



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos studijų programos magistrantūros II kurso studentė

Indrė GATULYTĖ

Magistrinis darbas

***Escherichia coli* ir *Salmonella enterica* daugiavaisčio atsparumo siurblių
įtaka safranino O baktericidiniam poveikiui**

Darbo vadovė:

dr. Elena Bakienė

Vilnius, 2011

***Escherichia coli* ir *Salmonella enterica* daugiavaisčio atsparumo siurblių įtaka safranino
O baktericidiniam poveikiui**

Darbas atliktas:

Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje

Darbą atliko:

Indrė Gatulytė

Darbo vadovė:

dr. Elena Bakienė

Turinys

Santrumpos.....	4
ĮVADAS.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Fotodinaminė terapija.....	7
1.1.1. Fotosensibilizacijos mechanizmas.....	7
1.2. Fotosensibilizatoriai.....	9
1.2.1. Fotosensibilizatorių savybės.....	9
1.2.2. Šiame darbe tirtas fotosensibilizatorius – safraninas O.....	11
1.3. Gramneigiamųjų bakterijų sienelė.....	12
1.4. Daugiavaistis atsparumas.....	13
1.4.1. MFS didšeimė.....	15
1.4.2. ABC didšeimė.....	16
1.4.3. SMR didšeimė.....	16
1.4.4. MATE didšeimė.....	17
1.4.5. RND didšeimė.....	17
1.4.6. Antibiotikų išmetimo pompos <i>E. coli</i> bakterijose.....	18
1.4.7. Antibiotikų išmetimo pompos <i>S. enterica</i> bakterijose.....	20
1.4.8. DVA siurblių slopinimas.....	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	23
2.1. Reagentai ir ląstelės.....	23
2.2. Mitybinės terpės, tirpalai ir jų paruošimas.....	24
2.3. Šviesos šaltinis, naudotas šiame darbe.....	25
2.4. Darbo metodai.....	25
2.4.1. Bakterijų auginimas ir paruošimas eksperimentams.....	25
2.4.2. Safranino O sugerties spektro matavimas.....	26
2.4.3. Potenciometrinių matavimų sistema.....	27
2.4.4. Duomenų statistikinė analizė.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	29
3.1. Sugerties matavimai.....	30
3.2. Fotosensibilizatoriaus safranino O fototoksinio poveikio tyrimas.....	31
3.3. DVA siurblių slopiklio PAβN poveikio ląstelėms tyrimas.....	35
3.4. <i>E. coli</i> ir <i>S. enterica serovar Typhimurium</i> DVA siurblių slopinimo įtaka dažiklio safranino O fotobaktericidinio poveikio efektyvumui.....	36
3.5. Slopiklio PAβN poveikio <i>E. coli</i> ir <i>S. enterica serovar Typhimurium</i> ląstelėms analizė potenciometrijos metodu.....	43
3.6. DVA išmetimo siurblių slopinimo įtakos safranino O poveikiui <i>E. coli</i> ir <i>S. enterica serovar Typhimurium</i> ląstelėms analizė potenciometrijos metodu.....	49
IŠVADOS.....	56
SANTRAUKA.....	57
SUMMARY.....	58
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	59

Santrumpos

ABC – (angl. „ATP-binding cassette“) vaistų išmetimo didšeimė

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

EHEC – enterohemoraginė *E. coli*

FS – fotosensibilizatorius

IM – išorinė membrana

LB – Luria-Bertani terpė

MATE – (angl. „multidrug and toxic compound extrusion family“) daugelio vaistų ir toksinių junginių išmetimo šeima

DVA (angl. MDR) - daugiavaistis atsparumas (angl. „multidrug resistance“)

MFS – (angl. „major facilitator superfamily“) didžioji nukreipiamoji didšeimė

$^1\text{O}_2$ – vienlypis deguonis

PACT – fotodinaminė antimikrobinė chemoterapija

PBS – fosfatinių druskų buferinis tirpalas

PDT – fotodinaminė terapija

PM – plazminė membrana

PmBN – polimiksino B nonapeptidas

RND – (angl. „resistance nodulation cell division superfamily“) atsparumo-pumpuravimosi-ląstelės dalijimosi didšeimė

SMR – (angl. „small multidrug resistance family“) mažoji dauginio atsparumo vaistams šeima

SUB – substratas

TBO – toluidino mėlis

λ_{max} – bangos ilgis, ties kuriuo yra didžiausia sugertis

λ_{fl} – fluorescencijos bangos ilgis

$\lambda_{\text{žad}}$ – žadinimo šviesos bangos ilgis

IVADAS

Patogeniniai mikroorganizmai sukelia sunkias infekcines ligas, taip pat daro didžiulę ekonominę žalą tiek išsivysčiusiose, tiek ir trečiojo pasaulio šalyse. Pastaruoju metu dėl spartaus medicinos pramonės vystymosi ir gausaus antibakterinių preparatų naudojimo išskirtine problema tapo bakterijų patogeninių kamienų, atsparių antibiotikams ir dezinfekcinėms medžiagoms, plitimas (Soukos ir Goodson, 2011; Tsai *et al.*, 2011).

Bakterijos išplėtojo daugybę būdų, kaip išvengti joms toksinių medžiagų, tokių kaip vaistai, antiseptikai, poveikio. Pagrindiniai atsparumo mechanizmai bakterijose - taikinio deformacija, antibiotikus degraduojantys fermentai, mažas ląstelės sienelės laidumas ir vaistų išmetimo pompos. Mažas išmetimo pompų specifiskumas suteikė galimybę susidaryti daugiavaisčio atsparumo (DVA) fenotipams (Wright, 2007).

Taigi, vienas didžiausių uždavinių šiuo metu tapo naujų antibakterinių medžiagų ir naujų antibakterinio gydymo metodų paieška. Vienu iš tokių metodų galėtų būti antimikrobinė fotodinaminė chemoterapija (angl., "photodynamic antimicrobial chemotherapy" - PACT), kuri remiasi tuo, kad tam tikro bangos ilgio šviesa sužadina dažą – fotosensibilizatorių, susidaro aktyviosios deguonies formos (vienlypis deguonis, superoksido radikalas O_2^* , vandenilio peroksidas H_2O_2 , hidroksilo radikalas OH^*), kurios žudo mikroorganizmus (Hamblin ir Hasan, 2004; Baptista ir Wainwright, 2011; Soukos ir Goodson, 2011). PACT yra labai perspektyvi terapinė priemonė kovai su patogeninėmis bakterijomis: saugi, nebrangi, efektyvi prieš kitiems baktericidiniams veiksmams atsparius mikroorganizmus (Wainwright, 2004; Jori *et al.*, 2006; Nakonechny *et al.*, 2010). Šis metodas ypač gerai tinka gydyti paviršiaus (odos ar gleivinių) ligoms, jau yra naudojamas klinikose burnos infekcijoms, periodontitams gydyti (Wilson, 2004; Gad *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2010).

Lietuvoje mikroorganizmų fotosensibilizacija medicinos praktikoje dar nėra taikoma. Bakterijų atsparumo antibiotikams mastas Lietuvoje auga, todėl svarbu įvertinti fotosensibilizacijos pritaikymo galimybes, siekiant išvengti sunkiai gydomų infekcijų.

Neseniai nustatyta, kad bakterijų apvalkalėliuose esančios vaistų išmetimo pompos, kurios šalina iš ląstelės daugelį amfifilinių junginių, įskaitant antibiotikus, nuo energijos priklausomu būdu iš ląstelių šalina ir vienus perspektyviausių, didelį fotobaktericidinį poveikį turinčius fenotiazinų grupės fotosensibilizatorius, tuo būdu mažindamos jų fototoksiškumą ląstelėms (Tegos *et al.*, 2006; Tegos *et al.*, 2008).

Yra žinoma, kad fotobaktericidinį poveikį turintis dažiklis safraninas O yra SMR didšeimės išmetimo pompų baltymų substratas (Asok ir Rajavenii, 2003). Tačiau nieko nežinoma apie jo galimą sąveiką su kitų DVA šeimų pompomis. Būtent dėl šios priežasties tyrimams pasirinkome fenotiazinams gimininę azinų klasės junginį - fenaziną – safraniną O.

Šio darbo tikslas – nustatyti safranino O fotodinaminį poveikį *E. coli* ir *S. enterica serovar Typhimurium* bakterijoms ir įvertinti daugiavaisčio atsparumo siurblių įtaką safranino O fotobaktericidiniam poveikiui:

- Nustatyti safranino O fotobaktericidinio poveikio sąlygas; įvertinti, kaip *E. coli* ir *S. enterica serovar Typhimurium* jautrumas fotosensibilizacijai safraninu O priklauso nuo šių bakterijų fiziologinės būklės.
- Palyginti fotosensibilizacijos poveikį *E. coli* ir *S. enterica serovar Typhimurium* laukinio tipo ląstelėms ir mutantinėms ląstelėms su išveiklintais DVA siurbliais.
- Įvertinti, kokią įtaką safranino O fotobaktericidiniam efektyvumui turi RND siurblių aktyvumo slopinimas slopikliu fenilalanilarginino β-naftilamidu (PAβN).
- Įvertinti *E. coli* ir *S. enterica serovar Typhimurium* bakterijų DVA siurblių sąveiką su safraninu O pagal šio dažiklio sukeltus universalus siurblių substrato tetrafenilfosfonio (TPP⁺) srautus per ląstelių apvalkalėlį.