Jensen agaras	- paruoštas Respublikinėje tuberkuliozės ir plaučių ligų ligoninėje

Darbe naudotas laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje esantys *Escherichia coli* kamienai MC4100 (*FavaD 139lacΔU169thi relA rpsL mot*) ir IQ86 (*zhd::Tn10, sps^r*), *Bacillus subtilis* WB746 kamienas ir *Mycobacterium smegmatis* ATCC14468 kamienas.

2.2 Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas

Mitybinės terpės ir tirpalai autoklavuojami 0,5 val. 1 atm. slėgyje. Terpių sudėtis nurodyta 1 L distiliuoto vandens:

LB terpė	Triptonas	10 g
	Mielių ekstraktas	5 g
	NaCl	9 g
Agarizuota terpė	Mitybinis agaras	35 g
	Agaras	10 g
7H9 terpė	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
	Na ₂ SO ₄	2,5 g
	KH ₂ PO ₄	1,0 g
	NaCl	0,1 g
	MgSO ₄	0,05 g
	CaCl ₂	0, 5 mg
	ZnSO ₄	1 mg
	CuSO ₄	1 mg
	Geležies amonio citratas	0,04 g
	L-glutamato rūgštis	0,5 g
	Piridoksinas	1 mg
	Biotinas	0,5 mg
OADC papildas	Jaučio albuminas	2,5 g
	Dekstrozė	1 g
	Katalazė	2 mg
	Oleino rūgštis	0,025 g
	NaCl	0,425 g

Tirpalai:

NaCl	0,9 %
Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
Natrio fosfatas, pH 8,0	100 mM
EDTA, pH 8,0	200 mM

Antibiotikų išeiginės koncentracijos:

Polimiksinas B	25 mg/ml
Gramicidinas D	4 mg/ml
Ampicilinas	12,8 mg/ml
Lizocimas	10 mg/ml

Peptidų išeiginės koncentracijos:

pVEC	9 mM
cys-pVEC	9 mM

Slopiklių išeiginės koncentracijos:

Clorpromazinas	12,8 mg/ml
Rezerpinas	12,8 mg/ml

Gramicidinas D tirpinamas etanolyje, rezerpinas – dimetilsulfoksido (DMSO), visi kiti antibiotikai, peptidai ir slopikliai tirpinami dejonizuotame vandenyje.

2.3 Darbo metodai

2.3.1 *E. coli* ląstelių auginimas

Į 25 ml sterilios LB terpės su mikrobiologine kilpele užsėjama viena bakterijų kolonija ir auginama per naktį purtyklėje, esant 37 °C temperatūrai. Auginant *E. coli* IQ86, į naktinės kultūros auginimo terpę įdedama 20 µg/ml tetraciklino. Užaugusi naktinė kultūra skiedžiama LB terpe iki optinio tankio 540 nm ilgio bangoje (OD₅₄₀) 0,045 ir auginama esant 37 °C temperatūrai, purtyklėje, kol optinis tankis pasiekia 1. Žinoma, kad esant optiniam tankiui 1 ląstelių koncentracija yra ~ 4 x 10⁸ ląst/ml.

2.3.2 Ląstelių suspensijos ruošimas

Užaugusi dieninė kultūra yra centrifuguojama 6000 g, 15 min., esant 4 °C temperatūrai, gautos nuosėdos sukonzentruojamos 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferyje, 1/150 pradinio terpės tūrio. Paskaičiuojama, kiek mikrolitrų ląstelių suspensijos reikės įnešti į paruoštą mėgintuvėlį su 5 ml matavimo terpės, kad OD₅₄₀ mėgintuvėlyje būtų 2. Bandymo metu koncentruota ląstelių suspensija laikoma lede, ne ilgiau kaip 5 valandas.

2.3.3 Ląstelių dorojimas EDTA

EDTA yra chelatinis junginys, kuris suriša divalenčius Mg^{2+} ir Ca^{2+} jonus. Šių jonų pašalinimas iš ląstelės padidina gramneigiamųjų bakterijų IM laidumą lipofiliniams junginiams (Marvin ir kt., 1989). Po centrifugavimo ląstelės sukonzentruojamos 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferyje, 1/15 pradinio terpės tūrio, pridamas reikiamas EDTA kiekis (galutinė koncentracija 2 mM) ir inkubuojama 10 min., esant 37 °C temperatūrai, purtyklėje. Ląstelės nusodinamos centrifuguojant jas 6000 g, 15 min., esant 4 °C temperatūrai ir sukonzentruojamos 100 mM Tris-HCl (pH 8) buferyje, 1/150 pradinio auginimo terpės tūrio.

2.3.4 *B. subtilis* bakterijų auginimas

Į 10 ml sterilios LB terpės (pH 8) su mikrobiologine kilpele užsėjama viena bakterijų kolonija ir auginama 14-16 val. purtyklėje, esant 30 °C temperatūrai. Užaugusi naktinė kultūra skiedžiama LB terpe (pH 8) iki OD_{540} 0.1 ir auginama 37 °C purtyklėje, kol optinis tankis pasiekia 0,8. Esant OD_{540} 0,8, ląstelių koncentracija yra $\sim 1 \times 10^8$ ląst/ml.

2.3.5 Ląstelių suspensijos ruošimas

Užaugusi dieninė kultūra yra centrifuguojama 8000 g, 10 min., esant kambario temperatūrai, gautos nuosėdos resuspenduojamos 100 mM Tris-HCl (pH8) buferyje, 1/150 pradinio terpės tūrio. Paskaičiuojama, kiek mikrolitrų ląstelių suspensijos reikės įnešti į paruoštą mėgintuvėlį su 5 ml matavimo terpės, kad OD_{540} mėgintuvėlyje būtų 1. Bandyto metu ląstelių suspensija laikoma kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 4 valandas.

2.3.6 *M. smegmatis* bakterijų auginimas

M. smegmatis bakterijų kultūra Lowenstein-Jensen nuožulnaus agaro mėgintuvėliuose laikoma +4 °C temperatūroje. Prieš bandymą su mikrobiologine kilpele bakterijų kultūra pernešama į 7H9 skystą terpę, į kurią papildomai pridama OADC papildas (10% terpės tūrio). Bakterijos auginama pustyklėje, esant 37 °C temperatūrai lengvai aeruojant 3 paras, iki $OD_{600} = 0,6-0,8$. Esant OD_{600} 1 ląstelių koncentracija yra $\sim 5 \times 10^9$ ląst/ml.

2.3.7 Ląstelių suspensijos ruošimas

Ląstelių kultūra centrifuguojama 5000 g, 15 min., esant 18 °C temperatūrai, gautos nuosėdos sukonzentruojamos 0,9 % NaCl tirpale, 1/100 ląstelės pradinio tūrio. Bandymo metu ląstelių suspensija laikoma kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 4 valandas. Paskaičiuojama, kiek mikrolitrų ląstelių suspensijos reikės įnešti į paruoštą mėgintuvėlį su 5 ml matavimo terpės, kad OD₆₀₀ mėgintuvėlyje būtų 1.

2.3.8 Potenciometriniai matavimai

TPP⁺ ir PCB⁻ jonų koncentracijų registravimui buvo naudojami membraniniai TPP⁺ ir PCB⁻ jonams selektyvūs elektrodai. Elektrodai buvo prijungti prie signalo stiprinimo sistemos, pagamintos Biochemijos ir biofizikos katedroje, Membranų laboratorijoje, aukštą įėjimo varžą turinčio operacinio stiprintuvo AD549JH pagrindu. Duomenų perdavimo plokštės DT302 perduoda sustiprintą signalą į kompiuterį, kuriame registruojami TPP⁺ arba PCB⁻ jonų koncentracijos pokyčių skaitmeniniai duomenys.

Kiekvieno matavimo pradžioje atliekama selektyvaus elektrodo kalibracija, pridodant į matavimo kiuvetę su buferiu tam tikrą TPP⁺ arba PCB⁻ kiekį. Nusistovėjus elektrodo parodymams, pridodamas reikiamas ląstelių kiekis. Nusistovėjus naujai TPP⁺ arba PCB⁻ jonų koncentracijai matavimo kiuvetėje, pridodami tiriami priedai ir registruojami šių lipofilinių jonų koncentracijos pokyčiai.

Indikatorinio jono koncentracija terpėje apskaičiuojama, remiantis tiesine priklausomybe: E-f(lgC). Potencialas E išreiškiamas mV (pagal prietaiso parodymus). Žinodami tikslų terpės tūrį matavimo kiuvetėje, iš matavimo sistemos duomenų galime apskaičiuoti sugertą TPP⁺ arba PCB⁻ jonų kiekį.

2.3.9 Minimalios slopinančiosios koncentracijos nustatymas mikroskiedimų metodu

Po 100 µl augimo terpės išpilstoma 96 šulinėlių plokštelėje, į pirmuosius šulinėlius įnešama pradinė tiriamosios medžiagos koncentracija ir atliekami 1:2 skiedimai. Užaugusi ląstelių kultūra skiedžiama iki 10⁵ ląst/ml ir išpilstoma į paruoštą plokštelę. Plokštelė inkubuojama esant 37 °C temperatūrai ir po 3 parų optinių tankių skaitytuvu (ASIS UVM 340) įvertinamas *M. smegmatis* bakterijų augimas. Neigiama kontrolė yra augimo terpė ir teigiama kontrolė – bakterijų augimas be antimikrobinių medžiagų.

3 REZULTATAI

3.1 Peptidų poveikis gramneigiamųjų bakterijų apvalkalėliui

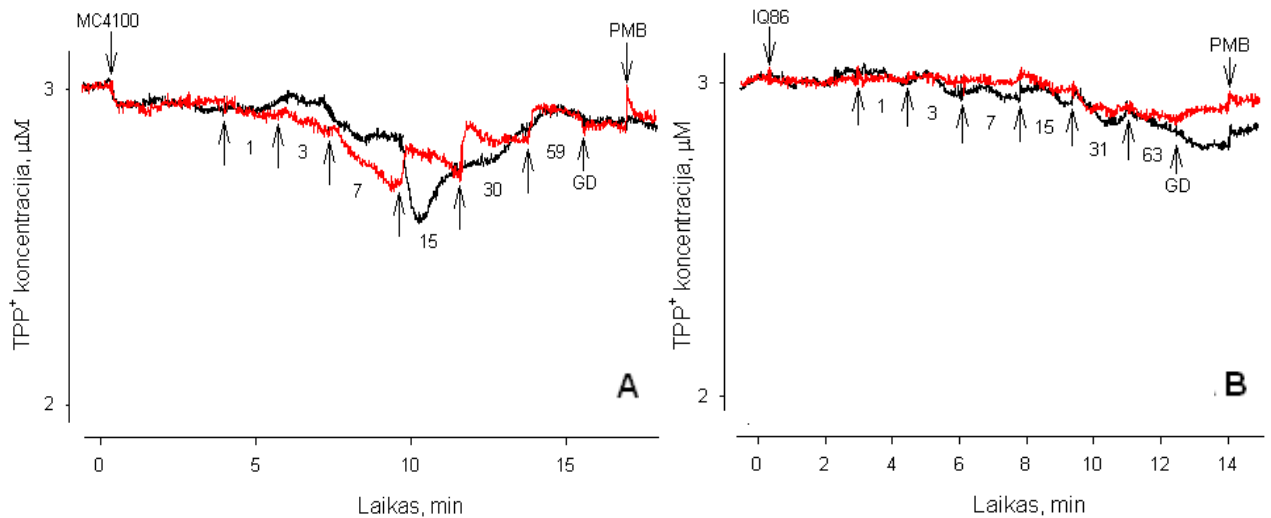
Norint užtikrinti veiksmingą antibiotikų poveikį gramneigiamosioms bakterijoms, reikia užtikrinti efektyvią vaistų pernašą pro ląstelės IM. IM laidinimui yra naudojami divivalenčius jonus surišantys junginiai, pvz., EDTA, arba su jais konkuruojančios ir iš IM paviršiaus juos išstumiančios polikatijoninės medžiagos, pvz., polimiksinas.

Yra žinoma, jog kaip ir kiti į ląsteles prasiskverbiantys peptidai (LPP), peptidas pVEC pereina eukariotinių ląstelių PM ir gali į ląstelės citozolį ar branduolį pernešti prie jo prijungtas medžiagas (Elmquist ir kt., 2001). LPP taip pat gali veikti kaip antimikrobiniai peptidai ir slopinti prokariotinių ląstelių augimą (Lundberg ir Langel, 2003; Nekhotiaeva ir kt., 2004; Palm ir kt., 2006).

Tyrimams buvo pasirinkti du peptidai – pVEC ir cys-pVEC, kurie skiriasi viena aminorūgštimi: prie peptido cys-pVEC yra prijungta cisteino aminorūgštis, kuri gali būti panaudota fluoroforų ar kitų žymeklių prijungimui. Tiriamuoju objektu buvo pasirinkti *E. coli* bakterijų kamienai MC4100 ir IQ86, kurie tarpusavyje skiriasi tuo, jog kamienas IQ86 turi TetA siurblių, iš ląstelių išstumiantį tetracikliną, o kamienas MC4100 tokio siurblio neturi.

Žinant peptido pVEC savybes, pirmiausia buvo atlikti eksperimentai, siekiant išsiaiškinti šių peptidų įtaką *E. coli* ląstelių IM laidumui. Tam buvo atliekami potenciometriniai matavimai ir stebimi indikatorinių tetrafenilfosfonio (TPP^+) jonų srautai per šių ląstelių apvalkalėlį, terpėje esant skirtingoms peptidų koncentracijoms. Yra žinoma, jog nenaudojant jokių laidinančių medžiagų, TPP^+ jonai sunkiai pereina gramneigiamųjų bakterijų IM (Daugelavičius ir kt., 2000).

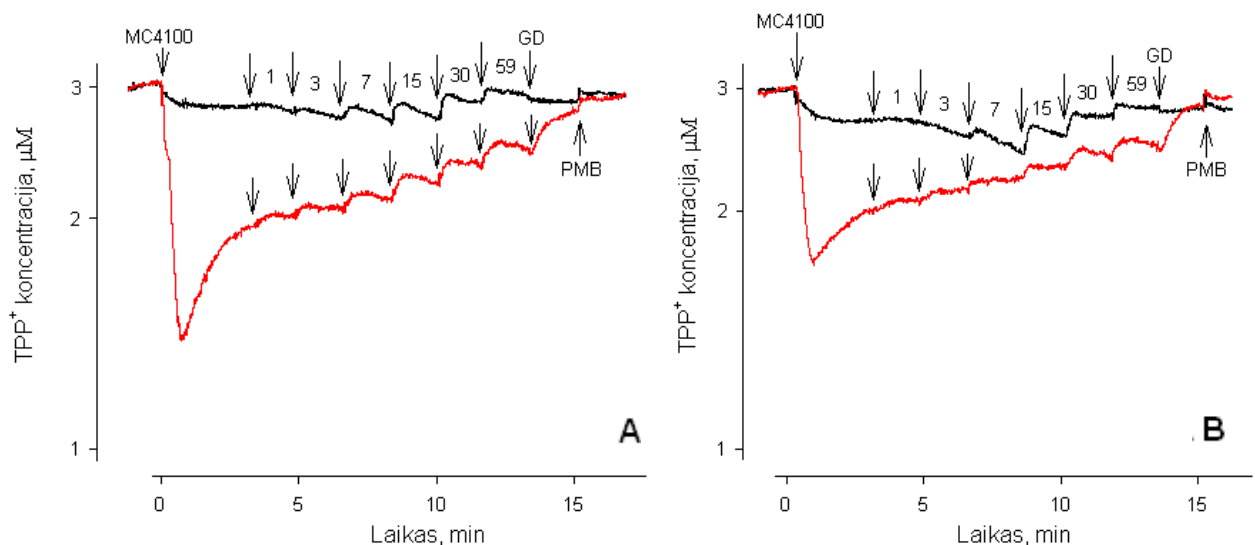
Eksperimentų metu nebuvo nustatyta jokių ženklių peptidų sąveikos su *E. coli* ląstelėmis skirtumų. Buvo parodyta, jog šių peptidų sąveika su bakterinių ląstelių apvalkalėliu yra panaši (3.1 pav.). Tirpale esant mažesnėms nei 3 μM abiejų peptidų koncentracijoms, matavimuose su *E. coli* MC4100 ląstelėmis, pokyčiai TPP^+ jonų sugėrime nėra stebimi arba jie labai maži (3.1 pav., A). Didinant peptidų koncentraciją terpėje, stebimas nedidelis TPP^+ jonų sugėrimas, tačiau padidinus koncentracijas iki 15 μM (pVEC) ir 30 μM (cys-pVEC), TPP^+ jonai pereina į matavimo buferį – matoma ląstelės PM depoliarizacija.



3.1 pav. Peptidų pVEC (raudona kreivė) ir cys-pVEC (juoda kreivė) sąveika su *E. coli* MC4100 (A) ir IQ86 (B) ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0.1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Įdėtų peptidų galutinės koncentracijos nurodytos grafikuose. Galutinė gramicidino D koncentracija (GD) – 5 µg/ml, o polimiksino B (PMB) – 100 µg/ml.

Tuo tarpu *E. coli* IQ86 ląstelės, tikriausiai dėl TetA siurblio veiklos, yra mažiau laidžios TPP⁺ jonams. Dėl to nėra matomas nei pradinis TPP⁺ jonų sugėrimas, nei peptidų sukeltas sugertų jonų ištekėjimas iš ląstelių (3.1 pav., B).

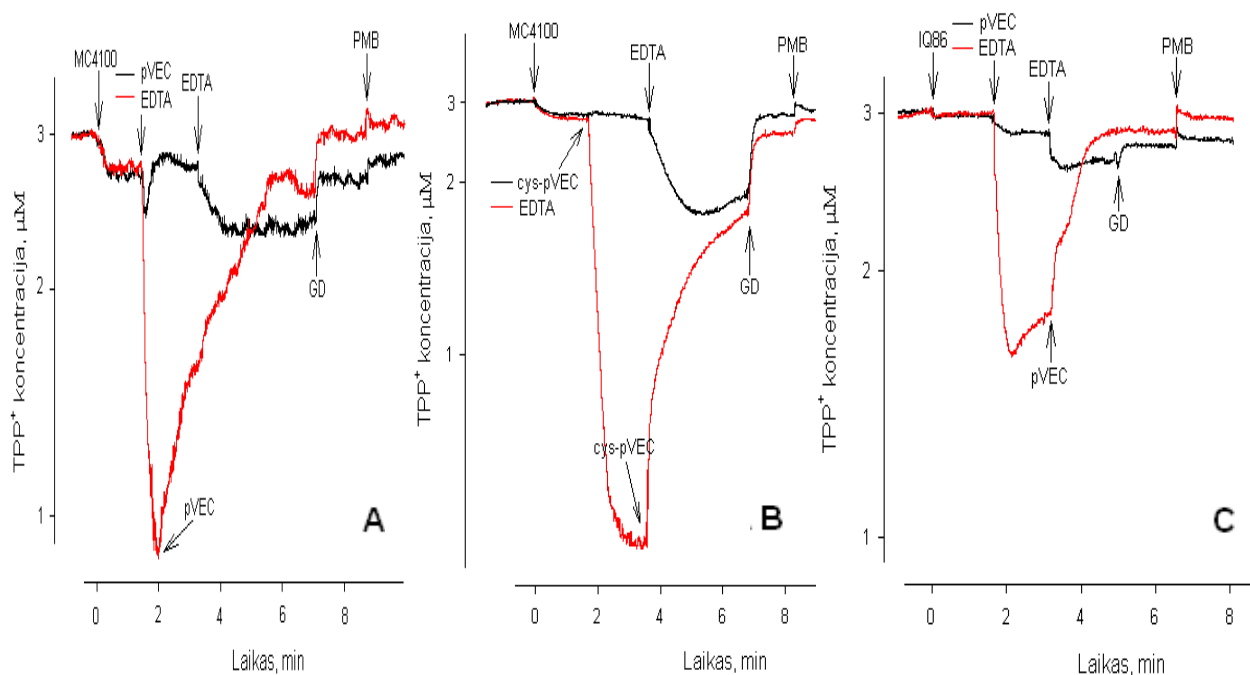
Nustačius, jog peptidai pVEC ir cys-pVEC beveik nelaidina IM, buvo atliekami eksperimentai su EDTA apdorotomis ląstelėmis (3.2 pav.). Yra žinoma, kad EDTA yra junginys, terpėje surišantis divalenčius Mg²⁺ ir Ca²⁺ jonus, ir taip padidinantis gramneigiamųjų bakterijų IM laidumą (Marvin ir kt., 1989).



3.2 pav. Peptidų pVEC (A) ir cys-pVEC (B) sąveika su EDTA laidintomis (raudona kreivė) ir nelaidintomis (juoda kreivė) *E. coli* MC4100 ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0.1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Įdėtų peptidų galutinės koncentracijos nurodytos grafikuose, GD – 5 µg/ml ir PMB – 100 µg/ml.

Didinant peptidų koncentraciją Tris/EDTA laidintų ląstelių suspensijoje, ląstelių PM palaipsniui depoliarizuojama ir iš ląstelių išbėga sukaupti TPP^+ jonai.

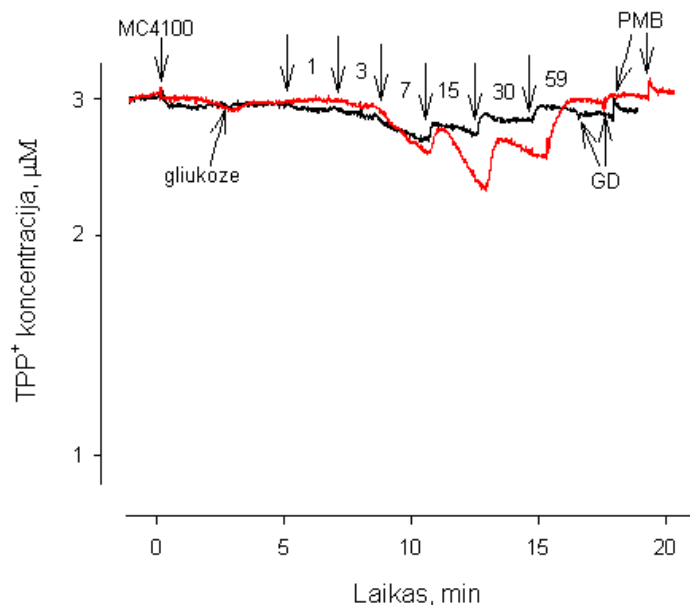
Parinkus laidinančias peptidų koncentracijas, buvo tiriamas EDTA poveikis *E. coli* ląstelių apvalkalėliui, šį kompleksoną dedant į ląstelių suspensiją (3.3 pav.). Į ląstelių suspensiją įdėjus 10 μM peptido pVEC stebimas tik nedidelis TPP^+ jonų sugėrimas IQ86 ląstelių atveju (3.3 pav. C). Su *E. coli* MC4100 ląstelėmis peptidų sukeltų sugėrimo pokyčių mes nematome (3.3 pav., A ir B). Po peptidų įdėjus EDTA junginio, stebimas TPP^+ jonų sugėrimas. Jis yra mažesnis, lyginant su jo sukeliama indikatorinių jonų sugėrimu dedant jį iš karto po ląstelių. Po EDTA pridėjus peptidų priedą, stebima ląstelių PM depoliarizacija. Galima pastebėti, kad IQ86 ląstelių atveju PM depoliarizacija vyksta dviem pakopomis. Be to, EDTA sukeltas TPP^+ jonų sugėrimas yra mažesnis su IQ86 ląstelėmis nei su MC4100 ląstelėmis. Iš šių pastebėjimų galima daryti išvadą, kad peptidai pVEC ir cys-pVEC nelaidina IM lipofiliniams jonams, tačiau sukelia stiprią PM depoliarizaciją.



3.3 pav. Peptido pVEC (A, C) ir cys-pVEC (B) sąveika su *E. coli* MC4100 (A, B) ir IQ86 (C) ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Įdėto peptido galutinė koncentracija 10 μM , EDTA – 2 mM, GD – 5 $\mu\text{g/ml}$ ir PMB 100 $\mu\text{g/ml}$.

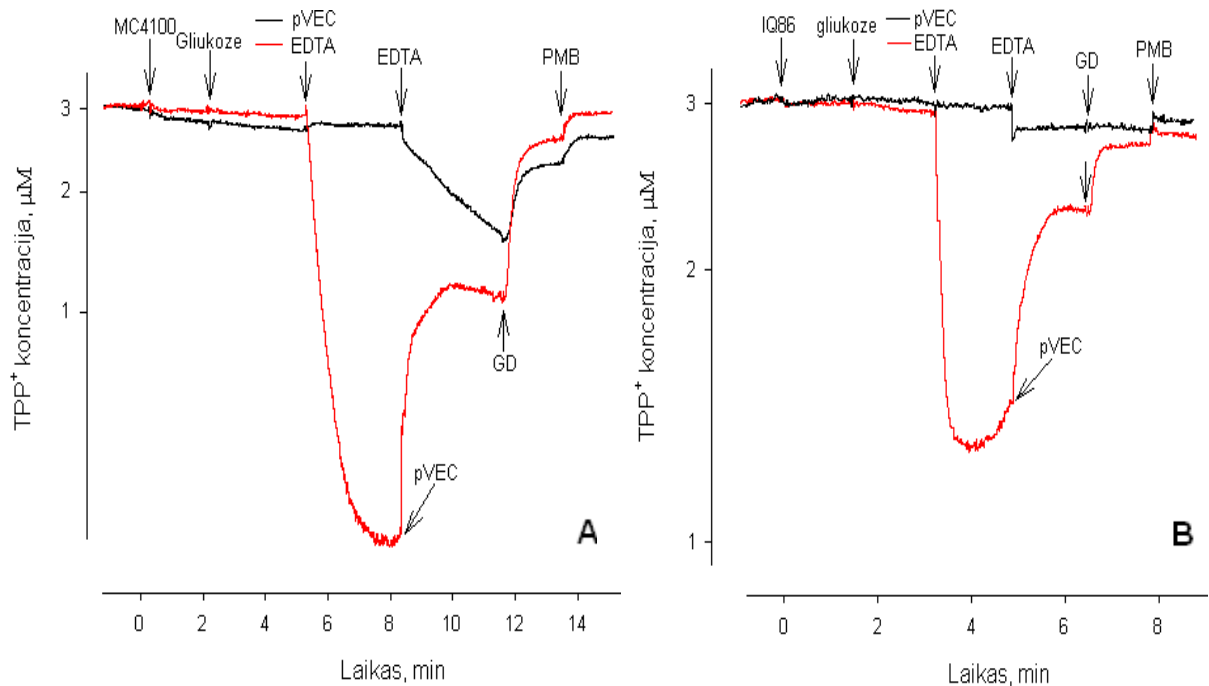
Įsitikinę, kad peptidų pVEC ir cys-pVEC poveikis ląstelėms beveik nesiskiria, mes toliau eksperimentus atlikome tik su peptidu pVEC. Yra žinoma, kad ląstelės energetinė būseną turi įtakos jų siurblių aktyvumui ir lipidų pasiskirstymui PM sluoksniuose. Deenergizuotos ląstelės pasižymi sumažintu siurblių aktyvumu, taip pat vyksta fosfolipidų mainai tarp išorinės ir vidinių membranų (Oh ir kt., 1998).

Žinant tai, buvo patikrinta peptido pVEC sąveika su *E. coli* ląstelių apvalkalėliu terpėje esant gliukozei. Į *E. coli* MC4100 ląstelių suspensiją įdėjus gliukozės ir vėliau titruojant peptidu, stebimas padidėjęs peptido laidinantis poveikis (3.4 pav.). Kaip ir sąveikoje be gliukozės, taip ir su gliukoze, 7 μM peptido pVEC pralaidina *E. coli* IM TPP⁺ jonams (žiūr. 3.1 ir 3.4 pav.). Peptido pVEC koncentracijai pasiekus 30 μM, prasideda ląstelės PM depoliarizacija. Grafikas su IQ86 kamieniu nepateiktas, kadangi gliukozės buvimas terpėje jokių pokyčių, stebint TPP⁺ jonų srautus, nesukelia.



3.4 pav. Peptido pVEC sąveika su *E. coli* MC4100 ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0.1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Gliukoze energizuotos ląstelės - raudona kreivė ir neenergizuotos ląstelės – juoda. Įdėtų peptidų galutinės koncentracijos nurodytos grafike, gliukozės – 0,4 μg/ml, GD – 5 μg/ml ir PMB – 100 μg/ml.

Parinkus *E. coli* IM laidinančias koncentracijas, buvo toliau stebimi TPP⁺ jonų srautai matavimo terpėje su gliukoze (3.5 pav.). Buvo pastebėta, kad į terpę įdėjus gliukozės ir vėliau peptido, pastarasis neturėjo įtakos bakterijų IM laidumui. Peptido pVEC sukelta depoliarizacija ir EDTA sukeltas TPP⁺ jonų sugėrimas buvo didesni su energizuotomis ląstelėmis (palyginti 3.5 pav. ir 3.3 pav.). Tiesa, IQ86 ląstelių atveju 10 μM peptido pVEC koncentracija, priešingai nei terpėje be gliukozės, yra nepakankama visiškai ląstelės PM depoliarizacijai sukelti (palyginti 3.3 pav. C ir 3.5 pav. B)



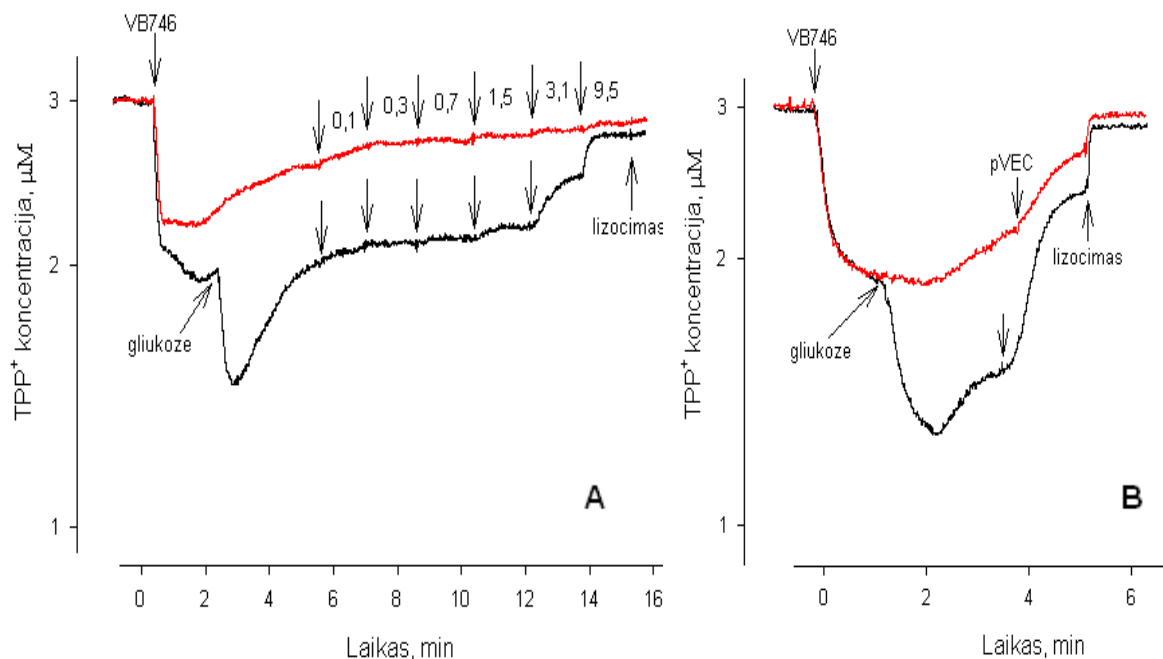
3.5 pav. Peptido pVEC sąveika su gliukoze energizuotomis *E. coli* MC4100 (A) ir IQ86 (B) ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Įdėto peptido galutinė koncentracija 10 µM, EDTA – 2 mM, gliukozės – 4 µg/ml, GD – 5 µg/ml ir PMB – 100 µg/ml.

3.2 Peptido pVEC poveikis gramteigiamųjų bakterijų apvalkalėliui

Gramteigiamosios bakterijos savo sienelės struktūroje neturi IM, todėl įvairioms lipofilinėms medžiagoms, tuo pačiu ir TPP⁺ jonams, prasiskverbti į ląstelės vidų yra daug lengviau. Mes atlikome eksperimentus su gramteigiamosiomis *B. subtilis* VB746 kamieno ląstelėmis, stebėdami peptido pVEC sukeltus jonų srautus.

Atlikę titravimus peptidu, mes pirmiausia įsitikinome, kokios koncentracijos pastebimai veikia *B. subtilis* ląsteles (3.6 pav. A). Ankstesni eksperimentai parodė, kad gramteigiamųjų bakterijų augimo slopinimui reikia daug mažesnių pVEC koncentracijų nei gramneigiamųjų bakterijų augimo slopinimui (Palm ir kt., 2006). Visiškai *B. subtilis* ląstelių PM depoliarizacijai sukelti, prireikė gerokai mažesnių koncentracijų nei su *E. coli* ląstelėmis (palyginti 3.2 pav. A ir 3.6 pav. A). Įdėjus gliukozės, mes pirmiausiai matome TPP⁺ jonų srautus į ląstelių vidų, o vėliau, įsijungus siurbliams, jų išmetimą į terpę. Ilgainiui nusistovi stabili TPP⁺ koncentracija terpėje. Tuomet titruojant peptidu išryškėja, kad ląstelių PM depoliarizacija prasideda peptido pVEC koncentracijai pasiekus 1,5 µM. Peptido sukelta ląstelių depoliarizacija matavimuose be gliukozės sutampa su savaiminiu TPP⁺ jonų ištekėjimu

iš ląstelių. Po gliukozės įdėjus 2 μM peptido, mes matome ryškia ląstelių depoliarizaciją (3.6 pav., B). Terpėje be gliukozės pVEC sukelta depoliarizacija mažiau ryški.



3.6 pav. Peptido pVEC sąveika su *B. subtilis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Gliukoze energizuotos ląstelės – juoda kreivė, neenergizuotos ląstelės – raudona. Galutinė peptido koncentracija nurodyta grafike (A) ir 2 μM (B), gliukozės – 4 $\mu\text{g/ml}$, lizocimo – 100 $\mu\text{g/ml}$.

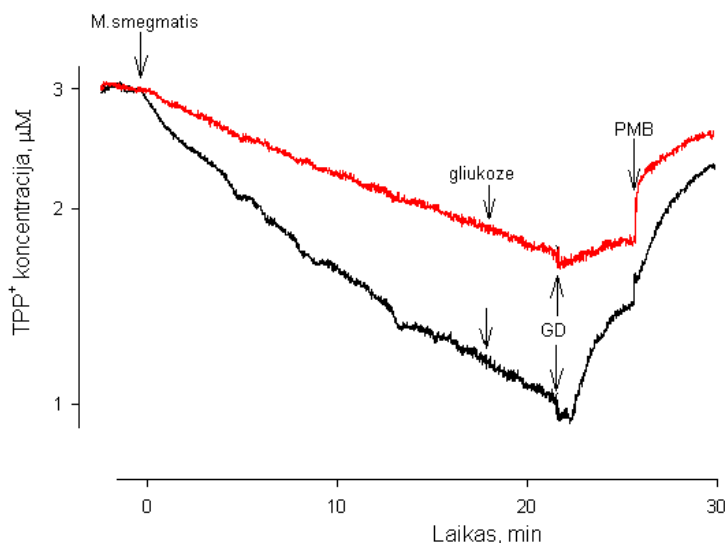
3.3 Peptido pVEC poveikis mikobakterijų apvalkalėliui

Mikobakterijos augdamos skystoje terpėje linkusios agreguoti, todėl dažnai yra auginamos su detergentais, pavyzdžiui, Tween 80, kuris augimo metu neleidžia bakterijoms sukibti. Taip auginamos ląstelės prieš eksperimentus yra kelis kartus plaunamos. Pabandžius taip auginti bakterijas, mes įsitikinome, kad šis ląstelių auginimo būdas mums netinka. Detergentas Tween 80 veikia matavimo elektrodus, o ląsteles kelis kartus plaunant, jos gali prarasti savo sienelės struktūros elementus, tokius kaip laisvuosius lipidus. Dėl to sienelės struktūra gali pakisti. Be to, Tween 80 yra naudojamas *in vitro* kaip polimerinis vėžinių ląstelių siurblių slopiklis (Friche ir kt., 1990). Todėl jis gali veikti ir *M. smegmatis* ląstelių siurblius. Vengiant jo poveikio mikobakterijų apvalkalėliui, mes pasirinkome auginti bakterijas natūraliomis sąlygomis, nenaudojant jokių papildomų priemonių sukibimui išvengti bei jų suspensiją ruošti po pirmo plovimo.

Pirmiausia norėjome pasižiūrėti, kuo skiriasi agregavusių ir neagregavusių ląstelių sąveika su TPP^+ jonais (3.7 pav.). Pasirodo, principinio skirtumo tarp agregavusių ir

neagregavusių ląstelių nėra. Neagregavusios ląstelės sugeria didesnę TPP⁺ jonų kiekį, tačiau tai daugiausiai priklauso nuo į matavimo buferį įnešamo ląstelių kiekio (agregavusios ląstelės įneštos remiantis jų užimamu tūriu, o neagregavusios – optiniu tankiu po resuspendavimo). Reikia atkreipti dėmesį, kad praėjus 20 minučių po ląstelių priedo, dar nėra nusistovėjusi TPP⁺ jonų pusiausvyra tarp ląstelių ir matavimo terpės. Tokia pusiausvyra su gramneigiamosiomis ir gramteigiamosiomis bakterijomis nusistovi vos per kelias minutes (žiūr., 3.1 ir 3.6 pav.). Greičiausiai TPP⁺ jonų pasiskirstymo greitį lemia savita mikobakterijų apvalkalėlio struktūra, kuri yra mažai laidži net ir lipofilinėms medžiagoms (Liu ir kt., 1996; Wang ir kt., 2000).

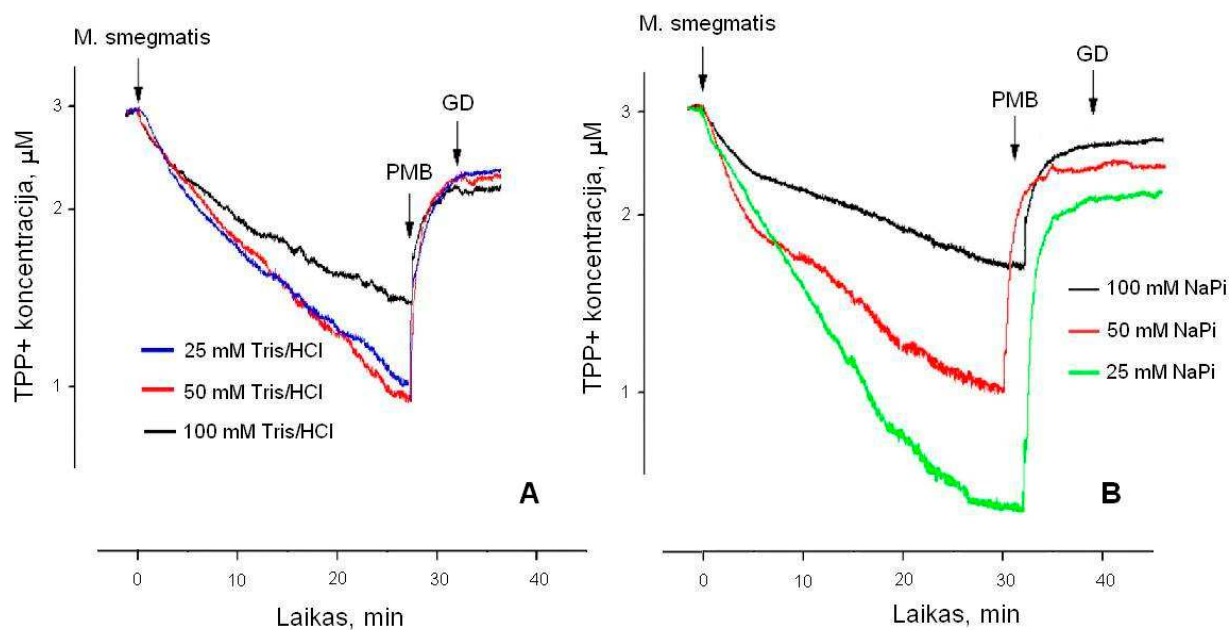
Gliukozė yra naudojama tiek gramteigiamųjų, tiek gramneigiamųjų bakterijų siurblių energizavimui. Yra duomenų, kad mikobakterijų siurblių energizavimas gliukoze didelės įtakos jų aktyvumui neturi (Rodrigues ir kt., 2008). Todėl mes norėjome pasižiūrėti, ar mūsų sistema gali registruoti net ir nedidelius siurblių aktyvumo pokyčius. Tačiau po gliukozės priedo jokių pokyčių TPP⁺ jonų sugėrimui nematome. Tolesniuose eksperimentuose gliukozės nenaudojome. Gramicidinas D (GD) – monovalentinių katijonų nešiklis, palyginti lėtai depoliarizuoja mikobakterijų PM. Po GD įnešus PMB, mes matome ląstelių PM depoliarizaciją (PMB sąveika su *M. smegmatis* apvalkalėliu plačiau aptarta 3.4 skyriuje).



3.7 pav. TPP⁺ jonų sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Agregavusios ląstelės - raudona kreivė, neagregavusios - juoda. Galutinė gliukozės koncentracija – 4 µg/ml, GD – 5 µg/ml, PMB - 50 µg/ml.

Įsitikinę, kad TPP⁺ jonų srautus galima stebėti tiesiogiai, mes atlikome matavimus su *M. smegmatis* ląstelėmis skirtingose terpėse (3.8 pav.). Kaip jau yra žinoma, Tris terpė laidina gramneigiamųjų bakterijų IM. Tris molekulės jungiasi su LPS ir pakeičia juos stabilizuojančius divalenčius Ca²⁺ ir Mg²⁺ jonus bei sumažina sąveiką tarp LPS molekulių

(Nikaido ir Vaara, 1985). Natrio fosfato buferis yra tipinė terpė, naudojama potenciometrinuose matavimuose.



3.8 pav. TPP⁺ jonų sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti skirtingos koncentracijos Tris/HCl (pH 8, A) ir natrio fosfato (pH 8, B) terpėse, esant 37 °C temperatūrai. Galutinė GD koncentracija – 5 µg/ml, PMB - 50 µg/ml.

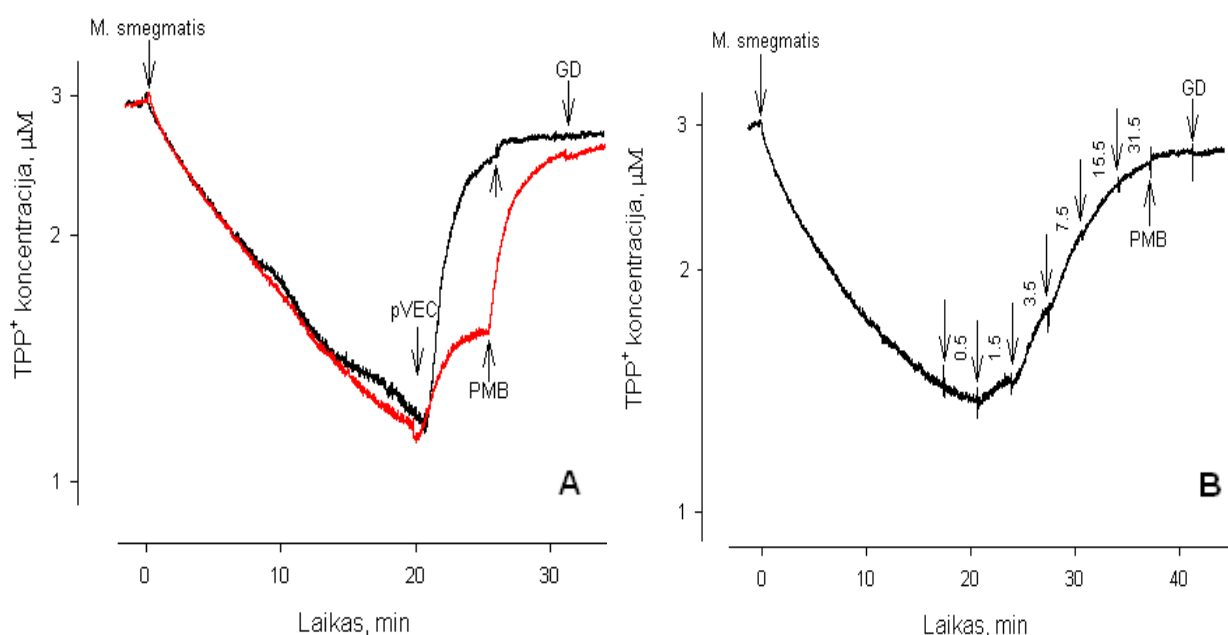
Lyginant TPP⁺ jonų pasiskirstymą tarp ląstelių ir matavimo terpės, reikia pastebėti, kad Tris terpėje ląstelės sugeria panašų kiekį TPP⁺ jonų nepriklausomai nuo terpės koncentracijos. Natrio fosfato buferyje sugėrimo kiekis priklauso nuo šios terpės koncentracijos. Kuo mažesnė terpės koncentracija, tuo stipriau ląstelės sąveikauja su TPP⁺ jonais – matome didesnę sugėrimo amplitudę. Ląstelės depoliarizavus PMB į terpę sugrįžta ne visi su ląstelėmis susirišę TPP⁺ jonai. Tai reiškia, kad priklausomai nuo joninės jėgos, ląstelės ne tik sugeria skirtingą TPP⁺ jonų kiekį, bet ir suriša dalį TPP⁺ jonų ląstelės apvalkalėlyje. Padarę išvadą, kad mūsų atliekamiems eksperimentams labiausiai tinka Tris terpė, tolesnius matavimus su *M. smegmatis* bakterijomis atlikome 100 mM Tris/HCl.

Ieškant optimalios temperatūros matavimams, mes atlikome matavimus esant 22 ir 37 °C temperatūrai ir pastebėjome, kad ląstelių ir TPP⁺ jonų sąveikos greitis ir intensyvumas priklauso nuo temperatūros (grafikas nepateiktas). Kuo žemesnė temperatūra, tuo silpniau TPP⁺ jonai rišasi su ląstelėmis. Žinant, kad mikobakterijų išorinio lipidinio sluoksnio fazinio perėjimo temperatūra yra tik ties 70 °C (Liu ir kt., 1996), kuo žemesnėje temperatūroje yra atliekami matavimai, tuo kompaktiškesnę struktūrą užima mikolinės rūgštys. Iš kitos pusės, siurblių, palaikančių membranos įtampą, aktyvumas sulėtėja esant žemesnei temperatūrai.

Todėl silpnesnė TPP⁺ jonų sąveika esant 22 °C temperatūrai gali būti įtakota ir mažiau laidaus išorinio lipidinio sluoksnio, ir membraninių baltymų.

Parinkę optimalius matavimo parametrus eksperimentams, atlikome matavimus su peptidu pVEC (3.9 pav.). Jau anksčiau buvo pastebėta, kad peptidas pVEC prasiskverbia pro mikobakterijų apvalkalėlį ir pereina į ląstelės citozolį, tuo pačiu inaktyvuodamas ląsteles (Nekhotiaeva ir kt., 2004).

Pirmiausia atlikome eksperimentus, norėdami pažiūrėti, kaip šis peptidas sąveikauja su mikobakterijų apvalkalėliu. Tam buvo atliekami titravimai su peptidu pVEC (3.9 pav. B). Terpėje esant 1,5 μM peptido koncentracijai prasideda ląstelės PM depoliarizacija. Parinkę dvi skirtingas peptido pVEC koncentracijas mes pastebėjome, kad 2 μM pVEC yra nepakankami visiškai ląstelės PM depoliarizacijai sukelti. Tačiau 10 μM koncentracijos užtenka visiems TPP⁺ jonams pereiti iš ląstelių citozolio į matavimo buferį (3.9 pav. A). Reiktų atkreipti dėmesį, jog mikobakterijų sąveika su TPP⁺ jonais trunka ilgiau nei pusę valandos, tačiau depoliarizacijos sukeltas TPP⁺ jonų ištekėjimas užtrunka vos kelias minutes.



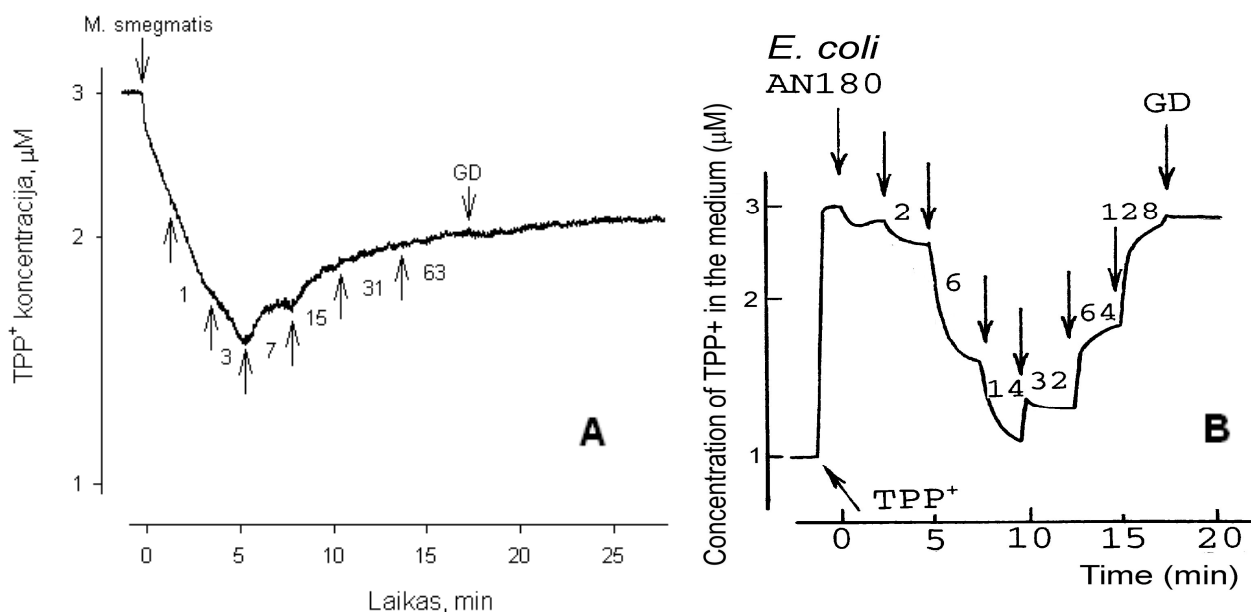
3.9 pav. Peptido pVEC sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Galutinė peptido pVEC koncentracija grafike A – 2 μM (raudona kreivė) ir 10 μM (juoda kreivė), B – galutinė peptido pVEC koncentracija nurodyta grafike, PMB - 50 μg/ml, GD – 5 μg/ml.

3.4 Polimiksino B įtaka *M. smegmatis* ląstelėms

Pastebėję, kad PMB depoliarizuoja mikobakterijas (3.8 pav.), nusprendėme atlikti tolimesnius tyrimus su šiuo antibiotiku. Yra žinoma, kad PMB yra pentakacijoninė ampifilinė molekulė, kuri yra baktericidiška gramneigiamosioms bakterijoms. PMB veikia dviem stadijom, kurias galima atskirti (Daugelavičius ir kt., 2000). Pirmiausia PMB jungiasi prie gramneigiamųjų bakterijų IM ir ją pralaidina (subletali fazė). Tai leidžia šiai molekulei prasiskverbti iki PM ir sukelti medžiagų ištekėjimą iš ląstelės citoplazmos (letali fazė) (Vaara, 1992).

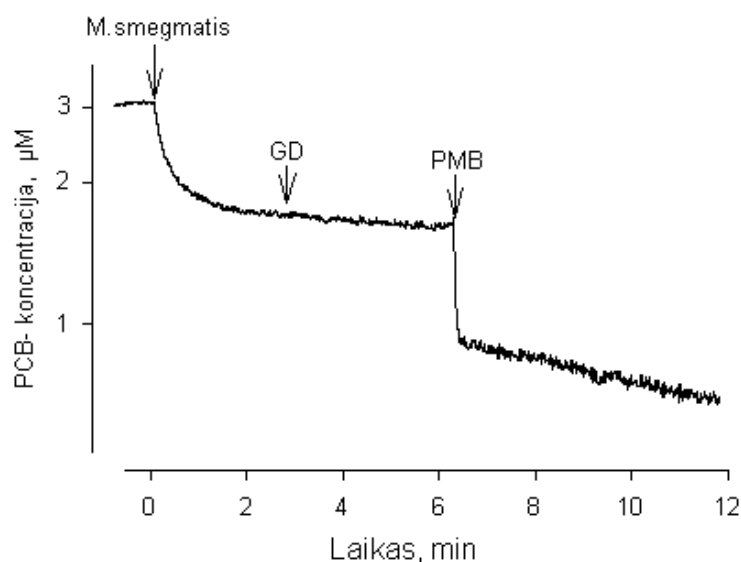
Iki šiol PMB ir mikobakterijų sąveikos tyrimų beveik nėra atlikta. Tačiau yra žinoma, kad polikacijoniniai junginiai, tokie kaip polimiksino B nonapeptidas, pralaidina ir *M. vaccae* ląstelių IM (Korychka-Machala ir kt., 2001). Šis junginys pasižymi daug silpnesniu poveikiu gramneigiamosioms bakterijoms: bakterijų augimas slopinamas esant palyginti didelėmis koncentracijoms, tačiau jų apvalkalėlio IM laidinimui hidrofobinėms medžiagoms užtenka labai nedidelių koncentracijų (Daugelavičius ir kt., 2000). Taip pat yra duomenų, kad PMB slopina mikobakterijų augimą, o jas painkubavus su šiuo antibiotiku, jos praranda savybę agreguoti (Yasue, 2000). Bet patogeniniai mikobakterijų atstovai *M. avium* ir *M. intracellulare* yra atsparūs didesnei nei 500 µg/ml PMB koncentracijai (McGarvey ir Bermudez, 2001). Nustatę mažiausią slopinančią PMB koncentraciją (MIC) *M. smegmatis* ląstelėms mikroskiedimų metodu, gavome, kad ląstelių augimas yra visiškai nuslopinamas, esant 32 µg/ml PMB koncentracijai.

Antibiotiku titruodami ląstelių suspensiją ir stebėdami TPP⁺ jonų srautus pabandėme išsiaiškinti, kaip šis antibiotikas sąveikauja su *M. smegmatis* ląstelėmis (3.10 pav., A). Mes nematome dvipakopio PMB poveikio *M. smegmatis* ląstelėms, kuris stebimas šiuo antibiotiku titruojant ir registruojant indikatorinių jonų srautus *E. coli* ląstelių apvalkalėliui (3.10 pav., B; Daugelavičius ir kt., 2000). Antibiotikas nesukelia TPP⁺ jonų srauto į ląstelių vidų sustiprėjimo, kas yra stebima vykstant pirmajai subletalai veikimo stadijai *E. coli* ląstelių atveju. Didinant PMB koncentracijas, yra matomas tik TPP⁺ jonų ištekėjimas – antroji letali antibiotiko veikimo stadija. Maksimali depoliarizacija pasiekama terpėje esant 31 µg/ml PMB koncentracijai, nors pasilieka didelis kiekis TPP⁺, surišto su ląstelėmis. Ankstesniuose eksperimentuose 50 µg/ml PMB koncentracija buvo pakankama visiškam TPP⁺ jonų iš ląstelių atpalaidavimui (3.8 pav.). Reikia pastebėti, kad ta pati priklausomybė stebima ir su PMB jautriomis gramneigiamosiomis bakterijomis (rezultatai nepateikti).



3.10 pav. Polimiksino B sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis (A) ir *E. coli* AN180 ląstelėmis (B, Daugelavičius ir kt., 2000). Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Galutinė PMB koncentracija nurodyta grafikuose, GD – 5 µg/ml.

Norėdami įsitikinti, ar PMB iš tiesų sukelia ląstelių PM depoliarizaciją, o ne tik surištų TPP⁺ jonų atpalaidavimą iš ląstelių apvalkalėlio, mes tyrėme ir PMB sukeltus PCB⁻ jonų srautus (3.11 pav.). PCB⁻ yra lipofiliniai anijonai, kurie yra naudojami ląstelių biomasei įvertinti, bei gyvų ir negyvų ląstelių kiekiui tiriamajame mėginyje nustatyti (Daugelavičius ir kt., 2001). Taip pat yra pastebėta, kad PCB⁻ jonai labai efektyviai jungiasi su bakterinių ląstelių membranomis, šias pralaidinus PMB (Daugelavičius ir kt., 1997).



3.11 pav. PCB⁻ jonų sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Galutinė GD koncentracija – 5 µg/ml, o PMB – 50 µg/ml.

Reikia pastebėti, kad PCB^- jonai efektyviai rišasi su intaktinėmis *M. smegmatis* ląstelėmis – pusiausvyrinė koncentracija terpėje, skirtingai nei TPP^+ jonų atveju, nusistovi greičiau nei per minutę. GD sukelta depoliarizacija vyksta gana lėtai stebint TPP^+ jonų srautus (3.7 pav.), bet neturi įtakos PCB^- jonų surišimui. Tačiau į ląstelių suspensiją įnešus PMB (50 $\mu\text{g/ml}$), pradžioje stebimas greitas papildomas PCB^- jonų susirišimas su ląstelėmis, po kurio vyksta antroji – lėta PCB^- sugėrimo stadija. Tai rodo, kad PMB poveikis mikobakterijų apvalkalėliui yra kompleksinis.

3.5 Slopiklių sąveika su *M. smegmatis* DVA siurbliais

Mikobakterijos pasižymi DVA, tačiau apie jo mechanizmus vis dar mažai žinoma. Pradžioje buvo manyta, jog DVA atsparumas yra nulemtas mutacijų, atsiradusių po ilgo veikimo antimikrobiniais vaistais, tačiau pasirodo vis daugiau duomenų apie siurblius, kurie dalyvauja DVA suformavime.

Yra žinoma, kad *M. tuberculosis* bakterijos yra atsparios visiems pirmos eilės tuberkuliozės vaistams bei daugeliui antros eilės vaistų. Vis daugiau atrandama vaistų išmetimo siurblių, kurie dalinai atsakingi už atsparumą šiems vaistams. *In vitro* šių siurblių veiklą bandoma užblokuoti DVA siurblių slopikliais. Daugiausiai tyrimų atliekama su rezerpinu, chlorpromazinu, chlorfenilhidrazonu, vanadatu, verapamilu, tioridazinu ir kitais slopikliais.

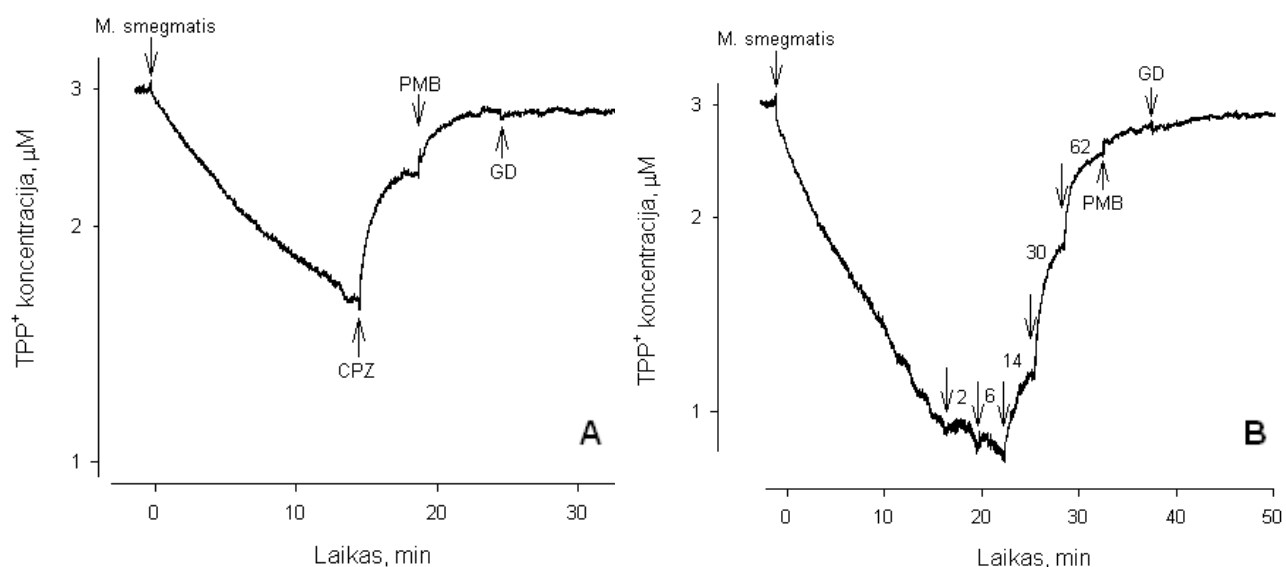
3.5.1 Chlorpromazino sąveika su *M. smegmatis* ląstelių apvalkalėliu

Chlorpromazinas yra sintetinis vaistas, priklausantis fenotiazinų klasei. Pastebėjus jo antimikrobinį poveikį praėjusio amžiaus viduryje jis buvo pradėtas plačiai naudoti tuberkuliozės gydymui. Tačiau įsitikinus, kad jis pasižymi stipriu šalutiniu poveikiu organizmui, ir tuo, kad jis veikia ne tik bakterijas, bet ir žinduolių ląsteles, jo kaip vaisto prieš tuberkuliozę buvo atsisakyta (Amaral ir kt., 2007).

Nepaisant jo šalutinių efektų, šiandien atliekama nemažai tyrimų su šiuo antibiotiku *in vitro*, bandant jį panaudoti kartu su kitais vaistais mikobakterijų atsparumui įveikti (Rodrigues ir kt., 2008). Ypač tai svarbu dėl to, kad DVA mikobakterijose dar tik pradėdamas tirti ir suprasti.

Žinant, kad mikobakterijos yra ilgai augančios bakterijos, ypač tai pažymėtina apie patogenines jų atstoves, svarbu atrasti metodus, greitam ir efektyviam vaistų efektyvumo įvertinimui. Todėl mes pasirinkome chlorpromaziną, kaip mikobakterijų augimą nuslopinantį

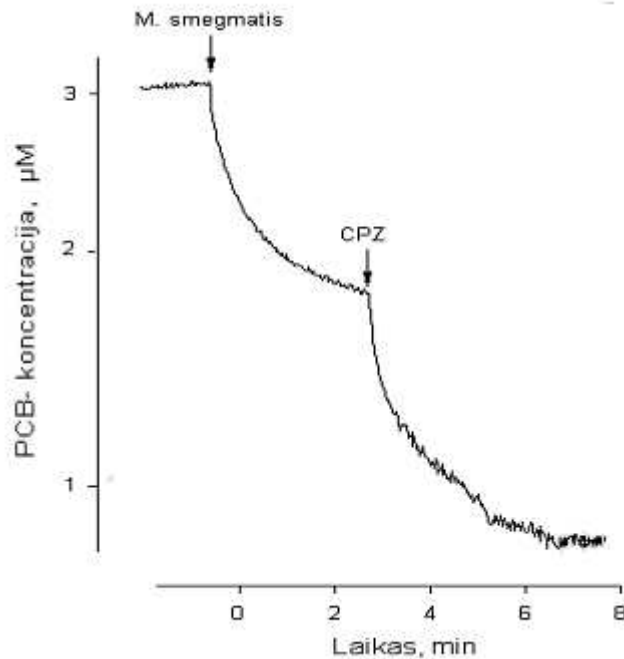
vaistą (MIC 64 $\mu\text{g/ml}$) ir, tuo pačiu, žinomą DVA siurblių slopiklį, bei atlikome eksperimentus su *M. smegmatis* ląstelėmis.



3.12 pav. Chlorpromazino sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Galutinė chlorpromazino koncentracija A – 30 $\mu\text{g/ml}$; B – nurodyta grafike, PMB - 50 $\mu\text{g/ml}$, GD – 5 $\mu\text{g/ml}$.

Pirmiausia norėjome pažiūrėti, kaip šis vaistas veikia ląstelių membranos įtampą. Tam mes atlikome eksperimentus stebėdami TPP⁺ jonų srautus (3.12 pav.). Pastebėjome, kad į terpę įnešus 30 $\mu\text{g/ml}$ chlorpromazino, šis DVA išmetimo siurblių slopiklis depoliarizuoja *M. smegmatis* ląstelių PM (3.12 pav. A). Tai rodo, kad šis vaistas veikia DVA siurblius ne inaktyvuodamas juos, bet blokuodamas jų veiklos aprūpinimą energija. Taip pat mes atlikome titravimus su šiuo vaistu (3.12 pav. B). Net ir mažos chlorpromazino koncentracijos nesukelia papildomo TPP⁺ jonų sugėrimo, o didinant jo koncentraciją, stebimas depoliarizacijos intensyvėjimas. Terpėje esant 62 $\mu\text{g/ml}$ chlorpromazino koncentracijai, mes matome pilną depoliarizaciją. Tai sutampa su koncentracija, kuri pilnai nuslopina *M. smegmatis* ląstelių augimą.

Stebėdami PCB⁻ jonų srautus, įsitikinome, kad chlorpromazinas veikia *M. smegmatis* ląstelių PM depoliarizuojančiai. Vos 10 $\mu\text{g/ml}$ chlorpromazino sukelia papildomą PCB⁻ jonų sugėrimą (3.13 pav.)



3.13 pav. Chlorpromazino poveikis PCB⁻ sąveikai su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37 °C temperatūrai. Galutinė chlorpromazino koncentracija– 10 µg/ml.

3.5.2 Chlorpromazino poveikis *M. smegmatis* ląstelių jautrumui ampicilinui

Ampicilinas priklauso β -laktaminiams antibiotikams, vienai iš plačiausiai naudojamų antibiotikų grupei. Šie antibiotikai blokuoja peptidoglikano sintezę ląstelėse. Bakterijų atsparumas šiems antibiotikams dažniausiai susijęs su β -laktamazių veikla, kurios inaktyvuoja šiuos antibiotikus. Yra žinoma, kad mikobakterijos yra atsparios šiems antibiotikams, todėl priešingai nei kitų bakterijų atveju, β -laktamai nėra naudojami mikobakterijų sukeltoms ligoms gydyti. Mikobakterijų atsparumas šiems vaistams taip pat dažniausiai siejamas su β -laktamazių veikla (Flores ir kt., 2005). Tačiau yra parodyta, kad *M. tuberculosis* ląstelių LfrA siurblys yra iš dalies atsakingas už atsparumą šiems antibiotikams (Danilchanka ir kt., 2008).

Įvertinę, kad *M. smegmatis* bakterijos yra jautrios didesnėms nei 128 µg/ml ampicilino koncentracijai, mes pabandėme išsiaiškinti, ar šis atsparumas yra nors iš dalies susijęs su DVA siurblių veikla. Tam mes atliko mikroskiedimus ir įvertinome, ar chlorpromazinas didina mikobakterijų jautrumą šiam vaistui (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Chlorpromazino poveikis ampicilino mažiausiai slopinančiai koncentracijai.

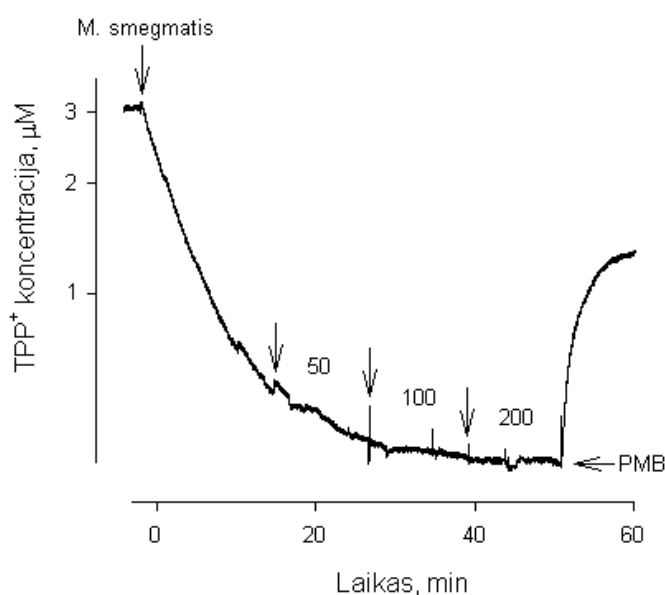
Chlorpromazinas ($\mu\text{g/ml}$)	15	20	25	30	35
Ampicilinas ($\mu\text{g/ml}$)	>128	128	32	8	>1

Kaip matyti iš 3.1 lentelėje pateiktų duomenų, chlorpromazinas lemia, kad mikobakterijos tampa jautrios ampicilinui. Žinant, kad chlorpromazino MIC yra $64 \mu\text{g/ml}$, kartu net ir su mažesnėmis nei $1 \mu\text{g/ml}$ ampicilino koncentracijom, jo užtenka perpus mažiau ($35 \mu\text{g/ml}$) tam, kad būtų visiškai nuslopintas ląstelių augimas.

Iš šių rezultatų galima spręsti, kad atsparumas ampicilinui yra susijęs ne tik su β -laktamazių, bet ir su DVA išmetimo siurblių veikla *M. smegmatis* ląstelėse.

3.5.3 Rezerpino sąveika su *M. smegmatis* ląstelių apvalkalėliui

Rezerpinas yra natūralus alkaloidas, kuris pasižymi DVA išmetimo siurblius slopinančiomis savybėmis. Rezerpinas plačiai naudojamas *in vitro* kaip mikobakterijų siurblių slopiklis, daugiausiai atsakingas už ABC didšeimei priklausančių siurblių inaktyvavimą (Choudhuri ir kt., 2002; Pasca ir kt., 2004; Pasca ir kt., 2005).



3.14 pav. Rezerpino sąveika su *M. smegmatis* ląstelėmis. Eksperimentai atlikti 0,1 M Tris-HCl (pH 8), esant 37°C temperatūrai. Galutinė rezerpino koncentracija nurodyta grafike, PMB - $50 \mu\text{g/ml}$.

Norėdami išsiaiškinti, šio DVA siurblių slopiklio veikimo pobūdį ir poveikį *M. smegmatis* bakterijų membranos įtampai, mes atlikome eksperimentus su TPP⁺ jonais (3.14 pav.). Kaip matyti iš rezultatų, mums nepavyko užregistruoti rezerpino poveikio TPP⁺ jonus

išmetantiems siurbliams. Viena iš priežasčių, kodėl mes nematome jokio rezerpino poveikio TPP⁺ jonų pasiskirstymui, gali būti ta, kad TPP⁺ jonai nėra išmetami siurblių, kurių aktyvumą blokuoja rezerpinas.

3.5.4 Naujai susintetintų mikobakterijų siurblių slopiklių poveikis *M. smegmatis* ląstelėms

Krokuvos universiteto Technologijų ir vaistų biotechnologijos katedroje Dr. J. Handzlik ir Prof. K. Kiec-Kononowicz susintetino naujus junginius, kurie galėtų būti mikobakterijų DVA siurblių slopikliais. Bendradarbiaudami pagal COST projekto programą, mes ištyrėme šių junginių biologinį aktyvumą. Visų pirma šių medžiagų aktyvumas buvo patikrintas mikroskiedimų metodu (žiūr. priedą). Visų medžiagų MIC buvo daugiau nei 160 µg/ml, ir tik dvi medžiagos (DB-6 ir PDPH-3) slopino *M. smegmatis* ląstelių augimą esant mažesnėms nei 160 µg/ml koncentracijoms. Buvo patikrintas visų medžiagų poveikis *M. smegmatis* ląstelių jautrumui ampicilinui. Nė vienas iš potencialių slopiklių nepadidino ląstelių jautrumo šiam antibiotikui. Tačiau reikia turėti omenyje, kad ampicilinas blokuoja peptidoglikano sintezę, ir tik vienos klasės siurbliai šalina šį antibiotiką. Dėl to reikalingi papildomi tyrimai, nes šios medžiagos gali būti siurblių, nesusijusių su atsparumu ampicilinui, slopikliais.

Taip pat buvo atlikti ląstelių sąveikos su šiais junginiais tyrimai, stebint TPP⁺ jonų srautus. Eksperimentų metu buvo pastebėta šešių medžiagų įtaka TPP⁺ jonų pasiskirstymui tarp ląstelių ir terpės. Sąveikoje su *M. smegmatis* ląstelėmis RW-13 sukėlė papildomą TPP⁺ jonų sugėrimą, o JH-33, KJ-8, DB-6, RW-14c ir PDPH-3 – jonų atpalaidavimą iš ląstelių.

IŠVADOS

1. Peptidų cys-pVEC ir pVEC poveikis bakterijų apvalkalėliams yra panašus; peptidai prastai laidina gramneigiamųjų bakterijų išorinę membraną, tačiau sukelia tiek gramteigiamųjų, tiek gramneigiamųjų ir mikobakterijų plazminės membranos depoliarizaciją.
2. Tetrafenilfosfonio jonai lėtai pasiekia pusiausvyrinį pasiskirstymą per *M. smegmatis* ląstelių apvalkalėlį, bet greitai iš jų išteką depoliarizavus plazminę membraną. Tai rodo, kad yra keli keliai lipofiliniams junginiams prasiskverbti per mikobakterijų apvalkalėlį.
3. Polimiksinas B nepralaidina *M. smegmatis* ląstelių apvalkalėlio lipofiliniams junginiams, bet sukelia plazminės membranos depoliarizaciją.
4. Chlorpromazinas padidina *M. smegmatis* ląstelių jautrumą ampicilinui ir depoliarizuoja šią ląstelių plazminę membraną.
5. Nauji potencialūs DVA siurblių slopikliai neturi įtakos *M. smegmatis* ląstelių jautrumui ampicilinui, bet keletas junginių sąveikauja su TPP⁺ išmetančiais siurbliais.

SANTRAUKA

Šio darbo tikslas buvo ištirti antimikrobinių medžiagų ir daugiavaisčio atsparumo siurblių slopiklių poveikį bakterijų sąveikai su TPP⁺ jonais. Šiam tikslui pasiekti reikėjo ištirti antimikrobinių peptidų įtaką bakterinių apvalkalėlių laidumui, įvertinti *M. smegmatis* bakterijų apvalkalėlio sąveiką su TPP⁺ jonais ir jų pasiskirstymą veikiant šias polikatijoniniais junginiais bei ištirti daugiavaisčio atsparumo siurblių slopiklių įtaką TPP⁺ jonų pasiskirstymui abipus *M. smegmatis* bakterijų apvalkalėlio.

Šio darbo metu buvo parodyta, kad peptidų pVEC ir cys-pVEC sąveika su gramneigiamųjų *E. coli* bakterijų apvalkalėliu beveik nesiskiria: peptidai mažai laidina *E. coli* bakterijų išorinę membraną, bet depoliarizuoja jų plazminę membraną. Peptidas pVEC depoliarizuoja ir gramteigiamųjų *B. subtilis* bei mikobakterijų *M. smegmatis* plazminę membraną. Be to, buvo parodyta, kad TPP⁺ jonų srautų tyrimai gali padėti įvertinti mikobakterijų energetinę būseną. Polimiksinas B – antibiotikas prieš gramneigiamąsias bakterijas – nelaidina mikobakterijų *M. smegmatis* apvalkalėlio TPP⁺ jonams, bet depoliarizuoja jų plazminę membraną. Daugiavaisčio atsparumo siurblių slopiklis chlorpromazinas veikia mikobakterijų *M. smegmatis* plazminę membraną depoliarizuojančiai ir sumažina ampicilino koncentracijas, reikalingas mikobakterijų augimo slopinimui. Nauji potencialūs DVA siurblių slopikliai neturi įtakos *M. smegmatis* ląstelių jautrumui ampicilinui, bet keletas junginių sąveikauja su TPP⁺ išmetančiais siurbliais.

Justina Vaitiekutė

Effect of membrane permeabilizing compounds and multidrug resistance pump inhibitors on interaction of bacterial envelope with TPP⁺ ions

Summary

The aim of this work was to estimate the effect of membrane permeabilizing compounds and multidrug resistance pump inhibitors on interaction of bacterial envelope with TPP⁺ ions. To achieve the aim we worked on antimicrobial peptides and their interaction with bacterial envelopes, on estimation of interaction of *M. smegmatis* envelope with TPP⁺ ions and equilibration of these ions across mycobacterial envelope.

We have found that antimicrobial peptides pVEC and cys-pVEC have very similar effect on the envelope of gram-negative *E. coli* cells. They have little permeabilizing effect on the outer membrane but effectively depolarize the plasma membrane of *E. coli*. The peptide pVEC has depolarizing effect on both *B. subtilis* and *M. smegmatis* plasma membrane. We described interaction of *M. smegmatis* envelope with TPP⁺ ions. Polymyxin B has no permeabilizing effect on the mycobacterial cell wall, but it depolarizes the plasma membrane of *M. smegmatis*. Multidrug resistance pump inhibitor chlorpromazine increases the efficacy of ampicillin against *M. smegmatis* and has a depolarizing effect on mycobacterial plasma membrane. New potential multidrug resistance pump inhibitors have no effect on *M. smegmatis* sensitivity to ampicillin, however some of the compounds interacted with TPP⁺ efflux pumps.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Amaral A., M. Martins, and M. Viveiros** (2007) Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *J Antimicrob Chemother* 1-10.
- Bambeke Van F., J. M. Pages, and V. J. Lee** (2006) Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Anti-Infect Drug Discover* 2,157-75.
- Beveridge T. J., and S. F. Koval** (1981). Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol* 42, 325-335.
- Borges-Walmsley M. I., K. S. McKeegan, and A. R. Walmsley** (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance drugs. *Biochem J* 376, 313-338.
- Brennan P. J.** (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83, 91-97.
- Chen F. J., and H. J. Lo** (2003) Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 36, 1-9.
- Choudhuri B. S., S. Bhakta, R. Barik, J. Basu, M. Kundu, and P. Chakrabarti** (2002) Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biochem* 367, 279-285.
- Crovella S., N. Antcheva, I. Zelezetsky, M. Boniotto, S. Pacor, M. V. V. Falzacappa, and A. Tossi** (2005). Primate β -defensins – Structure, Function and Evolution. *Current Science* 6, 7-21.
- Danilchanka O., C. Mailaender, and M. Niederweis** (2008) Identification of the novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2503-2511.
- Daugelavičius R., J. K. H. Bamford, and D. H. Bamford** (1997) Changes in host cell energetics in response to bacteriophage PRD1 DNA entry. *J Bacteriol* 179, 5203-5210.
- Daugelavičius R., E. Bakienė, J. Beržinskienė, and D. H. Bamford** (2001) Use of lipophilic anions for estimation of biomass and cell viability. *Biotech Bioengin* 71, 208-216.
- Daugelavičius R., E. Bakienė and D. H. Bamford** (2000) Stages of Polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2969-2978.

- Doerrler W. T.** (2006) Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **60**, 542-52.
- El-Andaloussi S., T. Holm, and Ü. Langel** (2005) Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Current Pharmac Des* **11**, 3597-3611.
- Elmqvist A., M. Lindgren, T. Bartfai, and Ü. Langel** (2001) VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* **269**, 237-244.
- Engelhardt H., Ch. Heinz and M. Niederweis** (2002) A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bio Chem* **277**, 37567-37572.
- Falagas M. E. and A. Michalopoulos** (2006) Polymyxins: old antibiotics are back. *www.thelancet.com* **367**, 633-634.
- Falagas M. E. and S. K. Kasiakou** (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistance gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **40**, 1333-1341.
- Faller M., M. Niederweis, and G. E. Schulz** (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* **303**, 1189-1192.
- Flores A. R., L. M. parsons, and M. S. Pavelka** (2005) Genetic analysis of the β -lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to β -lactam antibiotics. *Microbiol* **151**, 521-532.
- Friche E., P. B. Jensen, M. Sehested, E. J. Demant and N. N. Nissen** (1990) The solvents cremophor EL and Tween 80 modulate daunorubicin resistance in the multidrug resistant Ehrlich ascites tumor. *Cancer Commun* **9**, 297-303.
- Guay G. G., M. Tuckman, and D. M. Rothstein** (1994) Mutations in the tetA(B) gene that cause a change in substrate specificity of the tetracycline efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 857-60.
- Hancock R. E. W., and D. S. Chapple** (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1317-1323.
- Hancock R. E. W., and R. Lehrer** (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *TIBTECH* **16**, 82-88.
- Hoffmann Ch., A. Leis, M. Niederweis, J. M. Plitzko, and H. Engelhardt** (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *PNAS* **10**, 3963-3967.
- Ysue T.** (2000) Antibacterial activity of Polymyxin B against *Mycobacterium smegmatis* R-15. *J Osaka City Med Center* **49**, 63-77.

- Karakousis P. C., R. B. William and S. E. Dorman** (2004) *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune responses. *Cell Microbiol* **6**, 105-116.
- Korycka-Machala M., A. Ziolkowski, A. Rumijowska-Galewicz, K. Lisowska ir L. Sedlaczek** (2001) Polycations increase the permeability of *Mycobacterium vaccae* cell envelopes to hydrophobic compounds. *Microbio* **147**, 2769-2781.
- Krupovic M., R. Daugelavičius, and D. A. Bamford** (2007) Polymyxin B induced lysis of marine Pseudoalteromonads. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3908-3914.
- La Porte D. C., K. S. Rosenthal and D. R. Storm** (1977) Inhibition of *Escherichia coli* growth and respiration by polymyxin B covalently attached to agarose beads. *Biochem* **16**, 1642-1648.
- Li X. Z., and H. Nikaido** (2004) Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2415-2423.
- Li X. Z., and H. Nikaido** (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**, 159-204.
- Lindgren M., M. Hällbrink, A. Prochiantz, and Ü. Langel** (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 99-103.
- Liu J., C. E. Barry, G. S. Besra, and H. Nikaido** (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* **47**, 29545-29551.
- Lomovskaya O., and W. J. Watkins** (2001) Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr Med Chem* **8**, 1699-1711.
- Lubelski J., W. N. Konings, and A. J. M. Driessen** (2007) Distribution of ABC-transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Bio Rev* **71**, 463-476.
- Lundberg P., and Ü. Langel** (2003) A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* **16**, 227-233.
- Mahamoud A., J. Chevalier, S. Alibert-Franco, W. V. Kern, J. M. Pages** (2007) Antibiotic efflux pumps in gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother* **1-7**.
- Marvin, H. J. P., M. B. ter Beest, and B. Witholt** (1989) Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J Bacteriol* **171**, 5262-7.
- McGarvey J. A., and L. E. Bermudez** (2001) Phenotypic and genomic analysis of *Mycobacterium avium* complex reveal differences in gastrointestinal invasion and genomic composition. *Infec Immun* **69**, 7242-7249.

- Midgley M.** (1986) The phosphonium ion efflux system of *Escherichia coli*: relationship to the ethidium efflux system and energetic studies. *J Gen Microbiol* **132**, 3187-3193.
- Nekhotiaeva N., A. Elmquist, G. K. Rajarao, M. Hällbrink, Ü. Langel, and L. Good** (2004) Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB* **18**, 394-396.
- Nelson M. L.** (2002) Modulation of antibiotic efflux in bacteria. *Curr Med Chem Agents* **1**, 35-54.
- Niederweis M.** (2003) Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* **5**, 1167-1177.
- Nikaido H.** (1998) Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infec Dis* **27**, 32-41.
- Nikaido H.** (2001) Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 215-223.
- Nikaido H.** (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 593-656.
- Nikaido H., and M. Vaara** (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**, 1-32.
- Nishino K., and A. Yamaguchi** (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 5803-5812.
- Oh J.T., T. K. Van Dyk, Y. Cajal, P. S. Dhurjati, M. Sasser, and M. K. Jain** (1998) Osmotic stress in viable *Escherichia coli* as the basis for the antibiotic responses by Polymyxin B. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 619-623.
- Okusu H., D. Ma, and H. Nikaido** (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in antibiotic resistance phenotype of *Escherichia Coli* Multiple antibiotic resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**, 306-308.
- Palm C., S. Netzereab, and M. Hällbrink** (2006) Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides* **27**, 1710-1716.
- Pasca M. R., P. Gugliera, F. arcesi, M. Bellinzoni, E. De Rossi, and G. Riccardi** (2004) Rv-2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3175-3178.
- Pasca M. R., P. Gugliera, E. De Rossi, F. Zara, and G. Riccardi** (2005) mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4775-4777.

- Paulsen I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray** (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Mikrobiol Rev* **60**, 575-608.
- Piddock L. J. V.** (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**, 382-402.
- Pumbwe L., and L. J. V. Piddock** (2002) Identification and molecular characterization of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbio Let* **206**, 185-189.
- Rodrigues L., D. Wagner, M. Viveiros, D. Sampaio, I. Couto, M. Vavra, W. V. Kern and L. Amaral** (2008) Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1076-1082.
- Stahl C., S. Kubetzko, I. Kaps, S. Seeber, H. Engelhardt, and M. Niederweis** (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **2**, 451-464.
- Stavri M., L. J. V. Piddock, and S. Gibbons** (2007) Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* **59**, 1247-1260.
- Storm D. R., K. S. Rosenthal and P. E. Swanson** (1977) Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem* **46**, 723-763.
- Takiff H. E., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom, W. R. Jr. Jacobs** (1996) Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 362-366.
- Vaara M** (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **3**, 395-411.
- Zelezetsky I., U. Pag, H. G. Sahl, and A. Tossi** (2005) Tuning the biological properties of amphipathic α -helical antimicrobial peptides: Rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides* **xxx**, xxx-xxx.
- Zelezetsky I., and A. Tossi** (2006) Alpha-helical antimicrobial peptides-Using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochem Biophys* **1758**, 1436-1449.
- Zuber B., M. Chami, Ch. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths, and M. Daffe** (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **16**, 5672-5680.

Wang L., R. A. Slayden, C. E. Barry, and J. Liu (2000) Cell wall structure of a mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids. *J Biol Chem* **10**, 7224-7229.

PRIEDAS

Naujai susintetinti potencialūs *M. smegmatis* ląstelių DVA siurblių slopikliai

Nr.	Medžiagos pav.	Mm [g/mol]	Tirpumas	MIC	Poveikis TPP ⁺ jonams
1.	JH-8	503.06	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
2.	JH-10	558.58	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, nedidelis kiekis nuosėdų iškrenta po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
3.	JH-33	549.1	10 mg/ml tirpinami H ₂ O Reikalingas pradinis kaitinimas (100 ⁰ C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, stebimas TPP ⁺ jonų ištekėjimas.
4.	JH-63	505.05	10 mg/ml tirpinami 25% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,25 ml DMSO, tada pridedama 0,75 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
5.	TN-2	595.1	10 mg/ml tirpinami 25% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,25 ml DMSO, tada pridedama 0,75 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
6.	KJ-9	589.98	10 mg/ml tirpinami 50% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,5 ml DMSO, tada pridedama 0,5 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.

7.	KJ-8	555.6	10 mg/ml tirpinami 50% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,5 ml DMSO, tada pridedama 0,5 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, stebimas TPP ⁺ jonų ištekėjimas.
8.	LL-1	473.0	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
9.	LL-3	473.0	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
10.	Fur1	230.73	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
11.	DB-1	387.7	10 mg/ml tirpinamas DMSO. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta
12.	DB-6	329.24	10 mg/ml tirpinami DMSO. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, stebimas TPP ⁺ jonų ištekėjimas.
13.	DB-3	315.34	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta.
14.	Anil-1	366.63	20 mg/ml tirpinami DMSO. Reikalingas pradinis pašildymas, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Mažina elektrodo potencialą.
15.	Izon-1	325.3	Maksimaliai 5mg/ml tirpinami DMSO. Reikalingas pradinis pašildymas, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Mažina elektrodo potencialą.

16.	Thioam-1	280.34	20 mg/ml tirpinami DMSO. Reikalingas pradinis pašildymas, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Mažina elektrodo potencialą.
17.	KF-2	476.0	10 mg/ml tirpinami H ₂ O. Reikalingas pradinis kaitinimas (50-80 °C), ir 1 lašas/ml koncentruoto HCl, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta
18.	PDPH-3	430.93	10 mg/ml tirpinami 25% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,25 ml DMSO, tada pridedama 0,75 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, stebimas TPP ⁺ jonų ištekėjimas.
19.	Mor-1	431.91	10 mg/ml tirpinami 25% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,25 ml DMSO, tada pridedama 0,75 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta
20.	MS-1	268.1	10 mg/ml tirpinami DMSO Reikalingas pradinis pašildymas, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, poveikio nepastebėta
21.	RW-13	521.44	10 mg/ml tirpinami 25% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,25 ml DMSO, tada pridedama 0,75 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, stebimas papildomas TPP ⁺ jonų sugėrimas.
22.	RW-14a	547.08	10 mg/ml tirpinami 25% DMSO. Pirmiausia ištirpinamas 0,25 ml DMSO, tada pridedama 0,75 ml H ₂ O ir pašildoma, stabilus esant aukštesnėms ir kambario temperatūrai, neiškrenta į nuosėdas po 48 val. šaldytuve.	>160 μg/ml	Elektrodo potencialo nekeičia, stebimas TPP ⁺ jonų ištekėjimas.