



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Vygintė Araminaitė

**Streptolizino aktyvumo tyrimai ant dirbtinių lipidinių
membranų**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Tadas Ragaliauskas

Darbas atliktas

GMC Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir
biospektroskopijos skyriuje

Turinys

Santrumpos	4
Įvadas	5
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. Lipidinės membranos	7
1.1.1. Lipidinių membranų fizikinės savybės	7
1.1.2. Darbe naudotų lipidų fizikinės savybės ir jų reikšmė membranos struktūrai.....	8
1.1.3. DOPC: struktūrinį stabilumą palaikantis fosfolipidas.....	8
1.1.4. DOPE: membranos deformaciją skatinantis lipidas	8
1.1.5. Cholesterolis: membranos organizacijos modulatorius	9
1.1.6. Membranos hidratacija	9
1.2. Membranos jautrumas poras formuojantiems baltymams.....	10
1.2.1. Streptolizinas O kaip modelinis baltymas biofizikiniuose tyrimuose	10
1.3. Dirbtinės lipidinės membranos ir jų taikymas	11
1.3.1. Modelinių membranų tipai.....	12
1.3.2. Prikabintos lipidinės membranos (tBLM)	12
1.3.3. Inkariniai junginiai ir jų vaidmuo membranos stabilume.....	13
1.3.4. Pomembraninio rezervuaro reikšmė	14
1.3.5. Inkarinių junginių tankis ir membranos organizacija.....	14
1.3.6. Inkarinių junginių įtaka membranos elektrinėms savybėms	14
1.4. Elektrocheminė impedanso spektroskopija ir jos taikymas membranų tyrimuose	15
1.4.1. Elektrocheminės impedanso spektroskopijos charakteristikos	15
1.4.2. EIS reikšmė poras formuojančių toksinų tyrimuose	17
2. Medžiagos ir metodai	18
2.1. Naudotos medžiagos	18
2.2. Buferinių tirpalų paruošimas	18
2.3. Fosfolipidų tirpalų paruošimas	18
2.4. Lipidinių kompozicijų paruošimas	19
2.5. Naudota įranga	19
2.6. Tyrimo eiga	20
3. Rezultatai	21
3.1. Lipidinių membranų formavimas	21
3.2. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (20/70/10)	21
3.3. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (20/60/20)	23
3.4. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (30/40/30)	25
3.5. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (50/30/20)	27

3.6.	Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (50/50)	29
3.7.	Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (60/40)	31
3.8.	Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (70/30)	33
3.9.	WC 10 % inkariniai junginiai.....	34
3.10.	WC 50 % inkariniai junginiai.....	36
4.	Rezultatų aptarimas	38
	Išvados	40
	Rekomendacijos	41
	Literatūros sąrašas.....	42
	Autoriaus asmeninis indėlis	49

Santrumpos

BLM – lipidinis dvisluoksnis (angl. bilayer lipid membrane)

CDC – nuo cholesterolio priklausomi citolizinais (angl. cholesterol – dependent cytolysins)

Chol – cholesterolis

DOPE – 1,2 – dioleoil – sn – glicerolio – 3 – fosfoetanolaminas

DOPC – 1,2 – dioleoil – sn – glicerolio – 3 – fosfocholinas

EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija

Hz – hercas, dažnio matavimo vienetas

SAM – savitvarkis monosluoksnis (angl. self – assembled monolayer)

SLB – pritvirtinti lipidų dvigubo sluoksnio modeliai (angl. supported lipid bilayers)

SLO – streptolizinas O

tBLM – prikabinta lipidinė membrana (angl. tethered bilayer lipid membrane)

WC14 – 20 – tetradeciloksio – 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22 heptaoksaheksatrikontano – 1 – tiolis

Įvadas

Biologinės membranos yra sudėtingos ir dinamiškos struktūros, būtinos ląstelių gyvybingumui, signalų perdavimui ir homeostazės palaikymui. Membranų vientisumo pažeidimas dažnai lemia rimtus ląstelės funkcijų sutrikimus ar net žūtį. Viena svarbiausių tokius pažeidimus sukeliančių veiksnių grupių yra poras formuojantys baltymai ir toksinai, kuriuos gamina įvairūs mikroorganizmai. Jie sąveikauja su lipidinėmis membranomis, oligomerizuojasi ir formuoja poras, taip padidindami membranos pralaidumą.

Streptolizinas O yra vienas geriausiai ištirtų poras formuojančių toksinų, gaminamas *Streptococcus* genties bakterijų. Jis priklauso cholesterolio priklausomų citolizinių (CDC) šeimai, kurios baltymai specifiskai jungiasi prie cholesterolio turinčių eukariotinių membranų. Prisijungęs prie membranos paviršiaus, streptolizinas O oligomerizuojasi ir sudaro didelio skersmens poras, leidžiančias jonams ir mažoms molekulėms prasiskverbti per membraną.

Nors cholesterolio buvimas yra būtina streptolizino O aktyvumo sąlyga, jo veikimą reikšmingai veikia ir membranos sudėtis bei fizikinės savybės. Skirtingi fosfolipidai, tokie kaip fosfatidilcholinai ir fosfatidiletanolaminai, pasižymi nevienodu galvučių dydžiu, hidratacija ir tarpmolekulinėmis sąveikomis, todėl jų santykis gali keisti membranos paviršiaus hidrofiliškumą bei baltymų prisijungimo tikimybę. Taigi toksino aktyvumas priklauso ne tik nuo cholesterolio kiekio, bet ir nuo bendros membranos architektūros.

Kalbant apie aplinkos pH, svarbu paminėti, kad pH turi įtakos tiek baltymo konformacijos ir paviršiaus krūvių pokyčiams, tiek lipidinių membranų galvučių protonacijai bei hidratacijai. Net ir nedideli pH svyravimai gali paveikti baltymo – membranos sąveiką bei porų formavimo efektyvumą. Tačiau daugelyje ankstesnių tyrimų pH įtaka buvo nagrinėjama fragmentiškai arba sudėtingose biologinėse sistemose, kuriose sunku atskirti atskirų veiksnių poveikį.

Tradiciniai SLO aktyvumo tyrimai dažniausiai atliekami naudojant hemolizės testus arba ląstelines sistemas. Nors jie leidžia įvertinti bendrą toksino poveikį, šie metodai pasižymi dideliu biologiniu kintamumu ir neleidžia tiesiogiai nustatyti membranos fizinių bei elektrinių savybių pokyčių. Šias problemas padeda spręsti dirbtinės prikabinotos lipidinės membranos (tBLM), formuojamos ant laidžių paviršių, pavyzdžiui, aukso elektrodų. Jos pasižymi dideliu stabilumu, leidžia tiksliai kontroliuoti lipidų sudėtį ir yra ypač tinkamos elektrocheminiams tyrimams.

Vienas jautriausių tokių tyrimų metodų yra elektrocheminė impedanso spektroskopija (EIS), leidžianti nustatyti membranos varžą, talpą ir kitus elektrinius parametrus, susijusius su membranos sandarumu bei joniniu pralaidumu. Poras formuojančių toksinų atveju šis metodas suteikia galimybę tiesiogiai stebėti porų susidarymą pagal membranos elektrinių savybių pokyčius.

Šiame magistriniame darbe streptolizino O aktyvumas tiriamas naudojant tBLM modelines membranas ir EIS metodą. Analizuojamos skirtingos DOPC, DOPE ir cholesterolio sudėties membranos bei pH įtaka intervale nuo 5 iki 8. Šie lipidai pasirinkti dėl skirtingų fizikocheminių savybių ir vaidmens biologinėse membranose, o pasirinktas pH intervalas atitinka fiziologiškai ir fiziologiškai aktualias sąlygas. Toks metodas leidžia sistemškai įvertinti, kaip membranos sudėtis ir aplinkos sąlygos veikia streptolizino O sąveiką su lipidinėmis membranomis bei porų formavimo procesą.

Šio magistrinio darbo tikslas – ištirti streptolizino O (SLO) poveikį dirbtinėms lipidinėms membranoms ir įvertinti jo aktyvumo priklausomybę nuo membranos sudėties bei aplinkos pH, naudojant tBLM (prikabintos lipidinės membranos) modelį ir elektrocheminės impedanso spektroskopijos (EIS) metodą.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti streptolizino O (SLO) aktyvumo priklausomybę nuo cholesterolio.
2. Ištirti SLO aktyvumo priklausomybę nuo DOPE.
3. Nustatyti pH įtaką SLO aktyvumui.
4. Nustatyti inkarinio junginio, naudojamo prikabinti lipidines membranas prie aukso paviršiaus, įtaką SLO aktyvumui.

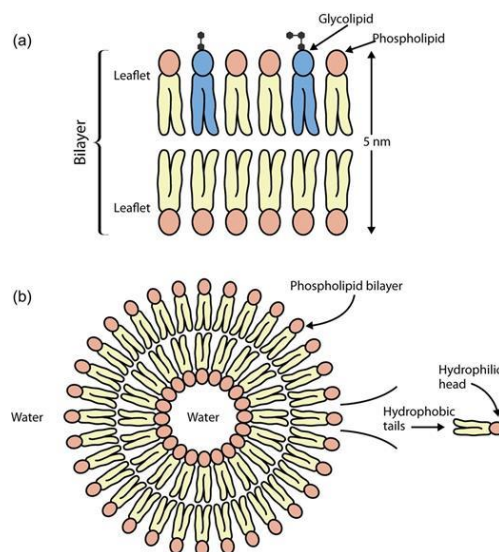
1. Literatūros apžvalga

1.1. Lipidinės membranos

1.1.1. Lipidinių membranų fizikinės savybės

Biologinės membranos (arba lipidinės membranos) yra vienas svarbiausių gyvųjų organizmų struktūrinių elementų, užtikrinančių ląstelės vientisumą ir jos vidinės terpės atskyrimą nuo aplinkos. Tačiau tokios membranos nėra tik barjeras – jos veikia kaip dinamiškos, sudėtingos ir nuolat reorganizuojamos sistemos, dalyvaujančios signalų perdavime, medžiagų transporte bei baltymų funkcijos reguliavime. Dėl šių savybių šis ląstelės barjeras yra ne tik struktūrinis darinys, bet ir biologinių procesų vyksmo vieta (Watson, 2015; Amisshah et al., 2025).

Pagal šiuolaikinį skystosios mozaikos modelį, lipidinė membrana sudaryta iš dvisluoksnio lipidų tinklo, kuriame yra įterpti baltymai, bei kitos amfifilinės molekulės. Lipidų molekulės pasižymi amfifiline prigimtimi – jos turi hidrofilines galvutes ir hidrofobines angliavandenilines uodegas. Vandeninėje terpėje tokia struktūra spontaniškai organizuojasi į dvisluoksnį, kuriame hidrofobinės uodegos orientuojasi į membranos vidų, o hidrofilinės galvutės – į išorę (1 pav.). Ši savitvarka yra termodinamiškai palanki, nes sumažina hidrofobinių paviršių kontaktą su vandeniu (Watson, 2015; Nicolson ir Ferreira de Mattos, 2022; Donghia et al., 2025).



1 pav. Biologinės membranos fosfolipidinio dvisluoksnio struktūros schema (Watson, 2015)

Nors lipidinis dvisluoksnis gali atrodyti kaip paprasta struktūra, jo fizikinės savybės yra itin jautrios lipidų sudėčiai. Membranos takumas, storis, mechaninis stabilumas ir pralaidumas priklauso nuo lipidų sudėties ir polinių galvūčių cheminės struktūros (Casares et al., 2019; Sezgin et al., 2017).

1.1.2. Darbe naudotų lipidų fizikinės savybės ir jų reikšmė membranų struktūrai

Dirbtinių lipidinių membranų savybės ir jų atsakas į išorinius veiksnius tiesiogiai priklauso nuo naudojamų lipidų fizikinių ir cheminių savybių. Skirtingi lipidai pasižymi nevienodu struktūriniu organizuotumu, sąveika tarpusavyje bei su aplinka, todėl jų sudėtis lemia membranų stabilumą, takumą ir pralaidumą (Casares et al., 2019; Sezgin et al., 2017). Šiame skyriuje aptariamos pagrindinės darbe naudotų lipidų – 1,2 – dioleil – sn – glicero – 3 – fosfocholinas (DOPC), 1,2 – dioleil – s – glicero – 3 – fosfoetanolaminas (DOPE) ir cholesterolio (Chol) – fizikinės savybės bei jų reikšmė membranų struktūrai.

1.1.3. DOPC: struktūrinį stabilumą palaikantis fosfolipidas

DOPC yra neutralaus krūvio fosfatidilcholino klasės fosfolipidas, pasižymintis cilindrine molekuline geometrija. Dėl šios formos DOPC linkęs spontaniškai organizuotis į plokščius lipidinius dvisluoksnius ir sudaryti mechaniškai stabilią membranų struktūrą (Kučerka et al., 2015).

DOPC lipidų polinė galvutė yra didesnė, lyginant su kai kuriais kitais fosfolipidais, ir stipriai sąveikauja su vandens molekulėmis, todėl šis lipidų paviršiuje formuoja ryškų hidratacinį sluoksnį (Vancuylenberg et al., 2023). DOPC galvutės dydis ir jos įtaka membranų savybėms šiame darbe vertinti remiantis literatūros duomenimis, kur fosfolipidų galvučių savybės aprašomos pagal jų cheminę sandarą ir skerspjūvio plotą membranoje (Molugu et al., 2022). Dėl šių savybių DOPC molekulės linkusios sudaryti cilindrinės formos struktūras ir formuoti mechaniškai stabilias lipidines membranas. Tokia savybė gali padidinti barjerą baltymų adsorbcijai, nes prie paviršiaus artėjantis baltymas turi išstumti vandens molekules prieš užmegzdamas tiesioginį kontaktą su lipidais (Calero ir Franzese, 2019).

Tuo tarpu, natūraliose sistemose dominuoja įvairios fosfatidilcholino (PC) formos, sudarytos iš skirtingų riebalų rūgščių grandinių, o jų bendras kiekis gali siekti nuo 40 % iki 50 % visų membranų lipidų (van der Veen et al., 2017). Dėl šios priežasties jis dažnai naudojamas kaip „bazinis“ modeliųjų membranų komponentas.

1.1.4. DOPE: membranų deformaciją skatinantis lipidų

Antra pagal gausumą fosfolipidų klasė membranose yra fosfatidiletanolaminai (PE), kurie sudaro nuo 15 % iki 25 % visų fosfolipidų (Calzada et al., 2017). DOPE yra fosfatidiletanolaminų grupės lipidų ir, remiantis literatūros duomenimis, šis lipidų pasižymi mažesne poline galvute nei DOPC (Risse et al., 2025). Dėl santykinai didesnės hidrofobinės dalies DOPE molekulė įgauna kūgio formą, kuri skatina membranų linkimą į vidų (Germain et al., 2023). Tokios formos lipidai didina

membranos lankstumą ir gali palengvinti struktūrinius persitvarkymus, reikalingus porų formavimuisi ar membranose susiliejimui (Joardar et al., 2022).

Svarbu paminėti, kad didėjant DOPE kiekiui membranoje, gali būti destabilizuojama plokščia dvisluoksnių struktūra, nes šis lipidai natūraliai linkę formuoti ne dvisluoksnių lipidų struktūras (Gudyka et al., 2024). Todėl jo koncentracija modelinėse membranose vertinama kartu su cilindrinės formos fosfolipidais, siekiant nustatyti, ar susidaro stabilios membranos.

1.1.5. Cholesterolis: membranose organizacijos modulatorius

Cholesterolis yra sterolis, kuris iš esmės skiriasi nuo fosfolipidų tiek savo struktūra, tiek funkcija. Jo molekulę sudaro trys cikloheksano ir vienas ciklopentano žiedas, kurie kartu sudaro steroidinę žiedų sistemą, taip pat trumpa hidroksilo grupė ir hidrofobinė uodega (Craig et al., 2023). Hidroksilo grupė orientuojasi link fosfolipidų galvutės, o hidrofobinė dalis įsiterpia tarp riebalų rūgščių grandinių. Jis didina lipidų grandinių tvarkingumą, mažina jų pernelyg didelį mobilumą ir kartu riboja nespecifinį membranose pralaidumą jonams (Olżyńska et al., 2020).

Įdomu tai, kad cholesterolis dažnai pasižymi vadinamuoju kondensuojančiu efektu – sumažina plotą, tenkantį vienam lipidui, ir taip padidina membranose tankį. Taip pat jis neleidžia lipidams pereiti į pernelyg standžią fazę, išlaikydamas optimalų mechaninį balansą (Harvard University, 2024).

1.1.6. Membranose hidratacija

Membranose paviršiuje esančios fosfolipidų galvutės aktyviai sąveikauja su vandens molekulėmis ir sudaro hidratacinį sluoksnį. Šis sluoksnis atlieka svarbų vaidmenį stabilizuojant membraną bei reguliuojant molekulių sąveiką su lipidiniu dvisluoksniu. Hidratacija gali veikti kaip barjeras baltymų adsorbcijai. Stipriai hidratuotas paviršius apsunkina hidrofobinių baltymo sričių kontaktą su membrana. Tuo tarpu mažesnė hidratacija sumažina šį barjerą ir sudaro palankesnes sąlygas baltymų sąveikai su lipidiniu dvisluoksniu (Chattopadhyay et al., 2021; Conti Nibali et al., 2025; Jiang et al., 2022; Miao et al., 2017).

Membranose, kurios stipriai sąveikauja su vandeniu, yra mažiau linkusios prie savęs prisijungti baltymus. Taip yra todėl, kad vandens molekulės sudaro tarsi apsauginį sluoksnį, kurį baltymui reikia „įveikti“, kad galėtų prisijungti prie membranose. Lyginant su mažiau hidratuotu paviršiumi, jis sumažina šį energetinį barjerą ir leidžia baltymo hidrofobinėms sritims lengviau sąveikauti su membranose vidumi (Boztepe et al., 2025; Bashkirov et al., 2024).

Hidratacijos lygis glaudžiai susijęs su lipidų galvutės struktūra. Dideles ir stipriai polines galvutes turintys lipidai dažniausiai formuoja storesnį hidratacinį sluoksnį, tuo tarpu mažesnės galvutės leidžia lipidams išsidėstyti kompaktiškiau ir sumažina vandens kiekį tarpfaziniame

sluoksnyje. Tokie skirtumai gali reikšmingai paveikti membranos jautrumą baltymų sukeltiems struktūriniams pokyčiams (Molugu et al., 2022; Maltseva et al., 2022).

1.2. Membranos jautrumas poras formuojantiems baltymams

Viena iš baltymų grupių, kurių aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo membranos sudėties, yra nuo cholesterolio priklausomi citolizinais (angl. *cholesterol-dependent cytolysins*, CDC). CDC šeimai priklausantys toksinai yra tirpūs monomeriniai baltymai, kurie, prisijungę prie membranos paviršiaus, oligomerizuojasi ir sudaro didelius makromolekulinius kompleksus, galintys sutrikdyti ląstelių funkcijas arba sukelti jų žūtį (Morton et al., 2019; Alves et al., 2022).

CDC selektyviai atpažįsta cholesterolio turinčias membranas. Šis procesas pažeidžia membranos barjerinę funkciją, sutrikdo jonų homeostazę ir galiausiai gali sukelti ląstelės lizę (Morton et al., 2019).

1.2.1. Streptolizinas O kaip modelinis baltymas biofizikiniuose tyrimuose

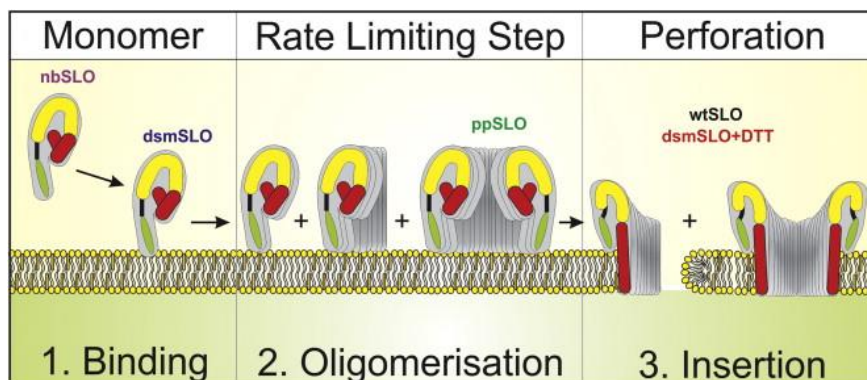
Streptococcus pyogenes yra A grupės streptokokas, pasižymintis gebėjimu sukelti įvairias infekcijas – nuo lengvų viršutinių kvėpavimo takų ar odos pažeidimų iki sunkių, gyvybei pavojingų ligų, tokių kaip nekrozinis fascitas ar toksinio šoko sindromas. Be to, neefektyvus šios bakterijos infekcijų gydymas gali sukelti poinfekcines komplikacijas, pavyzdžiui, ūminį reumatinį karščiavimą ar poststreptokokinį glomerulonefritą. Tokį platų patogeniškumo spektrą sąlygoja įvairūs virulentiškumo faktoriai, įskaitant paviršinius baltymus ir sekretuojamus toksinus, kurie padeda bakterijai sąveikauti su šeimininko audiniais ir išvengti imuninės sistemos atsako (Brouwer et al., 2023).

Streptococcus pyogenes sąveika su šeimininku vyksta per virulentiškumo veiksnius, tarp kurių yra ir sekretuojami baltymai – toksinai. Vienas iš tokių toksinų yra SLO, deguoniui jautrus baltymas, kurio biologinis aktyvumas gali sumažėti oksidacinėje aplinkoje, tačiau atsistatyti redukuojančiomis sąlygomis. SLO pasižymi stipriu citolitiniu poveikiu ir geba pažeisti eukariotinių ląstelių membranas (Walker et al., 2014; Clarke et al., 2021; Hynes ir Sloan, 2016).

Be to, SLO laikomas vienu iš pagrindinių *S. pyogenes* virulentiškumo veiksnių, nes padeda bakterijoms išvengti imuninės sistemos atsako ir palengvina audinių pažeidimą (Wang et al., 2023).

SLO veikimas yra daugiatapis procesas, kurį galima suskirstyti į kelias pagrindines stadijas: 1) Pirmiausia tirpūs toksino monomerai prisijungia prie cholesterolio turinčių membranos sričių. Šis etapas daugiausia priklauso nuo membranos sudėties bei cholesterolio prieinamumo. 2) Prisijungę monomerai pradeda sąveikauti tarpusavyje ir formuoja žiedines arba nepilnas lanko formos struktūras membranos paviršiuje. Ši tarpinė būseną vadinama prepore kompleksu ir dar nėra pilnai įsiterpusi į

lipidinį dvisluoksnį. 3) Galiausiai baltymo struktūroje įvyksta reikšmingi konformaciniai pokyčiai – tam tikros α -spiralės transformuojasi į β -gijas, kurios įsiterpia į membraną ir suformuoja porą (2 pav.). Susiformavus porai, membrana tampa pralaidi jonams ir mažoms molekulėms, sutrinka osmosinis balansas ir gali įvykti ląstelės lizė (Stewart et al., 2015).



2 pav. Streptolizino O (SLO) porų formavimosi lipidinėje membranoje etapai (Stewart et al., 2015)

Kadangi natūralios biologinės membranos yra sudėtingos ir sunkiai kontroliuojamos sistemos, baltymų – membranų sąveikos mechanizms tirti dažnai pasitelkiami supaprastinti modeliai. Dirbtinės lipidinės membranos leidžia tiksliai reguliuoti jų sudėtį ir fizikines savybes, todėl sudaro galimybę sistemiškai vertinti veiksnius, lemiančius toksinų aktyvumą.

1.3. Dirbtinės lipidinės membranos ir jų taikymas

Dirbtinės lipidinės membranos yra in vitro suformuotos lipidų dvigubo sluoksnio modelinės sistemos, kurių tikslas – atkartoti biologinių membranų struktūros ir funkcinės elgsenos aspektus. Jos pasižymi tam tikromis fizikocheminėmis savybėmis, leidžiančiomis tyrėjams analizuoti membranos elgseną supaprastintoje ir kontroliuojamoje aplinkoje, nors tokios sistemos yra mažiau sudėtingos nei natūralios biologinės membranos (Luchini ir Vitiello, 2020; Siontorou et al., 2017).

Dirbtinės membranos suteikia galimybę tiksliai kontroliuoti lipidų sudėtį, dvisluoksnio struktūrą ir eksperimentines sąlygas, todėl jos yra vertingos tiriant priežastinius ryšius tarp membranos fizikinių savybių ir molekulinų procesų. Šiose modelinėse sistemose galima kryptingai vertinti specifinių lipidų ar jų derinių poveikį membranos savybėms bei su ja sąveikaujančių baltymų aktyvumui (Yasuhara ir Morigaki, 2020).

Biologinės membranos yra heterogeniškos struktūros, sudarytos iš daugybės skirtingų lipidų ir membraninių baltymų, kurių santykiai bei pasiskirstymas nuolat kinta priklausomai nuo ląstelės būklės ir aplinkos veiksnių. Toks sudėtingumas apsunkina molekulinų mechanizmų ir atskirų komponentų funkcijų analizę, nes vienu metu vyksta daug tarpusavyje susijusių procesų (Wang et al., 2020). Dėl to, dirbtinės lipidinės membranos veikia kaip paprastesnės, bet funkcionaliai atpažįstamos modelinės sistemos, kurios leidžia išskirti specifines fizikines – chemines savybes ir tiksliai tirti jų

įtaką molekuliniams procesams, kas yra sudėtinga ar neįmanoma natūraliose biologinėse membranose (Siontorou et al., 2017).

1.3.1. Modelinių membranų tipai

Per pastaruosius dešimtmečius buvo sukurta įvairių dirbtinių lipidinių membranų modelių, kurie skiriasi savo struktūrinėmis savybėmis ir pritaikymo galimybėmis eksperimentuose. Vieni iš seniausiai ir plačiausiai naudojamų modelių yra dvisluoksnės lipidinės membranos (angl. *bilayer lipid membrane*, BLM) – tai laisvai „kabantys“ lipidų dvigubo sluoksnio modeliai, kurie klasikiniu būdu susidaro per lipidų savarankišką organizaciją tarp dviejų fazių. BLM pasižymi aukštu elektriniu sandarumu, todėl jos yra tinkamos elektrofiziologiniams matavimams ir jonų srautų analizavimui per membraną. Tačiau tradicinės BLM sistemos dažnai yra mechanškai mažiau stabilios ir jautrios išoriniams trikdžiams, o tai gali riboti jų stabilumą ilgalaikiuose eksperimentuose ir trukdyti patikimiems matavimams (Tsemperouli et al., 2019; Coronado et al., 2024).

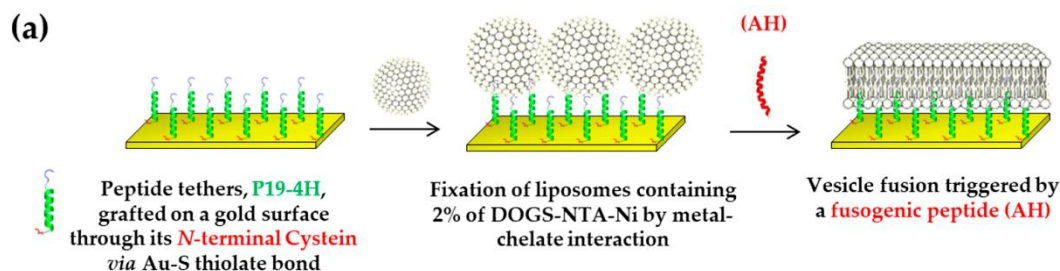
Siekiant išspręsti šias stabilumo problemas ir suteikti papildomų analitinių galimybių, buvo plačiai naudojami pritvirtinti lipidų dvigubo sluoksnio modeliai (angl. *supported lipid bilayers*, SLB). SLB formuojasi ant kieto hidrofilinio paviršiaus, tokio kaip stiklas, silicio dioksidas ar metalai, o tarp paviršiaus ir membranos lieka plonas vandens sluoksnis, leidžiantis lipidams išlaikyti tam tikrą lateralų judrumą. Šios membranos yra mechaniniu požiūriu geriau stabilizuotos nei laisvai kabantys BLM, todėl tinka taikyti daugybę paviršiaus analizės metodų (Parkkila et al., 2018).

Nors SLB pasižymi didesniu mechaniniu stabilumu ir leidžia taikyti paviršiaus analizės metodus, šie modeliai turi tam tikrų biologinių ribojimų. Glaudus lipidų dvisluoksnio kontaktas su kietu substratu gali sukelti erdvinius apribojimus, kurie ypač veikia didesnius transmembraninius baltymus ar jų kompleksus ir gali riboti jų konformacinį judrumą. Pavyzdžiui, dideli, poras formuojantys baltymai, kurių veikimas susijęs su struktūriniais pokyčiais membranoje, gali būti mechanškai ribojami, jei tarp membranos ir paviršiaus nėra pakankamai erdvės. Todėl SLB ne visada tiksliai atspindi natūralios membranos aplinką ir jų taikymas kai kuriuose biocheminiuose tyrimuose gali būti ribotas (Andersson ir Köper, 2016). Norint sujungti šių modelių privalumus ir sumažinti jų trūkumus, buvo sukurta tarpinė architektūra – prikabinotos lipidinės membranos (*tethered bilayer lipid membranes*, tBLM).

1.3.2. Prikabinotos lipidinės membranos (tBLM)

tBLM yra specializuotas modelinių membranų tipas, kuriame lipidinis dvisluoksnis yra pakeltas virš kieto paviršiaus naudojant inkarinius junginius. Šie junginiai sudaro tarpinį sluoksnį, kuris sukuria nanometrinio storio vandens rezervuarą tarp membranos ir substrato (3 pav.). Toks

struktūrinis sprendimas yra itin svarbus, nes sukuria tarpą tarp membranos ir kieto paviršiaus, kuris sumažina tiesioginį sąlytį su substratu ir leidžia išvengti dalies erdvių apribojimų (Girard-Egrot et al., 2021).



3 pav. tBLM membranos formavimo schema (Girard-Egrot et al., 2021)

Nors lipidų mobilumas tBLM sistemose yra mažesnis nei SLB ar BLM, šis tarpinis sluoksnis gali sudaryti palankesnes sąlygas tam tikriems membraniniams baltymams funkcionuoti, lyginant su tiesiogiai ant paviršiaus formuojamomis membranomis. Kartu šios membranos pasižymi dideliu mechaniniu stabilumu, kuris užtikrina membranos vientisumą ir mažesnę signalo svyravimą, todėl jos yra tinkamos ilgalaikiams eksperimentams ir jautriems elektrocheminiams matavimams (Andersson ir Köper, 2016). Didelė membranos elektrinė varža ir mažas jonų pralaidumas leidžia registruoti net nedidelius membranos pralaidumo pokyčius, kurie gali atsirasti baltymams formuojant poras (Valiūnienė ir Valinčius, 2023).

Modelinės membranos suteikia galimybę tiksliai reguliuoti jų sudėtį. Keičiant lipidų kompoziciją galima kryptingai moduluoti membranos hidrataciją ir mechanines savybes, taip sukuriant kontroliuojamą aplinką baltymų – membranų sąveikai tirti. tBLM paprastai formuojamos ant laidžių substratų (pavyzdžiui, aukso), kurie leidžia naudoti elektrocheminius matavimo metodus (pvz., EIS) membranos elektrinėms savybėms stebėti realiuoju laiku. Esminis struktūros elementas yra inkariniai junginiai, kurie užtikrina membranos atskyrimą nuo paviršiaus (Jackman et al., 2012).

1.3.3. Inkariniai junginiai ir jų vaidmuo membranos stabilume

Prikabintų lipidinių membranų struktūrinis stabilumas ir funkcionalumas dažniausiai priklauso nuo tarpinio sluoksnio, kuris atskiria lipidinį dv sluoksnį nuo kieto substrato. Šį sluoksnį sudaro inkariniai junginiai – amfifilinės molekulės, gebančios vienu metu prisitvirtinti prie paviršiaus ir sąveikauti su lipidais. Dauguma inkarinių molekulių pasižymi trimis pagrindinėmis struktūrinėmis dalimis: 1) Paviršių surišanti grupė. Dažniausiai tai yra tiolio grupė, kuri stipriai jungiasi prie aukso paviršiaus formuodama savitvarkius monosluoksnius (angl. *self-assembled monolayers*, SAM). 2) Hidrofilinė tarpinė grandinė. Paprastai sudaryta iš etilenoksido fragmentų, ši lanksti grandinė reguliuoja atstumą tarp membranos ir substrato bei padeda palaikyti hidratuotą pomembraninę erdvę. 3) Hidrofobinė dalis. Ji sąveikauja su lipidų uodegomis ir integruojasi į apatinį membranos sluoksnį.

Tokios molekulinės architektūros dėka inkariniai junginiai veikia kaip „molekuliniai tilteliai“, sujungiantys kietą paviršių su minkšta lipidine struktūra (Ragaliauskas, 2017; Jackman et al., 2012).

1.3.4. Pomembraninio rezervuaro reikšmė

Vienas svarbiausių tBLM architektūros privalumų yra pomembraninė vandens erdvė. Ji atlieka kelias kritines funkcijas: 1) Ši erdvė leidžia išlaikyti membranos elgseną artimesnę natūralioms biologinėms sistemoms, nes lipidai nėra tiesiogiai prispausti prie kieto paviršiaus. Tai sumažina trintį ir leidžia molekulėms laisvai judėti. 2) Vandens sluoksnis suteikia erdvės baltymų domenams, kurie gali išsikišti į pomembraninę sritį. Tai ypač svarbu tiriant poras formuojančius baltymus, kurių konformaciniai pokyčiai dažnai apima reikšmingus struktūrinius persitvarkymus. 3) Pomembraninis rezervuaras prisideda prie membranos elektrinių savybių. Kadangi vanduo yra laidus jonams, šios erdvės storis ir organizacija gali turėti įtakos elektrocheminiams matavimams (Andersson et al., 2018; Andersson ir Köper, 2016).

1.3.5. Inkarnių junginių tankis ir membranos organizacija

Formuojant savitvarkį monosluoksnį svarbus ne tik inkarnių molekulių tipas, bet ir jų paviršiaus tankis. Per didelis inkarnių junginių kiekis gali sumažinti lipidų judrumą ir riboti jų išsidėstymą, todėl membrana tampa standesnė ir mažiau dinamiška. Priešingu atveju, pernelyg mažas inkarnių molekulių tankis gali lemti nepakankamą membranos stabilumą. Todėl kuriant tBLM sistemas siekiama optimalaus balanso – pakankamo inkarnių junginių kiekio, užtikrinančio stabilumą, bet kartu leidžiančio lipidams formuoti sandarią struktūrą (Sabirovas et al., 2024; Andersson et al., 2018).

1.3.6. Inkarnių junginių įtaka membranos elektrinėms savybėms

tBLM sistemose lipidinis dvisluoksnis veikia kaip elektrinis izoliatorius, o jo varža ir talpa yra jautrūs struktūriniams pokyčiams. Inkariniai junginiai, formuodami apatinį membranos sluoksnį, prisideda prie šių parametrų stabilumo (Sabirovas et al., 2024; Aleksandrovic et al., 2026).

Tolygus ir vientisas inkarnių junginių sluoksnis padeda sumažinti membranos defektų susidarymą, kurie gali atsirasti dėl netolygaus inkarnių junginių pasiskirstymo ar nepilno paviršiaus padengimo. Dėl to galima tiksliau registruoti pokyčius, atsirandančius baltymams formuojant poras (Sabirovas et al., 2024; Aleksandrovic et al., 2026; Girard-Egrot et al., 2021).

Tarp įvairių inkarnių molekulių ypatingas dėmesys skiriamas junginiams, kurie gali užtikrinti tiek aukštą membranos stabilumą, tiek tinkamą pomembraninės erdvės organizaciją. Vienas iš tokių junginių yra WC14 (20 – tetradeciloksio – 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22 heptaoksaheksatrikontano – 1 –

tiolis), pasižymintis specifine molekuline struktūra, leidžiančia formuoti stabilias prikabinas lipidines membranas (Talaikis et al., 2020; Aleknavičienė et al., 2021).

Praktikoje WC14 dažnai naudojamas kartu su trumpesnėmis hidrofilinėmis molekulėmis, kurios veikia kaip skiedikliai. Toks metodas leidžia tiksliai reguliuoti inkarinių molekulių paviršiaus tankį ir išvengti pernelyg glaudaus jų susipakavimo. Tankio kontrolė yra būtina dėl anksčiau jau minėto lipidų prieinamumo ir membranos stabilumo (Aleknavičienė et al., 2021).

1.4. Elektrocheminė impedanso spektroskopija ir jos taikymas membranų tyrimuose

Elektrocheminė impedanso spektroskopija (EIS) yra plačiai taikomas elektroanalitinis metodas, leidžiantis tirti medžiagų elektrines savybes ir jų pokyčius. Šis metodas ypač vertinamas biofizikiniuose tyrimuose, nes suteikia galimybę jautriai ir nedestruktyviai vertinti membranų struktūrinį vientisumą bei jų pralaidumo pokyčius (Stupin et al., 2020).

EIS pagrįsta mažos amplitudės kintamosios srovės signalo taikymu tiriamajai sistemai ir jos atsako matavimu. EIS leidžia nustatyti sistemos impedansą, kuris apibrėžiamas kaip užduotos kintamos įtampos ir išmatuotos srovės santykis (Lazanas ir Prodromidis, 2023).

Kadangi lipidinis dvisluoksnis veikia kaip elektrinis izoliatorius, jo struktūriniai pokyčiai tiesiogiai atsispindi impedanso spektre. Analizuojant impedansą, galima išskirti realiąją ir menamąją dalis. Realioji dalis yra susijusi su varža ir nusako energijos nuostolius dėl jonų judėjimo, tuo tarpu menamoji dalis apibūdina talpinį sistemos atsaką, susijusį su krūvio kaupimu membranos paviršiuje. Intakti lipidinė membrana pasižymi didele varža, nes hidrofobinis dvisluoksnio vidus riboja jonų judėjimą. Tuo tarpu membranos talpinis elgesys atsiranda dėl to, kad lipidinis sluoksnis atskiria dvi laidžias terpės fazes ir veikia analogiškai kondensatoriui (Lazanas ir Prodromidis, 2023; Yudovich et al., 2022).

Kai membranoje susidaro poros, atsiranda papildomi jonų transporto keliai, todėl varža sumažėja. Tuo pačiu gali kisti ir talpa, nes struktūriniai pokyčiai pakeičia membranos storį arba dielektrines savybes (Maček Lebar et al., 2021).

1.4.1. Elektrocheminės impedanso spektroskopijos charakteristikos

Elektrocheminė impedanso spektroskopija (EIS) pagrįsta mažos amplitudės kintamosios įtampos taikymu sistemai ir srovės atsako registravimu, leidžiančiu apskaičiuoti sistemos impedansą (Lasia, 2014). Vienas svarbiausių šio metodo privalumų yra galimybė tirti sistemą skirtinguose dažniuose, nes kiekvienas dažnių diapazonas suteikia skirtingą informaciją apie membranos būseną.

Aukštų dažnių srityje (> 100 kHz) srovė dažniausiai teka per varžinius elementus, todėl ši zona atspindi tirpalo varžą ir elektrodo – elektrolito sąsajos procesus, o membranos savybės yra išreikštos mažiau (Wang et al, 2021).

Vidutinių dažnių diapazonas (nuo 1 Hz iki 100 Hz). Čia dažnai dominuoja talpinis membranos atsakas, nes kintantis elektrinis laukas lemia krūvio kaupimąsi abiejose membranos pusėse. Kadangi talpa yra susijusi su membranos struktūra ir vientisumu, šioje dažnių srityje galima spręsti apie jos stabilumą ir galimus struktūrinius pokyčius (George et al., 2026).

Žemų dažnių srityje (< 1 Hz) išryškėja varžiniai komponentai, susiję su jonų judėjimu per membraną. Jei membrana yra sandari, impedanso modulis šioje srityje būna didelis. Porų ar defektų atsiradimas sukuria jonų nutekėjimo kelius, todėl impedansas pastebimai sumažėja (Boorn et al, 2026).

Toks dažninės priklausomybės analizės principas leidžia ne tik aptikti membranos pažeidimus, bet ir geriau suprasti jų pobūdį.

Analizėje taip pat svarbus parametras yra fazinis kampas, nusakantis fazių poslinkį tarp srovės ir įtampos. Ideali talpinė sistema pasižymi faziniu kampu, artimu 90° . Nepažeista lipidinė membrana dažniausiai demonstruoja ryškų talpinį elgesį, todėl fazinis kampas vidutinių dažnių srityje būna didelis pagal absoliučią vertę. Membranai praradus sandarumą, didėja varžinė komponentė ir fazinis kampas mažėja. Dėl šios priežasties fazinio kampo pokyčiai dažnai laikomi jautriu membranos struktūrinių pažeidimų indikatoriumi (Lazanas ir Prodromidis, 2023; Lu et al., 2022; Ambrulevičius ir Valinčius, 2022).

Siekiant kiekybiškai interpretuoti impedanso duomenis, eksperimentinė sistema dažnai aprašoma naudojant ekvivalentines elektrines grandines. Tokie modeliai leidžia susieti matuojamus parametrus su konkrečiomis fizikinėmis membranos savybėmis (Lazanas ir Prodromidis, 2023).

Paprastai lipidinis dvisluoksnis modeliuojamas kaip talpos elementų kombinacija. Varža atspindi jonų transporto ribojimą, o talpa – membranos dielektrines savybes. Porų formavimasis dažniausiai pasireiškia membranos varžos sumažėjimu, todėl šis parametras laikomas vienu svarbiausių vertinant baltymų aktyvumą (Maček Lebar et al., 2021). Elektrocheminė impedanso spektroskopija turi keletą savybių, dėl kurių ji yra ypač tinkama membranų analizei:

Nedestruktyvumas. Matavimams naudojami mažos amplitudės signalai, todėl membranos struktūra išlieka nepažeista.

Didelis jautrumas. Net nedideli pralaidumo pokyčiai gali būti aptinkami elektrinių parametru pokyčių pavidalu (Wang et al., 2022).

1.4.2. EIS reikšmė poras formuojančių toksinų tyrimuose

Poras formuojančių baltymų aktyvumas tiesiogiai keičia membranos pralaidumą, todėl elektrocheminiai metodai yra ypač tinkami šiems procesams tirti. Streptolizino O atveju porų susidarymas sukuria jonų transporto kelius, kurie pasireiškia staigiu membranos varžos sumažėjimu ir fazinio kampo minimumo poslinkiu į aukštesnių dažnių sritį (Raila et al., 2019).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Naudotos medžiagos

Tyrimuose naudoti reagentai: natrio chloridas (NaCl), dinatrio vandenilio fosfatas (Na_2HPO_4), natrio dihidrofosfatas (NaH_2PO_4), tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), natrio acetatas, acto rūgštis, natrio hidroksidas (NaOH) ir druskos rūgštis (HCl), chloroformas, tergažyme. Naudotų reagentų gamintojai ir grynumas pateikti 1 lentelėje. Tirpalų ruošimui naudotas dejonizuotas vanduo.

1 lentelė. Naudotų reagentų gamintojai ir grynumas.

Reagentas	Gamintojas	Grynumas
NaCl	Sigma-Aldrich	$\geq 99 \%$
Na_2HPO_4	Merck	$\geq 99 \%$
NaH_2PO_4	Merck	$\geq 99 \%$
Tris	Carl Roth	$\geq 99 \%$
DOPC	Avanti Polar Lipids	$\geq 99 \%$
DOPE	Avanti Polar Lipids	$\geq 99 \%$
Cholesterolis	Avanti Polar Lipids	$\geq 99 \%$

Fosfolipidų membranų formavimui naudoti 1,2 – dioleil – sn – glicero – 3 – fosfocholinai (DOPC), 1,2 – dioleil – sn – glicero – 3 – fosfoetanolaminai (DOPE) ir cholesterolis (Chol). Fosfolipidai buvo tirpinami chloroforme ruošiant pradinius tirpalus.

2.2. Buferinių tirpalų paruošimas

Darbe naudoti buferiniai tirpalai:

- PBS buferis (pH 7,0 ir pH 6,0): 0,1 M NaCl, 0,01 M Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 ;
- Tris buferis (pH 8,0): 0,1 M NaCl ir 0,01 M Tris;
- Acetatinis buferis (pH 5,0): 0,1 M NaCl ir 0,01 M natrio acetatas;
- Natrio dihidrofosfato buferis (pH 4,4): 0,1 M NaCl ir 0,01 M NaH_2PO_4 .

Buferių pH reikšmės buvo koreguojamos naudojant NaOH ir HCl tirpalus bei matuojamos pH-metru. Visi tirpalai buvo ruošiami kambario temperatūroje ir laikomi šaldytuve nuo 5 °C iki 8 °C temperatūroje iki naudojimo. Natrio dihidrofosfato buferis buvo naudojamas lipidinių membranų kompozicijų paruošimui.

2.3. Fosfolipidų tirpalų paruošimas

Fosfolipidai buvo ištirpinti chloroforme ruošiant šių koncentracijų tirpalus:

- DOPC – 5 mM;
- DOPE – 5 mM;
- cholesterolis – 7,5 mM.

Paruošti fosfolipidų tirpalai buvo laikomi – 20 °C temperatūroje iki naudojimo.

2.4. Lipidinių kompozicijų paruošimas

Buvo paruoštos šios lipidų kompozicijos, nurodant lipidų komponentų molinius santykius:

- DOPC/Chol (70/30);
- DOPC/Chol (50/50);
- DOPC/Chol (60/40);
- DOPC/DOPE/Chol (30/40/30);
- DOPC/DOPE/Chol (50/30/20);
- DOPC/DOPE/Chol (20/60/20);
- DOPC/DOPE/Chol (20/70/10).

Reikalingi fosfolipidų tirpalų kiekiai buvo sumaišomi stikliniame buteliuke pagal nurodytas proporcijas. Tirpiklis pašalintas išgarinant chloroformą azoto dujų srove, kol susidarė sausa lipidų plėvelė.

Susidariusios lipidų plėvelės buvo hidratuojamos natrio dihidrofosfato buferiu. Tirpalai buvo maišomi pakartotinai pipetuojant, siekiant nuo stiklinio indo sienelių atskirti susidariusias lipidines struktūras. Pipetavimas tęsiamas tol, kol susidaro homogeniškas balkšvas tirpalas (4 pav.). Visos lipidų kompozicijos buvo ruošiamos kambario temperatūroje ir laikomos šaldytuve nuo 5 °C iki 8 °C temperatūroje iki naudojimo.

2.5. Naudota įranga

Tyrimuose naudota ši įranga:

- pH – metras;
- azoto dujų srovės sistema tirpiklio garinimui;
- EIS celė;

- elektrocheminė matavimo sistema „PalmSens“;
- EIS matavimai atlikti naudojant „PSTrace“ programinę įrangą nuo 0,5 Hz iki 100000 Hz dažnių intervale, taikant 10mV amplitudės sinusinį signalą esant 0,0 V potencialui. Matavimo metu registruoti 54 dažnių taškai.

2.6. Tyrimo eiga

Naudojant Tergazyme (Alconox Inc., JAV) fermentinį miltelinį laboratorinį ploviklį, buvo paruoštas 1,5 % vandeninis tirpalas. Šiame tirpale EIS celė kartu su specialiomis celės tarpinėmis buvo plaunama 20 min. Pasibaigus plovimui, celė kruopščiai išskalauta ir papildomai palikta dejonizuotame vandenyje dar 20 min. Vėliau celė ir tarpinės buvo išdžiovintos naudojant azoto dujų srovę.

Išdžiovinus visas dalis, celė buvo surenkama į tam skirtas vietas įdedant tarpines. Į surinktą celę buvo įdedama auksu padengta plokštelė su ant jos paviršiaus suformuotu savitvarkiu monosluoksniu (SAM), taip užbaigiant celės paruošimą. Į kiekvieną celės kanalą buvo įpilama po 100 μ L tiriamosios lipidinės kompozicijos. Membranos formavimasis ir inkubacija vyko 30 min. Po 30 min. inkubacijos celė buvo praplaunama 3 mL naudojamo buferio, pašalinant neprisijungusią lipidinę medžiagą, o po to atliekami EIS matavimai.

Atlikus pirminius matavimus, suformuotos membranos buvo paveikiamos tiriamąja analite ir pakartotinai inkubuojamos 30 min. Po inkubacijos vėl buvo atliekamas praplovimas tuo pačiu buferiu ir pakartotiniai EIS matavimai.

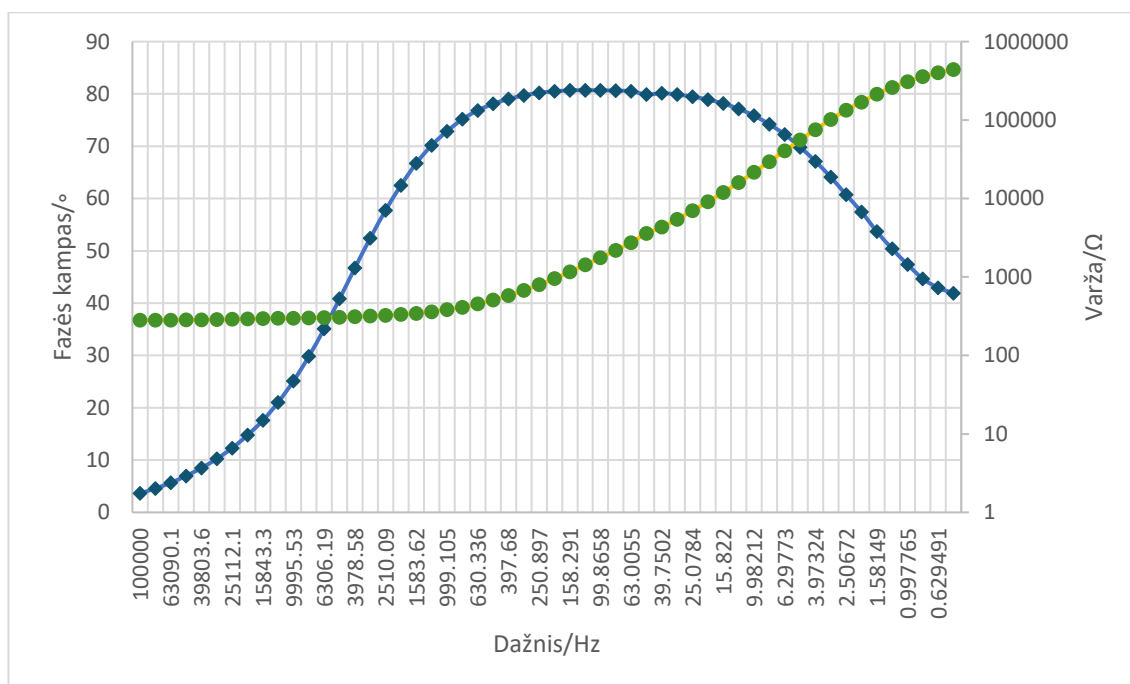
3. Rezultatai

Dirbtinių lipidinių membranų formavimas ir SLO poveikis joms buvo vertinamas elektrocheminės impedanso spektroskopijos (EIS) metodu. Membranos stabilumas ir baltymo poveikis analizuotas pagal fazės kampo minimumo pokyčius skirtingose pH terpėse.

3.1. Lipidinių membranų formavimas

Suformuotų lipidinių membranų stabilumas pirmiausia įvertintas registruojant fazės kampo priklausomybę nuo dažnio. Membranos stabilumui apibūdinti buvo nustatoma minimali fazės kampo reikšmė fazės kampo kreivėje (dešinioji y ašis) ir ją atitinkantis dažnis x ašyje. Visoms suformuotoms membranoms fazės minimumas buvo stebimas žemų dažnių srityje ($< 0,5$ Hz), kas rodo didelę membranų varžą ($\approx 10^6 \Omega$) ir stabilumą. Reikšmingų skirtumų tarp atskirų matavimų nenustatyta. Pavyzdinė suformuotos lipidinės membranų impedanso diagrama pateikta 1 pav. Diagramose žalia kreivė vaizduoja impedanso modulio priklausomybę nuo dažnio (dešinioji y ašis), o mėlyna kreivė – fazės kampo priklausomybę nuo dažnio (kairioji y ašis).

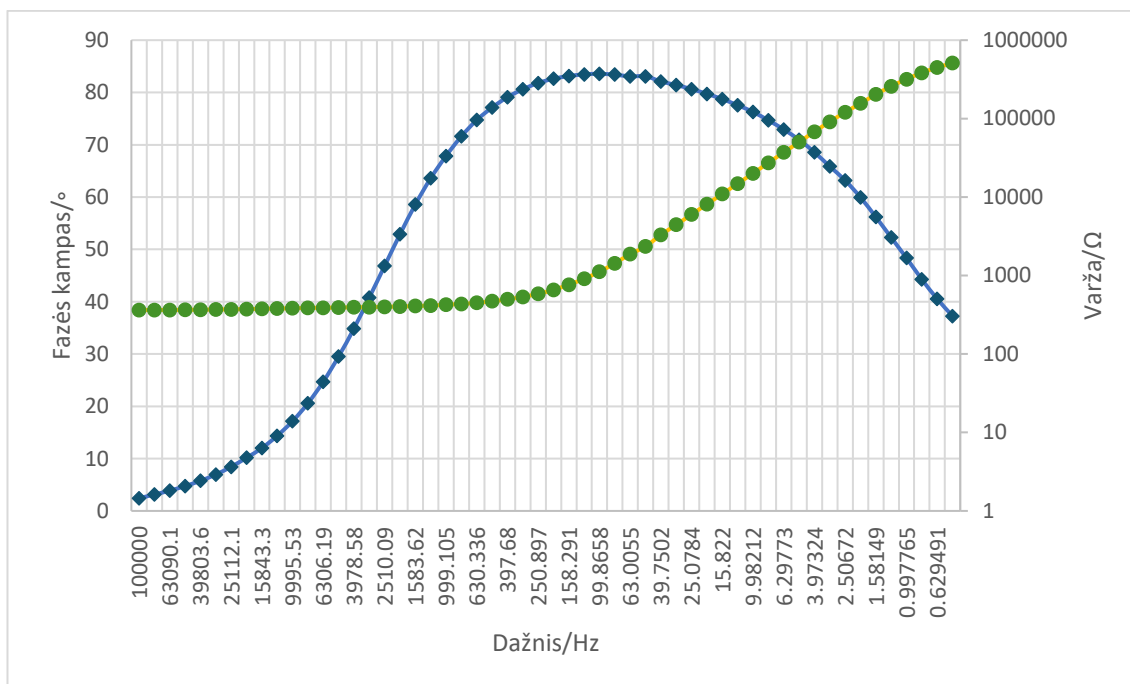
Buvo tirtas SLO aktyvumas esant skirtingoms lipidinėms kompozicijoms skirtingo pH aplinkoje.



4 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (20/70/10) lipidinei membranai prieš inkubaciją su SLO (30 % WC, pH 8)

3.2. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (20/70/10)

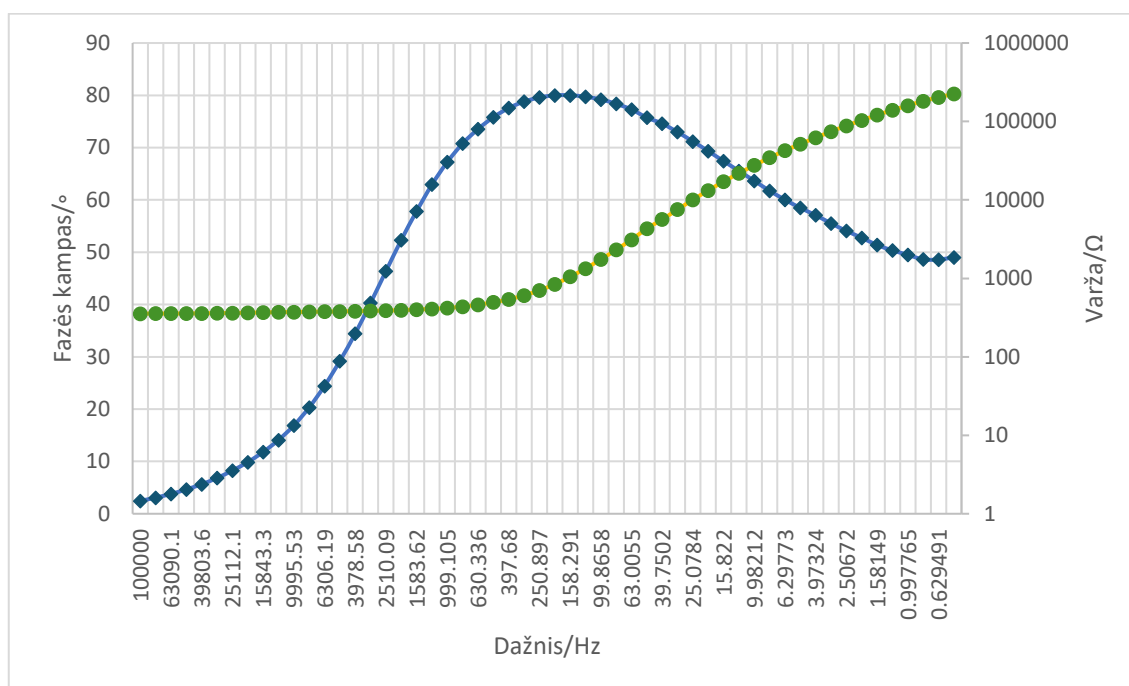
Tyrimai buvo pradėti šarminėje aplinkoje (pH 8). pH 8 terpėje po SLO pridėjimo fazės minimumas išliko žemų dažnių srityje ($< 0,5$ Hz). Reikšmingų fazės minimumo pokyčių nepastebėta, tačiau buvo stebimas nežymus varžos sumažėjimas, rodantis labai silpną membranos elektrinių savybių pokytį. Šioje terpėje streptolizino poveikis DOPC/DOPE/Chol (20/70/10) membranai buvo vertinamas kaip nedidelis, nes po toksino pridėjimo nebuvo stebėta reikšmingų fazės minimumo ar membranos varžos pokyčių (2 pav.).



5 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (20/70/10) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 8)

Neutralioje (pH 7) ir silpnai rūgštinėje (pH 6) terpėje po SLO pridėjimo stebėtas nedidelis fazės minimumo pokytis. Daugeliu atvejų fazės minimumas išliko žemų dažnių srityje, tačiau buvo stebimas minimalus poslinkis į aukštesnių dažnių sritį, siekiantis iki $\approx 0,6$ Hz. Šiose terpėse taip pat

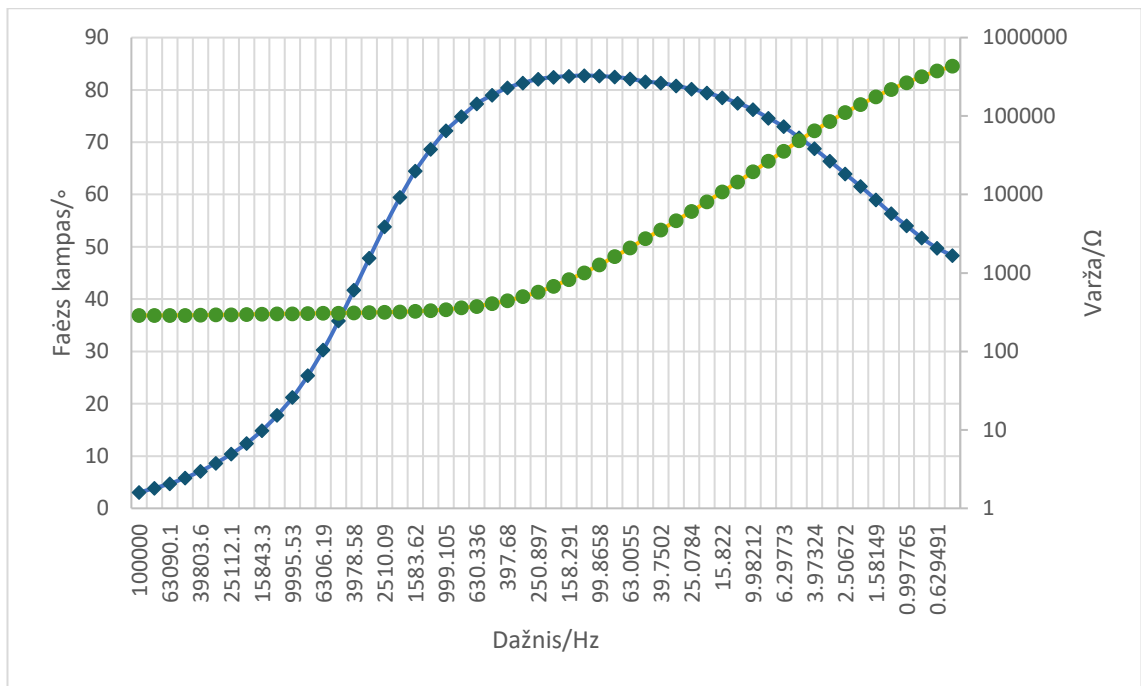
nustatytas varžos sumažėjimas, rodantis padidėjusį membranos laidumą. Gauti rezultatai rodo silpną SLO poveikį šiai membranos kompozicijai, kuris labiau pasireiškė pH 6 terpėje (3 pav.).



6 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (20/70/10) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 6)

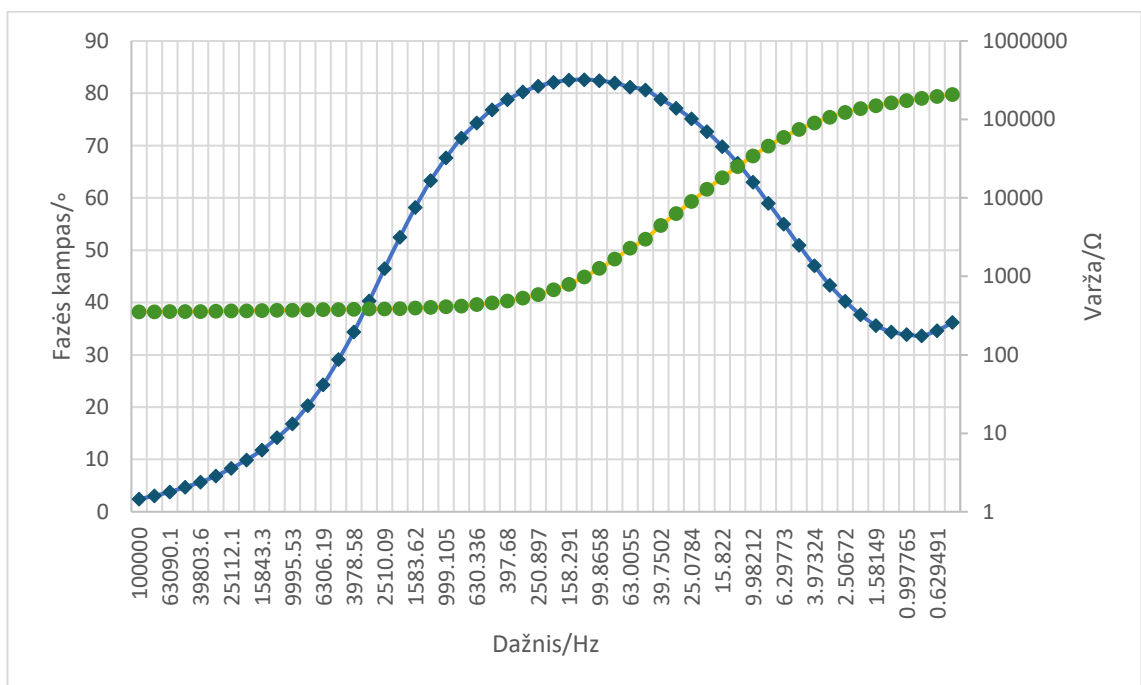
3.3. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (20/60/20)

Šios kompozicijos membranoms pH 8 terpėje po SLO pridėjimo fazės minimumas visais matavimais išliko žemų dažnių srityje ($< 0,5$ Hz). Tai rodo, kad šioje terpėje membranos elektrinės savybės iš esmės nepakito, nors stebėtas tik minimalus varžos sumažėjimas, rodantis labai silpną SLO poveikį (4 pav.).



7 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (20/60/20) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 8)

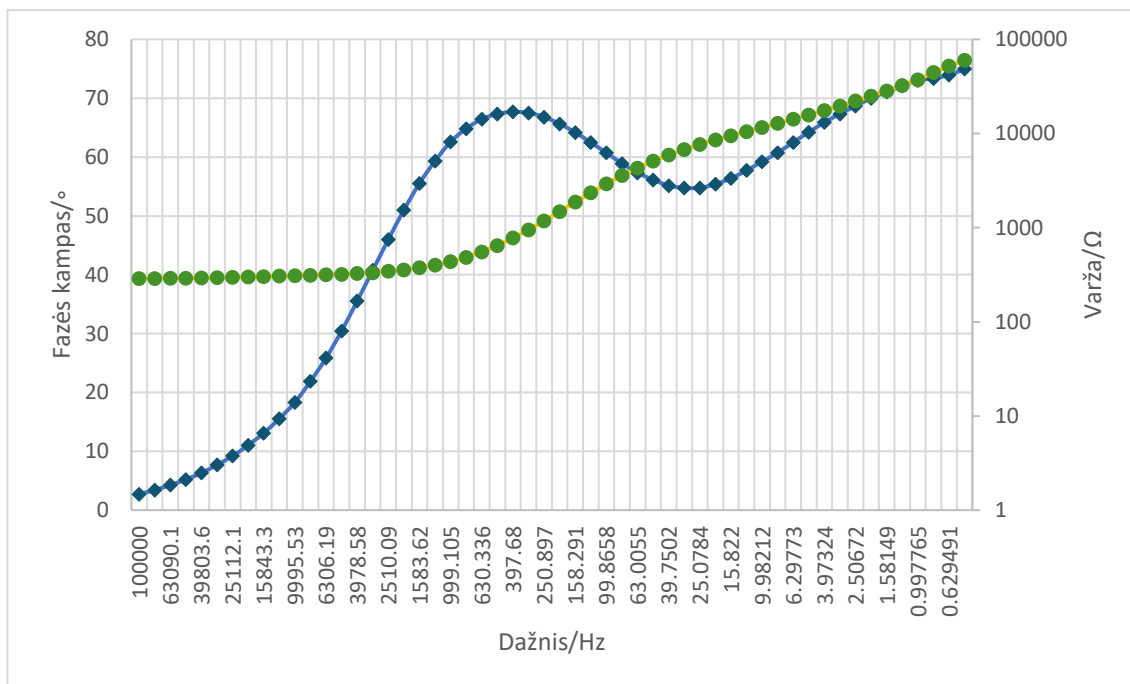
Neutralioje pH 7 terpėje po SLO pridėjimo stebėtas nevienodas fazės minimumo pokytis. Daliai membranų fazės minimumas išliko žemų dažnių srityje ($< 0,5$ Hz), tuo tarpu kituose matavimuose buvo stebimas nedidelis fazės minimumo padidėjimas iki $\approx 0,8$ Hz. Toks minimalus poslinkis į aukštesnių dažnių sritį kartu su nedideliu varžos sumažėjimu rodo dalinį membranos savybių pokytį ir silpną SLO poveikį (5 pav.).



8 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (20/60/20) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 7)

Mažinant tirpalo pH iki 6, DOPC/DOPE/Chol (20/60/20) membranoms po streptolizino pridėjimo stebėtas ryškesnis fazės minimumo poslinkis į aukštesnių dažnių sritį. Fazės minimumas

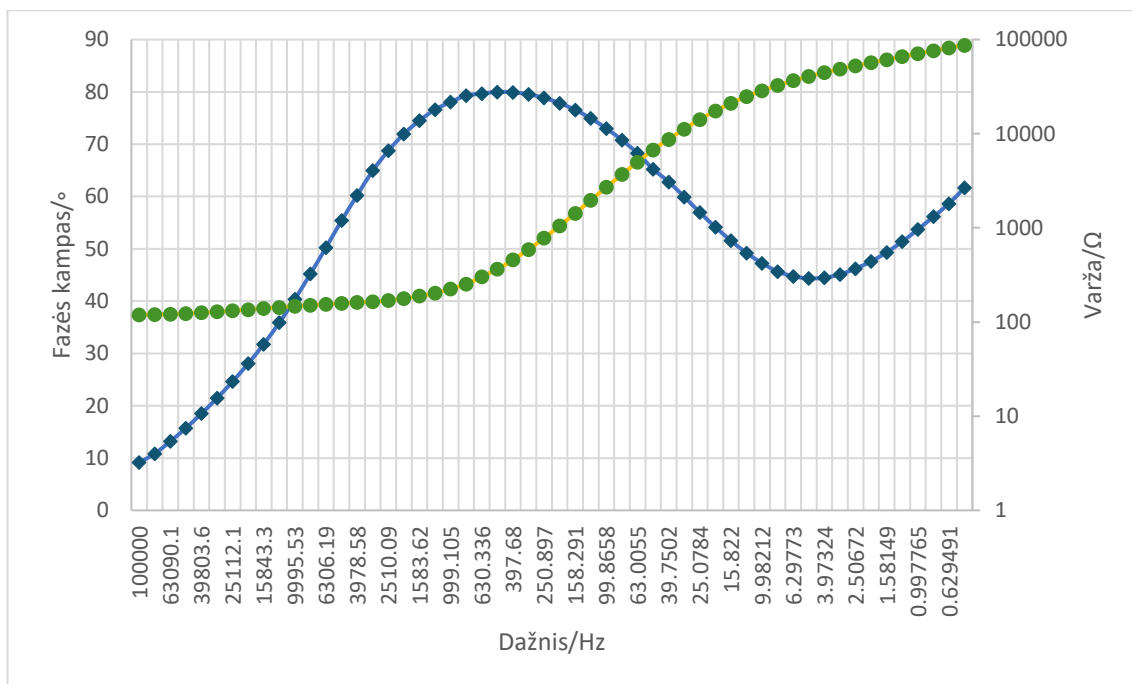
visuose matavimuose viršijo 0,5 Hz ir svyravo nuo 15,8 Hz iki 50,0 Hz. Visų fazės minimumo dažnių statistinė analizė atlikta naudojant logaritmuotas fazės minimumo reikšmes, o vidutinė šio matavimo vertė buvo $\log_{10}(f_{\min}) = 1,5 \pm 0,2$ ($n = 6$). Šiose sąlygose taip pat stebėtas didesnis varžos sumažėjimas, rodantis ryškesnį membranos laidumo padidėjimą (6 pav.).



9 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (20/60/20) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 6)

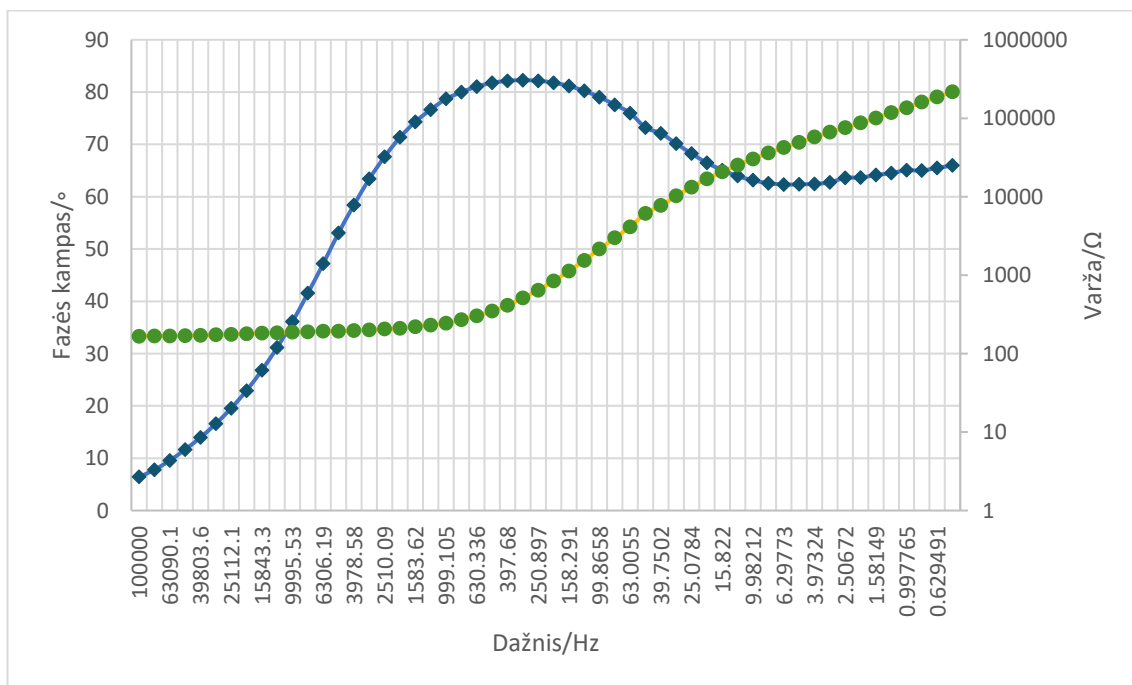
3.4. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (30/40/30)

DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) membranoms pH 8 terpėje po SLO pridėjimo fazės minimumas buvo stebimas aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 6,3 Hz iki 7,9 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 0,9 \pm 0,1$ ($n = 4$). Šiose sąlygose taip pat stebėtas nedidelis varžos sumažėjimas, rodantis silpną streptolizino poveikį membranai (pav. 7).



10 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 8)

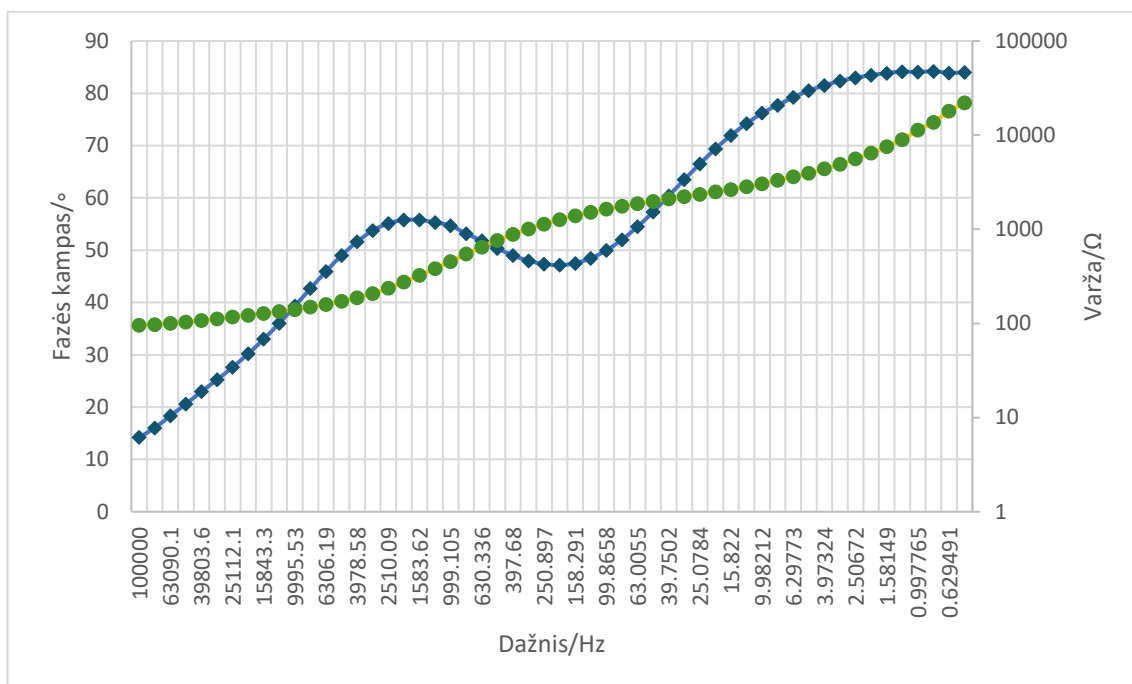
Mažinant tirpalo pH iki 7, po SLO pridėjimo fazės minimumas pasislinko į vidutinių dažnių sritį. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 125,7 Hz iki 315,9 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,3 \pm 0,1$ ($n = 14$). Šiose sąlygose taip pat stebėtas varžos sumažėjimas, rodantis reikšmingą membranos elektrinių savybių pokytį (8 pav.).



11 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 7)

Toliau mažinant pH iki 5, DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) membranoms stebėtas dar ryškesnis fazės minimumo poslinkis į aukštų dažnių sritį. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 158,3 Hz iki 630,3 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,5 \pm 0,2$ ($n = 16$). Šiuo atveju taip pat

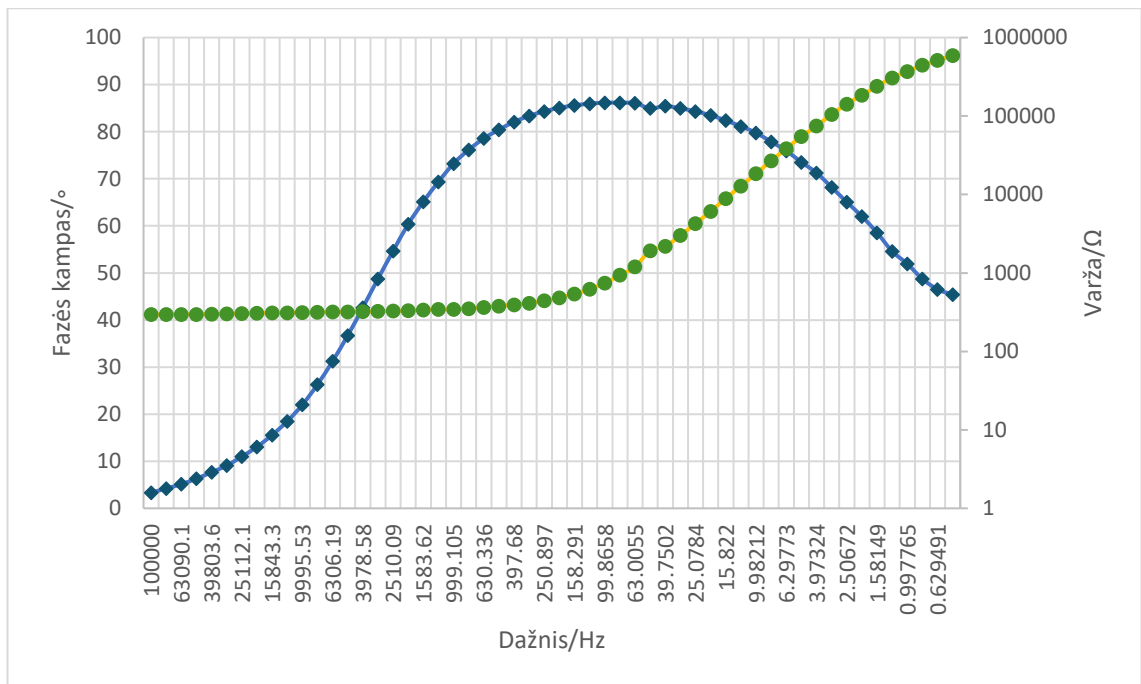
nustatytas reikšmingas varžos sumažėjimas, rodantis stiprų membranos laidumo padidėjimą ir ryškų SLO poveikį (9 pav.).



12 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 5)

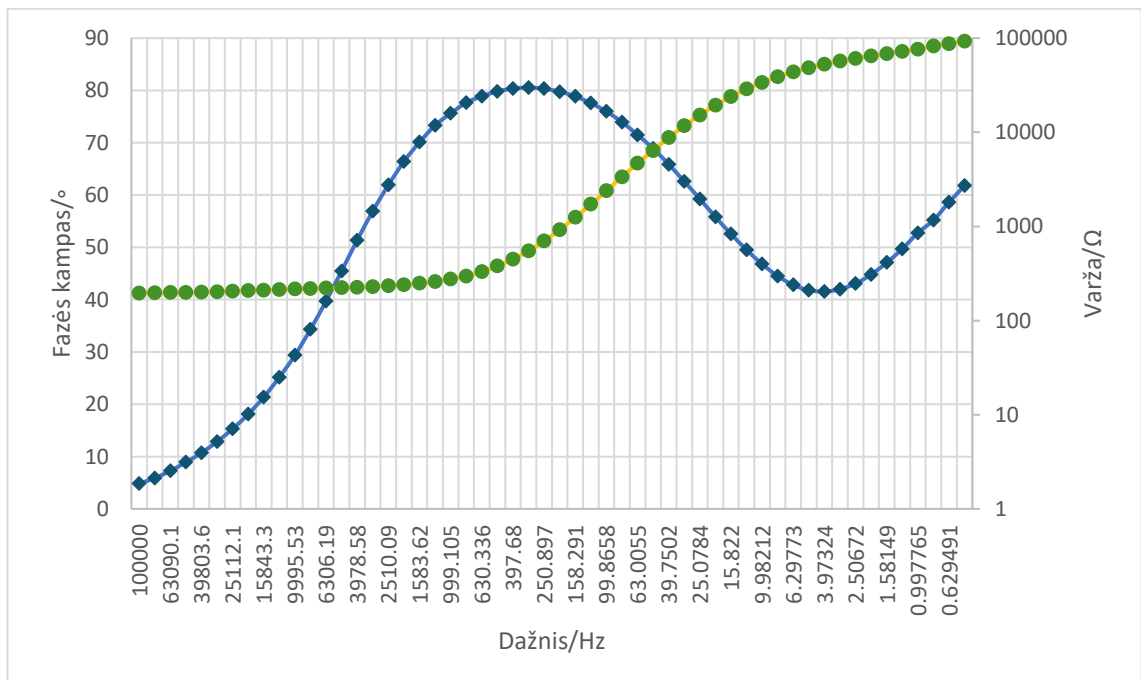
3.5. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (50/30/20)

Toliau vertinta DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) lipidinė kompozicija. pH 8 terpėje po streptolizino pridėjimo fazės minimumas visais matavimais išliko žemų dažnių srityje ($< 0,5$ Hz). Reikšmingų fazės minimumo ar varžos pokyčių nenustatyta, kas rodo stabilios membranos išlikimą (10 pav.).



13 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 8)

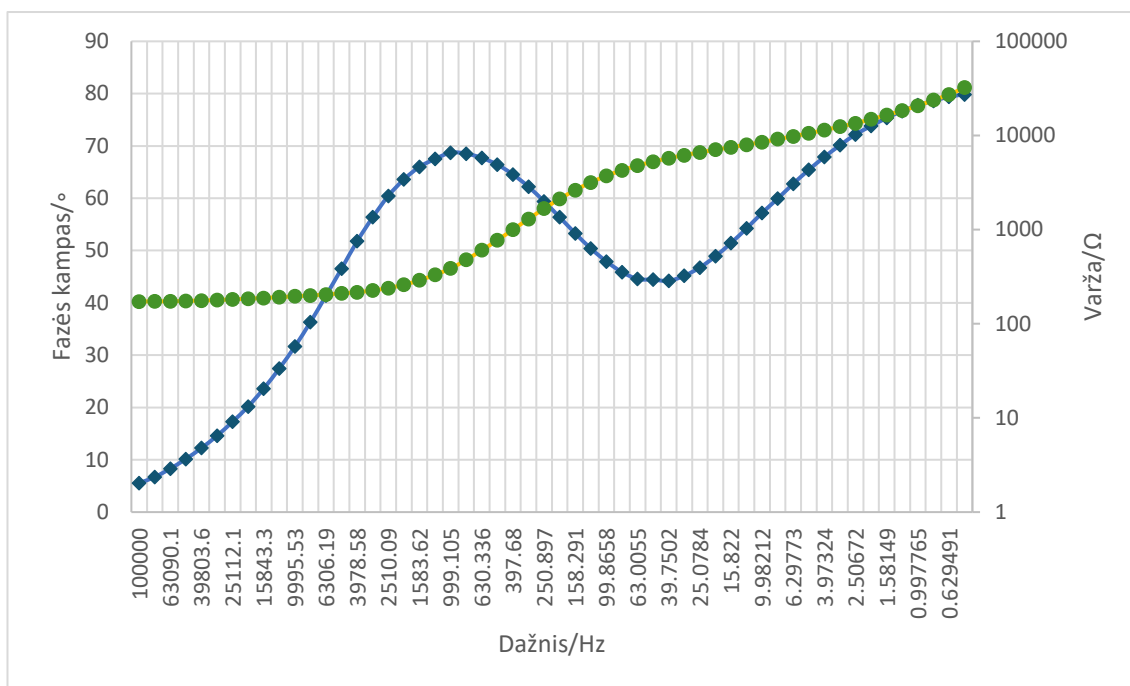
pH 7 terpėje po streptolizino pridėjimo DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) membranoms fazės minimumas buvo stebimas aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 0,8 Hz iki 7,9 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 0,5 \pm 0,4$ ($n = 6$). Šiose sąlygose taip pat stebėtas nedidelis varžos sumažėjimas, rodantis silpną membranos laidumo padidėjimą (11 pav.).



14 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 7)

pH 5 terpėje po streptolizino pridėjimo DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) membranoms fazės minimumas buvo stebimas aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 25,1

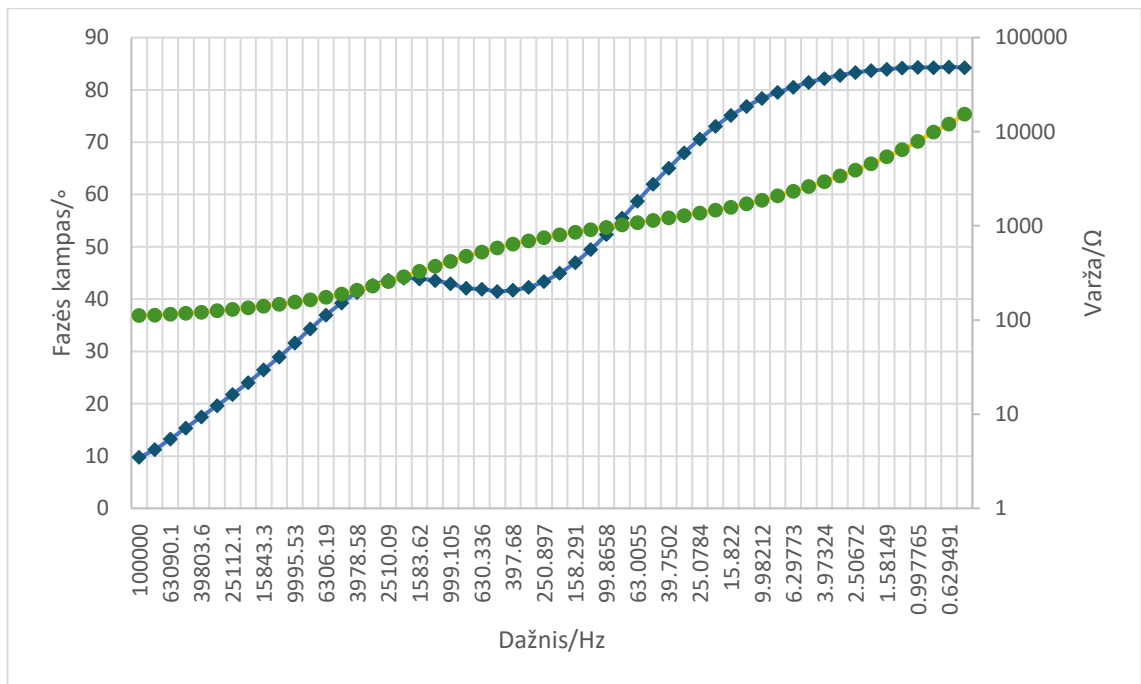
Hz iki 99,9 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 1,7 \pm 0,2$ ($n = 6$). Šiose sąlygose taip pat nustatytas varžos sumažėjimas, rodantis ryškesnį membranos laidumo padidėjimą (12 pav.).



15 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 5)

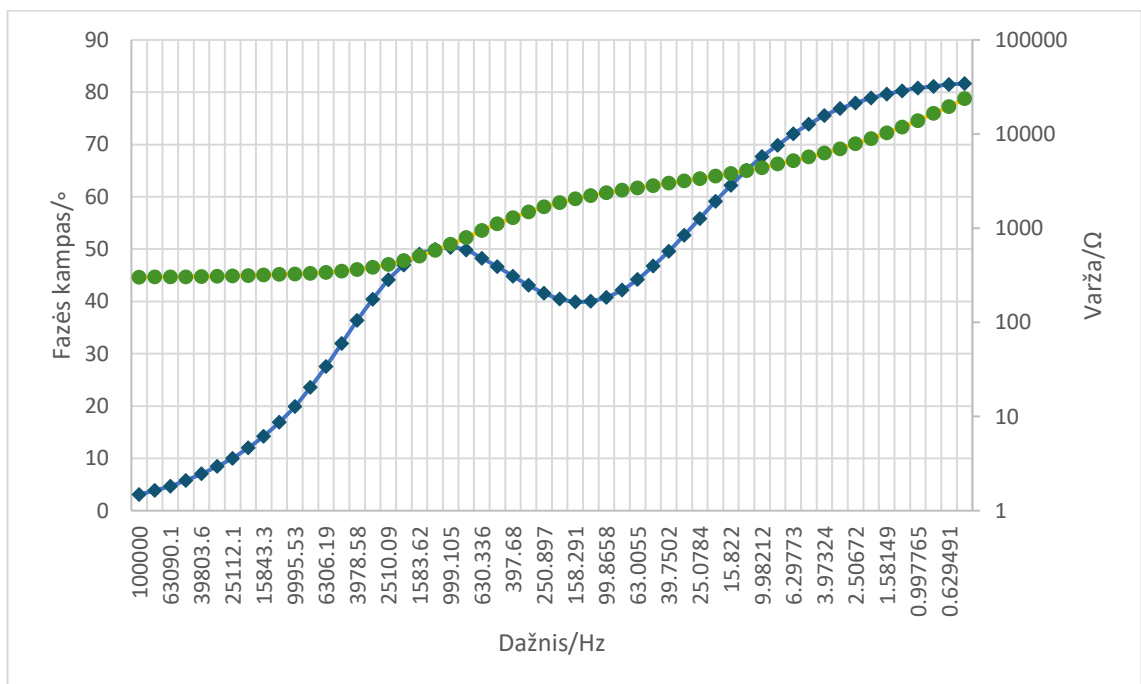
3.6. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (50/50)

Toliau buvo tiriama DOPC/Chol (50/50) lipidinė kompozicija, siekiant įvertinti cholesterolio kiekio įtaką membranos jautrumui SLO. pH 7 terpėje po SLO pridėjimo DOPC/Chol (50/50) membranoms fazės minimumas buvo stebimas vidutinių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 315,9 Hz iki 500,7 Hz. Vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,5 \pm 0,1$ ($n = 6$) (13 pav.).



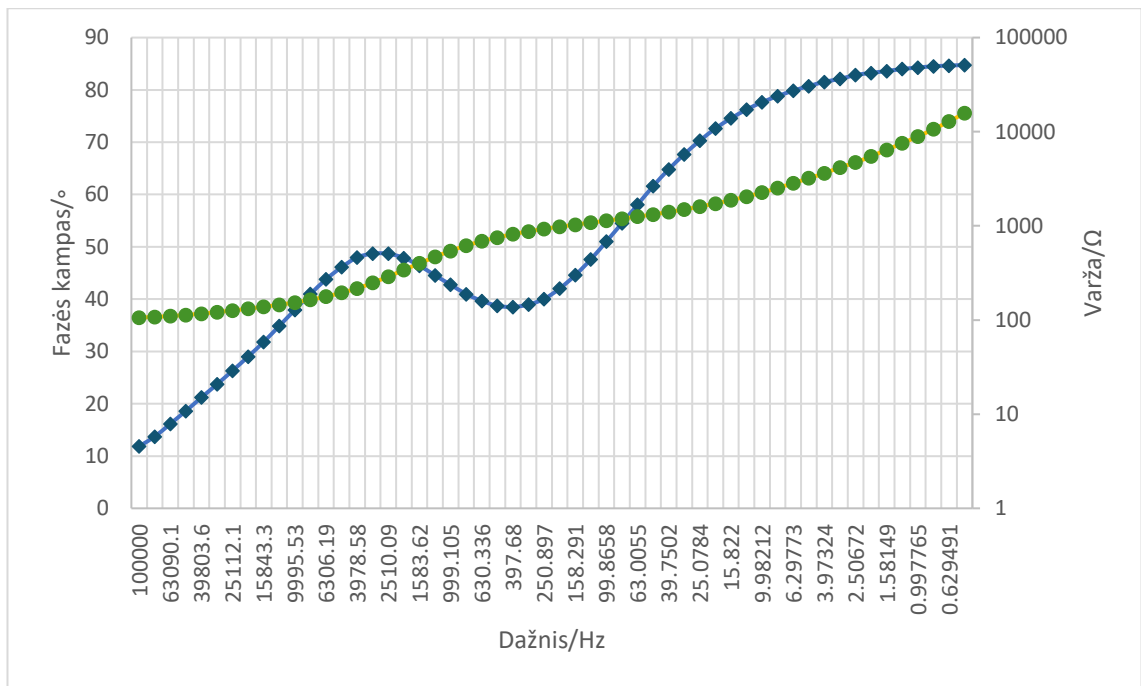
16 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (50/50) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 7)

Mažinant tirpalo pH iki 6, DOPC/Chol (50/50) membranoms po streptolizino pridėjimo fazės minimumas pasislinko į žemesnių dažnių sritį. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 125,7 Hz iki 199,3 Hz. Vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,2 \pm 0,1$ ($n = 6$) (14 pav.).



17 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (50/50) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 6)

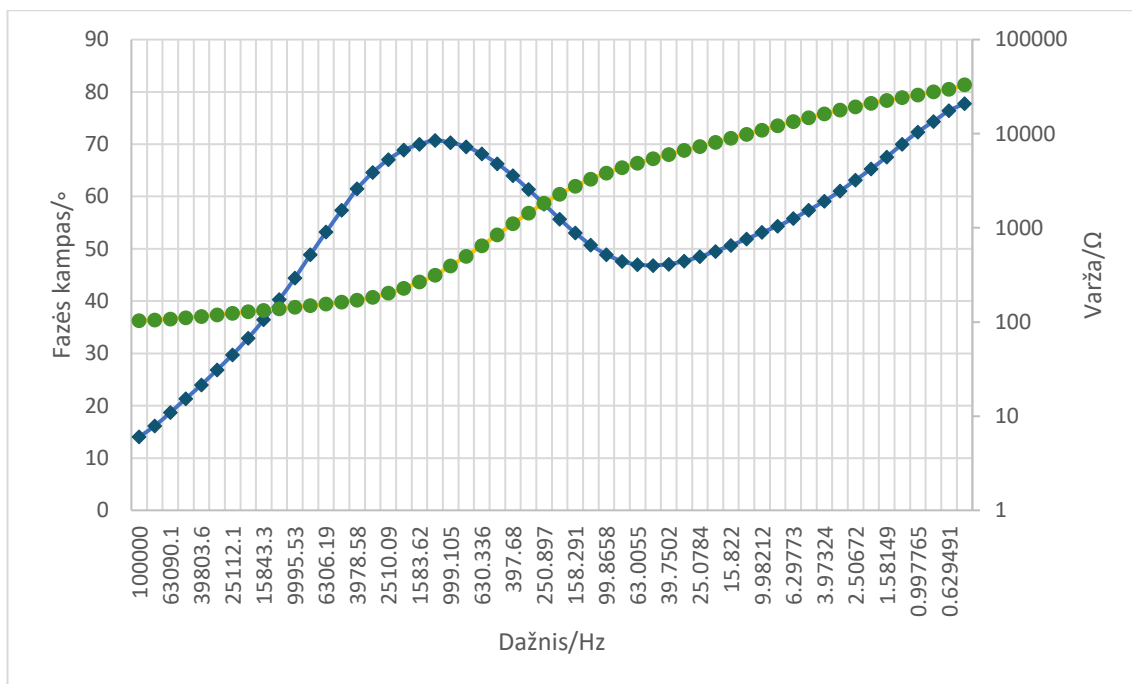
pH 5 terpėje po streptolizino pridėjimo DOPC/Chol (50/50) membranoms fazės minimumas buvo stebimas taip pat vidutinių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 250,9 Hz iki 397,7 Hz. Vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,5 \pm 0,1$ ($n = 6$) (15 pav.).



18 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (50/50) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 5)

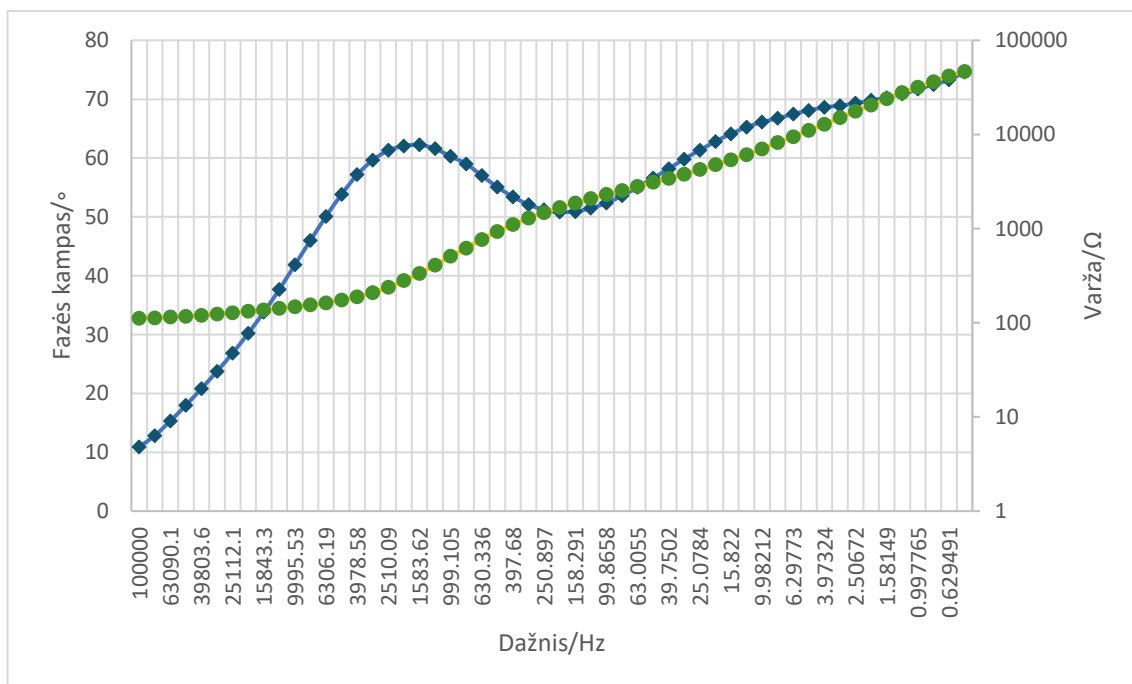
3.7. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (60/40)

Toliau vertinta DOPC/Chol (60/40) lipidinė kompozicija. pH 7 terpėje po streptolizino pridėjimo DOPC/Chol (60/40) membranoms fazės minimumas buvo stebimas arčiau vidutinių dažnių srities. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 50,1 Hz iki 125,7 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 1,9 \pm 0,2$ ($n = 4$). Šiose sąlygose taip pat stebėtas varžos sumažėjimas, rodantis membranos laidumo padidėjimą (16 pav.).



19 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (60/40) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 7)

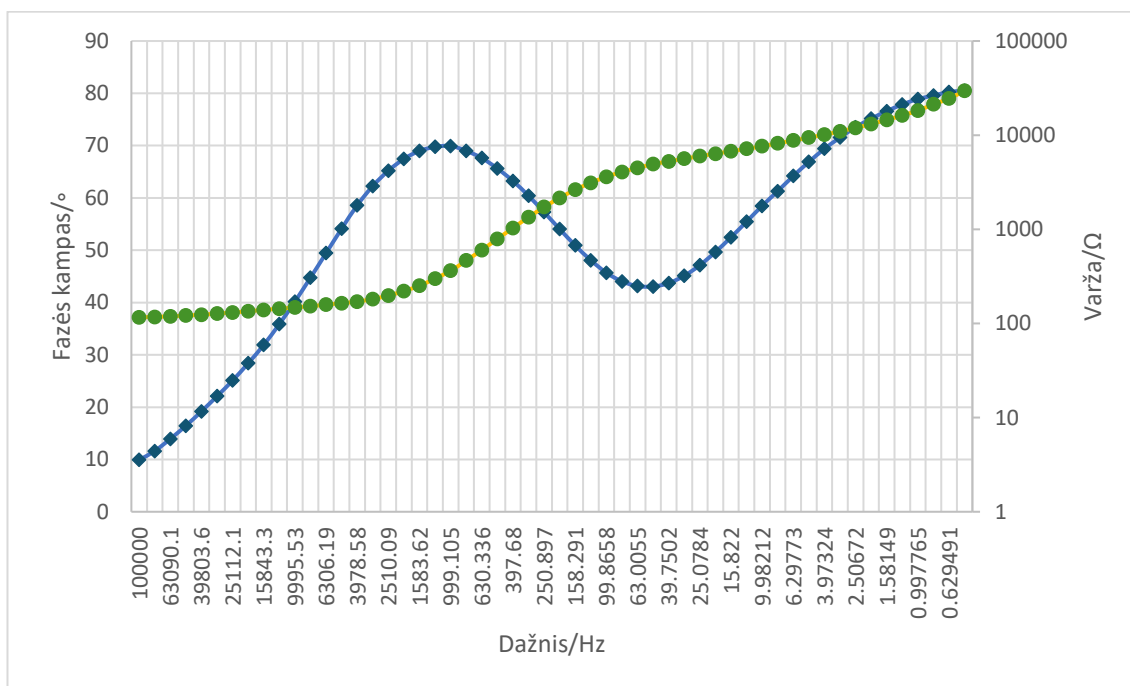
Mažinant tirpalo pH iki 5, DOPC/Chol (60/40) membranoms po SLO pridėjimo fazės minimumas išliko aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 125,7 Hz iki 199,3 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,2 \pm 0,1$ ($n = 4$). Šiose sąlygose taip pat nustatytas didesnis varžos sumažėjimas, rodantis ryškesnį membranos laidumo padidėjimą (17 pav.).



20 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (60/40) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 5)

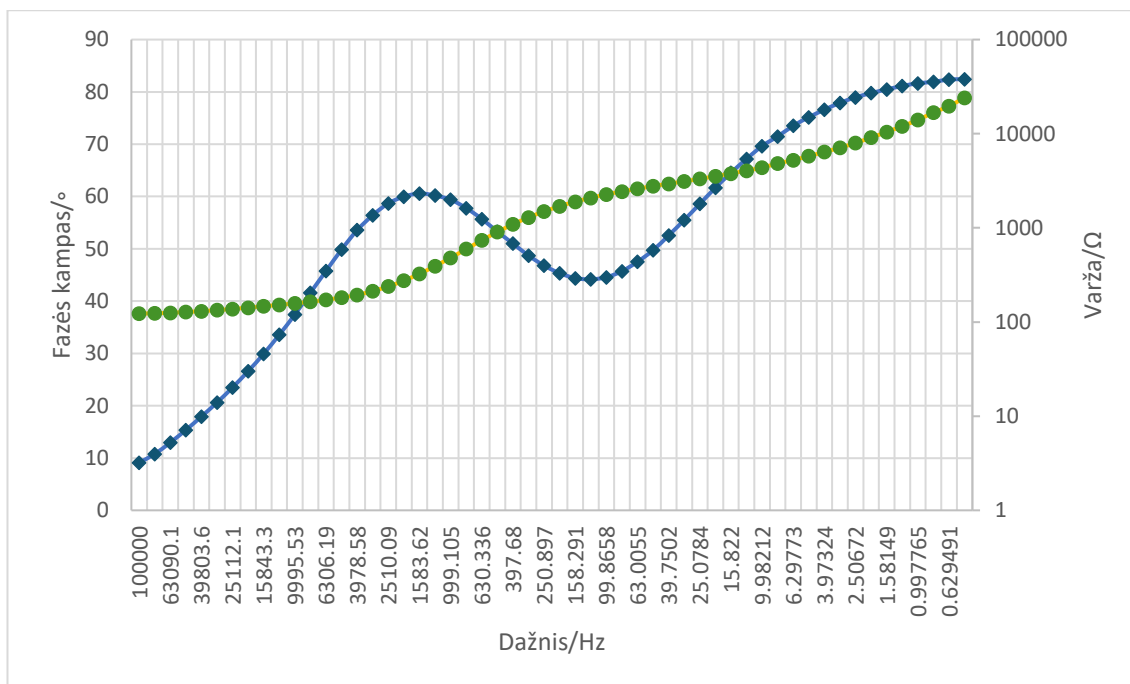
3.8. Kompozicija DOPC/DOPE/Chol (70/30)

Toliau buvo tiriama DOPC/Chol (70/30) lipidinė kompozicija. pH 7 terpėje po SLO pridėjimo DOPC/Chol (70/30) membranoms fazės minimumas buvo stebimas aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 50,1 Hz iki 79,3 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 1,8 \pm 0,1$ ($n = 6$). Šiose sąlygose taip pat stebėtas varžos sumažėjimas, rodantis membranos laidumo padidėjimą (18 pav.).



21 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (70/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 7)

pH 5 terpėje po SLO pridėjimo DOPC/Chol (70/30) membranoms fazės minimumas išliko aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 50,1 Hz iki 125,7 Hz, o vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 1,9 \pm 0,1$ ($n = 6$). Šiose sąlygose taip pat nustatytas didesnis varžos sumažėjimas, rodantis ryškesnį membranos laidumo padidėjimą (19 pav.).

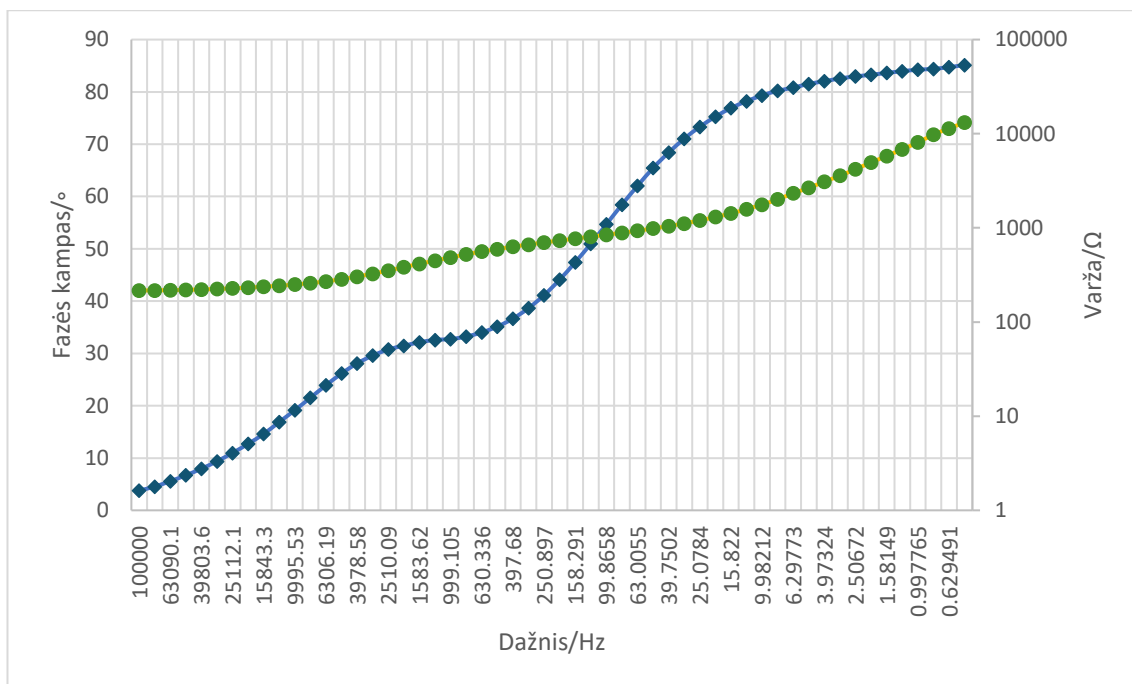


22 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (70/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (30 % WC, pH 5)

Aukščiau pateikti rezultatai gauti naudojant 30 % WC inkarinius junginius skirtingose pH terpėse. Toliau buvo vertinama WC inkarinių junginių koncentracijos įtaka membranos jautrumui SLO. Šiuo tikslu pasirinktos dvi lipidinės kompozicijos, kurios buvo tiriamos pH 7 terpėje naudojant 10 % ir 50 % WC inkarinius junginius.

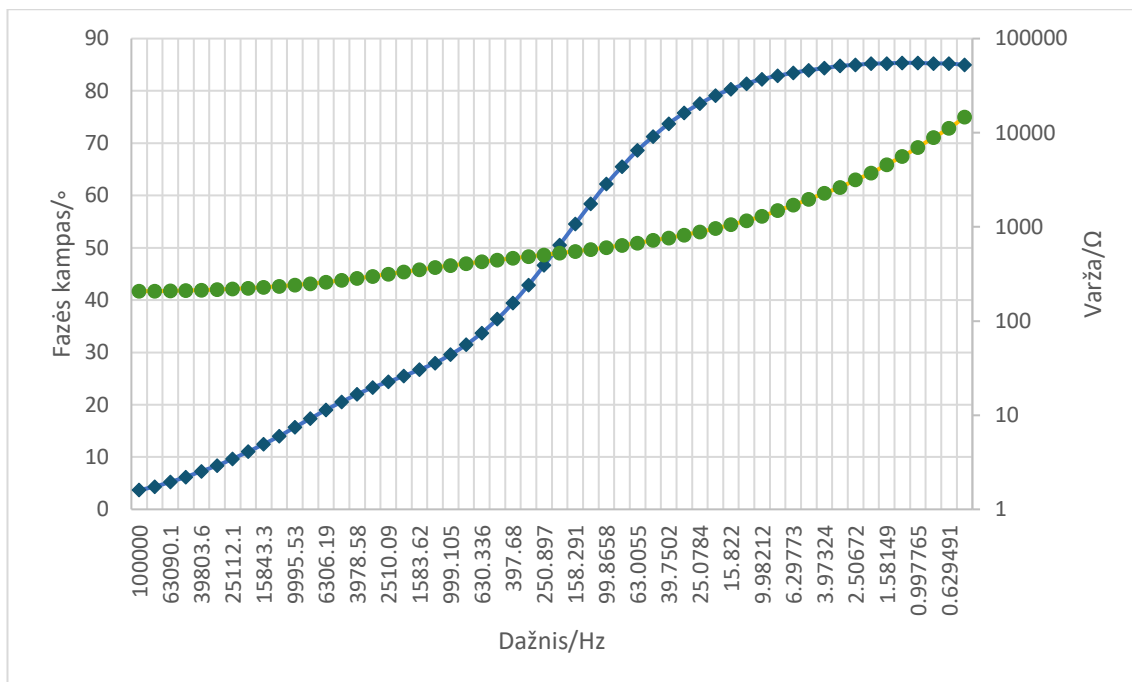
3.9. WC 10 % inkariniai junginiai

Naudojant 10 % WC inkarinius junginius, dar prieš SLO pridėjimą fazės minimumas ne visais atvejais buvo $< 0,5$ Hz, o svyravo iki ≈ 50 Hz, rodydamas nevienodą membranų susiformavimą. Vertinant 10 % WC inkarinius junginius su DOPC/Chol (70/30) kompozicija pH 7 terpėje, po streptolizino pridėjimo daugumoje matavimų fazės minimumas viršijo 100000 Hz. Tokios reikšmės rodo labai stiprų fazės minimumo poslinkį ir praktiškai visišką membranos destabilizaciją. (20 pav.)



23 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (70/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (10 % WC, pH 7)

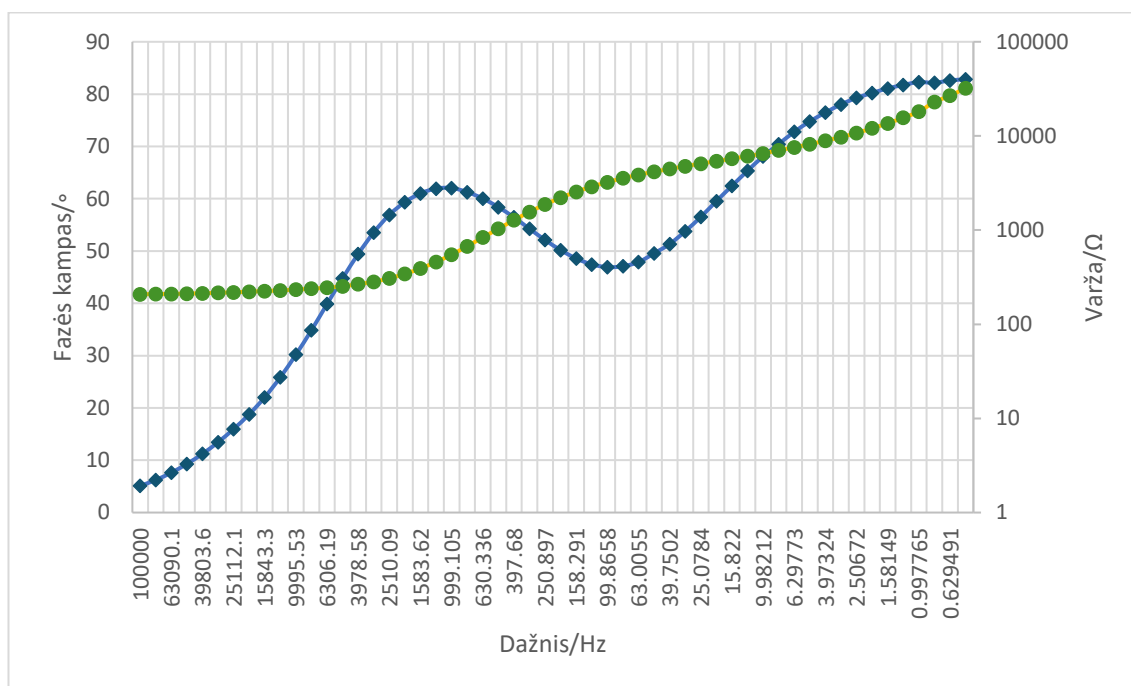
Vertinant 10 % WC inkarinius junginius su DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) kompozicija pH 7 terpėje, visais matavimais fazės minimumas viršijo 100000 Hz. Fazės minimumo poslinkis yra stiprus ir membrana visiškai destabilizuota (21 pav.).



24 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (10 % WC, pH 7)

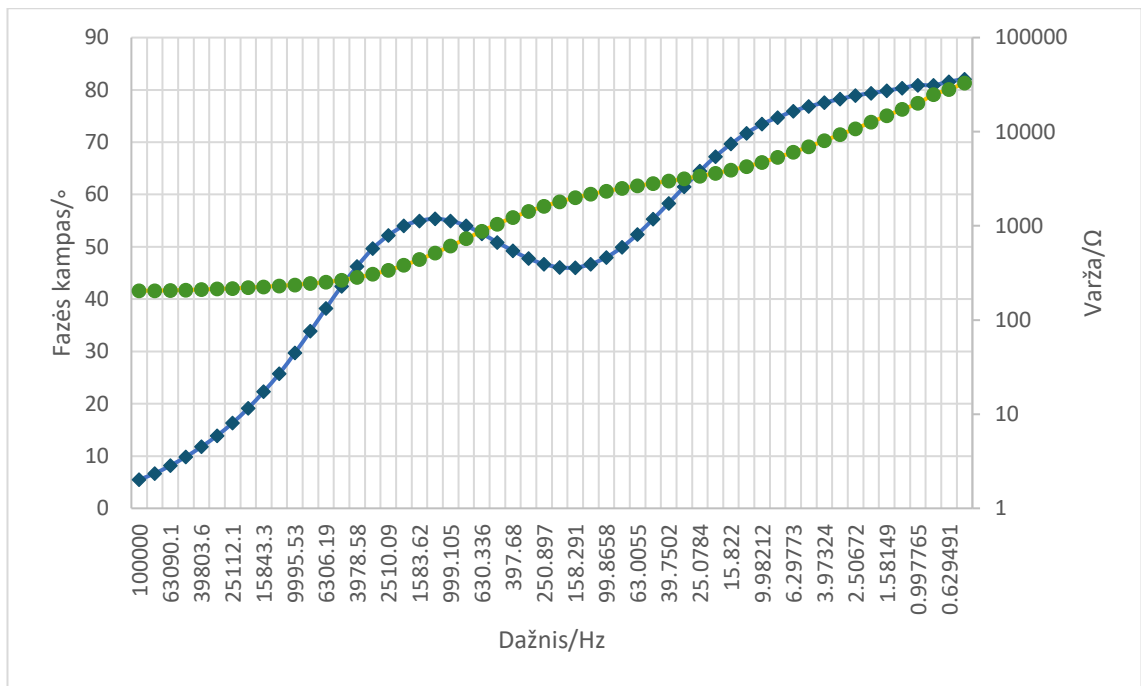
3.10. WC 50 % inkariniai junginiai

Vertinant 50 % WC inkarinius junginius su DOPC/Chol (70/30) kompozicija pH 7 terpėje, po SLO pridėjimo fazės minimumas buvo stebimas aukštesnių dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 6,3 Hz iki 250,9 Hz. Vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 1,7 \pm 0,5$ (n = 18) (22 pav.).



25 pav. Bode diagrama DOPC/Chol (70/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (50 % WC, pH 7)

Vertinant 50 % WC inkarinius junginius su DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) kompozicija pH 7 terpėje, po SLO pridėjimo fazės minimumas buvo stebimas aukštų dažnių srityje. Fazės minimumo reikšmės svyravo nuo 125,7 Hz iki 793,6 Hz. Vidutinė fazės minimumo vertė siekė $\log_{10}(f_{\min}) = 2,4 \pm 0,2$ (n = 18) (23 pav.).



26 pav. Bode diagrama DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) lipidinei membranai po 30 min. inkubacijos su SLO (50 % WC, pH 7)

4. Rezultatų aptarimas

Apibendrinant gautus rezultatus nustatyta, kad SLO poveikis dirbtinėms lipidinėms membranoms priklausė tiek nuo lipidų kompozicijos, tiek nuo tirpalo pH. Daugeliu atvejų šarminėje terpėje (pH 8) fazės minimumas išliko žemų dažnių srityje ($< 0,5$ Hz) arba buvo stebimas tik nedidelis jo poslinkis, rodantis minimalų membranos savybių pokytį. Mažinant pH iki neutralios terpės (pH 7), daugumai kompozicijų stebėtas ryškus fazės minimumo poslinkis į aukštesnių dažnių sritį, rodantis didesnę SLO poveikį membranoms. pH 7 terpėje fazės minimumo reikšmės, priklausomai nuo kompozicijos, svyravo nuo 0,5 Hz iki 500 Hz. Toliau mažinant pH iki 6 ir 5, kai kurioms membranoms buvo stebimas dar didesnis fazės minimumo padidėjimas, siekęs iki 630 Hz. Šie pokyčiai rodo padidėjusį membranos laidumą ir stipresnę SLO poveikį žemesnio pH sąlygomis. Mažesnėje pH terpėje SLO sąveika su cholesterolio turinčiomis membranomis gali tapti palankesnė dėl baltymo ir membranos paviršiaus savybių pokyčių, dėl ko gali sustiprėti toksino sąveika su membrana.

Tirtos DOPC, DOPE ir cholesterolio kompozicijos buvo pasirinktos siekiant įvertinti lipidų sudėties įtaką streptolizino O aktyvumui. Keičiant fosfolipidų kiekį membranose buvo galima palyginti, kaip membranos stabilumas ir jautrumas toksinui priklauso nuo skirtingų lipidinių komponentų santykio. Didžiausi fazės minimumo pokyčiai buvo nustatyti DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) ir DOPC/Chol (50/50) kompozicijoms, kurioms fazės minimumas siekė kelis šimtus Hz. Vidutinio stiprumo pokyčiai stebėti DOPC/DOPE/Chol (50/30/20) ir DOPC/Chol (60/40) membranoms. Mažiausias SLO poveikis nustatytas DOPC/Chol (70/30) bei didesnę DOPE kiekį turinčioms membranoms, kurioms fazės minimumas išliko žemų dažnių srityje arba pasislinko tik nežymiai.

Gauti rezultatai rodo, kad dirbtinių lipidinių membranų jautrumas SLO didėja priklausomai nuo lipidų kompozicijos, o pH pokyčiai turi reikšmingą įtaką SLO sukeltiems membranos elektrinių savybių pokyčiams. Nustatyta, kad didesnius fazės minimumo poslinkius ir ryškesnę varžos sumažėjimą demonstravo cholesterolio turinčios membranoms, ypač DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) bei DOPC/Chol (50/50) kompozicijos. Tai rodo, kad cholesterolio buvimas yra esminis veiksnys SLO sąveikai su membrana, nes šis toksinas yra cholesterolio priklausomas ir jo aktyvumas tiesiogiai susijęs su cholesterolio prieinamumu membranoje.

Taip pat nustatyta, kad DOPE kiekio pokyčiai membranoje veikė jos stabilumą ir paviršiaus savybes. Didesnę DOPE kiekį turinčios membranoms, pavyzdžiui, DOPC/DOPE/Chol (20/70/10), pasižymėjo mažesniais fazės minimumo pokyčiais, o mažiau DOPE turinčioms membranoms, kaip DOPC/DOPE/Chol (30/40/30), nustatyti didesni impedanso pokyčiai.

Be to, membranos paviršiaus hidrofiliškumas, susijęs su lipidų galvučių sąveika su aplinka ir inkarinių junginių savybėmis, taip pat turėjo įtakos streptolizino veikimui. Didesnis membranos paviršiaus hidrofiliškumas gali silpninti baltymo prisijungimą prie membranos, tuo tarpu hidrofobiškesnis membranos paviršius gali palengvinti jo įsiterpimą į lipidinį dvisluoksnį.

Įvertinus WC inkarinių junginių koncentracijos įtaką nustatyta, kad ji turi reikšmingą poveikį membranų stabilumui ir jautrumui SLO. Naudojant mažą WC koncentraciją (10 %), membranos buvo stipriai pažeidžiamos ir daugeliu atvejų visiškai suardomos, ypač DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) kompozicijoje, kuri pasirodė jautresnė nei DOPC/Chol (70/30). Tai rodo, kad mažesnė WC koncentracija neužtikrina pakankamo membranos stabilumo. Padidinus WC koncentraciją iki 50 %, membranos pasižymėjo didesniu stabilumu ir mažesniais elektrinių savybių pokyčiais. Didesnė WC koncentracija gali didinti membranos klampumą, todėl streptolizino monomerams tampa sunkiau difunduoti membranos paviršiumi ir tarpusavyje sąveikauti formuojant poras. Nustatyta, kad DOPC/DOPE/Chol (30/40/30) kompozicija demonstravo didesnę jautrumą streptolizinui nei DOPC/Chol (70/30), kas rodo, kad lipidų sudėtis, ypač DOPE kiekis, turi papildomą įtaką membranos atsakui į toksiną.

Apibendrinant galima teigti, kad SLO aktyvumas yra kompleksinis procesas, priklausantis nuo cholesterolio kiekio, membranos struktūrinės organizacijos ir paviršiaus hidrofiliškumo, o šie veiksniai kartu su pH pokyčiais lemia skirtingą membranų jautrumą toksinui.

Išvados

1. Nustatyta, kad cholesterolio turinčios membranos pasižymėjo didesniu jautrumu SLO – po toksino pridėjimo buvo stebimas ryškesnis fazės minimumo poslinkis į aukštesnių dažnių sritį ir didesni impedanso pokyčiai.

2. Membranose didinant DOPE kiekį buvo stebimas mažesnis jautrumas SLO, kadangi fazės minimumo ir impedanso pokyčiai buvo mažesni, lyginant su membranomis, turinčiomis didesnę cholesterolio ir DOPC kiekį.

3. Nustatyta, kad SLO aktyvumas priklauso nuo terpės pH – mažinant pH buvo stebimas ryškesnis fazės minimumo poslinkis į aukštesnių dažnių sritį, rodantis didesnę membranų elektrinių savybių pokytį.

4. Nustatyta, kad WC inkarinio junginio koncentracija turėjo įtakos membranų stabilumui ir streptolizino O poveikiui. Naudojant 10 % WC inkarinius junginius buvo suformuojamos mažiau stabilios membranos, o 30 % ir 50 % WC inkarinių junginių koncentracijos leido suformuoti stabilesnes lipidines membranas.

Rekomendacijos

Šiame magistriniame darbe gauti rezultatai prisideda prie poras formuojančių baltymų sąveikos su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis supratimo ir parodo, kad (tBLM bei elektrocheminės impedanso spektroskopijos derinys gali būti naudojamas kaip funkcinis streptolizino O aktyvumo vertinimo metodas. Taikytas metodinis požiūris leidžia tiesiogiai stebėti membranos elektrinių savybių pokyčius ir vertinti baltymo poveikį skirtingomis membranos sudėties bei aplinkos sąlygų kombinacijomis. Tokia sistema suteikia galimybę ne tik nustatyti baltymo sąveiką su membrana, bet ir palyginti jo aktyvumą keičiant lipidinę kompoziciją, inkarinių junginių koncentraciją bei terpės pH.

Gauti rezultatai rodo, kad dirbtinės lipidinės membranos gali būti naudojamos kaip jautri modelinė sistema poras formuojančių toksinų aktyvumui tirti. Elektrocheminės impedanso spektroskopijos metodas leidžia registruoti membranos atsaką realiu laiku, be papildomų žymenų, todėl toks metodinis sprendimas turi potencialą būti taikomas kuriant funkcinius biosensorinius metodus. Tokios sistemos galėtų būti naudojamos vertinant bakterinių toksinų aktyvumą, lyginant skirtingų aplinkos sąlygų poveikį baltymo veikimui ar tiriant membraną stabilizuojančių ar porų formavimą slopinančių junginių poveikį.

Šiame darbe taikytas tBLM ir elektrocheminės impedanso spektroskopijos metodas yra perspektyvus įrankis funkciniam baltymų aktyvumo tyrimams. Gauti rezultatai gali būti naudojami kaip pagrindas tolimesniems tyrimams, orientuotiems į membranos sudėties optimizavimą, baltymų–membranų sąveikų analizę ir potencialių biosensorinių sistemų kūrimą.

Literatūros sąrašas

Aleknavičienė, Indrė, Martynas Talaikis, Rima Budvytyte, and Gintaras Valincius. “The Impact of an Anchoring Layer on the Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes on Silver Substrates.” *Molecules* 26, no. 22 (2021): 6878. <https://doi.org/10.3390/molecules26226878>.

Aleksandrovic, Anastasija, Inga Gabriunaite, Gintaras Valincius, and Aušra Valiūnienė. “Regeneration of Tethered Bilayer Lipid Membrane Biosensors for Repetitive Use in Toxin Detection.” *Bioelectrochemistry* 167 (February 2026): 109078. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2025.109078>.

Alves, Sara, Joana M. Pereira, Rupert L. Mayer, et al. “Cells Responding to Closely Related Cholesterol-Dependent Cytolysins Release Extracellular Vesicles with a Common Proteomic Content Including Membrane Repair Proteins.” *Toxins* 15, no. 1 (2023): 4. <https://doi.org/10.3390/toxins15010004>.

Ambrulevičius, Filipas, and Gintaras Valinčius. “Electrochemical Impedance Spectrum Reveals Structural Details of Distribution of Pores and Defects in Supported Phospholipid Bilayers.” *Bioelectrochemistry* (Amsterdam, Netherlands) 146 (August 2022): 108092. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108092>.

Amissah, Haneef Ahmed, Ruslana Likhomanova, Gabriel Opoku, et al. “Plasma Membrane Epichaperome–Lipid Interface: Regulating Dynamics and Trafficking.” *Cells* 14, no. 20 (2025): 1582. <https://doi.org/10.3390/cells14201582>.

Andersson, Jakob, and Ingo Köper. “Tethered and Polymer Supported Bilayer Lipid Membranes: Structure and Function.” *Membranes* 6, no. 2 (2016): 30. <https://doi.org/10.3390/membranes6020030>.

Andersson, Jakob, Ingo Köper, and Wolfgang Knoll. “Tethered Membrane Architectures—Design and Applications.” *Frontiers in Materials* 5 (September 2018). <https://doi.org/10.3389/fmats.2018.00055>.

Bashkistrov, Pavel V., Sergey A. Akimov, Erdem Bairovich Dashinimaev, and Pavel V. Bashkistrov. “Boosting Lipofection Efficiency Through Enhanced Membrane Fusion Mechanisms.” No. 2024121256. Preprint, Preprints, December 16, 2024. <https://doi.org/10.20944/preprints202412.1256.v1>.

Boztepe, Inci, Shuaifei Zhao, Xing Yang, and Lingxue Kong. “Toward Rational Design of Ion-Exchange Nanofiber Membranes: Meso-Scale Computational Approaches.” *Membranes* 16, no. 1 (2025): 5. <https://doi.org/10.3390/membranes16010005>.

Brouwer, Stephan, Tania Rivera-Hernandez, Bodie F. Curren, et al. “Pathogenesis, Epidemiology and Control of Group A Streptococcus Infection.” *Nature Reviews. Microbiology* 21, no. 7 (2023): 431–47. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00865-7>.

Calero, Carles, and Giancarlo Franzese. “Membranes with Different Hydration Levels: The Interface between Bound and Unbound Hydration Water.” *Journal of Molecular Liquids* 273 (January 2019): 488–96. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.074>.

Calzada, Elizabeth, Ouma Onguka, and Steven M. Claypool. “Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease.” *International Review of Cell and Molecular Biology* 321 (2016): 29–88. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>.

Casares, Doralicia, Pablo V. Escribá, and Catalina Ana Rosselló. “Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues.” *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 9 (2019): 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>.

Chattopadhyay, Madhurima, Emilia Krok, Hanna Orlikowska, Petra Schwille, Henri G. Franquelim, and Lukasz Piatkowski. “Hydration Layer of Only a Few Molecules Controls Lipid Mobility in Biomimetic Membranes.” *Journal of the American Chemical Society* 143, no. 36 (2021): 14551–62. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c04314>.

Clarke, Jenny, Murielle Baltazar, Mansoor Alsahag, et al. “Streptolysin O Concentration and Activity Is Central to in Vivo Phenotype and Disease Outcome in Group A Streptococcus Infection.” *Scientific Reports* 11, no. 1 (2021): 19011. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97866-4>.

Conti Nibali, Valeria, Caterina Branca, Ulderico Wanderlingh, et al. “Insights on Hydrogen Bond Network of Water in Phospholipid Membranes: An Infrared Study at Varying Hydration.” *Membranes* 15, no. 2 (2025): 46. <https://doi.org/10.3390/membranes15020046>.

Coronado, Sara, Johan Herrera, María Graciela Pino, Santiago Martín, Luz Ballesteros-Rueda, and Pilar Cea. “Advancements in Engineering Planar Model Cell Membranes: Current Techniques, Applications, and Future Perspectives.” *Nanomaterials* (Basel, Switzerland) 14, no. 18 (2024): 1489. <https://doi.org/10.3390/nano14181489>.

Craig, Micah, Siva Naga S. Yarrarapu, and Manjari Dimri. “Biochemistry, Cholesterol.” In *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2026. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513326/>.

Doktorova, Milka. “On the Long and Winding Road to a Perfect Membrane Model.” *Biophysical Journal* 118, no. 2 (2020): 273–75. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.3386>.

Donghia, Daniela, Sara Baldassari, Giuliana Drava, Giorgia Ailuno, and Gabriele Caviglioli. “Insights on Natural Membrane Characterization for the Rational Design of Biomimetic Drug Delivery Systems.” *Pharmaceutics* 17, no. 7 (2025): 841. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17070841>.

Girard-Egrot, Agnès P., and Ofelia Maniti. “Why Do Tethered-Bilayer Lipid Membranes Suit for Functional Membrane Protein Reincorporation?” *Applied Sciences* 11, no. 11 (2021): 4876. <https://doi.org/10.3390/app11114876>.

Gudyka, Jamie, Jasmin Ceja-Vega, Michael Krmic, Riley Porteus, and Sunghee Lee. “The Role of Lipid Intrinsic Curvature in the Droplet Interface Bilayer.” *Langmuir* 40, no. 22 (2024): 11428–35. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c00270>.

Heberle, Frederick A., Robin S. Petruzielo, Jianjun Pan, et al. “Bilayer Thickness Mismatch Controls Domain Size in Model Membranes.” *Journal of the American Chemical Society* 135, no. 18 (2013): 6853–59. <https://doi.org/10.1021/ja3113615>.

Hynes, Wayne, and Melanie Sloan. “Secreted Extracellular Virulence Factors.” In *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*, edited by Joseph J. Ferretti, Dennis L. Stevens, and Vincent A. Fischetti. University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333411/>.

Jackman, Joshua A., Wolfgang Knoll, and Nam-Joon Cho. “Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes.” *Materials* 5, no. 12 (2012): 2637–57. <https://doi.org/10.3390/ma5122637>.

Jiang, Yining, Batiste Thienpont, Vinay Sapuru, et al. “Membrane-Mediated Protein Interactions Drive Membrane Protein Organization.” *Nature Communications* 13 (November 2022): 7373. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35202-8>.

Kučerka, Norbert, Frederick A. Heberle, Jianjun Pan, and John Katsaras. “Structural Significance of Lipid Diversity as Studied by Small Angle Neutron and X-Ray Scattering.” *Membranes* 5, no. 3 (2015): 454–72. <https://doi.org/10.3390/membranes5030454>.

Lazanas, Alexandros Ch., and Mamas I. Prodromidis. “Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial.” *ACS Measurement Science Au* 3, no. 3 (2023): 162–93. <https://doi.org/10.1021/acsmesuresciau.2c00070>.

Lu, Zixuan, Douglas van Niekerk, Achileas Savva, et al. “Understanding Electrochemical Properties of Supported Lipid Bilayers Interfaced with Organic Electronic Devices.” *Journal of Materials Chemistry C* 10, no. 20 (2022): 8050–60. <https://doi.org/10.1039/D2TC00826B>.

Luchini, Alessandra, and Giuseppe Vitiello. “Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies.” *Biomimetics* 6, no. 1 (2020): 3. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003>.

Maček Lebar, Alenka, Damijan Miklavčič, Malgorzata Kotulska, and Peter Kramar. “Water Pores in Planar Lipid Bilayers at Fast and Slow Rise of Transmembrane Voltage.” *Membranes* 11, no. 4 (2021): 263. <https://doi.org/10.3390/membranes11040263>.

Maltseva, Daria, Grazia Gonella, Jean-Marie Ruysschaert, and Mischa Bonn. “Phospholipid Acyl Tail Affects Lipid Headgroup Orientation and Membrane Hydration.” *The Journal of Chemical Physics* 156, no. 23 (2022): 234706. <https://doi.org/10.1063/5.0092237>.

Miao, Rui, Lei Wang, Miao Zhu, et al. “Effect of Hydration Forces on Protein Fouling of Ultrafiltration Membranes: The Role of Protein Charge, Hydrated Ion Species, and Membrane Hydrophilicity.” *Environmental Science & Technology* 51, no. 1 (2017): 167–74. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03660>.

Molugu, Trivikram R., Robin L. Thurmond, Todd M. Alam, Theodore P. Trouard, and Michael F. Brown. “Phospholipid Headgroups Govern Area per Lipid and Emergent Elastic Properties of Bilayers.” *Biophysical Journal* 121, no. 21 (2022): 4205–20. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.09.005>.

Morton, Craig J., Marc-Antoine Sani, Michael W. Parker, and Frances Separovic. “Cholesterol-Dependent Cytolysins: Membrane and Protein Structural Requirements for Pore Formation.” *Chemical Reviews* 119, no. 13 (2019): 7721–36. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00090>.

Nicolson, Garth L., and Gonzalo Ferreira de Mattos. “Fifty Years of the Fluid-Mosaic Model of Biomembrane Structure and Organization and Its Importance in Biomedicine with Particular Emphasis on Membrane Lipid Replacement.” *Biomedicines* 10, no. 7 (2022): 1711. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071711>.

Olżyńska, Agnieszka, Waldemar Kulig, Heikki Mikkolainen, et al. “Tail-Oxidized Cholesterol Enhances Membrane Permeability for Small Solutes.” *Langmuir* 36, no. 35 (2020): 10438–47. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01590>.

Parkkila, Petteri, Mohamed Elderdfi, Alex Bunker, and Tapani Viitala. “Biophysical Characterization of Supported Lipid Bilayers Using Parallel Dual-Wavelength Surface Plasmon

Resonance and Quartz Crystal Microbalance Measurements.” *Langmuir* 34, no. 27 (2018): 8081–91. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01259>.

Raila, Tomas, Tadas Penkauskas, Marija Jankunec, Gintaras Dreiz̄as, Tadas Meškauskas, and Gintaras Valincius. “Electrochemical Impedance of Randomly Distributed Defects in Tethered Phospholipid Bilayers: Finite Element Analysis.” *Electrochimica Acta* 299 (March 2019): 863–74. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.12.148>.

Risse, Kerstin, Jean-Luc Bridot, Jack Yang, Leonard Sagis, and Stephan Drusch. “Tuning Interfacial Properties of Phospholipid Stabilised Oil–Water Interfaces by Changing the Phospholipid Headgroup or Fatty Acyl Chain.” *Journal of Colloid and Interface Science* 686 (May 2025): 203–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2025.01.215>.

Sabirovas, Tomas, Martynas Talaikis, Rimgailė Tamulytė, et al. “Molecular Engineering of Tethered Bilayer Lipid Membranes for Impedimetric Detection of Pore-Forming Toxins.” *Electrochimica Acta* 508 (December 2024): 145226. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.145226>.

Sezgin, Erdinc, Ilya Levental, Satyajit Mayor, and Christian Eggeling. “The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Physiological Relevance of Lipid Rafts.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18, no. 6 (2017): 361–74. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.

Siontorou, Christina G., Georgia-Paraskevi Nikoleli, Dimitrios P. Nikolelis, and Stefanos K. Karapetis. “Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future.” *Membranes* 7, no. 3 (2017): 38. <https://doi.org/10.3390/membranes7030038>.

St Germain, Michaela, Roya Iraj, and Marica Bakovic. “Phosphatidylethanolamine Homeostasis under Conditions of Impaired CDP-Ethanolamine Pathway or Phosphatidylserine Decarboxylation.” *Frontiers in Nutrition* 9 (January 2023). <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1094273>.

Stewart, Sarah E., Michael E. D’Angelo, Stefania Piantavigna, Rico F. Tabor, Lisandra L. Martin, and Phillip I. Bird. “Assembly of Streptolysin O Pores Assessed by Quartz Crystal Microbalance and Atomic Force Microscopy Provides Evidence for the Formation of Anchored but Incomplete Oligomers.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, nos. 1, Part A (2015): 115–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.012>.

Stupin, Daniil D., Ekaterina A. Kuzina, Anna A. Abelit, et al. “Bio-Impedance Spectroscopy: Basics and Applications.” arXiv:2005.03275. Preprint, arXiv, May 7, 2020. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2005.03275>.

Tadas Ragaliauskas “Lipidinių Membranų Imobilizavimas Ant Paviršiaus Ir Jų Tyrimas Paviršiaus Plazmonų Rezonanso Metodu - „Google“ Paieška.” Accessed April 22, 2026. https://www.google.com/search?q=Tadas+Ragaliauskas+Lipidini%C5%B3+membran%C5%B3+imobilizavimas+ant+pavir%C5%A1iaus+ir+j%C5%B3+tyrimas+pavir%C5%A1iaus+plazmon%C5%B3+rezonanso+metodu&oq=Tadas+Ragaliauskas+Lipidini%C5%B3+membran%C5%B3+imobilizavimas+ant+pavir%C5%A1iaus+ir+j%C5%B3+tyrimas+pavir%C5%A1iaus+plazmon%C5%B3+rezonanso+metodu&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBCDEwMDRqMGo0qAIAsAIB&sourceid=chrome&ie=UTF-8.

Talaikis, Martynas, Gintaras Valincius, and Gediminas Niaura. “Potential-Induced Structural Alterations in the Tethered Bilayer Lipid Membrane-Anchoring Monolayers Revealed by

Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.” *The Journal of Physical Chemistry C* 124, no. 35 (2020): 19033–45. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04636>.

Tsemperouli, Maria, Esther Amstad, Naomi Sakai, Stefan Matile, and Kaori Sugihara. “Black Lipid Membranes: Challenges in Simultaneous Quantitative Characterization by Electrophysiology and Fluorescence Microscopy.” *Langmuir* 35, no. 26 (2019): 8748–57. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00673>.

Valiūnienė, Aušra, and Gintaras Valinčius. “Tethered Bilayer Membranes as Impedimetric Biosensors for Detection of Pore-Forming Biological Agents.” *Current Opinion in Electrochemistry* 40 (August 2023): 101344. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2023.101344>.

Vancuylenberg, Gerome, Amin Sadeghpour, Arwen I. I. Tyler, and Michael Rappolt. “Planar Confined Water Organisation in Lipid Bilayer Stacks of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine.” *Soft Matter* 19, no. 27 (2023): 5179–92. <https://doi.org/10.1039/D3SM00387F>.

Veen, Jelske N. van der, John P. Kennelly, Sereana Wan, Jean E. Vance, Dennis E. Vance, and René L. Jacobs. “The Critical Role of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Lipid Therapy: Drugs Targeting Biomembranes*, vol. 1859, nos. 9, Part B (2017): 1558–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>.

Walker, Mark J., Timothy C. Barnett, Jason D. McArthur, et al. “Disease Manifestations and Pathogenic Mechanisms of Group A Streptococcus.” *Clinical Microbiology Reviews* 27, no. 2 (2014): 264–301. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-13>.

Wang, Hong-Yin, Deepti Bharti, and Ilya Levental. “Membrane Heterogeneity Beyond the Plasma Membrane.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (November 2020): 580814. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580814>.

Wang, Hui, Xizi Long, Yingying Sun, et al. “Electrochemical Impedance Spectroscopy Applied to Microbial Fuel Cells: A Review.” *Frontiers in Microbiology* 13 (July 2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.973501>.

Wang, Jiachao, Cuiqing Ma, Miao Li, et al. “Streptococcus Pyogenes: Pathogenesis and the Current Status of Vaccines.” *Vaccines* 11, no. 9 (2023): 1510. <https://doi.org/10.3390/vaccines11091510>.

Watson, Helen. “Biological Membranes.” *Essays in Biochemistry* 59 (October 2015): 43–69. <https://doi.org/10.1042/bse0590043>.

Yasuhara, Kazuma, and Kenichi Morigaki. “New Lipid Membrane Technologies for Reconstitution, Analysis, and Utilization of ‘Living’ Membrane Proteins.” *Biophysics and Physicobiology* 17 (September 2020): 125–29. <https://doi.org/10.2142/biophysico.BSJ-2020021>.

Yudovich, Shimon, Adan Marzouq, Joseph Kantorovitch, et al. “Electrically Controlling and Optically Observing the Membrane Potential of Supported Lipid Bilayers.” *Biophysical Journal* 121, no. 13 (2022): 2624–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.05.037>.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Vygintė Araminaitė

Magistro baigiamasis darbas

Streptolizino aktyvumo tyrimai ant dirbtinių lipidinių membranų

SANTRAUKA

Biologinių membranų vientisumas yra būtinas normaliam ląstelių funkcionavimui, todėl poras formuojantys toksinai, pažeidžiantys membranų struktūrą ir didinantys jų pralaidumą, turi svarbią biologinę reikšmę. Vienas iš jų yra streptolizinas O – *Streptococcus* genties bakterijų gaminamas baltymas, priklausantis cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai. Jis selektyviai jungiasi prie cholesterolio turinčių lipidinių membranų, oligomerizuojasi jų paviršiuje ir formuoja poras, sutrikdydamas membranos sandarumą.

Šio magistrinio darbo tikslas buvo ištirti streptolizino O poveikį dirbtinėms lipidinėms membranoms ir įvertinti jo aktyvumo priklausomybę nuo membranos sudėties bei aplinkos pH. Tyrimams naudotos tethered bilayer lipid membranų, formuojamos ant aukso paviršiaus, pasižyminčios dideliu mechaniniu ir elektriniu stabilumu. Membranų elektrinės savybės vertintos elektrocheminės impedanso spektroskopijos metodu, leidžiančiu jautriai stebėti membranos sandarumo ir joninio pralaidumo pokyčius. Membranos buvo sudarytos iš skirtingų DOPC, DOPE ir cholesterolio kompozicijų, siekiant moduluoti jų paviršiaus hidrofiliškumą ir struktūrines savybes. Streptolizino O poveikis tirtas esant skirtingoms pH sąlygoms: pH 5,0, 6,0, 7,0 ir 8,0, naudojant pastovią 20 pM toksino koncentraciją ir 30 min. inkubacijos laiką.

Rezultatai parodė, kad prieš toksino poveikį membranos pasižymėjo dideliu elektriniu sandarumu, o po streptolizino O poveikio visose sistemose buvo stebimas impedanso modulio sumažėjimas, membranos varžos kritimas ir fazinio kampo pokyčiai, rodantys porų formavimąsi. Nustatyta, kad DOPE turtingos, mažesnio hidrofiliškumo membranos buvo jautresnės toksino poveikiui, o DOPC turtingos, labiau hidratuotos membranos pasižymėjo didesniu atsparumu. Didžiausias streptolizino O aktyvumas nustatytas rūgštinėmis sąlygomis (pH 5,0), o didėjant pH iki 8,0 poveikis silpnėjo.

Gauti rezultatai parodė, kad elektrocheminės impedanso spektroskopija kartu su tBLM membranomis yra tinkama sistema streptolizino O sąveikai su lipidinėmis membranomis tirti.

Vyintė Araminaitė

Master's Thesis

Investigation of Streptolysin Activity on Artificial Lipid Membranes

SUMMARY

The integrity of biological membranes is essential for normal cellular function; therefore, pore-forming toxins that disrupt membrane structure and increase permeability have significant biological importance. One of these toxins is streptolysin O, a protein produced by bacteria of the *Streptococcus* genus and belonging to the family of cholesterol-dependent cytolysins. It selectively binds to cholesterol-containing lipid membranes, oligomerizes on their surface, and forms pores, thereby disrupting membrane integrity.

The aim of this master's thesis was to investigate the effect of streptolysin O on artificial lipid membranes and to evaluate the dependence of its activity on membrane composition and environmental pH. Tethered bilayer lipid membranes formed on gold surfaces were used as model systems due to their high mechanical and electrical stability. The electrical properties of the membranes were analyzed using electrochemical impedance spectroscopy, a sensitive and non-destructive method for monitoring changes in membrane integrity and ionic permeability.

The membranes were composed of different ratios of DOPC, DOPE, and cholesterol to systematically modulate membrane surface hydrophilicity and structural properties. The effect of streptolysin O was studied under different pH conditions (pH 5.0, 6.0, 7.0, and 8.0) using a constant toxin concentration of 20 pM and an incubation time of 30 minutes.

The results showed that before toxin exposure, the membranes exhibited high electrical resistance and clear capacitive behavior characteristic of intact lipid bilayers. After streptolysin O treatment, all membranes demonstrated a decrease in impedance modulus, reduced membrane resistance, and phase angle changes, indicating pore formation. DOPE-rich membranes with lower hydrophilicity were more sensitive to the toxin, whereas DOPC-rich, more hydrated membranes showed greater resistance. The strongest streptolysin O activity was observed under acidic conditions (pH 5.0), while increasing pH to 8.0 gradually reduced its effect.

These findings demonstrate that electrochemical impedance spectroscopy combined with tethered bilayer lipid membranes is a suitable and sensitive system for studying streptolysin O interactions with lipid membranes.

Autoriaus asmeninis indėlis

Darbo autorė savarankiškai atliko eksperimentinius tyrimus, formavo lipidines membranas, vykdė elektrocheminės impedanso spektroskopijos (EIS) matavimus bei analizavo gautus rezultatus.

Autorė taip pat atliko rezultatų apdorojimą ir vizualizaciją, parengė darbo tekstą, literatūros apžvalgą, rezultatų aptarimą ir išvadas.

Tyrimo idėją, pagrindinę metodologinę koncepciją ir tyrimo kryptį suformulavo darbo vadovas, kuris taip pat ruošė EIS celę ir SAM plokšteles bei konsultavo eksperimentų planavimo, rezultatų interpretavimo ir darbo rengimo klausimais.