

RAPORT

Privind Etapa aII-a a proiectului Nr. 85/2012 Modelarea si simularea activitatii pompelor de eflux bacteriene prin metode laser avansate (AMPLE)

REZUMATUL ETAPEI

Titlul generic al etapei este „**Modelarea de medicamente si analiza partiala a mecanismelor de inhibare a pompelor de eflux (EPI)**”, iar activitatile abordate de fiecare partener au avut in vedere atingerea obiectivelor etapei. Sintetic, s-au obtinut urmatoarele rezultate:

1. *Masurari de absorbtie IR inainte si dupa iradierea cu fascicul laser a medicamentelor cu efect EPI cunoscut.*

S-au luat in discutie Promazina (PZ) si Prometazina (PMZ), care sunt derivati de fenotiazina, ca si BG1188, un derivat de chinazolina. Medicamentele au fost expuse la radiatie laser, iar comportarea lor in aceste conditii a fost evaluata cu ajutorul Spectroscopiei in Infrarosu cu Transformata Fourier (FTIR – Fourier Transformed Infrared Spectroscopy).

2. *Efectuarea partiala de modelari moleculare pentru medicamentele selectate.*

S-a realizat calculul de spectre moleculare vibrationale ale unor medicamente de interes (PMZ, PZ, derivati hidroxid si sulfoxid ai acestora, CPZ-clorpromazina) si al produsilor obtinuti in urma iradierii acestora cu fascicul laser emis la 266 nm. Pentru aceasta au fost folosite programele Gaussian09 si GaussView 5.0. S-au comparat rezultatele obtinute experimental cu cele calculate.

3. *Activitatea Clorpromazinei iradiate impotriva pompelor de eflux ale tulpinilor gram – negative si gram – pozitive.*

A fost desfasurat un experiment in scopul evaluarii calitatii EPI a CPZ iradiate pentru tulpinile gram – negative si gram – pozitive.

4. *Dezvoltarea de modele de interactie a medicamentelor cu pompele de eflux.*

Metoda “tabla de sah” a fost folosita pentru a testa sinergiile fenotiazinelor (CPZ, CPZ iradiat, PZ, PZ iradiat, Tioridazina - TZ si TZ iradiat) impreuna cu antibioticele Ampicilina si Ciprofloxacina pentru tulpina de referinta MRSA ATCC 43300 si tulpinile izolate clinic MRSA 002/03, MRSA 006/04 si MRSA 016/05 ale *Staphylococcus aureus*.

A fost testata, de asemenea, activitatea BG1188 si a BG1188 iradiat impotriva unor tulpini de bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) si ale unora Gram-negative (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104).

5. *Dezvoltarea unei platforme de calcul de inalta performanta pentru modelarea moleculara si a dinamicii moleculare si pentru realizarea de calcule de precizie a efectelor medicamentelor asupra pompelor de eflux ale bacteriilor la nivel molecular.*

Activitatea a avut ca rezultat principal livrarea unei platforme HPC operabile pentru studiul impachetarii si functionarii pompelor de eflux, care urmeaza sa fie folosita in etapa urmatoare pentru calcule de docking si dinamica moleculara, in vederea modelarii si simularii proceselor de interactie a compusilor chimici cu pompele bacteriene. In acord cu planul de realizare, in cea de-a doua etapa a proiectului s-a upgradat si definitivat configuratia platformei de calcul de inalta performanta care este utilizata pentru modelarea si simularea sistemelor moleculare de interes pentru proiect. Totodata, s-au efectuat teste pentru evaluarea performantelor versiunilor CPU si GPU ale codurilor de dinamica moleculara pe sistemele de calcul paralel din DFCTI.

6. *Progrese in modelarea statistica a structurii proteinelor pe baza principalelor grade de libertate ale lantului primar.*

Potentialele statistice constituie alternativa convenabila ce poate ajuta la modelarea structurii proteinelor complexe, de genul pompelor de eflux ce intervin in proiectul AMPLÉ, sau a unor parti ale acestora, care prezinta o importanta functionala deosebita. Pentru viitoarea etapa a proiectului se intentioneaza dezvoltarea acestei metode si la nivelul interactiei dintre o proteina si un ligand (pentru descrierea proceselor de docking).

7. *Aplicarea compusilor chimici cu efect EPI asupra ochilor de iepuri infectati cu tulpini de bacterii si analiza diferentiala a efectelor medicamentelor neiradiate si iradiate.*

P II a aprofundat problema evidentierii efectelor CPZ neiradiate si iradiate cu fascicule laser in UV asupra tesuturilor pseudotumorale induse pe ochi de iepure si a precizat conditiile optime de abordare a studiilor, asigurandu-se o cat mai buna reproductibilitate a masuratorilor. Astfel, folosirea CPZ expuse la radiatie laser pe tesuturi extrase de la pseudotumori ale ochilor de iepure supravegheate 3 zile de la producere are efecte ce depind de concentratia initiala (inainte de iradiere) a CPZ in apa, precum si de timpii de iradiere a solutiilor cu fascicul laser UV emis la 266 nm.

RST - Raport stiintific si tehnic in extenso

ETAPA aIIa/2013: MODELAREA DE MEDICAMENTE SI ANALIZA PARTIALA A MECANISMELOR DE INHIBARE A POMPELOR DE EFLUX (EPI)

INTRODUCERE GENERALA

Raportul de faza la proiectul AMPLE pe anul 2013 reprezinta o sinteza a rezultatelor obtinute dupa remodelarea fazelor ca urmare a schimbarii nivelului de finantare estimat initial pentru proiect, pastrandu-se obiectivele de baza privind modelarea proceselor de interactie dintre medicamente modificate prin interactia cu radiatia laser cu componente din structura bacteriilor. In aceasta abordare, titlul fazei generale pe anul 2013 este "*Modelarea de medicamente si analiza partiala a mecanismelor de inhibare a pompelor de eflux (EPI)*" iar contributiile aduse la zi ale unitatilor participante sunt, respectiv, urmatoarele:

- **CO** - masurari de absorbtie IR inainte si dupa iradierea cu fascicul laser a medicamentelor cu efect EPI cunosut, efectuarea partiala de modelari moleculare si de determinari ale efectelor EPI ale medicamentelor studiate si dezvoltarea de modele de interactie a medicamentelor cu pompele de eflux. Toate aceste obiective au fost tratate in mod cuprinzator iar rezultatele obtinute de CO sunt date in sinteza in prezentul raport de faza.
- **P I** - dezvoltarea unei platforme de calcul de inalta performanta pentru modelarea moleculara si a dinamicii moleculare si pentru realizarea de calcule de precizie a efectelor medicamentelor asupra pompelor de eflux ale bacteriilor la nivel molecular. Acest obiectiv a fost tratat de P I si rezultatele obtinute sunt raportate in sectiunea corespunzatoare a prezentei sinteze.
- **P II** - aplicarea compusilor chimici cu efect EPI asupra ochilor de iepuri infectati cu tulpini de bacterii si analiza diferentiala a efectelor medicamentelor neiradiate si iradiate. P II a tratat in amanuntime acest subiect plecand de la constatarea facuta in primul an al proiectului, care a aratat ca este necesara punerea in evidenta mai detaliata a efectelor amestecurilor de fotoprodusi obtinuti in urma iradierii unui compus parinte cu fascicul laser in UV asupra tesuturilor corneene pseudotumorale. Aceasta concluzie s-a bazat pe faptul ca tesuturile oculare odata infectate prezinta practic acelasi tip de reactie la tratament din punct de vedere al evolutiei structurilor histopatologice ale tesuturilor. Obiectivele P II au fost atinse in intregime si sunt raportate in sinteza in sectiunea corespunzatoare P II din raport.

Prezentarea raportului de faza este unitara. Pentru mai buna urmarire a rezultatelor obtinute s-a optat pentru pastrarea numerotarii figurilor pe subcapitole si s-a adoptat o lista bibliografica unica pentru intregul raport.

I. CONTRIBUTIE CO

I.1. MASURARI DE ABSORBTIE IR INAINTE SI DUPA IRADIAREA CU FASCICUL LASER A MEDICAMENTELOR CU EFECT EPI CUNOSUT.

Din clasele de medicamente luate in discutie in cadrul proiectului, in aceasta etapa sunt prezentate Promazina (PZ) si Prometazina (PMZ), care sunt derivati de fenotiazina si BG1188, un derivat de chinazolina. In Fig.I.1.1 sunt ilustrate structurile chimice ale acestora.

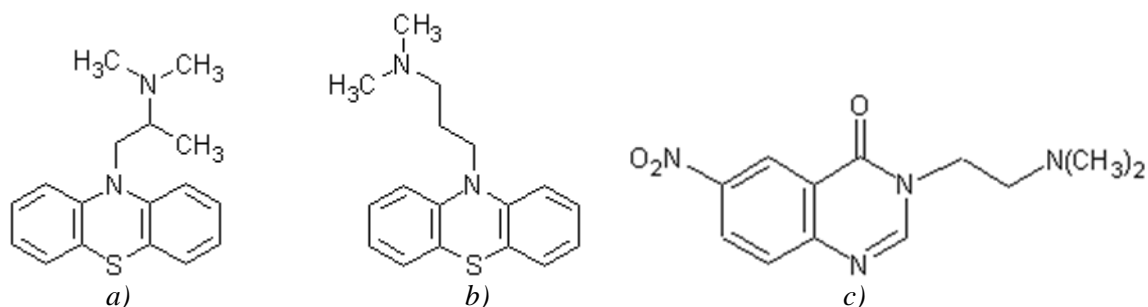


Fig. I.1.1. Structura chimica a medicamentelor investigate: Prometazina (a), Promazina (b) si BG1188 (c)

Celule de absorbtie din quart continand solutiile ale medicamentelor in apa ultra pura ($V=2$ mL) la diferite concentratii au fost expuse la radiatie laser intr-un montaj experimental (Fig. I.1.2) ce contine un laser pulsant cu Nd:YAG ca sursa optica. Fasciculul laser emis la 266 nm are rata de repetitie a pulsurilor de 10 pps si durata pulsului de 10 ns. Energia fasciculului aplicat asupra probelor de PMZ si PZ a fost de 6.5 mJ, iar in cazul BG1188 de 10 mJ.

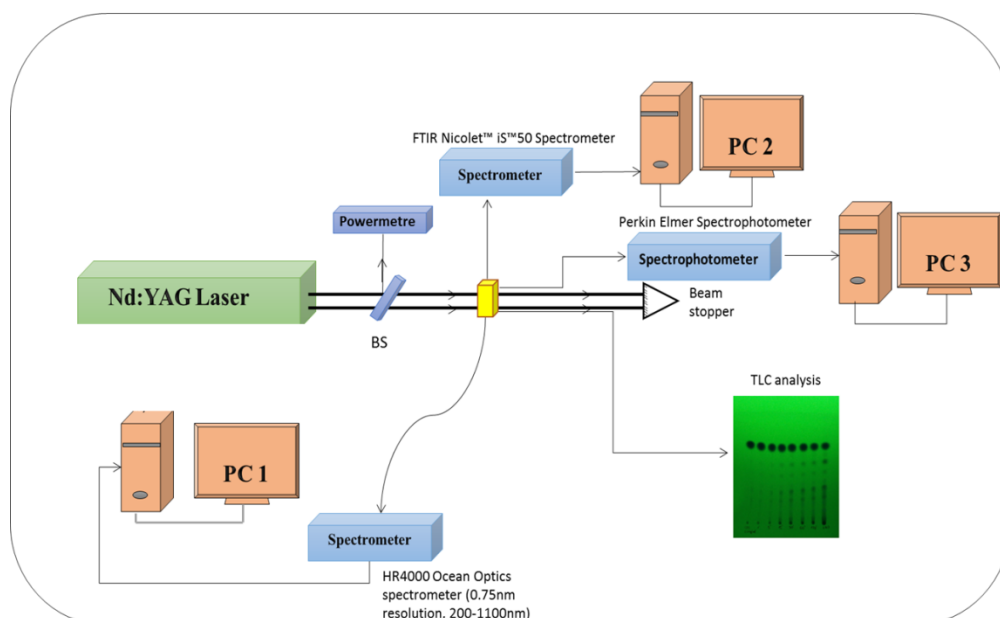


Fig. I.1.2. Montajul experimental folosit la iradiere si evaluarea efectului sau asupra solutiilor de medicamente

Modificarile structurale la nivel molecular ale solutiilor de medicamente au fost investigate cu ajutorul spectroscopiei FTIR, folosind un spectrometru Nicolet IS50 (Thermo, USA), avand o rezolutie de 0.09 cm^{-1} . In Fig. I.1.3 (a, b) sunt prezentate spectrele FTIR in domeniul spectral MIR ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) ale solutiilor de medicamente investigate, achizitionate anterior expunerii la radiatie laser si dupa fiecare secventa de iradiere.

Pozitiile maximelor (exprimate in cm^{-1}) din spectrul FTIR al solutiei de PMZ in apa ultra pura au fost atribuite urmatoarelor legaturi chimice: 3431.1 - vibratie de intindere asimetrica a legaturii N-H (amina secundara); 3053.17 si 3014.4 - vibratie de intindere asimetrica a legaturii C-H provenita din CH_3 ; 2975.64 si 2941.72 - vibratie de intindere simetrica a C-H provenita din CH_3 ; 2869.04 - vibratie de intindere asimetrica a C-H provenita din CH_2 ; banda intre ($2650 - 2300$) cm^{-1} cu maxime la 2617 , 2563.79 , 2510.49 , 2457.2 , 2413.58 poate fi datorata vibratiilor de intindere ale ionului NH^+ . Sarurile aminelor terciare prezinta o banda larga, intensa in aceasta regiune, banda care poate fi atribuita atomului de hidrogen al ionului NH^+ [Warren s.a., 1965]; 1639.61 si 1594.98 - intindere a inelului aromatic; 1461.1 - deformare asimetrica a CH_3 ; 1396 si 1286 - deformare simetrica a CH_3 ; 1382.87 - vibratie de torsiune a CH_3 ; 1352.83 - vibratie de rotatie a CH_2 ; 1256.71 , 1228.93 , 1128.95 si 1107.18 - deformare in plan a legaturii C-H a inelului aromatic; 1198.9 - vibratie de torsiune a CH_3 ;

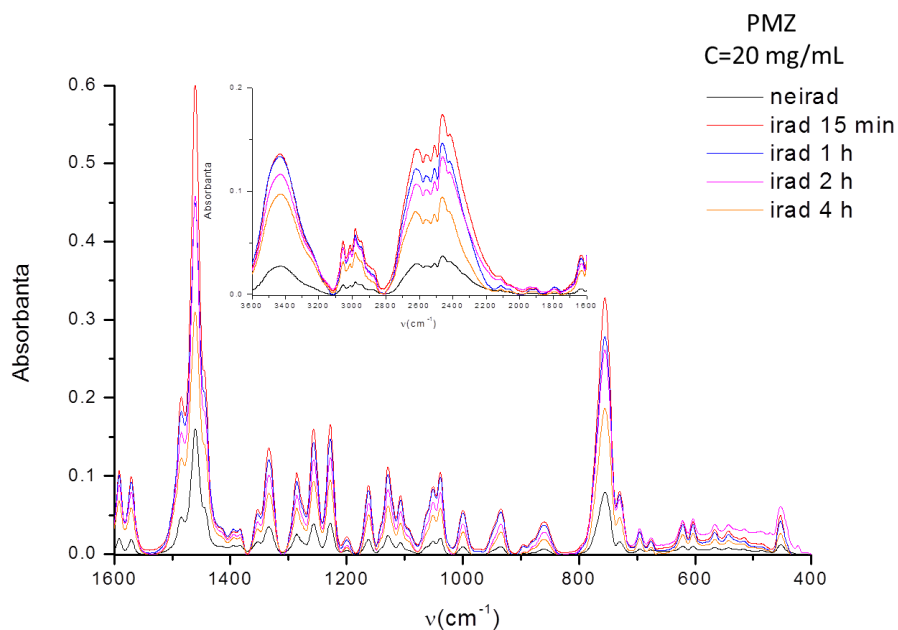


Fig. I.1.3.a. Spectrul FTIR al solutiei de PMZ in concentratie 20 mg/mL in apa ultra pura, iradiata pana la 4 ore

1161.99 – vibratie de intindere a legaturii C-N provenita din N-CH₃; 1062.87- vibratia scheletala a legaturii C-C; 1050.1 - vibratia scheletala ce implica intinderea C-C in inelul aromatic; 1038.09 – vibratii de balansare a C-H din CH₂; 997.54 - C-H vibratie de deformare a C-H din CH₃; 935.22 si 862 – vibratii de deformare a C-H din CH₃; 755, 730, si 696.82- deformare in afara planului a legaturilor C-H ale inelului aromatic si torsiunea acestuia [Socrates 2001; Silverstein s.a., 2005; Schrader, 1995].

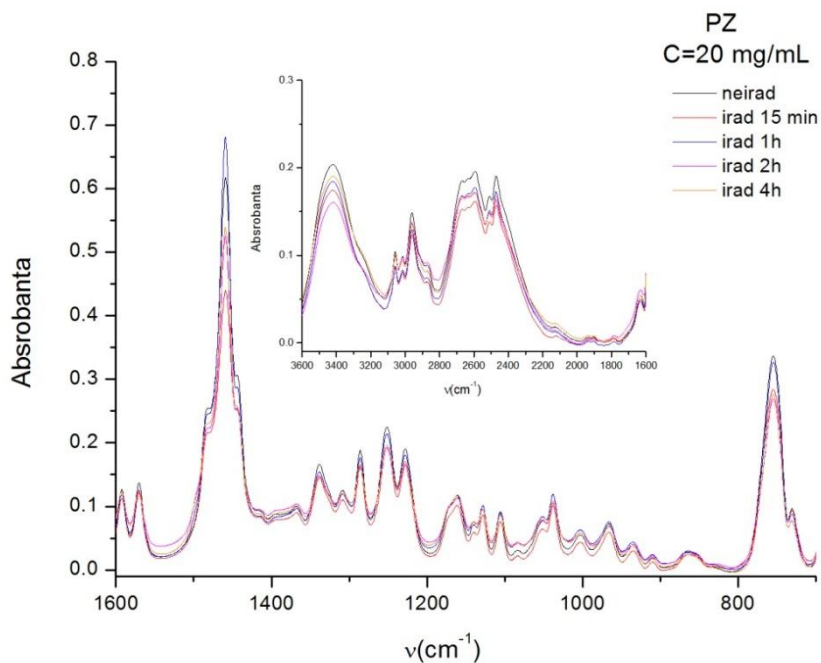
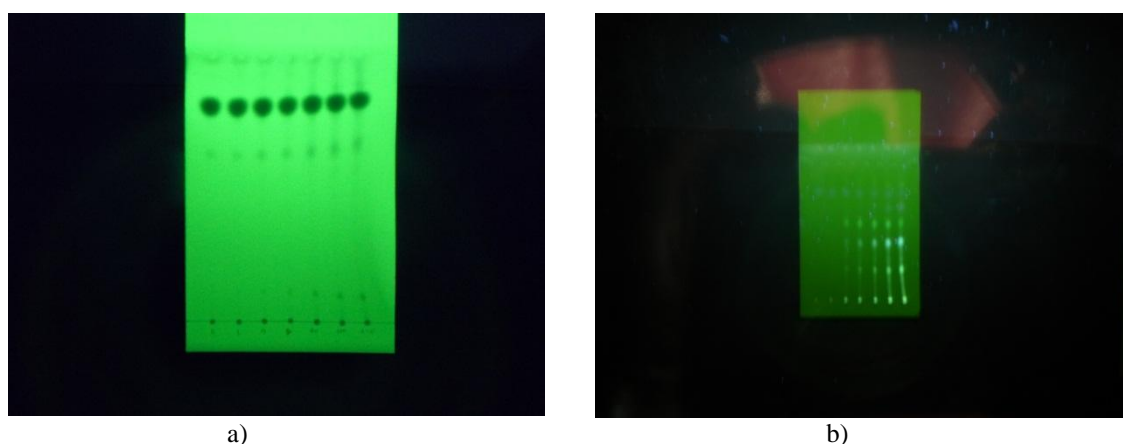


Fig. I.1.3.b. Spectrul FTIR al solutiei de PZ in concentratie 20 mg/mL in apa ultra pura, iradiata pana la 4 ore

Au fost identificate si atribuite maximele observate in spectrul FTIR al solutiei de PZ in apa ultra pura, dupa cum urmeaza: 3416.52- vibratie de intindere a legaturii N-H (amina secundara); 3058.12 si 3010.26 - intindere asimetrica a legaturii C-H provenite din CH₃; 2962.21 si 2870.47 – intindere simetrica legaturii C-H provenite din CH₃; banda intre (2700 – 2300) cm⁻¹ cu maxime la 2673.89,

2643.31, 2586.52, 2516.16 si 2468.58 poate fi datorata vibratiilor de intindere ale ionului NH^+ ; 1663, 1594.27 si 1568 – intindere a inelului aromatic; 1454- deformare asimetrica a CH_3 ; 1369- deformare asimetrica a CH_2 ; 1335.4- deformare prin rasucire a legaturii C-H provenite din CH_2 ; 1310- C-H deformare prin pendulare a C-H din CH_2 ; 1285.63, 1257.61, 1157.98 si 1105.05 - deformare in plan a legaturilor C-H din inelul aromatic; 1123.73, 936.92- deformare prin rasucire a legaturilor C-H provenite din CH_2 si CH_3 ; 1049, 1002.3, 859.09 – vibratii scheletale C-C (lant); 1039.67- vibratii scheletale ale legaturilor C-C din inelul aromatic; 968.06, 753.23, 731.43, 700.30 – deformare in afara planului a legaturilor C-H ale inelului aromatic.

In cazul ambelor solutii de medicamente nu se observa alterari ale maximelor MIR caracteristice in urma expunerii la radiatie laser cu parametrii descrisi anterior. Cu toate acestea, spectrele de absorbtie in UV/VIZ precum si cele de fluorescenta indusa laser (LIF) indica modificari la nivel molecular ale celor doua solutii investigate [Simon s.a., 2013]. De asemenea, masurari de cromatografie in strat subtire (TLC) demonstreaza existenta unor fotoprodusi care urmeaza a fi identificati prin metode chimice avansate (LC-TOF-MS), dar a caror concentratie in solutie este mascata de concentratia mare a substantelor initiale (Fig I.1.4).



a) b)
Fig. I.1.4. Cromatograma in strat subtire a PMZ(a) si PZ(b)

In urma iradierii solutiei de BG1188 se observa in spectrul FTIR (Fig. I.1.5) o crestere a maximelor de la 616 cm^{-1} , 668 cm^{-1} , in zona ($927 - 1004\text{ cm}^{-1}$), 1089 cm^{-1} , 1318 cm^{-1} si in domeniul ($2970-3330\text{ cm}^{-1}$). In acelasi timp se poate observa o scadere a maximelor de la 853 cm^{-1} si 2850 cm^{-1} .

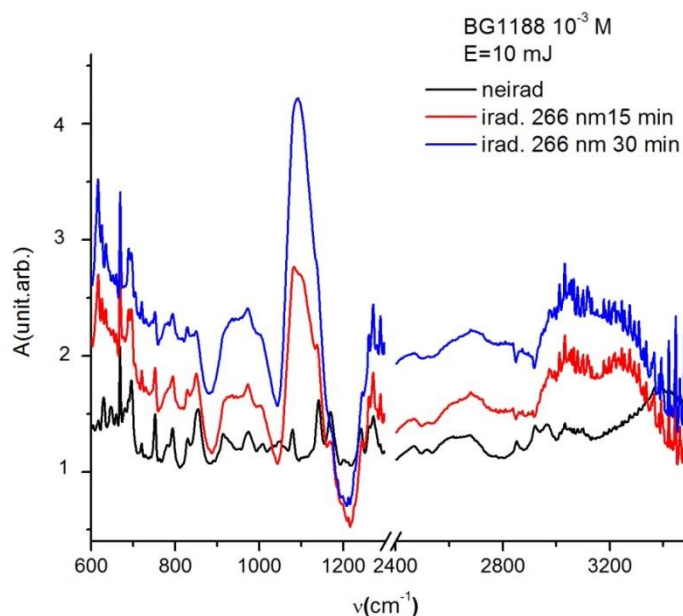


Fig. I.1.5. Spectrul FTIR al solutiei de BG1188 in concentratie 10^{-3}M in apa ultra pura, iradiata pana la 30 min

Maximul de la 616 cm^{-1} se poate datora unor vibratii de torsiune (wagging) ale legaturilor C–H, unor vibratii de deformare a inelului aromatic, dar si unor vibratii de deformare in afara planului ale legaturii O–H, unde oxigenul este atasat de inelul pirimidinic. Acest lucru sugereaza posibila rupere a legaturii duble C=O sub influenta radiatiei laser si formarea legaturilor C–O–H.

Vibratiile de torsiune ale legaturilor C–H, vibratiile de deformare in afara planului ale legaturii O–H si ale legaturii N–H dau nastere unei benzi de absorbtie cu maximul la 668 cm^{-1} . Cresterea acestui maxim sugereaza ruperea legaturii duble C=O si formarea legaturilor C–O–H, dar si posibila rupere a unor legaturi C–N pentru a se putea forma legaturi N–H.

Scaderea intensitatii benzii de la 853 cm^{-1} se poate datora ruperii inelului benzenic al chinazolinei, ipoteza sustinuta si de modificarile obtinute in spectrele de absorbtie in UV/VIS in urma iradierii solutiei de BG1188 [Smarandache s.a., 2012].

Benzile suprapuse din regiunea ($927 - 1004$) cm^{-1} se datoreaza vibratiilor de torsiune ale legaturilor C–H, dar si vibratiilor de torsiune ale inelului pirimidinic. Cresterea intensitatii acestor benzi in urma iradierii poate indica ruperea inelului benzenic, ceea ce ar permite mai multa libertate de vibrare a inelului pirimidinic.

Benzile din regiunea ($1270 - 1318$) cm^{-1} se pot datora vibratiilor de intindere asimetrice ale legaturii N–O, iar cresterea acestora se poate datora ruperii catenei de radicalul chinazolinic si formarea legaturii N–O.

In domeniul ($2970 - 3330$) cm^{-1} apar benzi suprapuse ce se pot datora vibratiilor de intindere asimetrice ale legaturilor C–H din partea R–CH₃ a moleculelor, cuplate cu vibratiile de intindere ale legaturilor O–H, ce se formeaza in cazul ruperii legaturii duble C=O. De asemenea, in aceeasi regiune apar benzi de absorbtie datorate vibratiilor de intindere simetrice si asimetrice ale legaturilor N–H.

Datorita modificarilor observate in spectrele FTIR, dar si in cele de absorbtie in UV/VIS, se poate presupune ca iradierea cu fascicul laser modifica structura moleculelor de BG1188, printre modificari numarandu-se ruperea inelului benzenic al chinazolinei, ruperea legaturii duble C=O si transformarea in C–O–H, dar si ruperea catenei laterale de radicalul chinazolinic.

1.2. EFECTUAREA PARTIALA DE MODELARI MOLECULARE SI DE DETERMINARI ALE EFECTELOR EPI ALE MEDICAMENTELOR STUDIATE;

1.2.1. Simulari moleculare cu Gaussian09

Un alt obiectiv al etapei I-a constituit calculul de spectre moleculare vibrationale ale unor medicamente de interes si a produsilor obtinuti in urma iradierii acestora cu fascicul laser la 266 nm . Pentru aceasta au fost folosite programele Gaussian09 si GaussView 5.0. S-a utilizat pentru optimizarea geometriei si pentru calculul nivelelor vibrationale corespunzatoare starilor fundamentale de singlet metoda de calcul Density Functional Theory (DFT:B3LYO) cu baza 6-311G [Frisch s.a., 2010]. In calculul de optimizare a geometriei a fost introdus si modelul de solvatare IEFPCM cu solventul apa pentru a lua in considerare influenta solventului utilizat in probele si experimentele derulate pana in prezent.

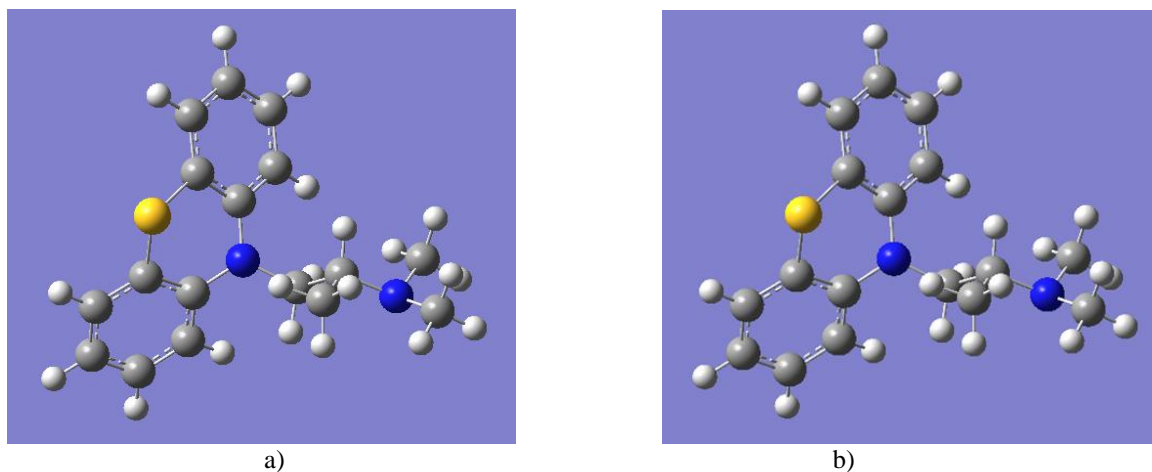


Fig. I.2.1. Structura PMZ optimizata cu metoda DFT:B3LYP in baza 6-311G: fara solvatare (a) si cu solvatare in apa (b)

Folosind acest model computacional au fost obtinute structurile optimizate pentru o serie de fenotiazine de interes in cadrul proiectului (PMZ, PZ, derivati hidroxid si sulfoxid ai acestora, CPZ-clorpromazina etc.). Spre exemplificare este data in Fig. I.2.1(a) si (b) structura geometrica a PMZ pentru molecula in faza gazoasa si in solvent apa.

De asemenea au fost calculate nivelele energetice vibrationale corespunzatoare starii de singlet S_0 a moleculelor amintite mai sus. In Fig. I.2.2 sunt prezentate pentru PMZ spectrele obtinute si intensitatile benzilor corespunzatoare atat in spectroscopie de IR cat si spectroscopie Raman.

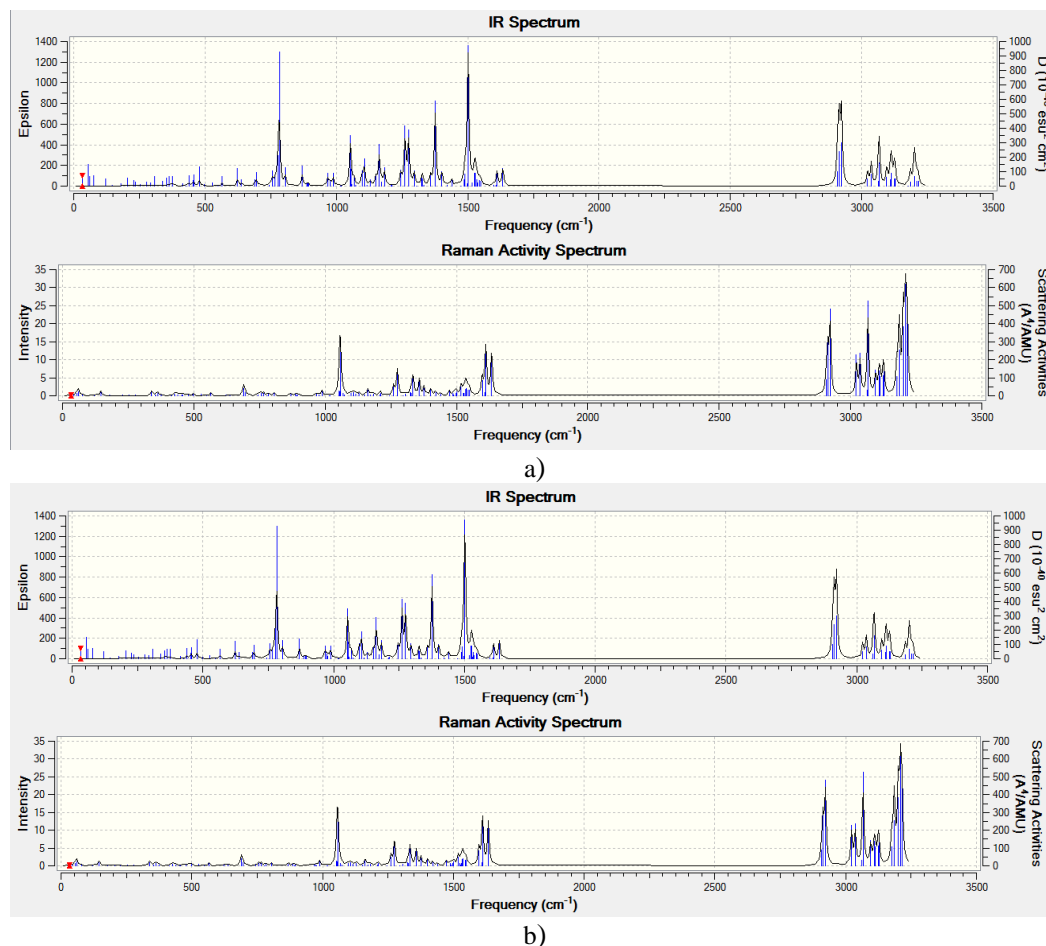


Fig. I.2.2. Spectrele IR si Raman pentru PMZ: (a) cu solvatare si (b) fara solvatare in apa

In Tabelul I.2.1 sunt comparate caracteristicile spectrale in IR ale PMZ obtinute experimental (inainte si dupa 4 h de expunere la radiatie laser pulsata, cu caracteristicile descrise la punctul anterior) cu calculele teoretice realizate prin metodologia mai sus prezentata [Schrader, 1995; Socrates 2001; Silverstein s.a., 2005].

Tabelul I.2.1. Caracteristicile spectrale in IR ale PMZ obtinute experimental, respectiv teoretic

Frecventa IR observata [cm ⁻¹]	Frecventa IR observata dupa 4 h de iradiere [cm ⁻¹]	Frecventa IR calculata [cm ⁻¹]	Intensitate IR calculata	Interpretare
-	-	528	10.494	ip CH (inel aromatic)
-	-	564	30.958	oop CH (inel aromatic)
-	-	624	67.393	ip CH (inel aromatic)
696.82	695.70112	696	64.596	oop CH (inel aromatic)
730	730.41312	-	-	oop CH (inel aromatic)
755	755.48362	756	96.523	oop CH (inel aromatic)
-	-	783	685.703	CCs (alifatic); CNs (alifatic); oopNH (alifatic)
-	-	804	109.128	CCs (alifatic); CNs (alifatic);

				oopNH (alifatic)
862	860.103	870	106.640	oopCH; t inel aromatic
935.22	934.3485	-	-	oopCH; t inel aromatic
-	-	966	81.982	oopCH; t inel aromatic
-	-	987	82.324	oopCH; t inel aromatic
997.54	999.43412	-	-	CNs (alifatic)
1038.09	1038.4875	-	-	CNs (alifatic)
1050.1	1051.50612	-	-	CNs (alifatic)
-	-	1053	423.497	CNs (alifatic); ip CH (inel aromatic) overtone 528cm ⁻¹
1062.87	-	-	-	CNs (alifatic)
-	-	1098	137.011	CNs (alifatic); CSs
1107.18	1107.43937	1107	194.873	CNs (alifatic)CSs
1128.95	1128.65462	-	-	CNs (alifatic)
-	-	1131	56.153	CNs (alifatic)
-	-	1152	119.486	CNs (alifatic)
1161.99	1161.92525	1164	297.642	CNs (alifatic)
-	-	1182	144.099	CNs (alifatic)
1198.9	1199.53525	-	-	CNs (alifatic); CCs
-	-	1212	29.918	CNs (alifatic)
1228.93	1228.46525	-	-	CNs (alifatic)
-	-	1245	151.81	CNs (alifatic); ip CH (inel aromatic) overtone 624 cm ⁻¹
1256.71	1256.91412	1263	446.315	CNs (alifatic)
-	-	1275	477.455	CNs (aromatic)
1286	1285.84512	-	-	CNs (aromatic)
-	-	1296	145.677	CNs (aromatic)
-	1333.5805	1326	121.957	CNs (aromatic)
1352.83	1353.34937	1359	133.428	CNs (aromatic)
1382.87	1383.727	1377	681.411	CNs (aromatic); CCs; CCHb
1396	1394.81662	1401	137.346	CNs (aromatic); CCs; CCHb
-	-	1440	70.214	CNs (aromatic); CCs; CCHb
1461.1	1461.84	-	-	C=Cs (inel aromatic); CHb
-	1484.50162	-	-	NHb (aromatic)
-	-	1503	1150.513	NHb (aromatic)
-	-	1527	278.948	NHb (aromatic)
-	1570.8115	-	-	CNs (aromatic); CCs; CCHb
1594.98	1592.028	-	-	CNs (aromatic); CCs; CCHb
-	-	1611	144.704	CNs (aromatic); CCs; CCHb
-	1630.60225	-	-	CNs (aromatic); CCs; CCHb
1639.61	-	1635	163.522	C=Cs (inel aromatic); CNs
-	1793.5775	-	-	oopCH
-	1907.85412	-	-	oopCH
2413.58	-	-	-	NH ⁺ s
2457.2	-	-	-	NH ⁺ s
-	2463.32312	-	-	NH ⁺ s
2510.49	2509.13	-	-	NH ⁺ s
2563.79	2561.68712	-	-	NH ⁺ s
2617	2623.8875	-	-	NH ⁺ s
2869.04	-	-	-	sp ³ CHs
-	-	2913	800.699	sp ³ CHs

2941.72	-	-	-	sp ³ CHs
2975.64	-	-	-	sp ³ CHs
-	2981.18212	-	-	sp ³ CHs
3014.4	3013.96937	3024	146.861	sp ³ CHs
-	-	3036	235.307	sp ³ CHs
3053.17	3055.43662	3066	486.233	sp ³ CHs
-	-	3096	201.512	sp ² CHs
-	-	3111	319.511	sp ² CHs
-	-	3126	266.549	sp ² CHs
-	-	3186	170.069	sp ² CHs
-	-	3201	375.198	sp ² CHs
3431.1	3429.125	-	-	NHs

Legenda: ip – deformare in plan; oop – deformare in afara planului; s – intindere; t – torsiune; b – deformare; sp²/ sp³ – gradul de hibridizare

I.2.2. Activitatea Clorpromazinei iradiate impotriva pompelor de eflux ale tulpinilor gram – negative si gram - pozitive

In cadrul experimentului s-a urmărit sa se demonstreze calitatea de inhibitor a Clorpromazinei (CPZ) iradiate asupra pompelor de eflux pentru tulpinile gram – negative si gram – pozitive.

Mediile de cultura folosite au fost: Muellder-Hinton (MH) sub forma de pudra (Sigma, Madrid, Spain), Luria Bertani (LB) si Tryptic Soy Broth (TSB) de la Oxoid (Basingstoke, Hampshire, UK), iar solutiile folosite au fost: solutie salina PBS (0.01 M tampon de fosfat, 0.0027 M KCl si 0.137 M NaCl, pH 7.4) de la Sigma Aldrich (Madrid, Spain) si glucoza (Sigma Aldrich), ce a fost dizolvata in apa, sterilizata prin filtrare si pastrata la o temperatura de 4°C. Solutia stoc de bromura de etidiu (EtBr) (Sigma Aldrich) a fost preparata in apa distilata la o concentratie de 100 mg/L.

Mediile de cultura au fost folosite in felul urmatoar: Tryptic Soya Broth (TSB) pentru *Staphylococcus aureus*, Luria-Bertani Broth (LB) pentru *Escherichia coli* si Mueller-Hinton Broth (MHB) pentru *Salmonella enteritidis*.

CPZ sub forma de pudra (Sigma, Spain), de puritate >98,9 % a fost dizolvata in apa ultra pura. Un volum de 2 mL solutie 20 mg/mL a fost iradiat cu un fascicul laser emis la 266 nm intr-un sistem experimental prezentat anterior (Fig. 1.2) pentru diferite perioade de timp: 4, 8, 16 si 24 ore.

Bacteriile Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 si HPV 107), cat si cele Gram-negative (*Escherichia coli* K-12 AG100, *Escherichia coli* K-12 AG100A, *Escherichia coli* AG100_{TET8}, *Escherichia coli* AG100A_{TET8} si *Salmonella Enteritidis* 104, *Salmonella Enteritidis* 104_{CIP}, *Salmonella Enteritidis* 5408 si *Salmonella Enteritidis* 5408_{CIP}) au fost evaluate pentru a determina activitatea pompelor de eflux in prezenta si in absenta inhibitorilor.

Pentru a determina capacitatea EPI a CPZ s-a folosit metoda de acumulare in timp real a EtBr de catre celule prin intermediul sistemului de pompe de eflux.

Pentru detectia acumularii de EtBr, culturile de celule ce se aflau in mediile de cultura (TSB, LB și MHB) au fost introduse in incubatorul setat la 37°C si la 180 rpm, pana cand densitatea optica masurata la 600 nm a fost egala cu 0,6. Pentru a prepara suspensia de celule, acestea au fost centrifugate la 13000 rpm timp de 3 minute si paleta ramasa a fost spalata de doua ori cu PBS, apoi densitatea optica a fost ajustata la valoarea de 0.6 (Fig. I.2.3).

Pentru a determina concentratia la care acumularea de EtBr este detectabila, a fost desfasurat un experiment la diferite concentratii ale acesteia in amestecul ce continea PBS si glucoza cu o concentratie finala de 4%. Astfel, in tuburi de 200 μL s-au adaugat: 50 μL de celule si 50 μL de amestec. Pentru fiecare tip de celula s-au testat concentratii EtBr de la 0.25 mg/L pana la 5 mg/L si s-a ales concentratia de substrat adecvata. Prin urmare, pentru fiecare tip de tulpina s-a stabilit o concentratie de EtBr astfel incat acumularea de substrat in interiorul bacteriei sa fie detectata de instrumentul folosit. In primul pas, pentru desfasurarea experimentului trebuie sa se aleaga concentratia de EtBr pentru care acumularea este detectabila. Intr-un tub de 200 μL se adauga EtBr la concentratia finala dorita, glucoza care are o concentratie finala de 0.4%, iar restul de cantitate de pana la 100 μL este PBS. Astfel, se adaugă intr-un tub de 200 μL: 45 μL de amestec, 50 μL de celule cu densitatea optica de 0.6 masurata la 600 nm si 5 μL de CPZ iradiata la concentratii intre 50 mg/L si 0.78 mg/L. De asemenea, se pun si tuburi in care nu se adauga inhibitori de pompe de eflux, pentru

control. Prin utilizarea instrumentului Real-Time Thermal Cycler Rotor-Gene (TM) 3000 se obține gradul de fluorescență generat în unitatea de timp pentru fiecare dintre cele 32 de tuburi.

Pentru rezultate corecte este necesar să se folosească o concentrație de inhibitor de pompe de eflux care să fie mai mică decât concentrația antibacteriană [Ramelhete s.a., 2011].

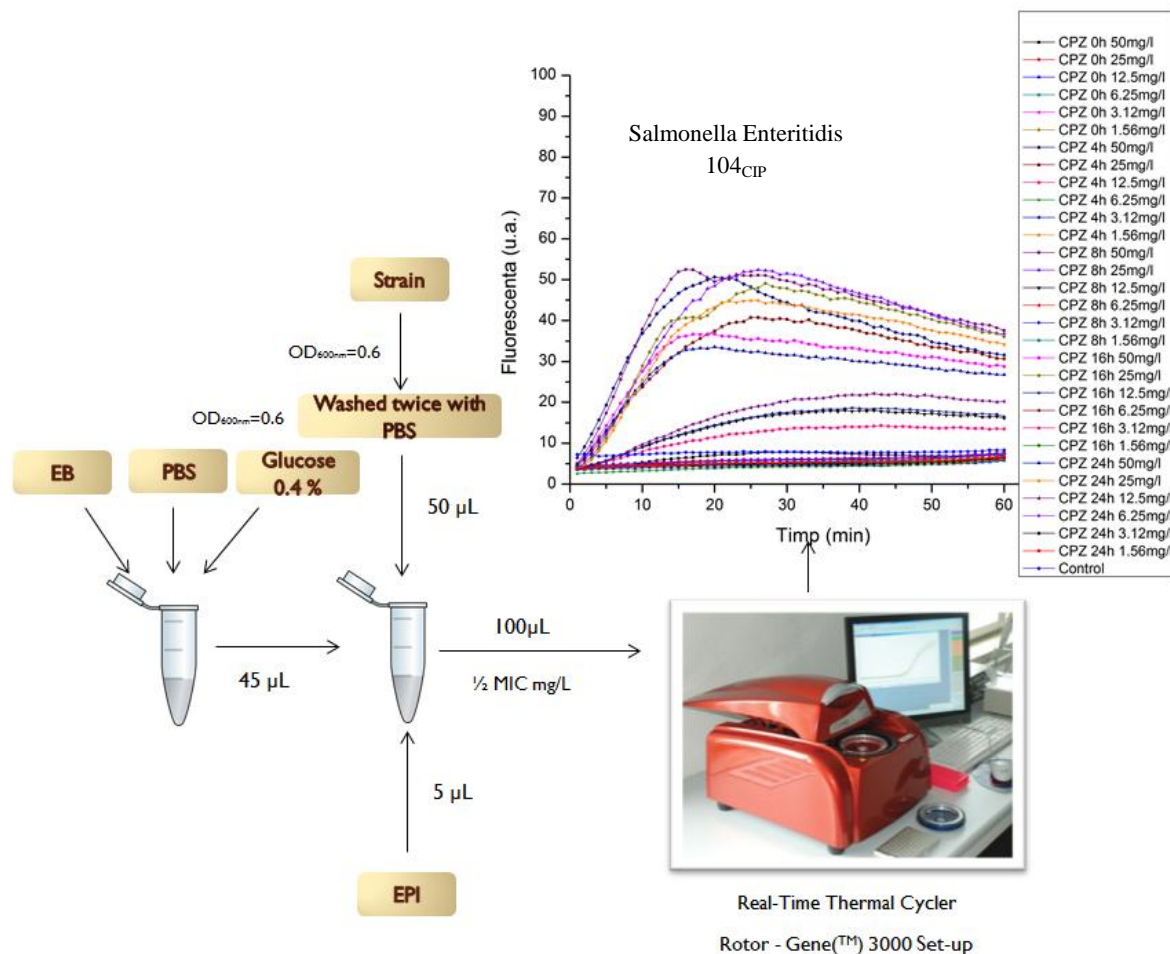


Fig.I.2.3. Schema experimentului de analiza a acumulării de EtBr

Este important de reținut, ca indiferent de metoda folosită pentru analiza activității fenotiazinelor, aceste activități trebuie să aibă loc la concentrații care să nu depășească foarte mult concentrația maximă a plasmii de 0.5 mg/L [Amaral s.a., 2004].

Din analiza spectrelor înregistrate rezultă că pentru tulpinile gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) nu există acumulare de EtBr în interiorul celulelor la valoarea dată de jumătatea MIC-ului specific fiecărui tip de bacterie. Atât pentru CPZ neiradiată cât și pentru cea iradiată timp de 4, 8, 16 și 24 de ore curbele spectrelor sunt drepte, neindicând o creștere a fluorescenței în timp. Pentru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 CPZ neiradiată nu inhibă pompele de eflux, curba fluorescenței în timp fiind practic constantă. Același lucru se întâmplă și pentru compuşii iradiati; există o ușoară creștere a curbelor de fluorescență, însă nesemnificativă. Pentru *Staphylococcus aureus* HPV 107 compusul neiradiat nu prezintă proprietăți de inhibitor, dar pentru probele iradiate rezultă o creștere semnificativă a fluorescenței în timp, însă doar pentru concentrații toxice: 50 mg/L, 25 mg/L, 12.5 mg/L.

Analizele efectuate pe tulpini gram-negativ (*Escherichia coli* și *Salmonella enteritidis*) au prezentat rezultate diferite pentru aceste două tipuri de bacterii. Astfel, pentru *Escherichia coli* niciuna din cele patru tipuri testate nu a prezentat activitate împotriva pompelor de eflux la 1/2 din MIC, fluorescența menținându-se constantă în timp. CPZ neiradiată a prezentat proprietăți de inhibiție doar pentru *Escherichia coli* K-12 AG 100, dar pentru valori toxice de 50 mg/L și 25 mg/L iar pentru *Escherichia coli* K-12 AG 100A se observă o ușoară creștere a fluorescenței în raport cu timpul. De asemenea, CPZ iradiată inhibă pompele de eflux ale tulpinilor de *Escherichia coli* K-12 AG 100A_{TET8}, dar doar pentru concentrații toxice de 50 mg/L și 25 mg/L. Același lucru se întâmplă și pentru

Escherichia coli K-12 AG 100, dar tot pentru concentratii toxice: 50 mg/L, 25 mg/L si 12.5 mg/L.

Pentru cele patru tipuri de tulpini de *Salmonella enteritidis* CPZ neiradiata nu prezinta caracteristici EPI, decat pentru *Salmonella enteritidis* 5408 la o concentratie finala toxica de 50 mg/L. Pentru 1/2 din MIC, substantele iradiate pentru 4, 8, 16 si 24 de ore sunt candidate perfecte pentru inhibarea pompelor de eflux ale tulpinilor de *Salmonella*, valorile semnificative obtinandu-se doar pentru *Salmonella enteritidis* 104 [Alexandru s.a., 2013].

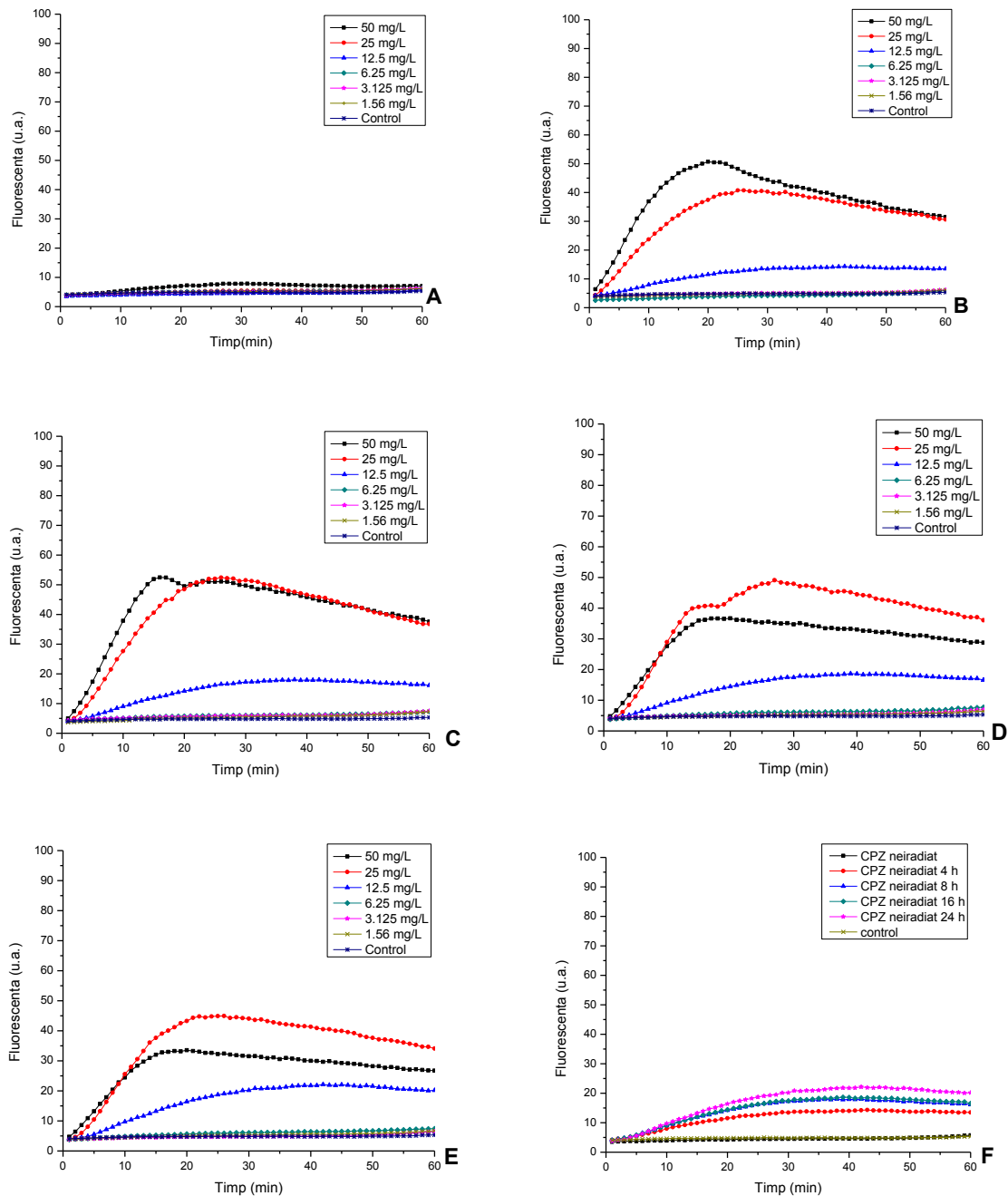


Fig.I.2.4. Analiza acumularii EtBr de catre *Salmonella enteritidis* 104 CIP in prezenta glucozei (0.4%).

Experimentul a fost efectuat la 37°C pentru o concentratie de 2 mg/L de EtBr la concentrații finale variind de la 50 mg/L la 1.56 mg/L. Inhibitorii pompelor de eflux sunt: (A) CPZ neiradiata, (B) CPZ iradiata 4 ore, (C) CPZ iradiata 8 ore, (D) CPZ iradiata 16 ore si (E) CPZ iradiata 24 ore. (F) Analiza acumularii EtBr la o concentratie finala de 12.5 mg/L (jumătate din MIC) pentru toti compusii.

I.3. DEZVOLTAREA DE MODELE DE INTERACTIE A MEDICAMENTELOR CU POMPELE DE EFLUX.

I.3.1. Evaluarea sinergismului – metoda “tabla de sah” pentru fenotiazine

Metoda “tabla de sah” a fost folosita pentru a evalua raspunsul bacteriilor la doi compusi antimicrobieni administrati impreuna. Aceasta metoda poate determina daca activitatea combinata a celor doua medicamente este: *a)* sinergetica, atunci cand activitatea unui medicament administrat in combinatie cu celalalt este semnificativ mai mare decat activitatea medicamentului singur; *b)* antagonista, cand activitatea unui medicament utilizat in aceasta combinatie este mult mai mica decat a medicamentului folosit singur; *c)* aditiva, atunci cand activitatea celor doi compusi administrati impreuna este egala cu activitatile adunate ale fiecarui compus in parte; *d)* indiferenta, cand activitatea medicamentelor combinate nu difera cu mult de rezultatul obtinut in cazul utilizarii celui mai activ compus antimicrobian singur [Motyl s.a., 2006].

Metoda “tabla de sah” a fost folosita pentru a testa sinergiile fenotiazinelor (CPZ, CPZ iradiat, PZ, PZ iradiat, Tioridazina - TZ si TZ iradiat) impreuna cu antibioticele Ampicilina si Ciprofloxacina pentru tulpina de referinta MRSA ATCC 43300 si tulpinile izolate clinic MRSA 002/03, MRSA 006/04 si MRSA 016/05 ale *Staphylococcus aureus*. Testele au fost facute pentru toate combinatiile posibile ale compusilor antimicrobieni. Pentru a putea evalua raspunsul unui organism la cele doua medicamente administrate impreuna a fost necesar sa se determine anterior valorile concentratiilor minime inhibitorii (MIC) ale fenotiazinelor si antibioticelor.

MIC a fenotiazinelor a fost determinata folosind metoda microdilutiei mediului de cultura. Pe scurt, 100 μ L de mediu de crestere Mueller-Hinton au fost adaugati in fiecare godeu al micoplacilor cu 96 de godeuri, cu exceptia coloanei 12. Un volum de 200 μ L din medicamentul studiat a fost adaugat in godeurile coloanei 12, incepand cu randul A pana la randul H. S-au efectuat dilutiile succesive ale compusului de la coloana 12 pana la coloana 3. Din coloana 3 se vor arunca 100 μ L din amestec dupa terminarea dilutiei, pentru a asigura un volum egal in toate godeurile microplacii. Randurile 1 si 2 sunt randuri de control. In primul rand se adauga doar mediu de cultura, ce va servi ca si control in cazul contaminarii, iar randul al doilea va contine doar mediu de crestere inoculat cu bacteria in solutie tampon fosfat salin (PBS – phosphate buffered saline). Randul al doilea va servi ca si control de crestere al bacteriei in lipsa unui compus antimicrobian. Microplacile au fost incubate peste noapte la 37°C, timp de 16-18 ore. Dupa aceasta perioada, microplacile au fost analizate cu ochiul liber, notandu-se cresterea sau lipsa cresterii bacteriilor in godeuri.

MIC este definita ca fiind concentratia minima a compusului antimicrobian pentru care nu se obtine o crestere vizibila a bacteriei. Toate aceste experimente au fost repetate de trei ori pentru a se asigura corectitudinea rezultatelor.

Dupa examinarea microplacilor si determinarea MIC, 5 μ L din fiecare godeu in care nu s-a observat crestere a bacteriilor au fost transferati pe placi Petri cu agar Mueller-Hinton. Acestea au fost incubate 16-18 ore la 37°C. Dupa aceasta perioada, placile au fost analizate cu ochiul liber pentru a determina concentratia minima bactericida (MBC). Concentratia cea mai mica de compus pentru care nu se observa nicio unitate care formeaza colonii (CFU – colony forming units) este considerata concentratia minima bactericida. Toate aceste experimente au fost repetate de trei ori pentru a se asigura corectitudinea rezultatelor.

Experimental, pentru metoda “tabla de sah” un volum de 100 μ L de mediu Mueller – Hinton a fost adaugat in fiecare godeu al microplacii cu 96 de godeuri, cu exceptia primei coloane. Un volum de 200 μ L de antibiotic a fost adaugat in prima coloana a microplacii. Concentratia antibioticului a fost de 4 ori mai mare decat MIC a acestuia determinata pentru fiecare tulpina in parte. Concentratia antibioticului a fost injumatatita succesiv prin dilutii, de la coloana a doua pana la coloana 11. In coloana 12 nu s-a adaugat antibiotic, deoarece aceasta a fost folosita ca si control de crestere a bacteriilor. De asemenea, niciun compus antibacterian nu se adauga in randul H, deoarece acesta e folosit ca si control in cazul contaminarii. In randul A se adauga cate 100 μ L de fenotiazine, cu o concentratie de 4 ori mai mare decat MIC. Concentratia fenotiazinelor a fost injumatatita prin dilutii succesive de la randul B pana la randul G. In fiecare godeu, cu exceptia randului H, se adauga cate 100 μ L de suspensie de bacterii in PBS. Rezultatele se citesc cu ochiul liber dupa 16-18 ore de incubare la 37°C si se fac poze ale microplacilor. Densitatea optica se poate folosi pentru a compara cresterea bacteriilor.

In Fig. I.3.1 este prezentata o imagine a unei microplaci in care s-a aplicat metoda “tabla de sah”. Au fost aplicate impreuna ampicilina si PZ iradiat impotriva unei tulpini izolate clinic de *Staphylococcus aureus* MRSA 002/03. Godeurile in care nu au crescut bacterii dupa incubare apar ca fiind transparente, iar cele in care exista bacterii apar ca fiind albicioase/ tulburi.

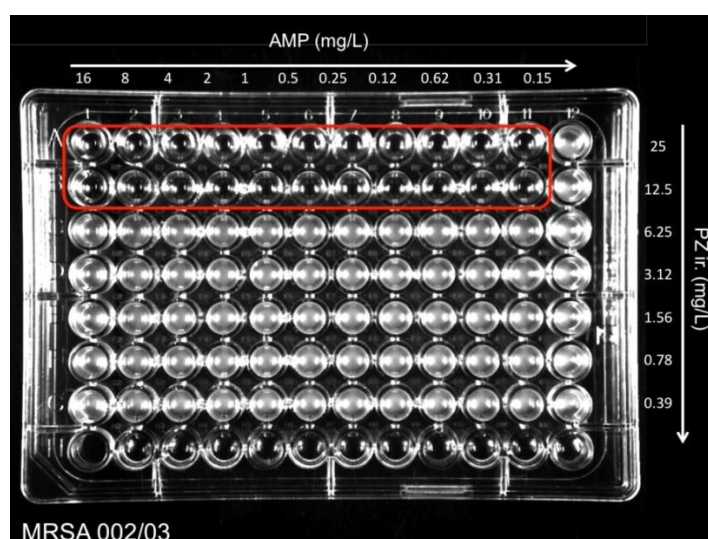


Fig. I.3.1. Activitatea antibacteriana a ampicilinei utilizata impreuna cu PZ iradiat impotriva tulpinii MRSA 002/03, determinata prin metoda “tabla de sah”

Ultimul rand (randul H) este randul de control pentru contaminarea mediului de cultura. In randurile A si B (primele doua randuri) se poate observa ca PZ iradiat inhiba cresterea bacteriilor.

Ampicilina nu prezinta activitate impotriva tulpinii MRSA 002/03, la concentratiile testate.

Activitatea celor doi compusi administrati impreuna poate fi clasificata ca fiind indiferenta. Aceleasi rezultate au fost obtinute in cazul tuturor combinatiilor de fenotiazine si antibiotice testate, pentru toate cele patru tulpini.

Metoda “tabla de sah” face parte din testele ce pot demonstra ca un medicament are rol de inhibitor al pompelor de eflux si astfel poate imbunatati activitatea unui antibiotic. Aceste experimente au demonstrat ca, in cazul tulpinilor de *Staphylococcus aureus* testate, fenotiazinele neiradiate si iradiate nu actioneaza ca inhibitori ai pompelor de eflux si nu faciliteaza activitatea antibioticelor testate.

I.3.2. Activitatea antibacteriana a derivatului chinazolinic BG1188

Conditii de crestere a bacteriilor. Stocurile de bacterii sunt pastrate la -80°C . Cu o ansa sterila se traseaza linii din stocul de bacterii pe o placa Petri cu agar Mueller-Hinton si se incubeaza la 37°C pentru 18 ore. De pe aceste placi Petri se selecteaza colonii izolate, care se inoculeaza in eprubete cu 5 mL de mediu de crestere Mueller-Hinton. Eprubetele se incubeaza la 37°C , cu agitare continua, pentru 16-18 ore.

Activitatea BG1188 si a BG1188 iradiat a fost testata impotriva unor tulpini de bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) si ale unora Gram-negative (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104).

Tabelul I.3.1. Valorile MIC si MBC pentru tulpinile de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104

Tulpini	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		MBC ($\mu\text{g/ml}$)	
	BG1188	BG1188 iradiat	BG1188	BG1188 iradiat
13348	>200	>200	>200	>200
3798	>200	>200	>200	>200
A43	>200	>200	>200	>200
1481	>200	>200	>200	>200

100326	>200	>200	>200	>200
100533	>200	>200	>200	>200
100688	>200	>200	>200	>200

In Tabelul I.3.1 se gasesc valorile concentratiilor minime inhibitorii si concentratiilor minime bactericide ale derivatului chinazolinic BG1188 pentru tulpinile de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104.

Atat pentru tulpina de referinta *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 13348, cat si pentru celelalte tulpini izolate clinic, valorile MIC si MBC au fost mai mari de 200 µg/ml. Concentratia maxima testata a fost 200 µg/ml.

Aceste valori ale MIC si MBC sunt prea mari pentru a putea considera ca BG1188 sau BG1188 iradiat au activitate antibacteriana individuala impotriva tulpinilor de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104.

In Tabelul I.3.2 sunt prezentate valorile concentratiilor minime inhibitorii si concentratiilor minime bactericide ale BG1188 pentru tulpinile de referinta si izolate clinic de *Staphylococcus aureus*.

Tabelul I.3.2. Valorile MIC si MBC pentru tulpinile de *Staphylococcus aureus*

Tulpini	MIC (µg/ml)		MBC (µg/ml)	
	BG1188	BG1188 iradiat	BG1188	BG1188 iradiat
MSSA 8325/A	>200	>200	>200	>200
MRSA ATCC 43300	>200	>200	>200	>200
MRSA 002/03	>200	>200	>200	>200
MRSA 006/04	>200	>200	>200	>200
MRSA 003/05	>200	>200	>200	>200
MRSA 010/05	>200	>200	>200	>200
MRSA 016/05	>200	>200	>200	>200

Rezultatele obtinute au fost mai mari decat concentratia maxima de BG1188 aplicata (200 µg/ml), atat pentru tulpinile de referinta MSSA 8325/A si MRSA ATCC 43300, cat si pentru restul tulpinilor izolate clinic.

La fel ca in cazul tulpinilor de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, aceste valori ale MIC si MBC sunt prea mari pentru a putea considera ca BG1188 sau BG1188 iradiat au activitate antibacteriana individuala impotriva tulpinilor de *Staphylococcus aureus*.

Totusi, derivatul chinazolinic BG1188 are rol de inhibitor al pompelor de eflux si a imbunatatit activitatea cloramfenicolului impotriva mai multor tulpini de bacterii Gram-negative [Chevalier 2010].

II. CONTRIBUTIE P I

Introducere

Conform planului de realizare al proiectului, in cea de-a doua etapa DFCTI/IFIN-HH s-a efectuat Activitatea II.2 "Dezvoltarea unei platforme de calcul de inalta performanta pentru modelarea moleculara si a dinamicii moleculare si pentru realizarea de calcule de prezicere a efectelor medicamentelor asupra pompelor de eflux ale bacteriilor la nivel molecular". Activitatea a avut ca rezultat principal livrarea unei platforme HPC operabile pentru studiul impachetarii si functionarii pompelor de eflux, care urmeaza sa fie folosita in etapa urmatoare pentru calcule de docking si dinamica moleculara, in vederea modelarii si simularii proceselor de interactie a compusilor chimici cu pompele bacteriene.

Platforma HPC a fost realizata prin extinderea aplicatiei ISyMAB [Vasile I. s.a., 2012; Drakulic Branko J. s.a., 2012; <http://www.helmedchem2012.gr>], care a fost dezvoltata anterior la

DFCTI in cadrul proiectului FP7 HP-SEE [<http://www.hp-see.eu/>] si inglobarea componentelor software pentru predictia structurii proteinelor si de bioinformatica care au fost implementate in etapa precedenta a proiectului AMPLE.

In versiunea finala, platforma poate utiliza un sistem distribuit de clustere de calcul paralel pentru rulara codurilor de dinamica moleculara NAMD, CHARMM si AMBER, furnizeaza interfete grafice pentru editarea de catre utilizator a fisierelor de input, ofera acces la instrumente multiple de analiza a datelor (ca MMTSB pentru NAMD, sau AmberTools pentru AMBER), si permite vizualizarea grafica la distanta a rezultatelor. De asemenea, platforma ofera posibilitatea de a rula versiunile CUDA ale NAMD si AMBER pe acceleratoarele GPGPU Nvidia Tesla M2090, ofera access la coduri de chimie computationally (Gaussian), si include programe de docking molecular, screening virtual, vizualizare si analiza (suita AutoDock, AutoDock Vina si MGL Tools).

Pentru evaluarea capacitatii de calcul a platformei HPC s-au efectuat testele de dinamica moleculara ApoA1, ATPase, STMV [<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/utilities/>], si ASIC1 pentru NAMD si testele standard AMBER, utilizand campurile de forta CHARMM [Brooks BR s.a., 2009], respectiv AMBER [Cornell WD s.a., 1995]. De asemenea, s-au comparat performantele CPU si GPU ale NAMD/AMBER pe nodurile IBM HS23 si, respectiv, sistemele Nvidia Tesla M2090 ale clusterului IFIN_BC din DFCTI.

Detaliile tehnice, reproduse in cap. 2 mai jos, au fost prezentate la Conferinta de Fizica TIM-13, desfasurata la Universitatea de Vest din Timisoara, 21-24.11.2013, in comunicarea '*Molecular dynamics studies on the HPC platform for computational biophysics at IFIN-HH*', autori Ionut Vasile, Dragos Ciobanu-Zabet si Mihnea Dulea, care urmeaza sa fie trimisa spre publicare. Comunicarea descrie, printre altele, arhitectura sistemului integrat pentru simulari de dinamica moleculara dezvoltat la DFCTI, care face parte din platforma HPC a proiectului AMPLE.

Rezultatele stiintifice obtinute in aceasta etapa vizeaza doua aspecte importante pentru proiect: a) modelarea statistica a efectului CPZ iradiat asupra mecanismului de protectie al bacteriilor care dispun de pompe de eflux; b) modelarea structurii secundare si terciare a proteinelor complexe (prezente, de exemplu, in pompele de eflux) folosind potentiale statistice inter- si intra-moleculare parametrizate pe baza datelor experimentale extrase din Protein Databank (PDB).

In primul studiu, pornind de la rezultatele experimentale ale grupului de la INFLPR [Alexandru T s.a., 2013; Pascu M.L. s.a., 2013] se dezvoltaza modele statistice minimale pentru explicarea fluctuatiilor populatiei de bacterii in prezenta medicamentului. Se propune un formalism teoretic in care sunt descrise conditiile necesare pentru ca populatia de bacterii sa atinga o stare stationara - in functie de ratele de crestere/moarte ale populatiei de bacterii, rata de administrare a medicamentului si rata de eliminare a acestuia de catre bacterii - printr-un proces Markov de nastere/moarte cu timp continuu si spatiu al starilor discret.

In ipoteza simplificatoare ca medicamentul poate fi doar in doua stari (prezent/absent), modelul este studiat analitic iar distributia de probabilitate stationara este calculata exact, in functie de parametrii modelului (care pot fi dedusi din datele experimentale).

Cel de-al doilea studiu continua investigatia din prima etapa a proiectului [Rata I. s.a., 2013] privind definirea unui potential statistic pentru determinarea structurii secundare a proteinelor in functie de identitatea aminoacizilor din secventa primara a acestora. Metoda este perfectionata pentru a permite si analiza structurii terciare a proteinelor, in special a acelor regiuni care nu au o structura regulata (buclele) si care joaca un rol important in functia acestora datorita flexibilitatii lor.

Folosind metodele mecanicii statistice, se obtin energiile de interactie calculand probabilitatile ca secventele de aminoacizi sa adopte diferite tipuri de structura (helix, beta, bucle), in functie de corelatiile unghiurilor de torsiune ϕ si ψ ale aminoacizilor apropiati.

Studiul demonstreaza utilitatea potentialelor statistice pentru modelarea structurii proteinelor complexe, de tipul pompelor de eflux, sau a unor parti ale acestora ce prezinta o importanta functionala deosebita. Pentru viitoarea etapa a proiectului se intentioneaza dezvoltarea acestei metode si la nivelul interactiei proteina-ligand, relevanta pentru dockingul molecular.

Rezultatele au fost comunicate la 3rd IEEE International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences (ICCABS 2013), unde s-a prezentat lucrarea "*An Improved Statistics-based Backbone Torsion Potential Energy for Protein Loop Structure Modeling*", autori Rata I, Wessells K, Li Y.

Un alt articol a fost elaborat si publicat in revista Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures vol. 8, Issue 3, July 2013, pp. 1051-1059, cu titlul ‘*Stochastic approaches in protein synthesis-degradation - the two interacting protein case*’, autor Diana David-Rus.

Rezultatele etapei creeaza premisele pentru continuarea cu succes in etapa urmatoare a simularii numerice pe platforma HPC a proceselor de interactie utilizand software-ul de modelare moleculara, precum si pentru implementarea si testarea algoritmilor/metodelor VLS (virtual ligand screening), si utilizarea acestora pentru predictia activitatii de inhibitie a pompelor de eflux.

In acord cu planul de realizare, in cea de-a doua etapa a proiectului s-a upgradat si definitivat configuratia platformei de calcul de inalta performanta care este utilizata pentru modelarea si simularea sistemelor moleculare de interes pentru proiect. Totodata, s-au efectuat teste pentru evaluarea performantelor versiunilor CPU si GPU ale codurilor de dinamica moleculara pe sistemele de calcul paralel din DFCTI.

II.1. ARHITECTURA HARDWARE SI SOFTWARE

In configuratia finala, platforma de calcul dedicata AMPLE din IFIN-HH este compusa din cluster-ul de calcul paralel IFIN_BC (IBM BladeCenter), o statie de lucru performanta (teo1.nipne.ro), un server web si trei servere de stocare pe disc. Caracteristicile tehnice ale sistemelor de calcul au fost descrise in detaliu in etapa anterioara; in continuare vor fi prezentate doar modificarile efectuate in 2013. Arhitectura platformei de calcul este reprezentata in Fig.II.1.1.

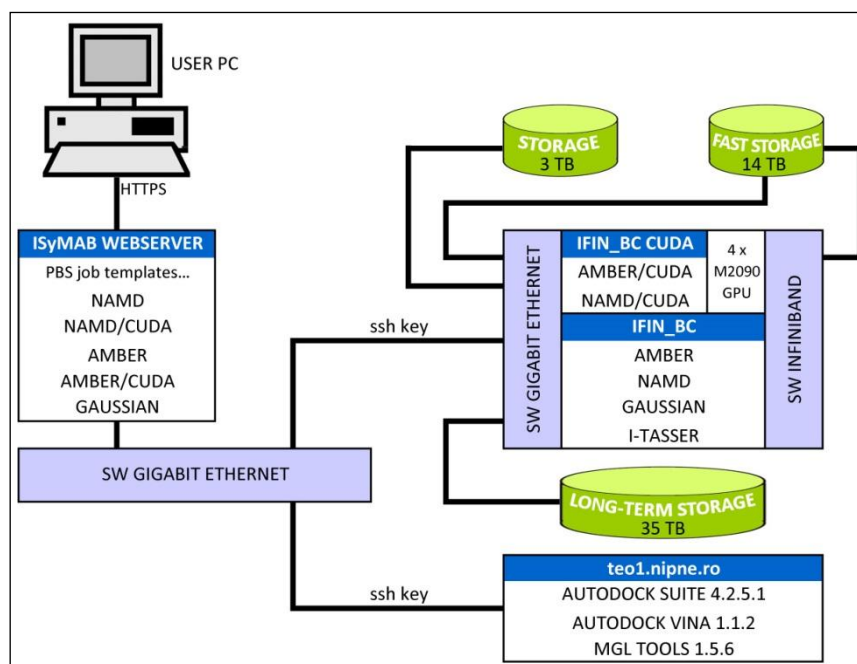


Fig. II.1.1. Arhitectura platformei HPC pentru predictia structurii proteinelor, calcule de structura electronica, simulari de dinamica moleculara si docking ligand-proteina

Cluster-ul IFIN_BC a fost upgradat prin adaugarea a 7 servere IBM HS23 si a 4 placi GPU, cu caracteristicile:

- IBM HS23
2x Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2670 0 @ 2.60GHz (8 core), RAM - 64GB - 1600MHz; software: s.o. Scientific Linux 6.4 (2.6.32-358.23.2.el6.x86_64), MLNX_OFED_LINUX-2.0-3.0.0-rhel6.4-x86_64, mvapich2-1.9, CUDA-5.5
- NVIDIA Tesla M2090 GPU
512 CUDA cores, frecventa grafica 650 MHz, frecventa procesor 1300 MHz, memorie 6144 MB GDDR5

Un server de stocare, cu capacitate de 14 TB, este conectat la switch-ul Infiniband, fiind dedicat transferurilor rapide de date (necesare, de exemplu, pentru I-TASSER). Stocarea de date pe

termen lung se face pe un server cu capacitatea de 35 TB, conectat la switch-ul Gb Ethernet, iar Linux/software repository este gazduit pe un server separat (3TB).

Software-ul stiintific include instrumente pentru:

- Predictia structurii proteinelor: I-TASSER SUITE v2.1, gazduit acum pe IFIN_BC
- Calcule de structura electronica: Gaussian09
- Bioinformatica: BLAST+ 2.2.7, mpiBLAST 1.6.0
- Simulari de dinamica moleculara: AMBER12 si AmberTools13, CHARMM37, NAMD 2.9
- Docking molecular: AUTODOCK SUITE 4.2.5.1, AUTODOCK VINA 1.1.2, MGL TOOLS 1.5.6

Pentru AMBER si NAMD sunt instalate/compileate atat versiuni pentru CPU cat si pentru GPU.

Accesul la platforma de calcul se face securizat (folosind HTTPS), prin intermediul aplicatiei web ISyMAB [Vasile I. s.a., 2012; Drakulic Branko J. s.a., 2012; <https://hpc.ifin.ro/>]. ISyMAB, care a fost upgradat in cadrul AMPLE cu software dezvoltat in DFCTI pentru AMBER, permite rularea codurilor de dinamica moleculara pe un sistem distribuit de clustere HPC, pune la dispozitia utilizatorilor interefete grafice pentru editarea fisierelor de input si pentru manipularea aplicatiilor de analiza a datelor (cum sunt MMTSB pentru NAMD, sau AmberTools pentru AMBER), si ofera instrumente pentru vizualizarea grafica la distanta a rezultatelor.

Pentru exemplificare, reproducem mai jos o interfata grafica de introducere a datelor de intrare pentru calculele cu AMBER.

The screenshot displays a web-based interface for editing AMBER MD simulation input files. It features several input fields and dropdown menus for parameters such as `imin`, `ntx`, `irest`, `ntr`, `ntwx`, `ntwe`, `ntwprt`, `idecomp`, `temp0`, `ntt`, `gamma_In`, `ntb`, `ntf`, `ntc`, and `nstim`. Each field has a 'Send' button. A 'New line' button is also present. A preview window shows the resulting input file content, which includes parameters like `&cntrl`, `ntx=5`, `irest=1`, `ntc=2`, `ntf=2`, `tol=0.000001`, `nstim=10000`, `ntr=1000`, `ntwx=1000`, `ntwr=10000`, `dt=0.002`, `cut=8`, `ntt=0`, `ntb=1`, `ntp=0`, `ioutfm=1`, `&ewald`, and `dsum_tol=0.000001`. A 'Save' button is located at the bottom left of the preview window.

Fig.II.1.2. Interfata de editare a fisierelor input mdin pentru AMBER

II.2 TESTE DE PERFORMANTA

Scopul testelor discutate in acest capitol este de a compara performantele codurilor de dinamica moleculara (masurate in nanosecunde simulate per 24 ore timp CPU), atunci cand sunt rulate pe GPU-urile Nvidia Tesla M2090 (cu mecanismul de corectie a erorilor oprit - ECC off) si, respectiv

pe CPU-urile Intel Xeon E5 ale clusterului IFIN_BC. Condițiile de simulare pentru testele AMBER și mărimea sistemelor sunt identice cu cele prezentate în [<http://ambermd.org/gpus/benchmarks.htm>].

II.2.1 Teste AMBER pe modele cu solventul reprezentat explicit

Forțele electrostatice sunt calculate prin metoda PME (Particle Mesh Ewald). NVE reprezintă un ansamblu statistic cu volum și energie constante. NPT = ansamblu statistic cu presiune și temperatură constante.

a) Testele **JAC** (Joint Amber-Charmm) simulează proteina dihidrofolat-reductază în interacție cu un rezervor de apă reprezentată explicit, cu condiții la limita periodice. Rezultate:

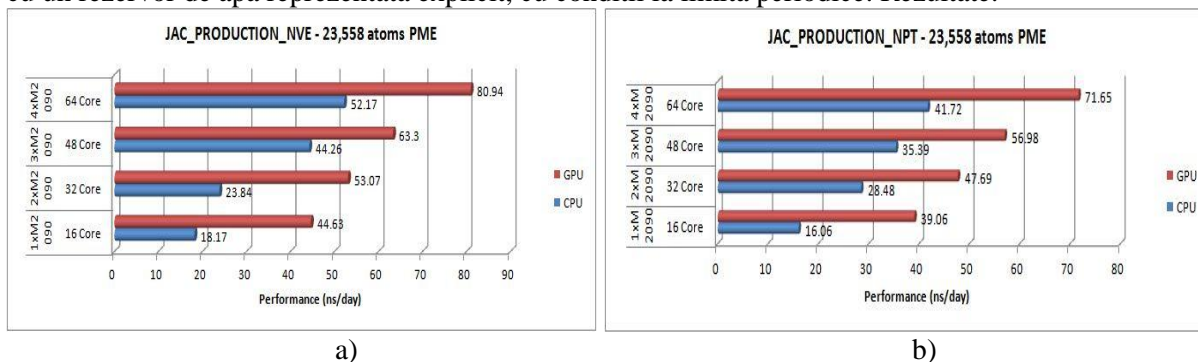


Fig. II.2.1.1: Performanța măsurată în condiții NVE (a), respectiv NPT (b). Albastru - sistem de calcul compus exclusiv din CPU-uri (1-4 noduri); roșu - sistem compus dintr-un nod și 1-4 plăci GPU

b) Testele **Factor IX** simulează o peptidază responsabilă de coagularea sângelui, în interacție cu modelul de apă TIP3, în cutie periodică. Rezultatele sunt date în Fig. II.2.2.

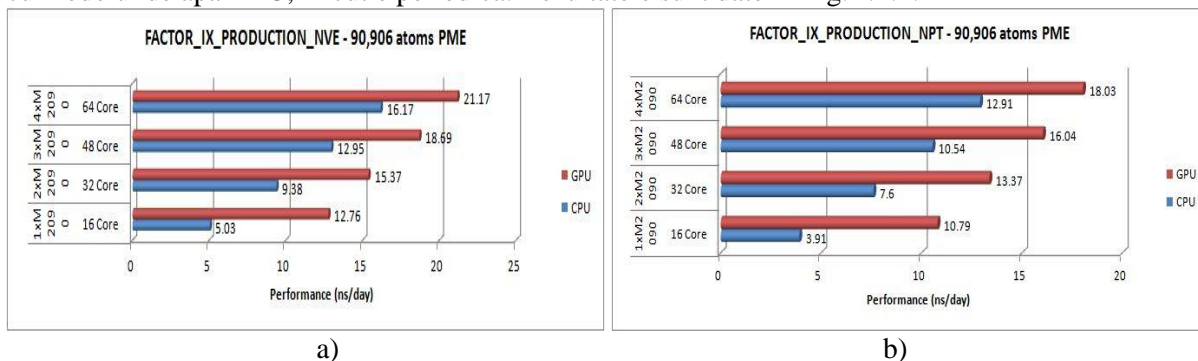


Fig. II.2.1.2. Performanța măsurată în condiții NVE (a), respectiv NPT (b). Albastru - sistem compus exclusiv din CPU-uri (1-4 noduri); roșu - sistem compus dintr-un nod și 1-4 plăci GPU

c) Alte două teste de producție simulează o fibră de **celuloză** în interacție cu modelul de apă TIP3P, în cutie periodică. Rezultate:

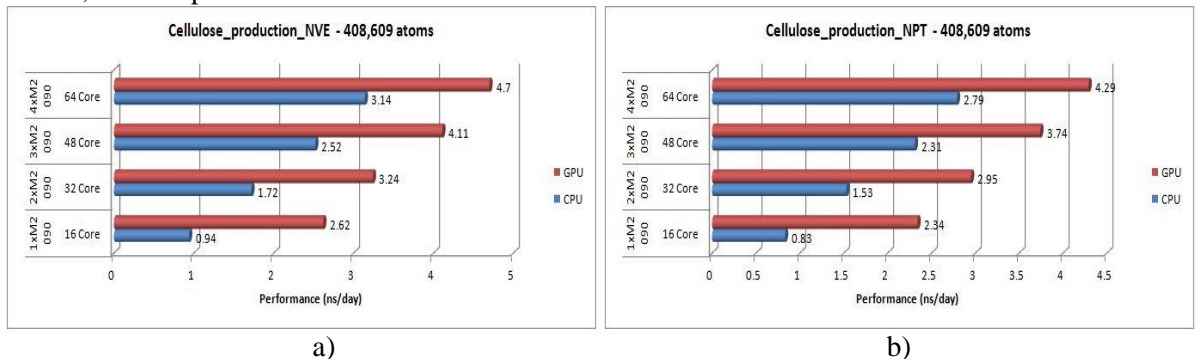


Fig. II.2.1.3. Performanța măsurată în condiții NVE (a), respectiv NPT (b). Albastru - sistem compus exclusiv din CPU-uri (1-4 noduri); roșu - sistem compus dintr-un nod și 1-4 plăci GPU

d) Investigarea dependentei performantei de numarul de placi GPU conectate per nod evidentiaza influenta comunicarii MPI peste conexiunea Infiniband asupra vitezei celor 4 procese concurente (Fig. II.2.1.4).

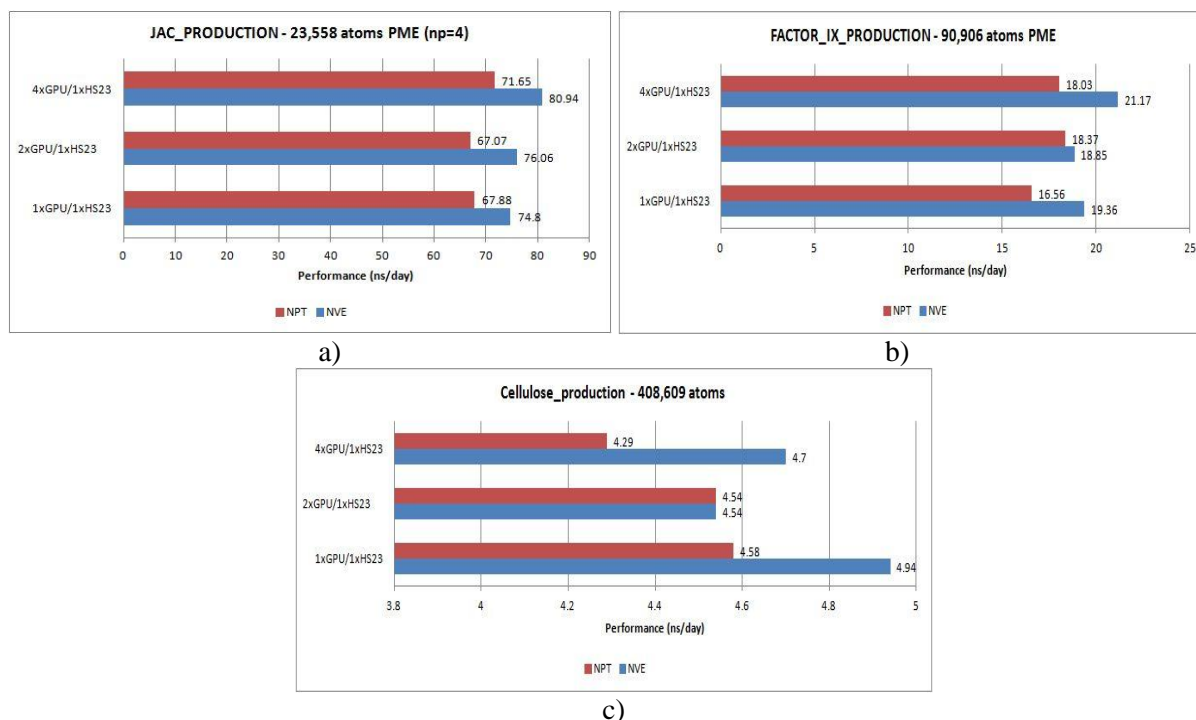


Fig. II.2.1.4. Performanta masurata in conditii NVE (albastru), respectiv NPT (rosu). a) un nod cu patru GPU; b) doua noduri cu doua GPU fiecare; c) patru noduri cu cate un GPU fiecare

II.2.2 Teste AMBER pe modele cu solventul reprezentat implicit

Metoda presupune ca interactia moleculara electrostatica in solvent este descrisa de ecuatia Poisson-Boltzmann, in aproximatia Born generalizata. Mai jos sunt reproduse rezultatele pentru trei modele biomoleculare de referinta: TRPCage, Mioglobina, Nucleozom.

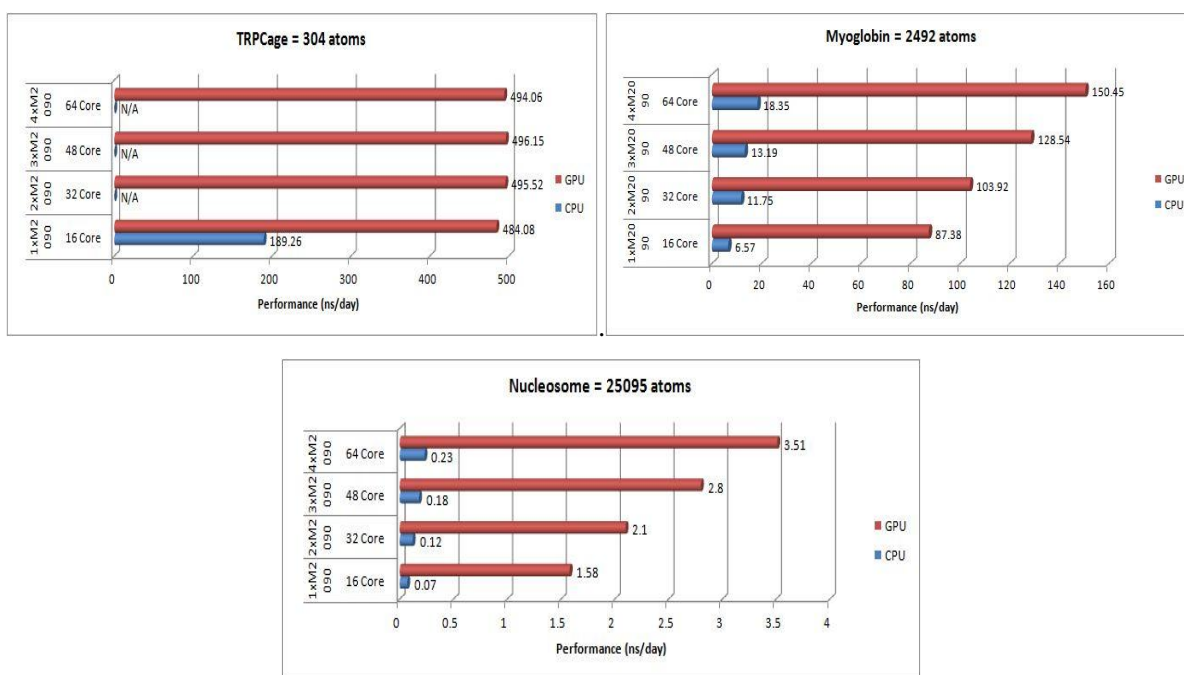


Fig.II.2.2.1. Performanta CPU si GPU masurata in ns/zi. Albastru - sistem de calcul compus exclusiv din CPU-uri (1-4 noduri); rosu - sistem compus dintr-un nod si 1-4 placi GPU

Este de remarcat ca sistemul TRPCage nu se scaleaza pe mai mult de 16 core-uri CPU (un nod) datorita numarului mic de atomi.

In final s-a testat dependenta performantei de calcul de numarul de GPU-uri conectate per nod.

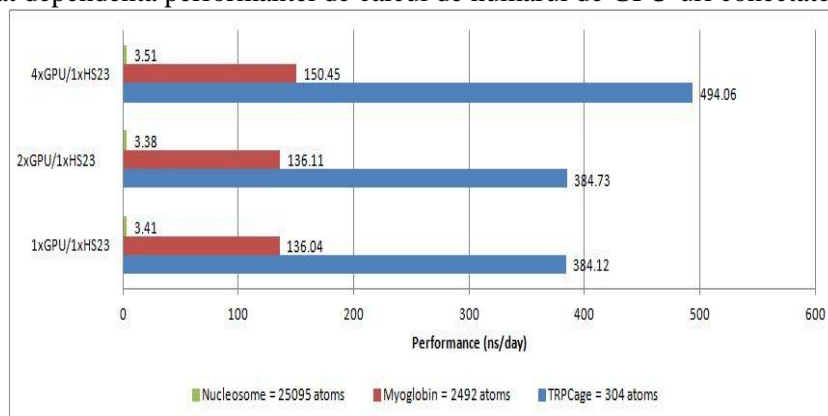


Fig. II.2.2.2. Performanta in functie de numarul de placi GPU conectate per nod: a) sus - un nod cu patru GPU; b) doua noduri cu doua GPU fiecare; c) jos - patru noduri cu cate un GPU fiecare

II.2.3 Teste NAMD pe modele cu solventul reprezentat explicit

S-au efectuat pe IFIN_BC testele standard de benchmark pentru NAMD [<http://ambermd.org/gpus/benchmarks.htm>] si, in plus, testul pentru ASIC1 (acid-sensing ion channel) 1) incorporat intr-un bistrat lipidic, sistem care este investigat in DFCTI.

Cu privire la rezultatele testelor efectuate, reproduse mai jos, se remarca, in general, urmatoarele: a) hyper-threading-ul (HT) nu imbunatateste semnificativ performanta de calcul; b) procese multiple NAMD pot partaja acelasi GPU.

a) APOA1

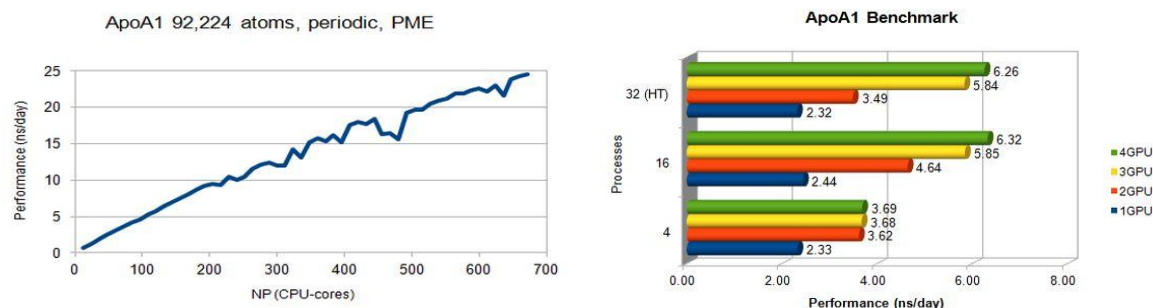


Fig.II.2.3.1. Performanta CPU si CPU + GPU pentru APOA1

Aceiasi performanta (6,3 ns/zi) se poate obtine exclusiv pe CPU-uri ruland 132 de procese concurente, cu un consum energetic de ~2100 W/ora, sau ruland 16 procese pe un nod + 4 placi GPU, cu un consum de ~1100 W/ora.

b) ATPaza

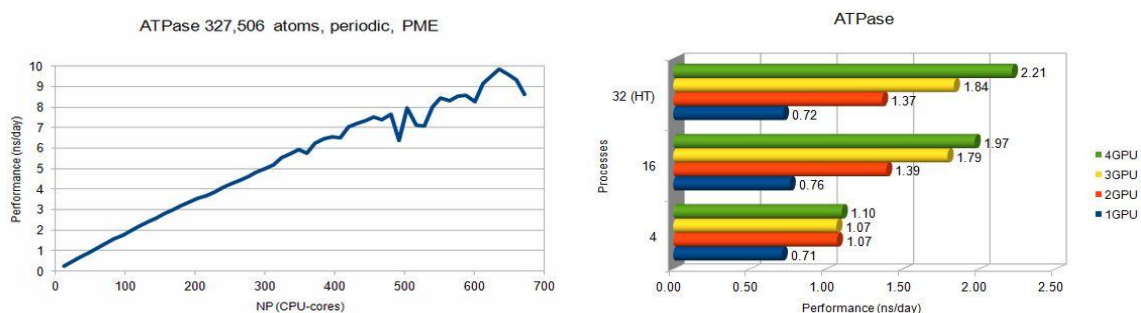


Fig.II.2.3.2. Performanta CPU si CPU + GPU pentru ATPaza

Aceiasi performanta (2,2 ns/zi) se poate obtine exclusiv pe CPU-uri ruland 120 de procese concurente, cu un consum energetic de ~1900 W/ora, sau ruland 16 procese pe un nod + 4 placi GPU, cu un consum de ~1100 W/ora.

c) STMV

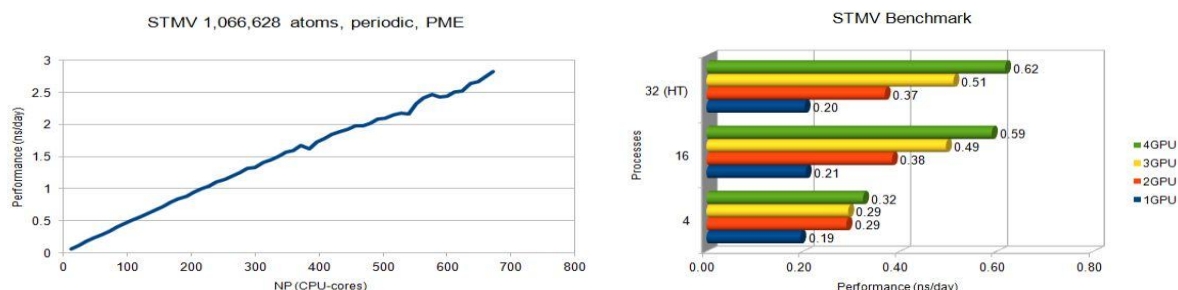


Fig. II.2.3.3: Performanta CPU si CPU + GPU pentru STMV

Aceiasi performanta (0,6 ns/zi) se poate obtine exclusiv pe CPU-uri ruland 132 de procese concurente, cu un consum energetic de ~2100 W/ora, sau ruland 16 procese pe un nod + 4 placi GPU, cu un consum de ~1100 W/ora.

d) ASIC1

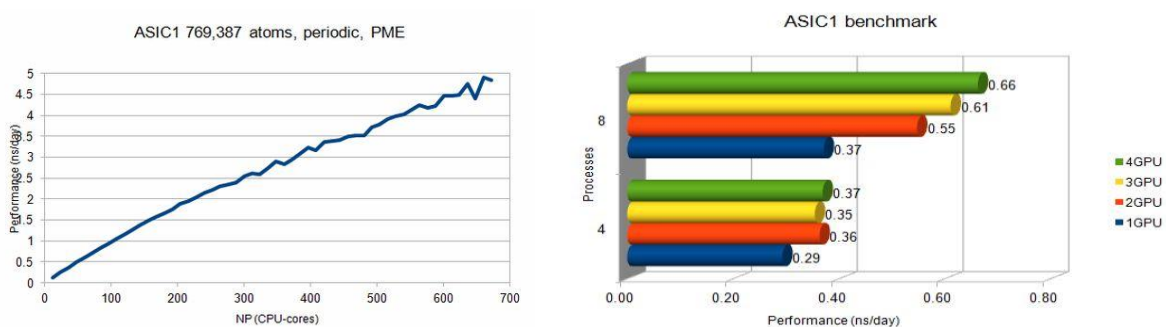


Fig. II.2.3.4. Performanta CPU si CPU + GPU pentru ASIC1

Aceiasi performanta (0,6 ns/zi) se poate obtine exclusiv pe CPU-uri ruland 60 de procese concurente, cu un consum energetic de ~1000 W/ora, sau ruland 8 procese pe un nod + 4 placi GPU, cu un consum de ~1000 W/ora.

Compararea rezultatelor obtinute pe platforma HPC AMPLE cu cele publicate [Vasile I. s.a., 2012; Drakulic Branko J. s.a., 2012, <http://ambermd.org/gpus/benchmarks.htm>] pentru acelasi tip de hardware conduce la concluzia ca performanta sistemului de calcul paralel de la DFCTI este in general asemanatoare, iar in unele cazuri superioara performantelor raportate de producatorii AMBER si NAMD.

II.3. Progrese in modelarea statistica a structurii proteinelor pe baza principalelor grade de libertate ale lantului primar

In general, structura multor proteine de interes pentru proiectul AMPLE (pompele de eflux etc.) este complexa si nu este determinata experimental cu precizie. In cazul anumitor bacterii studiate insasi determinarea experimental a structurii unor proteine constituie o problema. Aceasta situatie face ca modelarea sau rafinarea computationala a acestor structuri sa joace un rol important. De asemenea, simularea functionalitatii proteinelor respective si a modului in care ele pot fi inhibate se poate face numai computational.

O problema esentiala a metodelor computationale este evaluarea precisa a fortelor si potentialelor inter- si intra-moleculare. Teoretic, o evaluare precisa se poate face numai la nivel de mecanica cuantica, insa datorita numarului mare de atomi si a complexitatii ecuatiilor implicate, metodele cuantice devin impracticabile in majoritatea cazurilor. De aceea, pentru calcularea potentialelor implicate se prefera folosirea unor ecuatii simple, parametrizate. Aceasta este o metoda aproximativa si determinarea corecta a parametrilor, din date experimentale, devine esentiala. De multe ori nu se pot folosi aceiasi parametri pentru diferite genuri de probleme (adica aceste potentiale nu sunt “transferabile”).

In lucrarile noastre am introdus un potential strict statistic care, pe baza datelor experimentale extrase din Protein Databank (PDB) stabileste corelatii intre identitatea aminoacizilor prezenti in diferite proteine (R) si structura lor data de gradele de libertate torsionale ϕ si ψ (vezi Fig.II.3.1).

In etapa precedenta a proiectului am descris o metoda [Rata I. s.a., 2013; Hui L. s.a., 2012] in care am folosit acest potential statistic pentru determinarea structurii secundare a proteinelor in functie de identitatea aminoacizilor din secventa primara a proteinelor.

In cadrul formalismului propus se demonstreaza ca secventa primara este determinanta nu numai pentru structura secundara dar si pentru intreaga structura terciara a proteinelor.

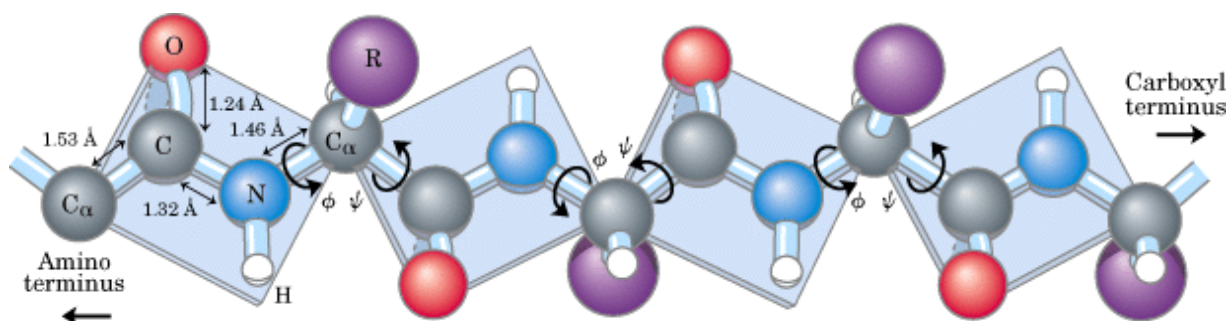


Fig. II.3.1. Principalele grade de libertate de-a lungul lantului principal al unei proteine sunt date de unghiurile torsionale ϕ si ψ corespunzatoare fiecarui aminoacid R din secventa primara.

In cazul structurii secundare am impartit unghiurile ϕ si ψ ale fiecarui aminoacid R in numai 3 perechi corespunzatoare celor 3 categorii de structuri secundare: helix, beta si restul (coil). Valorile lor se grupeaza ca in Fig. II.3.2, care reprezinta posibilele valori ale unghiurilor ϕ si ψ de-a lungul axelor principale (asa numita reprezentare (plot) Ramachandran).

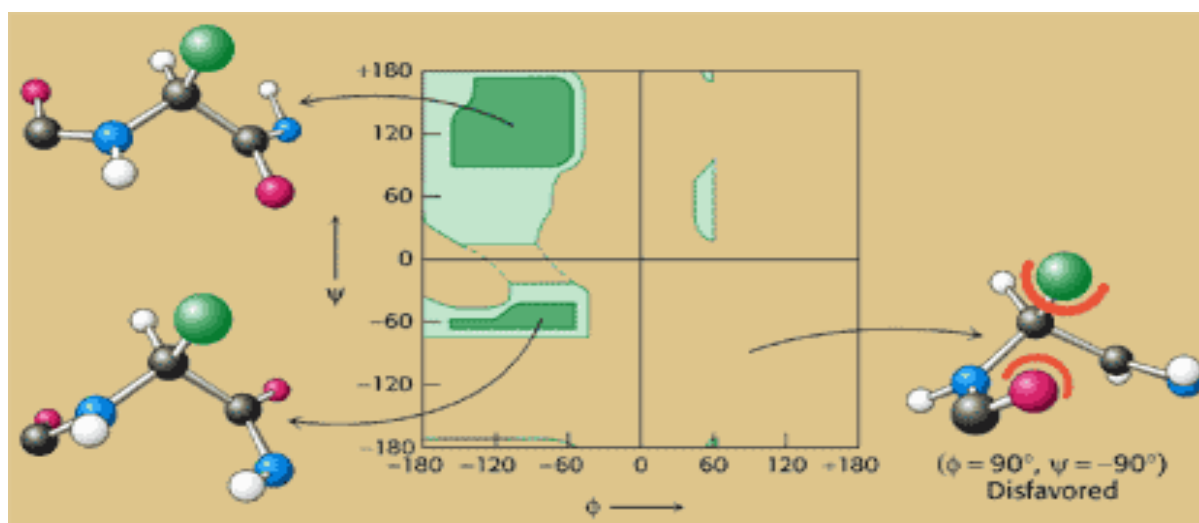


Fig. II.3.2. Reprezentarea Ramachandran ale valorilor posibile pe care le poate lua o pereche de unghiuri ϕ si ψ corespunzatoare unui aminoacid. In functie de structura secundara in care se incadreaza aminoacidul, aceste valori se grupeaza in trei regiuni principale.

In acest raport de faza vom prezenta o impartire mai fina a unghiurilor torsionale ϕ si ψ care permite si analiza structurii tertiare a proteinelor, in special a acelor regiuni care nu au o structura regulata (buclele) si care joaca un rol important in functia proteinelor datorita flexibilitatii lor. In lucrarea [Rata I. s.a., 2013] (care face referiri la proiectul AMPLE) este prezentata o perfectionare a metodei care a fost introdusa anterior [Li Y. s.a., 2011; Rata I. s.a., 2010; Li Y. s.a., 2010; Rata I. s.a., 2010].

In cadrul formalismului mecanicii statistice, am dezvoltat o metoda de a cuantifica numeric frecventa de distributie a valorilor ϕ - ψ pentru o anumita reprezentare Ramachandan, si a obtine o densitate de probabilitate ca in Fig. 3.

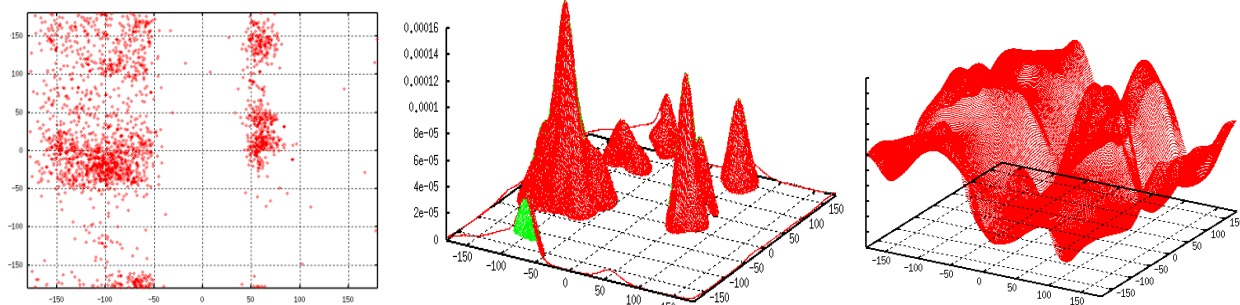


Fig. II.3.3. Figura prezinta, pe rand, un plot Ramachandran pentru un caz real din datele (punctele) disponibile in PDB, conversia lui statistica intr-o densitate de probabilitate, si transformarea acesteia intr-o suprafata energetica.

Caracteristicile structurale ϕ - ψ depind nu numai de identitatea aminoacidului pe care le caracterizeaza dar si de identitatea aminoacizilor invecinati. De asemenea ele depind si de structurile ϕ - ψ ale aminoacizilor invecinati. De exemplu, in Fig. II.3.3 sunt reprezentate valorile ϕ ale aminoacidului Asn vs. valorile ψ pe care le ia aminoacidul Asp, cand sunt prezente in ordinea Asp-Asn in PDB. Cu alte cuvinte este calculata densitatea de probabilitate $P(\phi_{Asn}, \psi_{Asp} | Asp, Asn)$. Diferite combinatii de acest gen trebuie calculate, de obicei de pana la doua unghiuri diedre si pana la trei aminoacizi adiacenti. Avand aceste date disponibile (sub forma de tabele), se pot face combinatii intre diferitele probabilitati pentru a obtine o probabilitate rezultanta care sa caracterizeze cat mai bine configuratia unui lant de aminoacizi.

In mod specific, daca definim corelatia unghiurilor aminoacizilor apropiati ca:

$$NNC(\phi_{i+1}\psi_i | R_i R_{i+1}) = \frac{PDF(\phi_{i+1}\psi_i | R_i R_{i+1})}{PDF(\phi_{i+1} | R_i R_{i+1})PDF(\psi_i | R_i R_{i+1})}$$

atunci probabilitatea rezultanta ca o secventa de aminoacizi Seq sa adopte structura Str se poate exprima ca:

$$P(Str | Seq) = \prod_{i=1}^N PDF(\phi_i \psi_i | R_{i-1} R_i R_{i+1}) NNC(\phi_{i+1} \psi_i | R_i R_{i+1})$$

Logaritmand expresia de mai sus putem transforma produsele in sume de tip energii.

Folosind aceasta expresie ca un potential al unei anumite structuri, am reusit sa obtinem o clasificare favorabila a structurii native in comparatie cu alte structuri alternative. De asemenea, folosind acest potential impreuna cu o metoda de cautare de tip Monte-Carlo sau Genetic Algorithm, am reusit sa gasim structuri apropiate spatiale de cele native [Rata I. s.a., 2013; Li Y. s.a., 2011; Li Y. s.a., 2010].

In concluzie, potentialele statistice constituie alternativa convenabila ce poate ajuta la modelarea structurii proteinelor complexe, de genul pompelor de eflux ce intervin in proiectul AMPLE, sau a unor parti ale acestora ce prezinta o importanta functionala deosebita. Pentru viitoarea etapa a proiectului se intentioneaza dezvoltarea acestei metode si la nivelul interactiei dintre o proteina si un ligand (pentru descrierea proceselor de docking).

Datele reprezentand o serie de modele necesare intelegerii impactului CPZ iradiat asupra mecanismelor EPI sunt sintetizate intr-un material (Anexa 1) trimis spre publicare.

III. CONTRBUTIE P II

APLICAREA COMPUSILOR CHIMICI CU EFECT EPI ASUPRA OCHILOR DE IEPURI INFECTATI CU TULPINI DE BACTERII SI ANALIZA DIFERENTIALA A EFECTELOR MEDICAMENTELOR NEIRADIATE SI IRADIATE

INTRODUCERE

In etapa anterioara a proiectului au fost prezentate rezultatele unor studii primare privind producerea de tesuturi pseudotumorale pe ochi de iepure utilizand metoda Schmidt-Erfurth, ca o prima etapa in identificarea efectelor posibile ale fenotiazinelor asupra tesuturilor oculare. In particular, au fost prezentate imagini ale tesuturilor pseudotumorale recoltate de la ochii de iepure, care arata modificarile acestora in urma interactiei cu solutii de CPZ. Din datele prezentate la sfarsitul primei faze a proiectului a rezultat ca identificarea cu precizie a efectelor CPZ asupra structurilor tesuturilor pseudotumorale este dificil de facut, cu atat mai mult cu cat este necesar sa fie stabilite si conditiile in care aprecierea reproductibilitatii rezultatelor poate fi facuta cu acuratetea necesara.

De aceea, in cadrul etapei prezente, Clinica de Oftalmologie a SUUB si-a propus sa aprofundeze problema evidentierii efectelor CPZ neiradiate si iradiate cu fascicule laser in UV asupra tesuturilor pseudotumorale induse pe ochi de iepure si sa precizeze conditiile optime de abordare a studiilor, asigurandu-se o cat mai buna reproductibilitate a masuratorilor.

III.1. MATERIALE SI METODE

In Fig. III.1.1 este prezentata in mod sintetic schema logica a masuratorilor efectuate pe ochi de iepure, de la producerea pseudotumorilor si pana la evidentiarea efectelor CPZ asupra acestor tesuturi in urma tratamentului. In faza anterioara este descrisa metoda Schmidt-Erfurth; pe baza ei sunt produse inflamatii ale ochiului care sunt lasate 7 zile fara tratament pentru atingerea unui grad de inflamare ridicat si, posibil, infectare. Dupa aplicarea solutiilor apoase de CPZ neiradiata si iradiata se lasa ochii si tesuturile oculare sa reactioneze, *in vivo*, la medicament timp de 3 zile. Mai apoi se extrag probe, efectuandu-se masuratori microscopice asupra urmand protocolul descris in etapa I a proiectului. Se obtin astfel imagini macroscopice si apoi microscopice ale tesuturilor tumorale obtinute *in vitro* pe ochii martor si pe cei tratati, astfel incat se pot face aprecieri obiective bazate pe studierea modificarilor microscopice ale tesuturilor privind efectele medicamentelor expuse la radiatie laser asupra pseudotumorilor produse pe ochi de iepure.

Solutiile de CPZ au fost expuse la fascicule laser pulsate emise la 266 nm si avand energia medie de 6.5 mJ, la concentratii de 20 mg/mL si 10 mg/mL, intervale de timp intre (5 – 240) min. Efectele acestor solutii asupra tesuturilor pseudotumorale au fost studiate si descrise, iar rezultatele obtinute au fost comparate cu ochii netratati folositi ca martor nr.1 si cu ochii tratati cu CPZ neiradiata, folositi ca martor nr.2.

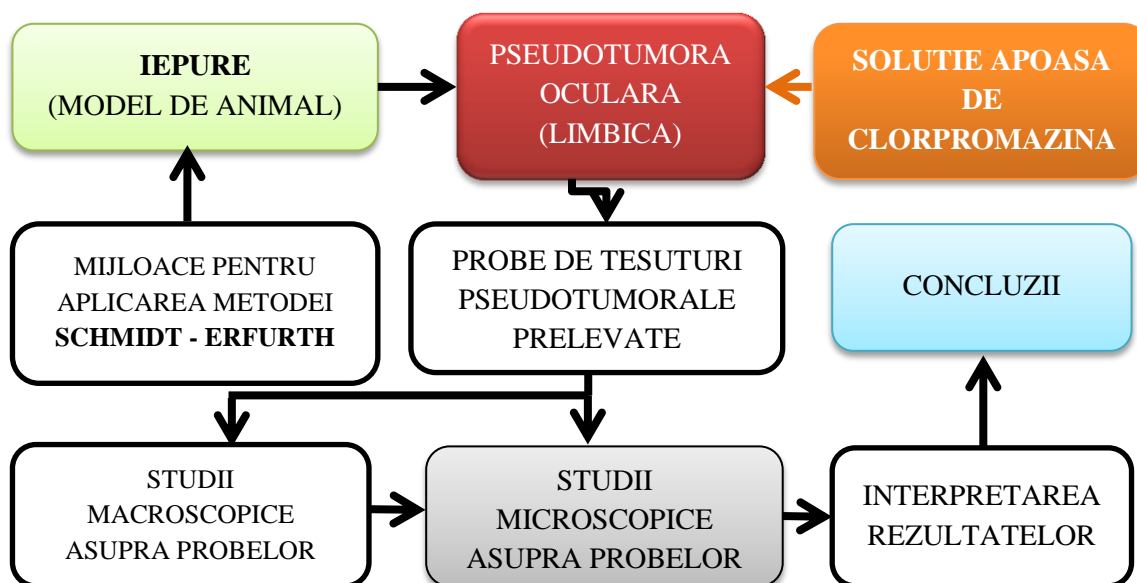


Fig. III.1.1. Schema bloc a experimentelor

III.2. REZULTATE

Masuratorile au fost efectuate pe un grup de 5 iepuri in secventa: primul iepure pastrat pentru control, nr.1, cu ochii pe care au fost produse pseudotumori (prin inserare in limbul sclerodermal a unui fir de sutura 0,5 de propilena, procedura fiind denumita Schmidt-Erfurth), al doilea iepure pastrat pentru control, nr.2, cu ochii tratati cu CPZ neiradiata si iepurii 3, 4 si 5, tratati cu CPZ iradiata la diferite concentratii si timpi de iradiere. Pentru fiecare dintre ochii studiiati au fost obtinute imagini cu aspectul histologic al tesuturilor pseudotumorale si a fost efectuat examenul anatomo-patologic al ochilor tratati.

Rezultatele obtinute sunt materializate prin imaginile histologice inregistrate pentru fiecare din grupele de iepuri mentionate.

In Fig. III.2.1 si Fig. III.2.2 sunt prezentate imagini histologice ale tesuturilor pseudotumorale produse pe ochi de iepuri netratati, pastrati ca martor. Se pot observa structurile specifice ale tesutului conjunctival, prezenta de tesut inflamator si rare elemente vasculare (Fig. III.2.1, imagine obtinuta cu marire 10x) si tesut minim inflamator cu rare elemente vasculare (Fig. III.2.2, imagine obtinuta cu marire 20x).

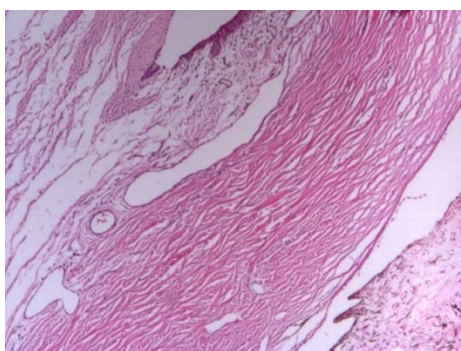


Fig. III.2.1. Pseudotumora pe ochi de iepure netratat tesut (limb sclero-cornean, tesut conjunctival) inflamator (marire 10x)

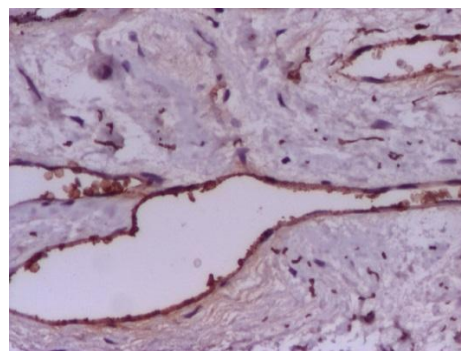


Fig. III.2.2. Tesut pseudotumoral, ochi de iepure netratat; rare elemente vasculare (marire 20x)

Un al doilea tip de martor utilizat l-a constituit ochiul de iepure care are produsa pseudotumora si pe care se aplica 0.1 mL solutie de CPZ neiradiata la concentratia 20 mg/mL in apa ultrapura. In Fig. III.2.3 si Fig. III.2.4 sunt prezentate imaginile histologice ale tesutului pseudotumoral in acest caz, din care rezulta aparitia unui tesut inflamator granular (Fig. III.2.3) si a unui infiltrat cronic moderat cu frecvente eozinofile (Fig. III.2.4). In ambele cazuri sunt prezente si relativ frecvente vase de sange. Aceleasi concluzii se pot trage si pentru tratarea cu 0.1 mL solutie de CPZ neiradiata la concentratia de 10 mg/mL in apa.

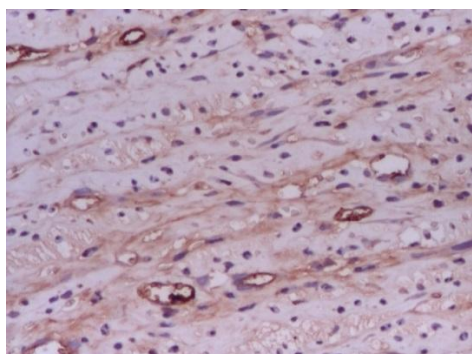


Fig III.2.3. Aspect al tesutului pseudotumoral tratat cu 0.1 ml CPZ 20 mg/mL in apa, neiradiata; relativ frecvente vase de sange (marire 20x)

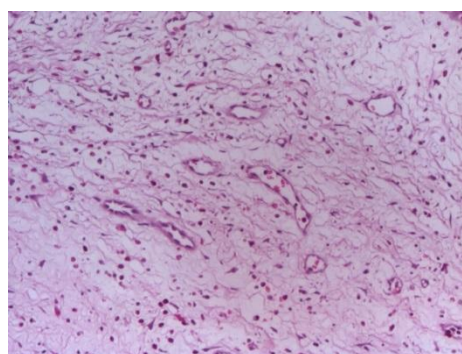
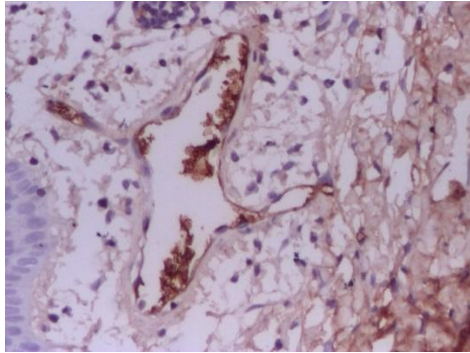
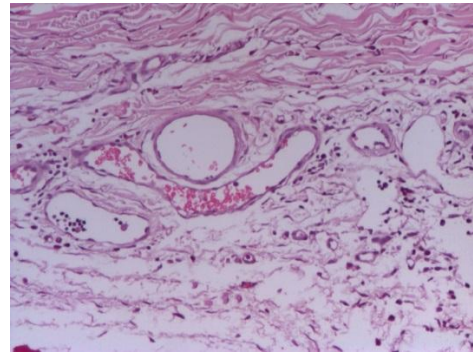


Fig. III.2.4. Tesut pseudotumoral tratat cu 0.1ml CPZ 20 mg/mL in apa, neiradiata; infiltrat inflamator cronic cu frecvente eozinofile si relativ frecvente vase de sange (marire 20x).



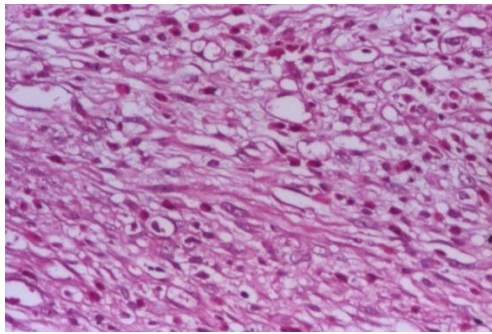
a)



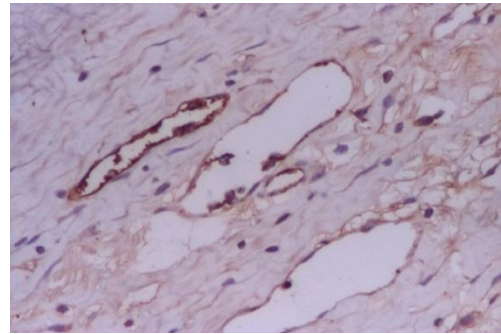
b)

Fig. III.2.5. Tesut tratat cu 0.1 mL CPZ 10 mg/mL solutie neiradiata cu marire 20x (a) si 10x (b)

In Fig.III.2.5 se pot de asemenea observa: mase tisulare nodulare necrozate in tesut striat, bogat infiltrat si inflammat cronic cu eozinofile. Si aceste figuri descriu starea tesutului pseudotumoral pentru ochi martor. In cazul iepurelui nr.3, pe un ochi s-a aplicat solutie de CPZ la concentratia de 20mg/ mL in apa, iradiata 20 min iar pe un al doilea ochi, 0.1 ml CPZ 10 mg/mL iradiata tot 20 min. In Fig.III.2.6 (a) este data imaginea ochiului tratat cu CPZ la 20 mg/mL iradiat 20 min si se pot observa bogat infiltrate inflamatorii cu aspect cronic cu frecvente eozinofile si mase tisulare nodulare necrozate in tesut muscular striat ca si relativ frecvente vase de sange.



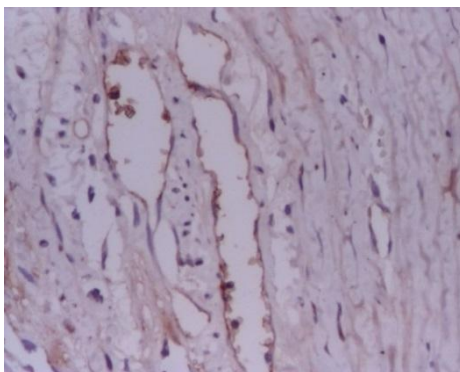
a)



b)

Fig. III.2.6. Tesut tratat cu 0.1 mL solutie de CPZ iradiata 20min cu concentratii de 20 mg/mL (a) si 10 mg/ml (b).

In Fig. III.2.6 (b) este data imaginea ochiului tratat cu CPZ la 10 mg/mL iradiat 20 min si se pun in evidenta aceleasi tipuri de efecte. Totusi, densitatea formatiilor la folosirea CPZ in apa la 10mg/mL pare a fi mai mica, fapt care arata ca tratarea cu solutie la aceasta concentratie este mai recomandata.



In Fig. III.2.7 este aratata, spre comparare cu situatia descrisa anterior, imaginea histopatologica a unui tesut pseudotumoral obtinut pe un ochi al iepurelui cu nr.4 la tratare cu 0.1 mL CPZ la 10 mg/mL expusa la fascicul laser timp de 20 min. Se poate observa aparitia unei mase nodulare necrozate la o marire de 10x. In Fig. III.2.8 si Fig. III.2.9 sunt aratate imagini obtinute pe ochii iepurelui cu nr.5. In Fig. III.2.8 tesutul pseudotumoral este injectat cu 0.1mL solutie CPZ 20 mg/mL in apa, iradiata 4 ore, iar in Fig. III.2.9 tesutul a fost injectat cu 0.1mL solutie CPZ 10 mg/mL in apa, iradiata 4 ore. In ambele figuri sunt prezente bogate infiltrate inflamato

Fig. III.2.7. Tesut tratat cu 0.1 mL CPZ 10 mg/mL solutie iradiata 20min

cronic, cu frecvente eozinofile si mase tisulare nodulare necrozate in tesut muscular striat. Apar de asemenea relativ frecvente vase de sange.

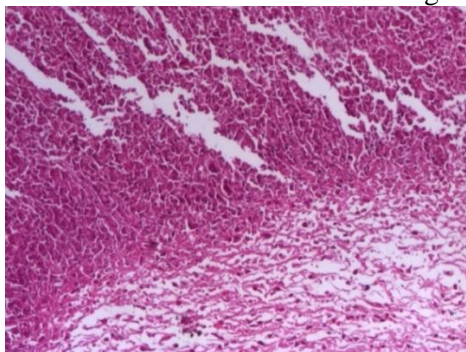


Fig. III.2.8. Imagine a tesutului in cazul iepurelui Nr.5 injectat in ochiul nr.1 cu 0.1mL CPZ 20 mg/mL iradiat 4 ore (marire 10x)

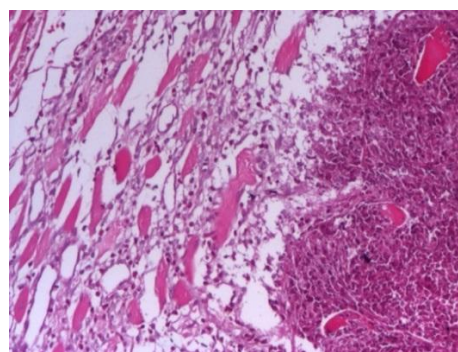


Fig. III.2.9. Imagine histopatologica la ochiul nr.2 al iepurelui nr.5 injectat cu 0.1mL CPZ 10 mg/mL iradiat 4 ore (marire 10x). Sunt de notat mase tisulare nodulare necrozate in tesut muscular striat cu bogate infiltrate inflamate cu aspect cronic, frecvente eozinofile si frecvente vase de sange.

Ca si in cazul iepurelui cu nr.4 principala constatare care rezulta din tratament este ca solutia de CPZ 10 mg/mL este mai eficienta in recuperarea calitatilor tesutului cornean original decat cea de concentratie 20 mg/mL. In plus, in cazul iepurelui cu nr.5, timpul de iradiere este de 4 ore adica de aproximativ 18 ori mai mare decat in cazul iepurelui cu nr. 4.

Datele prezentate constituie o selectie a imaginilor masurate in studierea efectelor solutiilor de CPZ neiradiate si iradiate diferite intervale de timp si arata in sinteza principalele rezultate obtinute.

III.3. CONCLUZII

Folosirea CPZ expuse la radiatie laser pe tesuturi extrase de la pseudotumori ale ochilor de iepure supravegheate 7 zile de la producere are efecte ce depind de concentratia initiala (inainte de iradiere) a CPZ in apa, precum si de timpii de iradiere a solutiilor cu fascicul laser la 266 nm. Obtinerea si masurarea imaginilor histopatologice s-au facut in toate cazurile la 3 zile dupa injectare a medicamentului. Solutiile de CPZ in apa expuse la fascicule laser si utilizate pentru tratarea pseudotumorilor contin cel putin 200 de fotoprodusi (dintre care sunt indentificati, inafara de urme de clorpromazina: promazina, promazina sulfoxid, hidroxipromazina, hidroxipromazina sulfoxid si clorpromazina sulfoxid). Nu se cunoaste in acest moment si ramane un subiect de studiu in continuare, care dintre produsii mentionati au efect antitumoral si antibacterian si daca efectele lor sunt individuale sau/si sinergetice. Pe de alta parte, aceste tipuri de efecte sunt, in principiu de aceeasi natura si cu acelasi continut ca si in cazul in care tesuturile sunt infectate efectiv, dat fiind aspectul histopatologic al probelor recoltate si studiate.

CONCLUZII GENERALE

Activitatea desfasurata in 2013 in cadrul proiectului AMPLE, desi rearanjata in functie de nivelul mai redus de finantare a atins in intregime obiectivele anuale reasezate. S-a obtinut un progres insemnat in caracterizarea experimentală a medicamentelor studiate (probe de fenotiazine si de chinazoline) prin spectroscopie in IR si prin modelarea evolutiei structurilor moleculelor de medicamente in urma interactiei cu fascicule laser prin utilizarea de platforme de calcul de inalta performanta si de soft asociat (Gaussian 09, Revision C.01). Progresul obtinut este caracterizat si prin punerea in evidenta a unor cazuri de bacterii la care pompele de eflux sunt implicate in distrugera bacteriilor ca si prin emiterea de ipoteze privind compusii rezultati, in urma iradierii medicamentelor cu fascicule laser, care pot actiona asupra pompelor de eflux ale bacteriilor sau asupra unor alte structuri componente ale acestora.

Completarea acestor date este constituita de descrierea efectelor pe care medicamentele iradiate cu fascicul laser le au asupra tesuturilor pseudotumorale produse pe ochi de iepure, ca un prim pas spre evaluarea potentialului terapeutic al metodelor dezvoltate in cadrul proiectului. Proiectul a permis

diseminarea rezultatelor, in mod deosebit in comunitatea stiintifica nationala si internationala; datele prezentate au fost primite cu deosebit interes la manifestarile stiintifice la care au fost comunicate.

BIBLIOGRAFIE:

Alexandru T., Armada A., Danko B., Hunyadi A., Militaru A., Boni M., Nastasa V., Martins A., Viveiros M., Pascu M.L., Molnar J., Amaral L. Biological Evaluation of Products Formed from the Irradiation of Chlorpromazine with a 266 nm Laser Beam. *Biochem Pharmacol*, 2:1, 2013.

Amaral L., Viveiros M., Molnar J. Antimicrobial activity of phenothiazines. *In Vivo*, 18:725-732, 2004.

Brooks BR, ..., Karplus M., *J. Comput. Chem.* 30(10): 1545-614, 2009.

Chevalier J., Mahamoud A., Baitiche M., Adam E., Viveiros M., Smarandache A., Militaru A., Pascu M.L., Amaral L., Pagès J.M. Quinazoline derivatives are efficient chemosensitizers of antibiotic activity in *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains, *International Journal of Antimicrobial Agents* 36:164–168, 2010.

Cornell WD, et al, *J. Am. Chem. Soc.* 117: 5179–5197, 1995.

Drakulic Branko J., Ciobanu-Zabet D., Vasile I., et al, Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry, Athens, May 25-27, 2012, <http://www.helmedchem2012.gr>.

Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., R. Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery J. A., Peralta Jr., J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Keith T., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2010.

<http://www.hp-see.eu/>

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/utilities/>

Hui L, Li Y, Rata I, Jakobsson E; A Next Step in Protein Secondary Structure Prediction. *Biophysical Journal*, 102(3): 619a, 2012.

Li Y, Rata I, Jakobsson E; Integrating Multiple Scoring Functions to Improve Protein Loop Structure Conformation Space Sampling, IEEE Symposium on CIBCB: 1-8, 2010.

Li Y, Rata I, Jakobsson E; Sampling Multiple Scoring Functions Can Improve Protein Loop Structure Prediction Accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51(7): 656–1666, 2011.

Motyl M., Dorso K., Barrett J., Giacobbe R. Basic Microbiological Techniques Used in Antibacterial Drug Discovery. *Current Protocols in Pharmacol.*, Suppl.31:13A.3.15–13.A.3.22, 2006.

Ramalhete C., Spengler G., Martins A., Martins M., Viveiros M., Mulhovo S., Ferreira M.J.U., Amaral L. Inhibition of efflux pumps in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37: 70–74, 2011.

Rata I, Li Y, Chiu SW, Jakobsson E; Improving Predicted Protein Loop Structure Ranking using a Pareto-Optimality Consensus Method. *BMC Structural Biology*; 10, 22, 2010.

Rata I, Li Y, Jakobsson E; Backbone Statistical Potential from Local Sequence-Structure Interactions in Protein Loops. *Journal of Physical Chemistry B* 114(5): 1859–1869, 2010.

Rata I, Hui L, Jakobsson E, Li Y; Building a Knowledge-based Statistical Potential by Capturing High-Order Inter-Residue Interactions and its Applications in Protein Secondary Structure Assessment. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(2): 500-8, 2013.

Rata I, Wessells K, Li Y, An Improved Statistics-based Backbone Torsion Potential Energy for Prot in Loop Structure Modeling, 3rd IEEE International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences (ICCABS 2013).

Schrader B. *Infrared&Raman Spectroscopy:Methods and Applications*, VCH Publishers, 1995.

Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., 2005.

Simon A., Smarandache A., Alexandru T., Nastasa V., Pascu M.L. Studies about the stability of Promethazine hydrochloride exposed to 266 nm laser beam. *International Student Conference on Photonics (ISCP2013)*, 20-24 mai 2013, Bran, Romania.

Smarandache A., Militaru A., Goker H., Pascu A., Pascu M.L. Laser methods for pharmaceutical pollutants removal, *Proc. SPIE 8411*, Advanced Topics in Optoelectronics, Microelectronics, and Nanotechnologies VI, 84111E, 2012.

Socrates G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts, John Wiley & Sons Ltd, USA, 2001.

Vasile I., Ciobanu-Zabet D. IEEECFP1232T-PRT, pp.100-102, ISBN978-973-662-710-1, 2012.

Warren R. J., Thompson W. E., Zarembo J. E. Effect of Water of Hydration on the Infrared Spectra of Tertiary Amine Salts. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **54**(10):1554, 1965.

DISEMINAREA REZULTATELOR:

PUBLICATII:

1. Moreau Magali, Timothy Westlake, Giulio Zampogna, George Popescu, Miaoying Tian, Christos Noutsos, and Sorina Popescu. The Arabidopsis Oligopeptidases Top1 and Top2 Are Salicylic Acid Targets That Modulate SA-Mediated Signaling and the Immune Response. *The Plant Journal* 76(4): 603-614, 2013.

2. Singh Dharmendra K., Mauricio Calvino, Elizabeth Kalinda Brauer, Noe Fernandez-Pozo, Susan Strickler, Roopa D. Yalamanchili, Hideyuki Suzuki, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Johannes W. Stratmann, George V. Popescu, Lukas Mueller, and Sorina Claudia Popescu. The Tomato Kinome and the Tokn Orfeome: Novel Resources for the Study of Kinases and Signal Transduction in Tomato and Solanaceae. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.27(1), in press.

3. Brauer EK, Popescu SC, and Popescu GV (2013) Experimental and analytical approaches to characterize plant kinases using protein microarrays. *Methods in Molecular Biology*, in press .

4. Alexandru T., Armada A., Danko B., Hunyadi A., Militaru A., Boni M., Nastasa V., Martins A., Viveiros M., Pascu M.L., Molnar J., Amaral L. Biological Evaluation of Products Formed from the Irradiation of Chlorpromazine with a 266 nm Laser Beam. *Biochem Pharmacol*, 2:1, 2013.

5. A. Dinache, M. Boni, M.L. Pascu. Phenothiazine derivatives interaction with laser radiation, *Romanian Reports in Physics*, 65(3):1078–1091, 2013.

6. I.R. Andrei, G.V. Popescu, M.L. Pascu. Optical spectrum behaviour of a coupled laser system under chaotic synchronization conditions, *Journal of the European Optical Society*, - Rapid Publications, vol 8 13054, 2013.

7. Rata I, Wessells K, Li Y An Improved Statistics-based Backbone Torsion Potential Energy for Protein Loop Structure Modeling, 3rd IEEE International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences ICCABS 2013. Accepted for publication.

8. Rata I, Hui L, Jakobsson E, Li Y Building a Knowledge-based Statistical Potential by Capturing High-Order Inter-Residue Interactions and its Applications in Protein Secondary Structure Assessment, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53 (2): 500-8, 2013.

PREZENTARI LA CONFERINTE

1. A. Militaru, M. Martins, M. P. McCusker, T. Alexandru, V. Nastasa, M. Boni, S. Fanning, M. L. Pascu Laser modified medicines: new alternatives in fighting MDR bacteria, IInd International Conference on Antimicrobial Research– ICAR2012, November 2012, Lisbon, Portugal. Oral Commun.

2. A. Militaru, A. Smarandache, S. Alibert, A. Mahamoud, V. Damian, M. Filipescu, L. Frunza, J. M. Pages, M. L. Pascu Quinazoline derivatives designed as antimicrobials : spectroscopic studies and microscopy evidence of micro-aggregates formation, IInd International Conference on Antimicrobial Research – ICAR2012, November 2012 Lisbon, Portugal. Poster presentation.

3. T. Alexandru, A. Armada, V. Nastasa, A. Dinache, E. Radu, A. Stoicu, M. Viveiros, L. Amaral, M. L. Pascu UV photoactivated non-antibiotics in fighting multidrug resistance in Gram-negative bacteria, NABATIVI summer school "Targeting Gram-negative bacteria: from drugs discovery to pre-clinical exploitation", July 1-3, 2013, Milan, Italy. Oral Communication.

4. M.L. Pascu, V. Nastasa, M. Boni, G.V. Popescu, I.R. Andrei Studies on the interaction of laser beams with pendant droplets, EOSAM CONFERENCE , 2012, Aberdeen , UK. Oral Communication.
5. A. Dinache, M. Boni, M. Martins, M.P. McCusker, V. Nastasa, S. Fanning, M.L.Pascu Antibacterial activity and spectroscopic analysis of laser modified drugs, Annual Scientific Conference of Faculty of Physics, 21 June 2013, Magurele, Romania. Oral communication.
6. A. Simon, A. Smarandache, T. Alexandru, V. Nastasa, M.L.Pascu, Stability studies of Promethazine hydrochloride exposed to 266 nm laser beam, Annual Scientific Conference of Faculty of Physics, 21 June 2013, Magurele, Romania. Oral communication.
7. V. Nastasa, K. Samaras, T. Karapantsios, M.L.Pascu Laser induced modifications on colloidal systems and measurement of their properties, Annual Scientific Conference of Faculty of Physics, 21 June 2013, Magurele, Romania. Oral communication.
8. A. Smarandache, A. Pascu, I.R.Andrei, J. Handzlik, K. Kiec-Kononowicz, A. Staicu, M.L.Pascu Study of the optical properties of 2-thiohydantoin derivatives, Annual Scientific Conference of Faculty of Physics, 21 June 2013, Magurele, Romania. Oral communication.
9. V. Nastasa, M. Boni, I.R.Andrei, M.L. Pascu Laser induced modifications on drugs and their use as transport vectors to biological targets, International Conference on Optics "Micro- to Nano-Photonics III- ROMOPTO 2012", September 2012, Bucharest, Romania. Poster presentation.

Indicatori de proces si de rezultat

	Denumirea indicatorilor	UM/an
Indicatori de proces	Numarul de proiecte realizate în parteneriat international	0
	Mobilitati interne	0
	Mobilitati internationale	11 zile-1om 14 zile-1om
	Valoarea investitiilor în echipamente pentru proiecte	174.72603 mii lei
	Numarul de întreprinderi participante	0
	Numarul de IMM participante	0
Indicatori de rezultat	Numarul de articole publicate sau acceptate spre publicare în fluxul stiintific principal international	8
	Number of articles published in journals indexed AHCI or ERIH Category A or B (applied to the Humanities only)	0
	Number of chapters published in collective editions, in major foreign languages, at prestigious foreign publishing houses (applies only to Social Sciences and Humanities)	0
	Number of books authored in major foreign languages at prestigious foreign publishing houses (applies only to Social Sciences and Humanities)	0
	Number of books edited in major foreign languages at prestigious foreign publishing houses (applies only to Social Sciences and Humanities)	0
	Factorul de impact relativ cumulat al publicatiilor publicate sau acceptate spre publicare	17,335 (6,582+4,307+1,123+1,019+4,304)
	Numarul de citari normalizat la domeniu al publicatiilor	
	Numarul de cereri de brevete de invenție înregistrate (registered patent application), în urma proiectelor, din care:	
	- naționale (în România sau în altă țară);	0
	La nivelul unei organizații internaționale (EPO/ PCT/ EAPO/ ARIPO/ etc.)*	0
	Numarul de brevete de inventie acordat (granted patent), în urma proiectelor, din care:	0
	naționale (în România sau în altă țară);	0
	La nivelul unei organizații internaționale (EPO/ PCT/ EAPO/ ARIPO/ etc.)*	0
	Veniturile rezultate din exploatarea brevetelor și a altor titluri de proprietate intelectuala	0
	Veniturile rezultate în urma exploatarii produselor, serviciilor și tehnologiilor dezvoltate	0
	Ponderea contributiei financiare private la proiecte	0
	Valoarea contributiei financiare private la proiecte	0

Minimal models for understanding the impact of irradiated CPZ on the protective mechanism of bacteria-efflux pumps

Diana David-Rus *

* National Institute for Physics and Nuclear Engineering (IFIN-HH)-DFCTI
R-77125, Bucharest-Magurele, Romania

1 Introduction

During this part of the project we focused on developing minimal models to understand the dynamics and the impact of irradiated Clorpromazine (CPZ) on the protective mechanism of the bacteria-efflux pumps. In this sense we developed several minimal models that will help us understand the fluctuations of bacteria population in the presence of the drug. Next we compared the dynamics of bacteria population and the impact of the drug on efflux pumps bacteria at various drug administrated quantities.

The minimal models that we developed are based mainly on the experimental results from the papers of Tatiana A, Pascu ML et. al Biochem Parmacol 2013 and ML Pascu et. al PLOS February 2013, vol 8 issue 2 that are reported by our partener-group of Professor Pascu.

Experimental evidences -reported in the experiments of Dr. Pascu group-showed that CPZ irradiated at 4h starts killing bacteria Staphylococcus aureos (S.A) population. Also they reported the existence of a threshold for the quantity of CPZ from which the killing effect start to be noticed-ML Pascu et. al PLOS February 2013, vol 8 issue 2. Experiments performed on Salmonella by the same group showed that the protective rolle of Efflux pumps is significant diminuated in the presence of the irradiated CPZ, see fig.1 bellow:

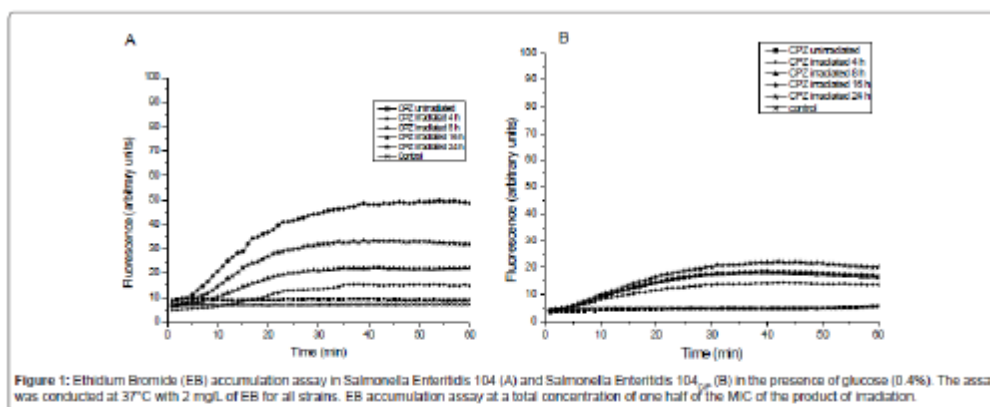


Figure 1: Ethidium Bromide (EB) accumulation assay in Salmonella Enteritidis 104 (A) and Salmonella Enteritidis 104_T (B) in the presence of glucose (0.4%). The assay was conducted at 37°C with 2 mg/L of EB for all strains. EB accumulation assay at a total concentration of one half of the MIC of the product of irradiation.

Alexandru T, Armada A, Danko B, Huryadi A, Mitaru A, et al. (2013) Biological Evaluation of Products Formed from the Irradiation of Chlorpromazine with a 266 nm Laser Beam. Biochem Pharmacol 2:109. doi:10.4172/2167-0501.1000109

Figure 1: Ethidium Bromide acumulation

The minimal inhibitory concentration-the minimal concentration of CPZ that will inhibit the visible growth of bacteria population, is clearly much smaller for irradiated CPZ then when using regular CPZ on all gram positive and negative strains tested (see table 1 bellow) Given that the drug used has a certain impact on the bacteria in this work we propose a theoretical framework for understanding the necessary conditions for bacteria population to get to a stationary state. Based on such framework we build several statistical models that are allowing us to monitor the dynamics of bacteria population in the presence of the drug. We create the required mathematical framework for compairing the effects of the irradiated CPZ administrated at various concentration, on the protective mechanism of bacteria population. We consider the stationary state for bacteria population as a first sign for keeping the bacteria population under control.

Strains	CPZ	CPZ	CPZ	CPZ	CPZ
	unirradiated MIC (mg/L)	irradiated 4 h MIC (mg/L)	irradiated 8 h MIC (mg/L)	irradiated 16 h MIC (mg/L)	irradiated 24 h MIC (mg/L)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	3.125	3.125	3.125	3.125
<i>Staphylococcus aureus</i> HPV 107	25	3.125	3.125	3.125	3.125
<i>Escherichia coli</i> K-12 AG100	25	3.125	3.125	3.125	3.125
<i>Escherichia coli</i> K-12 AG100A	25	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>Escherichia coli</i> AG100TET8	50	3.125	3.125	3.125	3.125
<i>Escherichia coli</i> AG100ATET8	50	6.25	6.25	6.25	6.25
<i>Salmonella Enteritidis</i> NCTC 13349	50	25	25	25	25
<i>Salmonella Enteritidis</i> 104	50	25	25	25	25
<i>Salmonella Enteritidis</i> 104 _{cp}	100	25	25	25	25
<i>Salmonella Enteritidis</i> 5408	50	25	25	25	25
<i>Salmonella Enteritidis</i> 5408 _{cp}	50	25	25	25	25

Table 1: Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of the compounds for Gram-negative and Gram-positive strains.

2 The general mathematical framework

We assume that the bacteria population has a constant growth rate β . Given that not all bacteria individuals in a population have same sensitivity to the drug we consider a constant death rate proportional with the number of bacterial individuals j at the time of death : $j\delta$. In order to better understand the effects of the drug on bacteria population we consider the drug is administrated at a constant rate b that follows a step function. In this sense, when the number of bacteria individuals is reaching a threshold θ we change the rate at which the drug is administrated from b_0 to b_1 :

$$b = \begin{cases} b_0, & \text{when } j < \theta \\ b_1 & \text{when } j \geq \theta \end{cases}$$

Due to the efflux pumps mechanism of bacteria, the drug is eliminated at a constant rate kd , proportional with the amount of the drug k at the time of elimination.

We start with some initial drug and bacteria and let the dynamics evolve. For the general case when the number of bacteria individuals and the drug concentration is very high, the master equation describing the time evolution of the probability distribution gives the flow for $\pi(j, k; t) = \pi_{jk}$, the probability of there being j copies of bacteria and k amount of drug, at time t .

$$\frac{d\pi_{jk}}{dt} = \sum_{j=1}^{\infty} \sum_{k=1}^{\infty} (\pi_{j-1k}\beta + \pi_{jk-1}b_{jk} - \pi_{jk}j\delta - \pi_{jk}kd) \quad (1)$$

3 The first minimal model: when the drug administrated is either present or absent

The model can be understood as a stochastic birth/death Markov process continues in time and with a discrete very large state space (large number of bacteria individuals).

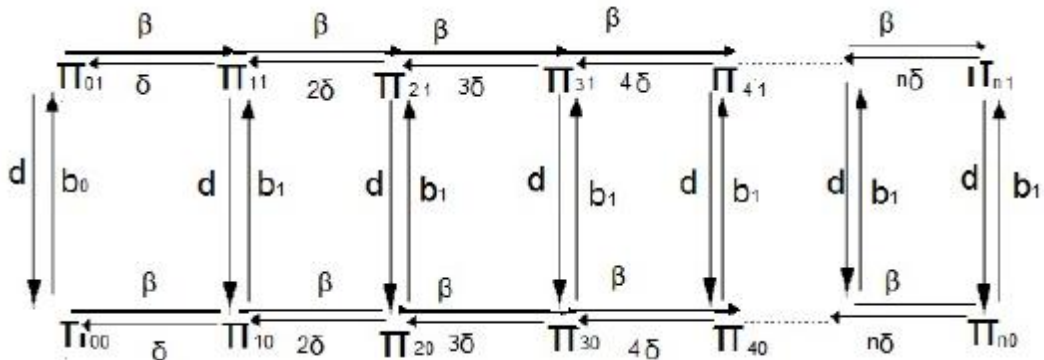


Figure 2: first/bottom line -dynamics of the bacteria population when no drug was administrated; second line -dynamics of bacteria population in the presence of the drug; $\theta = 1$; The result can be generalised for $\forall \theta$.

We will study, analytically the stochastic model of bacteria dynamics for a particular choice of states and rules of state transitions. More precisely for our first minimal model we will consider the drug as being in two states: present/absent.

The stationary state is the first "sign" that the drug keeps the population under control. In steady state the master equation (1) is replaced by the following stochastic equations:

$$j = 0, k = 0 : \pi_{00}(\beta + b_0) = \pi_{10}\delta + \pi_{01}d, \quad (2)$$

$$j \geq 1, k = 0 : \pi_{j0}(j\delta + \beta + b_1) = \pi_{j+1,0}(j+1)\delta + \pi_{j1}d + \pi_{j-1,0}\beta, \quad (3)$$

$$j = 0, k = 1 : \pi_{01}(\beta + d) = \pi_{11}\delta + \pi_{00}b_0, \quad (4)$$

$$j \geq 1, k = 1 : \pi_{j1}(j\delta + \beta + d) = \pi_{j+1,1}(j+1)\delta + \pi_{j0}b_1 + \pi_{j-1,1}\beta, \quad (5)$$

4 Methods

We used generating function technique;

Let define $f_k(x) = \sum_{j=0}^{\infty} \pi_{jk}x^j$ as probability generating function (p.g.f); the differential of p.g.f. is: $f'_k(x) = \sum_{j=0}^{\infty} j\pi_{jk}x^{j-1}$; where $\sum_{j=0}^{\infty} \pi_{jk}x^j$ converges absolutely for $|x| \leq 1$. According with the above notation, we have: $f_k(0) = \pi_{0k}$; $f_0(0) = \pi_{00}$; $f_1(0) = \pi_{01}$.

$f_0(x) = \sum_{j=0}^{\infty} \pi_{j0}x^j$ is the g.f. when we have no drug

$f_1(x) = \sum_{j=0}^{\infty} \pi_{j1}x^j$ is the g.f. in the presence of drug. All we need is $f_0(0)$ since pgf at zero generates the probabilities associated with the distribution: for $k=0$ (no drug present) $\pi_{00} = f_0(0)$; $\pi_{10} = f'_0(0)$; $2!\pi_{20} = f''_0(0) \dots n!\pi_{n0} = f^n_0(0)$ and marginal: $\sum_{j=0}^{\infty} \pi_{j0} = \sum_{n=0}^{\infty} f^n_0(0)$ for $k=1$ (in the presence of the drug) $\pi_{01} = f_1(0)$; $\pi_{11} = f'_1(0)$; $2!\pi_{21} = f''_1(0) \dots n!\pi_{n1} = f^n_1(0)$ and again marginal: $\sum_{j=0}^{\infty} \pi_{j1} = \sum_{n=0}^{\infty} f^n_1(0)$. For the simpler case when no drug is involved, it is known that the stationary probability distribution of bacteria population undergoing a birth/death process with a constant birth (β) rate and a constant decay (δ) rate is a Poisson distribution defined as:

$$p_j = \frac{1}{j!} \left(\frac{\beta}{\delta} \right)^j e^{-\beta/\delta},$$

Knowing that the marginal distribution of bacteria population will still be given by the Poisson distribution: $p_j = \pi_{j0} + \pi_{j1} = \frac{1}{j!} \left(\frac{\beta}{\delta} \right)^j e^{-\beta/\delta}$; it follows that marginal, in the generating function notation is correct to right:

$$(6) f_0(x) + f_1(x) = \sum_{j=0}^{\infty} x^j (\pi_{j0} + \pi_{j1}) = \sum_{j=0}^{\infty} x^j e^{-\beta/\delta} \frac{1}{j!} \left(\frac{\beta}{\delta} \right)^j = e^{-\beta/\delta} \sum_{j=0}^{\infty} \frac{1}{j!} \left(x \frac{\beta}{\delta} \right)^j = e^{-\beta/\delta} e^{x\beta/\delta} = e^{(x-1)\beta/\delta}.$$

and

$$(7) f_0'(x) + f_1'(x) = \frac{\beta}{\delta} e^{(x-1)\beta/\delta}$$

5 Results

Applying generating fct. technique on eq 2-5, together with conditions 6 & 7, after some calculations we get a first order non-homogeneous ODE satisfied by generating function that can be solved:

$$(x-1)\delta \frac{d}{dx} f_0(x) + (-\beta(x-1) + b_1 + d)f_0(x) = de^{(x-1)\beta/\delta} + (b_1 - b_0)f_0(0) \quad (8)$$

Using the integrand factor method: $e^{\int_0^x \frac{b_1+d-\beta(y-1)}{(y-1)\delta} dy}$ for solving the ODE (8), after some calculations one gets the expression for $f_0(0)$:

$$f_0(0) = \frac{de^{-\beta/\delta}}{b_1 + d} \left[\frac{1}{1 - \frac{b_1-b_0}{\delta} \int_0^1 e^{-(\beta/\delta)y} (1-y)^{\frac{b_1+d}{\delta}-1} dy} \right]$$

Going back at condition (6) $f_1(x) = e^{(x-1)\beta/\delta} - f_0(x)$, and setting $x=0$ we get $f_1(0) = e^{-\beta/\delta} - f_0(0)$. Given that the derivatives of generating fct at zero gives the probabilities associated with the distribution, we have this way the entire information regarding the distribution.

$$\pi_{00} = f_0(0); \pi_{10} = f_0'(0); \pi_{20} = f_0''(0) \dots \pi_{n0} = f_0^{(n)}(0); \pi_{01} = f_1(0); \pi_{11} = f_1'(0); \pi_{21} = f_1''(0) \dots \pi_{n1} = f_1^{(n)}(0)$$

6 Conclusions

This result allows us to compute exactly the stationary probability distribution of the amount of bacteria population and the drug providing that we know the parameters involved in the model. In this calculations we consider the dynamics of the bacteria when the drug can be in 2 states: present or absent. Next, we are developing a model that takes in consideration the situation when the drug can be in 3 states. Such a model would help us understand the impact of various drug concentrations on bacteria population. Nevertheless the analytical result obtained so far can be used to help developing appropriate numerical methods for approximating results of the stochastic process for the situation when we want to explore the dynamics of bacteria population for when we use various drug amounts and not just 2 state drug.

7 References

- [1] Bailey N.T.J, The Elements of Stochastic Processes with Applications to the Natural Sciences, J. Wiley and Sons, New York, (1990)
- [2] Karlin, S. and H. Taylor, First and Second Course in Stochastic Processes, (1975, 1981)
- [3] S. Lampoudi, D. T. Gillespie, and L. R. Petzold, J. Chem. Phys. 130, 094104 (2009).
- [4] Linda S. Allen, Stochastic processes with applications to Biology, (2003)
- [5] Brian Drawert, Michael J. Lawson, Linda Petzold, and Mustafa Khammash, J. Chem. Phys. 132, 074101 (2010)
- [6] B. Munsky and M. Khammash, Journal of Computational Physics 226, 818 (2007).
- [7] D. Gillespie, M. Roh, and L. Petzold, J. Chem. Phys. 130, 174103 (2009).