

Българска Академия на Науките
Институт по Биофизика и Биомедицинско Инженерство

Секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани”

Теодора Василева Лупанова

**Структурна организация и функционална
активност на мембранните липиди в норма и в
условия на оксидативен стрес**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен
„доктор”

Научна специалност
4.3 – Биологически науки
(стар шифър - 01.06.08 – Биофизика)

Научен ръководител:
проф. Албена Момчилова, дбн

**София,
2012 г.**

Благодарности

Бих желала да изкажа своята специална благодарност на **проф. Албена Момчилова**, за предоставената ми възможност да бъда докторант в нейната група от научни специалисти. Искрено благодаря за начина, по който тя отдели от времето си, за да ме окуражи, мотивира, да ме насочи към целите в експериментите и съсредоточи към важните неща; за предложенията и подкрепата при конференции. Благодаря, че Вие бяхте мой научен ръководител.

Благодаря на **доц. Галя Станева** за постоянната помощ, оказана ми по време на научните изследвания, дискусиите, относно науката и всеобщите теми, подкрепата при научни мероприятия, за съветите, получени по време на целият ми престой в секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани”.

Благодаря на **акад. Камен Куманов** за помощта която той оказа по време на газово-хроматографските експерименти, демонстративното обучение с газовия хроматограф и съветите, получени от него.

Благодаря на **проф. Диана Петкова** и **спец. Таня Марковска**, за помощта с експерименталните методики, подходите и реагентите в началните етапи от моята докторантура, както и съветите в различен аспект, получени през целия период.

Бих желала да благодаря на **проф. Румен Панков** от катедра „Цитология, хистология и ембриология” към Биологическия факултет на СУ и неговите асистенти - **ас. Надежда Стефанова** и **ас. Ралица Скробанска**, за предоставените от тях клетъчни култури по време на моите научни експерименти, за съветите и дискусиите по време на научния ми труд.

Благодаря на **моите родители** за грижливата подкрепа и обичта.

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

2D – клетки култивирани в дву-измерни условия

3D – клетки култивирани в три-измерен матрикс

Cer – церамид

CERase – церамидаза

CHOL – холестерол

DHA – докозахексаенова киселина

EPA – ейкозапентаенова киселина

GSH – редуциран глутатион

GUVs – гигантски униламеларни везикули

LA – линолова мастна киселина

Ld (L α) – течно-неподредена фаза (liquid-disordered phase)

Lo – течно-подредена фаза (liquid-ordered phase)

PC – фосфатидилхолин

PDPC – палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолин

PE – фосфатидилетаноламин

PG – фосфатидилглицерол

PI – фосфатидилинозитол

PLA2 – фосфолипаза A2

POPC – палмитоил-олеоил фосфатидилхолин

POVPC – палмитоил-оксо-валероил фосфатидилхолин

PS – фосфатидилсерин

PUFA – полиненаситени мастни киселини

ROS – реактивни кислородни видове

SAT – наситен

SM – сфингомиелин

SM synthase – сфингомиелин синтаза

SMase – сфингомиелиназа

UNSAT – ненаситен

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

МК – мастни киселини

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години учените от различни области на медицината и биологията все повече насочват интереса си към изучаването на оксидативния стрес и влиянието му върху функциите на клетките и организмите като цяло. Проучванията са насочени главно към установяване на молекулните механизми и ефекти при действието на различни окислителни агенти (активни форми на кислорода, известни в литературата с понятието ROS - reactive oxygen species, ултравиолетова радиация, реактивни азотни видове). Изследват се биохимичните промени на различни субклетъчни структури в клетката, както и на молекули (липиди, белтъци, нуклеинови киселини), атакувани от оксидативни агенти. Голямо внимание се отделя на клетъчните мембрани, които са една от основните мишени на оксидативна атака, но също така служат и като бариера срещу проникване на свободни радикали. Външният монослой на плазмената мембрана се явява едно от основните прицелни места на действието на тези токсични молекули. Фосфолипидите, влизащи в състава на биомембраните са особено податливи на окисление, особено тези, съдържащи ненаситени двойни връзки в хидрофобните си мастно-киселинни опашки. Окислението е свързано с биохимични модификации на фосфолипидните молекули, както и с конформационни промени в тяхната геометрия. Така се променят някои функции на мембраната (електрохимичните градиенти и йонният транспорт, преносът на вещества навън и навътре през мембраната), структурната организация на клетъчната мембрана (наличие на различни по големина и брой домени - рафтове и кавеоли), както и биофизичните свойства на липидните бислоеве. Като моделни системи за изучаването на оксидативните процеси в биомембраните се използват нативни клетъчни мембрани, както и изкуствено създадени липидни везикули (липозоми), които имитират по състав клетъчните мембрани. В настоящата дисертация са използвани модели на няколко вида култивирани клетки, както и изкуствени липидни мембрани – гигантски униламеларни везикули. Част от експериментите са проведени

върху плазмени мембрани на клетки, отглеждани в триизмерна система за клетъчно култивиране, имитираща растежа на клетките в условия *in vivo* – обкръжение на клетките от естествено синтезиран екстрацелуларен матрикс. Изследван е ефекта на експериментално индуциран оксидативен стрес върху състава и структурната организация на плазмените мембрани на клетките, активността на някои липид-метаболизиращи ензими, чувствителността на мембранните липиди към оксидативни увреждания, влиянието на полиненаситените МК върху мембранната структурна организация в условия на оксидативен стрес, както и механизма на действие на природния антиоксидант кверцетин върху липидната пероксидация в чернодробни мембрани. Проведените експерименти с гигантски везикули визуализират структурните промени при образуването на липидните домени в присъствието на различни по ненаситеност мастни киселини в състава на фосфолипидите. Изследван и установен е, също така, ефектът на окислени липидни молекули върху формирането на тези домени и техните физико-химични характеристики.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

В настоящата дисертация беше поставена следната цел:

Да се изследва влиянието на оксидативния стрес върху структурата и функциите на мембранните липиди, като се използват различни моделни системи – нативни и моделни мембрани.

За изпълнението на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Установяване на ролята на екзогенния оксидативен стрес върху образуването на липидни пероксидни продукти в плазмени мембрани на

фибробласти, култивирани като 3-измерна (3D) матрична система и *Ras* - трансформирани клетки.

2. Изучаване влиянието на екзогенният оксидативен стрес върху количеството на липидните пероксиди след модулиране количеството на сфингомиелина и включване на различни по ненаситеност мастни киселини.
3. Изследване антиоксидантната функция на сфингомиелина и изучаване механизмите на действие на природни антиоксиданти.
4. Установяване ефекта на степента на ненаситеност на мастните киселини и окислените фосфолипидни молекули върху латералната организация на моделни липидни бислосове.

Използвани експериментални техники

1. Клетъчно култивиране в 2D и 3D условия.
2. Изолитане на плазмено-мембранна фракция от NIH 3T3 фибробласти и чернодробни клетки от плъх в прекъснат захарозен градиент.
3. Определяне на белтък.
4. Анализ на липидния и мастно-киселинния състав на мембранните фракции.
5. Моделиране на латералната хетерогенност на плазмените мембрани.
6. Определяне на сфингомиелин-метаболизиращите ензимните активности.
7. Измерване количеството на активни форми на кислорода (ROS) в 2D и 3D фибробласти.
8. Измерване количеството на редуциран глутатион (GSH) в 2D и 3D фибробласти.
9. Анализ на липидните пероксиди (LPO assay).
10. Третиране на 2D и 3D клетките с екзогенна сфингомиелиназа (SMase).
11. Обогаляване на NIH 3T3 фибробласти с мастни киселини (EPA, LA).

12. Третиране на 2D и 3D клетки, NIH 3T3 фибробласти и плазмени мембрани от черен дроб на плъх с H_2O_2 .
13. Изолиране на детергент-резистентна мембранна (DRM) фракция.
14. Третиране на плазмени мембрани от черен дроб на плъх с Cyclodextrin.
15. Установяване на аминокислотна асиметрия в плазмени мембрани от черен дроб на плъх.
16. Статистически анализ.

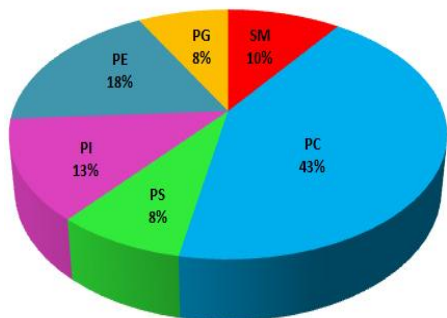
РЕЗУЛТАТИ

I. Изследвания, проведени с дву-измерни (2D) и три-измерни (3D, *in vivo*-подобни) клетъчни култури

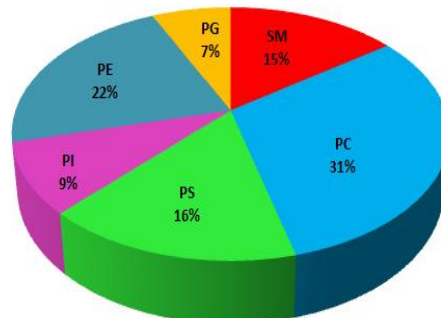
1. Качествено и количествено определяне на фосфолипидни фракции от плазмени мембрани на клетки, култивирани като монослой (2D клетки) и в три-измерни условия (3D клетки)

В нашите изследвания анализирахме фосфолипидния състав на плазмени мембрани на клетки, отглеждани като дву-измерна (2D) и три-измерна (3D) клетъчна култура от GD₂₅β₁A-фибробласти. Използвахме двуизмерната моделна система като контролна (2D- клетки), спрямо която сравнявахме получените резултати от 3D матриксната култура (3D- клетки). Видът и количеството на фосфолипидните фракции бяха определени чрез тънкослойна хроматография. Резултатите от липидния състав на плазмените мембрани в двата типа култури са показани качествено и количествено на фиг. 1.

Phospholipid compositions - 2D cells



Phospholipid compositions - 3D cells



Фиг. 1. Графично представяне на фосфолипидния състав и количеството на отделните фосфолипидни фракции в плазмени мембрани, изолирани от $GD_{25}\beta_1A$ фибробласти, култивирани като монослой - 2D клетки и в три-измерен матрикс -3D клетки. Резултатите са представени количествено като **mol%**.

Както се забелязва, количеството на почти всички фосфолипидни фракции се различава в двата типа клетъчни култури. Количеството на *сфингомиелин* (SM) е силно повишено – с около 50% в плазмените мембрани на 3D клетките, в сравнение с 2D. В допълнение на това отчетохме, че при 3D „матриксните” клетки другият холин-съдържащ фосфолипид - *фосфатидилхолин* (PC) е със значително намалено съдържание, както и *фосфатидилинозитола* (PI), докато аминокислотите *фосфатидилетаноламин* (PE) и *фосфатидилсерин* (PS) са повишени.

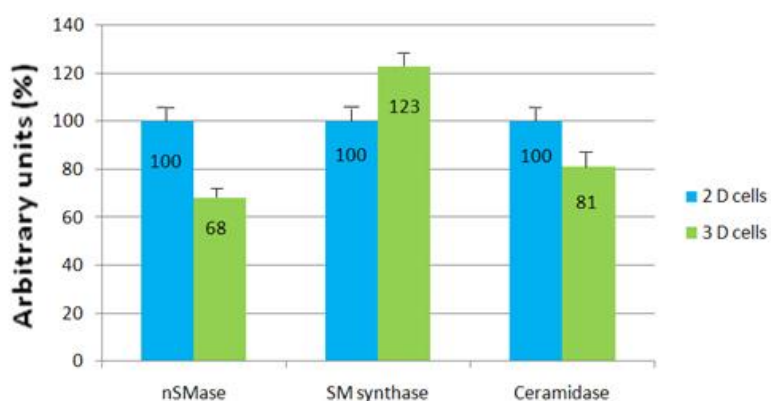
Поради значимата разлика в количеството на SM между двата типа клетки ние фокусирахме изследванията си върху причините за повишеното му съдържание в мембраните на 3D клетките.

2. Определяне активностите на сфингомиелин-метаболизиращите ензими в 2D и 3D клетки

В нашите изследвания ние фокусирахме вниманието си върху сфингомиелина по две основни причини: защото е главен компонент на мембранните рафт домени и поради данни за антиоксидантните му функции [Papasani, Subbaiah, Arch. Biochem. Biophys. 481:72–79; 2009]. За да установим

механизмите, които обуславят повишеното количество на SM в плазмените мембрани на 3D клетките, ние анализирахме активностите на три сфингомиелин-метаболизиращи ензими, които имат отношение към неговото ниво в мембраната - сфингомиелин синтаза (*SM syntase*), церамидаза (*CERase*) и неутрална сфингомиелиназа (*nSMase*), която е мембранно свързана и хидролизира SM, разположен предимно във вътрешния монослой на плазмената мембрана.

Резултатите (фиг. 2) показаха, че активността на неутралната сфингомиелиназа е понижена, докато сфингомиелин синтазата е по-активна в 3D, в сравнение с 2D клетките. Също така беше установено, че активността на церамидазата е намалена при 3D клетките.



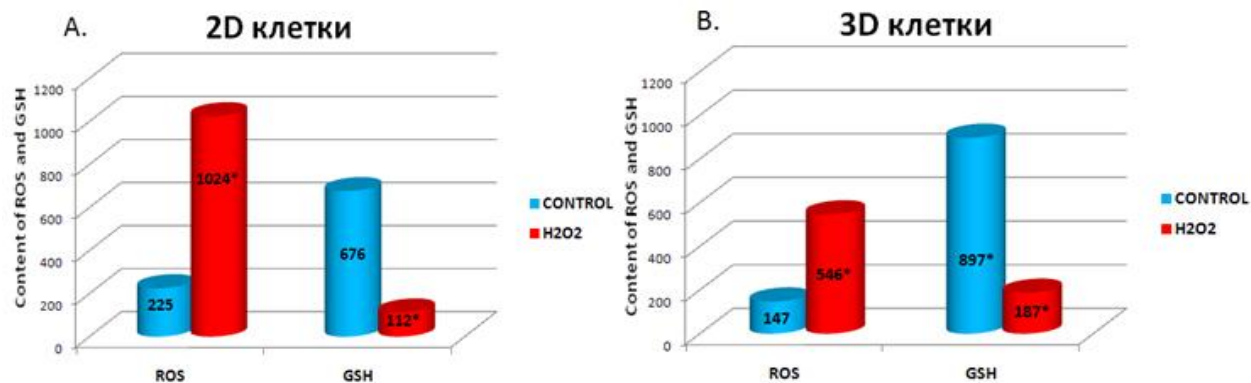
Фиг. 2. Промени в активността на ензимите, участващи в метаболизма на сфинголипидите в клетки, култивирани като монослой (2D клетки) – сини колони и в три-измерен матрикс (3D клетки) – зелени колони. Резултатите са представени в условни единици от три отделни експеримента. Наблюдаваните различия между 2D и 3D фибробластите за всяка от ензимните активности са статистически значими при $P < 0,001$.

В следващите експерименти анализирахме чувствителността на двата типа клетъчни култури към оксидативен стрес, като проучванията ни бяха съсредоточени главно върху акумулирането на активни форми на кислорода и липидни пероксиди. Освен това, както беше споменато, в литературата съществуват предположения, че SM има ролята на природен мембранен

антиоксидант при определени условия и инхибира окислението на ненаситените мастно-киселинни вериги. Тъй като неговото съдържание се различава значително в 2D и 3D фибробластите, ние анализирахме неговата роля в чувствителността на плазмено мембранните липиди към оксидативно увреждане в двата типа клетки.

3. Нива на ROS и GSH и роля на екзогенният оксидативен стрес в образуването на липидни пероксиди в клетките, култивирани в 2D и 3D условия

Количествата на реактивните форми на кислорода (ROS) и редуцирания глутатион (GSH) бяха анализирани в клетките, култивирани в 2D и 3D условия. За да се определи как се променят концентрациите на ROS и GSH преди и след оксидативна атака в двата типа клетки, експериментите бяха разделени на две серии, като една част от 2D и 3D бяха използвани като контролни и не бяха третирани с H_2O_2 , а друга част от тях бяха третирани с окислителя H_2O_2 . Резултатите от експериментите с **нетретирани** с пероксид клетки са показани на фиг. 3 - А и В (сини колонии). От тях се вижда, че нивото на ROS в контролните, нетретирани 3D-фибробласти е по-ниско с около 40%, спрямо нетретираните с пероксид 2D-клетки, докато стойността на GSH е по-висока с почти 30% при 3D-клетките, в сравнение с 2D-контролните клетки. Тоест, съдържанието на активни форми на кислорода е по-ниско в матриксните клетки, в сравнение с тези, култивирани като монослой. За да установим ролята на екзогенният оксидативен стрес върху факторите за култивиране на клетките ние третирахме двата вида клетъчни култури с H_2O_2 (фиг. 3А и В – червени колонии). Като резултат от третирането с H_2O_2 ние установихме, че стойността на ROS се повишава 4.5 пъти в 2D клетките и 3.7 пъти при 3D.



Фиг. 3. Съдържание на ROS и GSH в GD25β1A-фибробласти, култивирани като монослой-2D (A) и в три-измерен матрикс-3D (B). Сините колони показват концентрациите на ROS и GSH в двата типа контролни клетки, нетретиран с H₂O₂. Червените колони показват количествата на ROS и GSH в двата типа, третирани с H₂O₂ клетки.

ROS - активни кислородни видове; **GSH**- редуциран глутатион

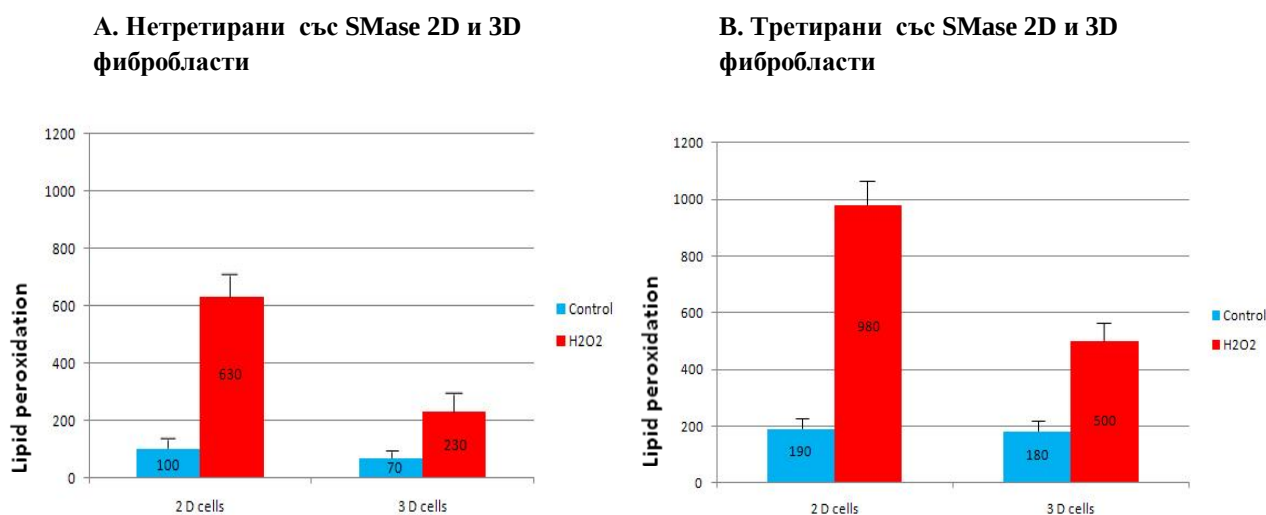
ROS се изразяват като интензитет на флуоресценцията / mg протеин. GSH се определя спектрофотометрично като се използва сулфхидрилният реагент DTNB и измерване на абсорбцията на 412 nm, а резултатите са изразени като pmol / mg протеин. Данните са въз основа на четири отделни експеримента. *P<0,001

Количеството на GSH в условия на оксидативен стрес намалява 6 пъти в 2D и 4.8 пъти в 3D културите, спрямо нетретираните с оксидативен агент клетки. Въпреки, че след оксидативната атака концентрациите на ROS и GSH се променят силно и при двата типа клетки, при фибробластите, отглеждани в 3D условия стойностите на ROS остават по-ниски, както и намалението на GSH е по-слабо, в сравнение с клетките, култивирани като 2D култура.

4. Антиоксидантни функции на мембрания фосфолипид сфингомиелин

Предположихме, че повишеното количество на SM в плазмените мембрани на 3D клетките може да има отношение към по-ниската им чувствителност към липидно окисление. За да проверим тази хипотеза, анализирахме антиоксидантната роля на този фосфолипид, като намалихме селективно съдържанието му в двата типа клетки, чрез третирането им с екзогенна сфингомиелиназа. Резултатите относно нивата на липидни пероксиди в нетретираните със SMase 2D и 3D фибробласти служеха като контролни, спрямо които сравнявахме тези от клетките с намалено съдържание на SM.

Освен това, за да отчетем влиянието на индуцирания оксидативен стрес третираните и нетретираните клетки със SMase бяха инкубирани с H_2O_2 . Резултатите показаха, че намаленото количество на SM води до увеличение в количеството на липидните пероксиди, както при 2D, така и при 3D клетките (фиг. 4 А и В). Въпреки обаче, значителното намаление на SM, съдържанието на липидни пероксиди остана по-ниско в 3D фибробластите, в сравнение с 2D (фиг. 4 В). След специфичното делипидиране на SM и оксидативна атака с H_2O_2 нивото на липидни пероксиди при 2D клетките се повиши с 1.5 пъти, а при 3D клетките 2.17 пъти спрямо неинкубираните със сфингомиелиназа клетки.



Фиг. 4. Количество на липидни пероксиди в GD25β1A-фибробласти, отглеждани като монослой (2D) и в три-измерен матрикс (3D).

А. Интактни клетки, нетретираните със сфингомиелиназа

В. Клетки, с понижено съдържание на SM, инкубирани със сфингомиелиназа

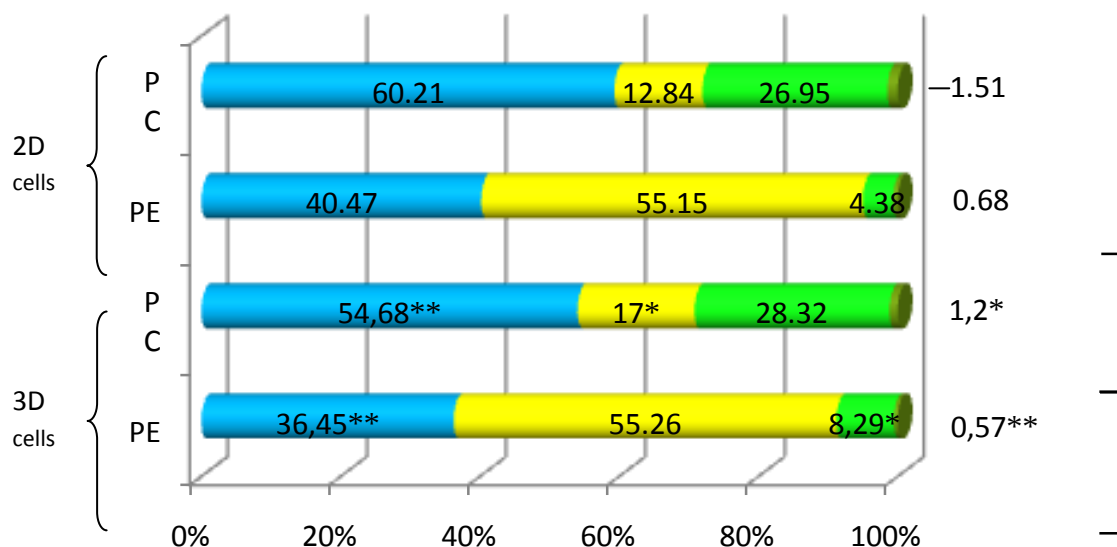
Нетретираните клетки с H_2O_2 – сини колони

Клетки, третирани с H_2O_2 – червени колони

Липидните пероксиди се изразяват като интензитет на флуоресценцията / mg протеин.

5. Маслно-киселинен анализ на основните плазмено-мембранны фосфолипиди - фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин

Друга възможна причина за по-ниската чувствителност към окисление на фосфолипидните молекули в 3D клетките може да бъде степента на ненаситеност в техните маслно киселинни вериги. Ненаситените вериги на масните киселини в мембраната са по-податливи на окисление [C. Code, Biochim.Biophys.Acta 1798: 1593-1600; 2010]. Ние анализирахме вида на масните киселини в двата доминиращи плазмено мембранны фосфолипида – PC и PE. Резултатите от този маслно-киселинен анализ показаха значителни различия в двата типа клетки (фиг. 5).



Фиг. 5. Графично представяне на съдържанието на наситени (SAT), мононенаситени (MONO) и полиненаситени (PU) маслни киселини в PC и PE от плазмени мембрани на клетки, култивирани като монослой (2D) и в три-измерен матрикс (3D). 3D клетките съдържат по- високо количество ненаситени маслни киселини.

Резултатите са изразени като mol%

UNSAT – ненаситени маслни киселини

SAT/UNSAT – индекс на наситеност, показва съотношението на наситени спрямо ненаситени МК.

PC – phosphatidylcholine

PE - phosphatidylethanolamine

Резултатите са въз основа на четири отделни експеримента; * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$

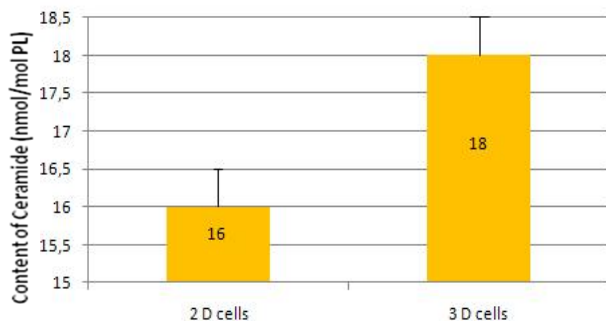
Този експеримент показва неочакван резултат, тъй като се оказа, че изследваните плазмено - мембранни фосфолипиди в 3D клетките съдържат по-високо количество **ненаситени мастни киселини**, в сравнение с 2D. Тези данни са изразени като отношение на наситените към ненаситените МК (SAT/UNSAT - *т.нар. индекс на наситеност*). Резултатите показаха, че въпреки по-високото съдържание на ненаситени МК, в плазмените мембрани на 3D фибробластите се установява по-ниско ниво на липидни пероксиди, в сравнение с 2D.

Тъй като при експериментите с фибробластите, култивирани в 2D и 3D условия беше установена различна чувствителност към окислителни увреждания, както и разнообразие от различни по наситеност мастно-киселинни вериги, които са прицелни места за оксидативна атака, ние анализирахме активността на ензима фосфолипаза A2 (PLA2). Този ензим участва в цикъла деацилиране-реацилиране в мембраните, който е отговорен за елиминиране на увредени ацилни вериги във фосфолипидните молекули и замяната им с други мастни киселини.

6. Активност на PLA2 в плазмени мембрани на фибробласти, култивирани в 2D и 3D условия

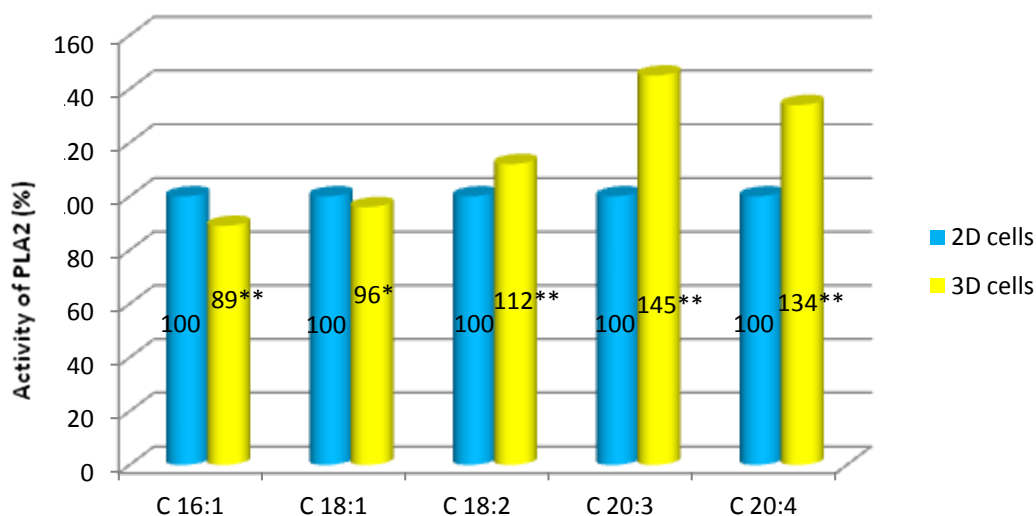
Целта на този експеримент беше да се установят евентуалните различия в активността на ензима PLA2 и следователно в потенциала за репарация на оксидативно увредени плазмени мембрани в 2D и 3D клетките. Главният субстрат на мембранно- свързаната PLA2 е PC, който в мембраните на фибробластите, култивирани в 2D и 3D условия, е в различно количество (фиг. 1, по-горе). Нашето внимание беше фокусирано и върху количеството на Cer в плазмените мембрани на двата типа клетки, поради това, че този сфинголипид повишава активността на PLA2, както и променя специфичността на ензима към мастно-киселинния състав [Koumanov, Biochem. J. 363:45 – 51; 2002]. Получените резултати показаха, че

концентрацията на Cer е по-висока с около 10% в мембраните на 3D фибробластите, в сравнение с 2D (фиг. 6).



Фиг. 6. Съдържание на церамид (Cer) в плазмени мембрани на фибробласти, култивирани като монослой (2D) и в три-измерен матрикс (3D). Резултатите са изразени като (nmol/mol phospholipids) на базата на три отделни експеримента.

Поради установените различия в количеството на отделните фосфолипиди и състава на мастно киселинните им вериги, по-нататъшните изследвания бяха насочени върху промените в активността на мембранно-свързаната PLA2 от двата вида клетки. Получените резултати показаха, че специфичността на PLA2 към различните фосфолипидни видове е различна в мембраните на 3D клетките, в сравнение с 2D (фиг. 7).



Фиг. 7. Графично изображение на активността на фосфолипаза A2 (PLA2) спрямо различни мастни киселини в плазмени мембрани на клетки, култивирани като монослой (2D) и в три-измерен матрикс (3D). Резултатите са изразени в условни единици от три отделни експерименти. Условно приемаме активността на PLA2 към различните МК в 2D клетките за 100%. * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$

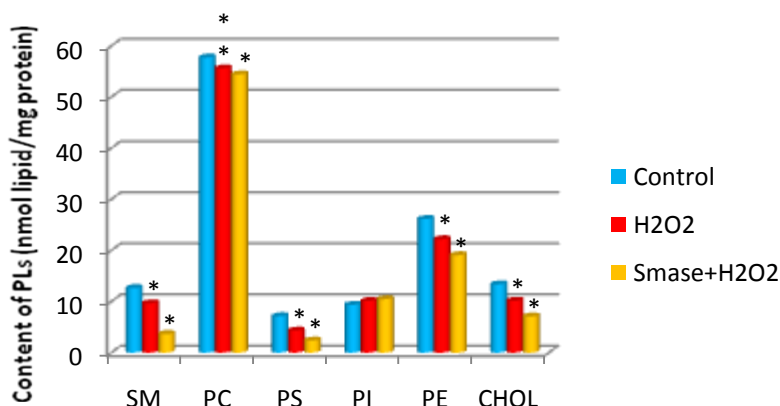
От резултатите се установи, че активността на ензима към мононенаситените C16:1 и C18:1 мастни киселини е по-ниска в мембраните на 3D клетките, в сравнение с 2D. Активността на фосфолипазата към фосфолипиди, съдържащи PUFA (C18:2 и особено C20:3 и C20:4) обаче беше значително по-висока в мембраните на 3D фибробластите, в сравнение с 2D.

II. Влияние на оксидативния стрес върху NIH 3T3 фибробласти

Една от основните задачи при разработването на този дисертационен труд беше да се установи ролята на екзогенните оксиданти върху акумулирането на свободни радикали, причиняващи увреждания в клетъчните мембрани от различни клетки, както и ролята на сфингомиелина в оксидативните процеси. Следващата моделна система, която използвахме за изпълнението на поставените задачи са *Ha-ras* - трансформирани и нетрансформирани *NIH 3T3* миши фибробласти.

1. Влияние на H₂O₂ върху количеството на мембранните фосфолипидни фракции в NIH 3T3 фибробласти преди и след редукция на сфингомиелин

Целта на тази серия от експерименти беше да се установи ролята на сфингомиелина в качеството на естествен мембранен антиоксидант в условия на оксидативен стрес. В тези опити използвахме клетъчни култури от *NIH 3T3* миши фибробласти, които бяха третирани с екзогенна сфингомиелиназа с цел селективно редуциране на нивото само на един мембранен фосфолипид - *сфингомиелин*. Резултатите от това изследване са представени на фиг. 8 и показват, че третирането на клетките с H₂O₂ повлиява в различна степен отделните фосфолипидни фракции.

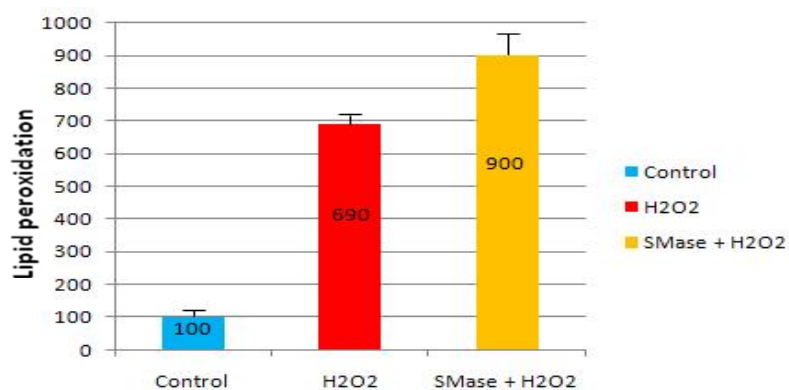


Фиг. 8. Фосфолипиден състав на плазмени мембрани, изолирани от NIH 3T3 фибробласти (nmol lipid / mg protein), третирани с H_2O_2 преди и след инкубиране със сфингомиелиназа.
* $P < 0.001$; ** $P < 0.01$

По-значително е намалението в количеството на PS и PE, последвано от SM и CHOL. Леко понижение се забелязва и в доминиращия мембранен фосфолипид PC, но резултатът при него не е статистически значим. Инкубирането на клетките с екзогенна SMase обаче, преди оксидативната атака с H_2O_2 , води до по-забележими промени в количеството на липидните компоненти (фиг. 8). Не само намалява концентрацията на SM в резултат на специфичното действие на SMase, но и количеството на останалите липидни фракции (с изключение на PI) също се редуцира много повече в условия на оксидативен стрес, в сравнение с неинкубираните със SMase фибробласти.

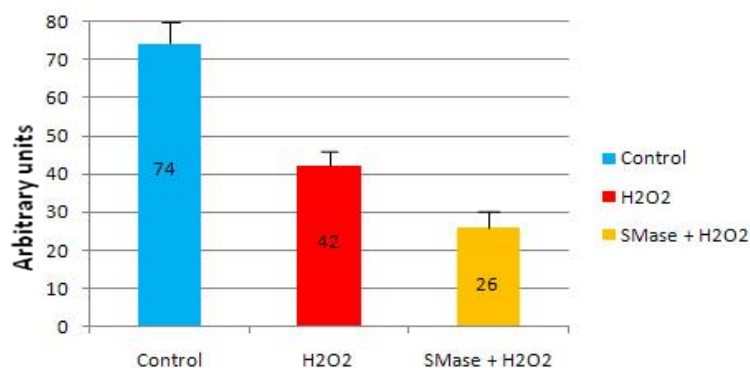
2. Количество на липидни пероксиди в NIH 3T3 фибробласти след инкубиране със SMase и оксидативна атака с H_2O_2 . Връзка между raft-липидите и общите плазмено-мембранны липиди в DRMs мембранны фракции

По нататъшните изследвания бяха съсредоточени върху установяване на количеството на липидните пероксиди в NIH 3T3 фибробластите, инкубирани със SMase и H_2O_2 (фиг. 9). Резултатите показаха, че инкубирането на клетките със SMase преди индуциране на оксидативен стрес с H_2O_2 води до значително повишаване в нивото на липидни пероксиди в сравнение с клетките третирани само с H_2O_2 и непроменена концентрация на SM.



Фиг. 9. Количество на липидни пероксиди, в NIH 3T3 фибробласти третирани с H₂O₂ и екзогенна SMase (интензитет на флуоресценцията / mg protein) P < 0.001

С цел да се установи евентуална връзка между количеството на рафт-домени и чувствителността към оксидативни увреждания на мембранните липиди, беше определен относителния дял на рафт-липидите от общите фосфолипиди в плазмените мембрани на NIH 3T3 фибробластите, чрез изолиране на DRMs фракция (идентична на *rafts* домени). Резултатите показаха, че повишението в стойността на липидните пероксиди е обратно пропорционално на отношението между *rafts* липидите и общите фосфолипиди (фиг. 10).



Фиг. 10. Отношение между *rafts*-липидите и общи плазмено мембранни фосфолипиди (x100) в NIH 3T3 фибробласти, третирани с H₂O₂ и H₂O₂ + SMase. Резултатите са изразени като условни единици, P < 0.001

Изследвания върху чувствителността към оксидативни увреждания на Ras-трансформирани фибробласти

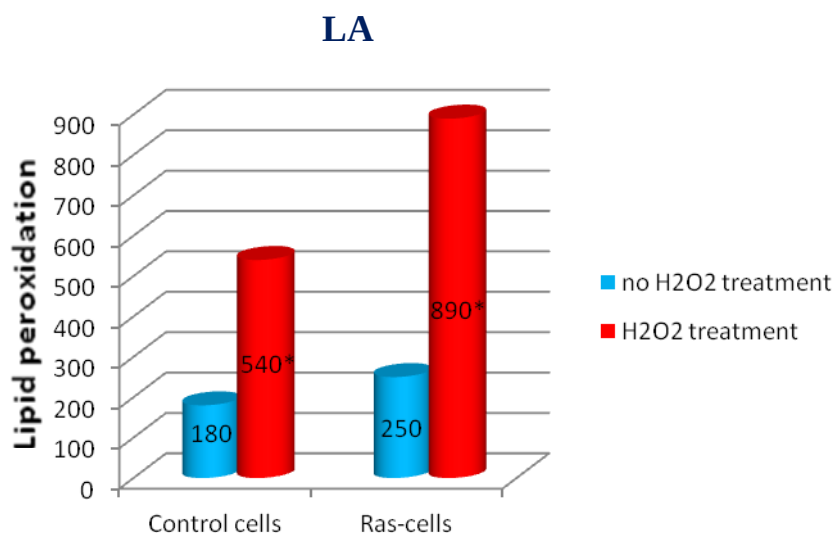
В следващите опити с Ras-трансформирани фибробласти след включване в клетките на две различни по степен на ненаситеност мастни киселини (които

са прицелни места за оксидативни увреждания), установихме различия в чувствителността към окисление на мембранните липиди.

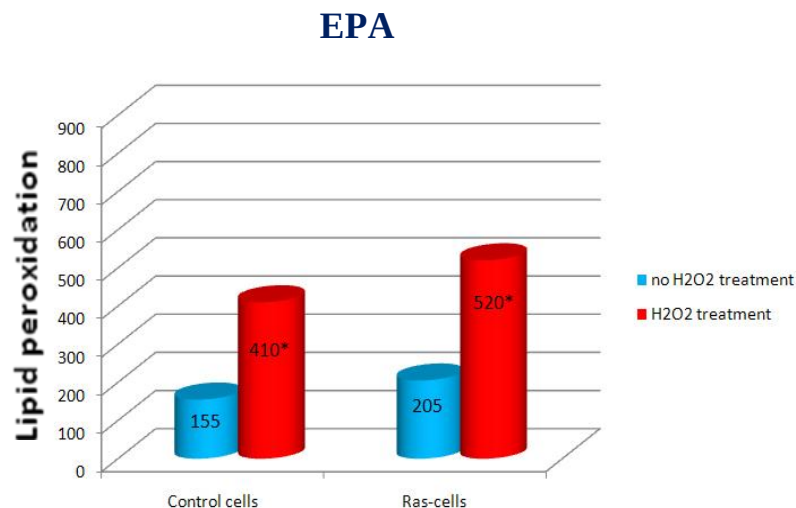
1. Изследване на чувствителността към окисление на контролни и Ras-трансформирани NIH 3T3 фибробласти след включване на различни по степен на наситеност мастни киселини

Контролните (нетрансформирани) и Ras-трансформирани NIH 3T3 фибробласти бяха инкубирани с два типа мастни киселини, различаващи се по степента на ненаситеност – **линолова, LA** (с две двойни връзки) и **ейкозапентаенова, EPA** (с пет двойни връзки, омега-3 МК).

Тъй като ненаситените МК са мишена за оксидативно увреждане на липидните молекули, а окислените липидни продукти имат висока физиологична активност, ние установихме количеството на липидните пероксиди в двата типа клетки след включването на LA и EPA. Резултатите показаха, че след включването на двата вида мастни киселини количеството на липидните пероксиди е по-високо в Ras-трансформирани клетки, отколкото в контролните (фиг. 11 и 12, сини колони).



Фиг. 11. Количество на липидни пероксиди в контролни и Ras-трансформирани фибробласти, след въвеждане на LA преди и след екзогенен оксидативен стрес с H₂O₂. Резултатите са изразени като интензитет на флуоресценцията/mg протеин



Фиг. 12. Количество на липидни пероксиди в контролни и *Ras*-трансформирани фибробласти, след въвеждане на **EPA** преди и след екзогенен оксидативен стрес с H₂O₂. Резултатите са изразени като интензитет на флуоресценцията/мг протеин

За да установим ролята на екзогенния оксидативен стрес ние третирахме двата вида клетки с H₂O₂ след въвеждането на двата вида мастни киселини, различаващи се по степен на ненаситеност. Резултатът от този експеримент показва значително повишаване в нивото на липидните пероксиди в двата вида клетки, обогатени с LA и EPA (фиг. 11 и 12, червени колони). Забелязва се обаче, че при клетките (контролни и *Ras*-), инкубирани с LA (с две двойни връзки) това повишение е по-значително.

III. Изучаване на механизмите на взаимодействие на природни антиоксиданти с чернодробни плазмени мембрани от плъх

Напоследък в биомедицинските изследвания се обръща голямо внимание на природните антиоксиданти с фенолна структура – флавоноиди. За да установим влиянието на флавоновия антиоксидант кверцетин ние използвахме като моделна система изолирани чернодробни плазмени мембрани от плъх. Все още механизмът на действие на този природен антиоксидант не е ясен – как взаимодейства с плазмената мембрана, с какви молекули от нейният състав се свързва, има ли специфични участъци от плазмената мембрана с които взаимодейства преференциално и т.н. са въпроси с ненапълно установен отговор. Изучаването на тези механизми и

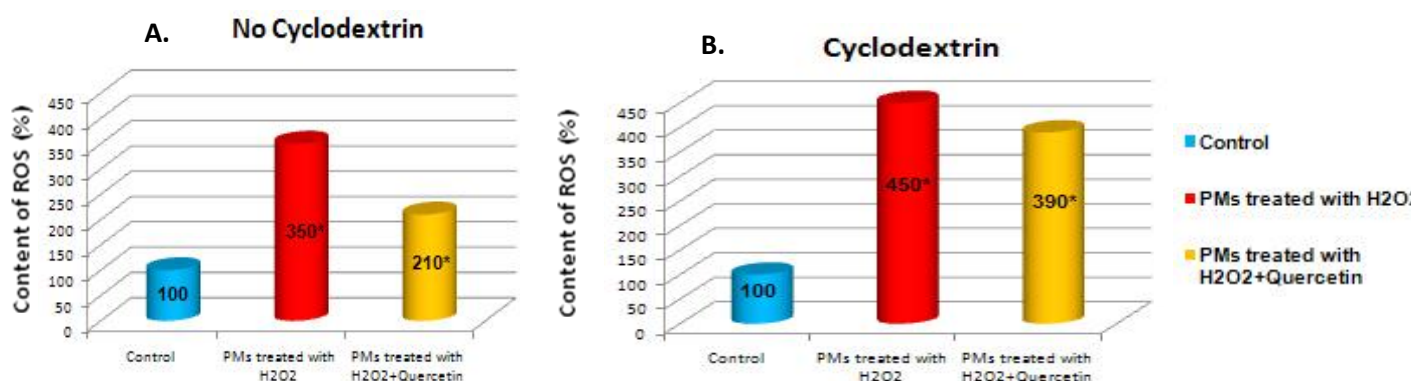
фактори е важен елемент при установяване на ефективността му като антиоксидант.

Тъй като CHOL е основен структурен и функционален компонент в плазмената мембрана, ние изследвахме как промяната на съдържанието му влияе върху ефективността на действие на *кверцетина* в качеството му на антиоксидант.

1. Промени в антиоксидантната функция на кверцетин при модулиране съдържанието на CHOL

За тази цел модулирахме съдържанието на CHOL в изолирани чернодробни плазмени мембрани чрез третиране с Cyclodextrin (агент, който намалява количеството му в мембраните). В резултат на обработката с Cyclodextrin в третираните плазмени мембрани концентрацията на CHOL беше намалена с 1.7 пъти, в сравнение с нетретираните мембрани.

Използвахме двата вида плазмени мембрани (*интактни* - с немодифицирано съдържание на CHOL и *модифицирани* - с намалено количество на CHOL), за да установим съдържанието на ROS след третирането им с H_2O_2 и кверцетин. Резултатите са показани графично на фиг. 13 А и В.



Фиг. 13. Количество на ROS в чернодробни плазмени мембрани от плъх. **Контролни мембрани** – син цвят; **мембрани, третиран с H_2O_2** - червен цвят; **мембрани третиран с H_2O_2 + Quercetin** – жълт цвят.

А) Плазмени мембрани, нетретиран с Cyclodextrin (непроменено съдържание на CHOL)

В) Плазмени мембрани, третиран с Cyclodextrin (намалено съдържание на CHOL)

Резултатите са изразени в проценти (%). Изчисленията са въз основа на контролните мембрани, в които условно приемаме количеството на ROS за 100%. Резултатите са получени въз основа на три отделни експеримента. * $P < 0.001$

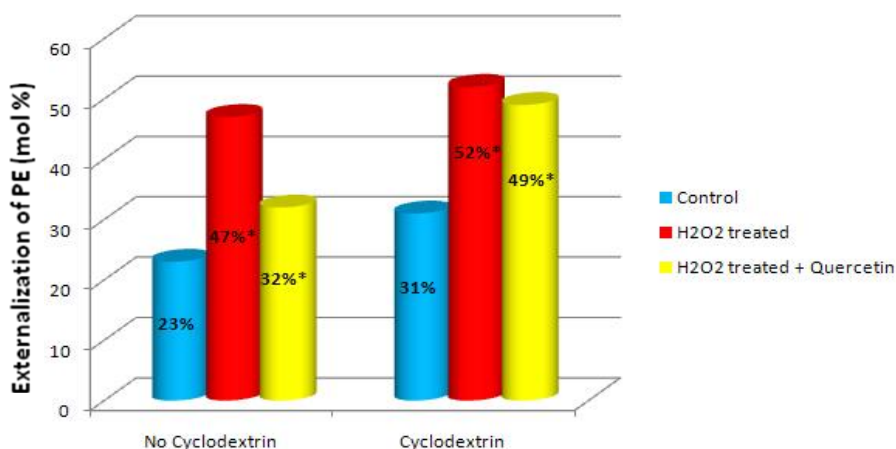
От тях се вижда, че след оксидативна атака с H_2O_2 (фиг. 13 А) съдържанието на ROS в плазмените мембрани с непроменено количество на CHOL е 3.5 пъти повече, докато количеството на ROS в мембраните с намалено съдържание на CHOL е 4.5 повече, в сравнение с контролните плазмени мембрани, в които условно приемаме, че концентрацията на ROS е 100%. Направните изчисления са въз основа на контролните плазмени мембрани (100%). При индуциране на оксидативната атака с H_2O_2 в присъствие на кверцетин беше установено, че в клетъчните мембрани, нетретирани с Cyclodextrin, съдържанието на ROS е 2 пъти повече, в сравнение с контролните мембрани. Това увеличение, обаче, се оказва почти 4 пъти по-силно в мембраните с намалено съдържание на CHOL, спрямо контролните мембрани (фиг. 13 В).

В литературата съществуват данни, че оксидативния стрес води до промени в нативната асиметрия на мембрания бислой, като се засяга предимно трансмембранната локализация на мембранните аминоксифолипиди (фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин). Освен това съществува хипотеза, че ефективността на някои природни антиоксиданти, зависи от структурната организация на липидния бислой, както и от промени в нативната мембранна асиметрия. Поради това, бяха проведени изследвания насочени към установяване на корелация между промените в трансмембранната асиметрия на аминоксифолипидите и ефективността на действие на антиоксиданта кверцитин.

2. Поява на аминоксифолипида PE във външния монослой на плазмената мембраната в зависимост от количеството на кверцетин

За да анализираме ефекта от намаленото съдържание на CHOL върху появата на аминоксифолипиди във външния монослой на мембраната в присъствие и отсъствие на кверцетин, ние проведохме експерименти върху асиметричното разпределение на PE в плазмените мембрани с интактно и модифицирано (намалено) количество на CHOL.

Резултатите показаха, че в интактните мембрани третирането с H_2O_2 предизвиква двукратно увеличение в появата на PE във външния монослой, в сравнение с контролните плазмени мембрани (*нетретирани с H_2O_2 и кверцетин*) (фиг. 14). При мембраните с непроменено количество CHOL се установи, че оксидативната атака в присъствието на антиоксиданта *кверцетин* не води до толкова изразена екстернализация на PE към външния монослой (1.4 пъти спрямо контролните мембрани). При мембраните с намалено количество на CHOL обаче, се забеляза, че трансфера на PE към външния монослой, в присъствие на H_2O_2 , е почти в еднаква степен както в отсъствие, така и в присъствие на флавоновия антиоксидант (1.7 и 1.5 %, съответно).



Фиг. 14. Локализация на PE във външния монослой на плазмената мембрана в интактни (*нетретирани с Cyclodextrin*) и *Cyclodextrin*-третираните плазмени мембрани от плъх. Резултатите са изразени като % на екстернализация на NBD-PE и са анализирани въз основа на три отделни експерименти. * $P < 0.001$

Тъй като ненаситените мастни киселини са отлична мишена за оксидативна атака, а един важен мембранен липиден компонент с антиоксидантни свойства, какъвто е сфингомиелина, се явява главен компонент на рафт-домени, ние анализирахме влиянието на ненаситените ацилни вериги върху фазовото разделяне на липидите и ролята им при образуване на липидни домени. Тези изследвания бяха проведени върху една много съвременна и информативна моделна мембранна система, каквато са гигантските униламеларни везикули (GUVs).

IV. Експерименти с моделни мембрани

Плазмените мембрани на еукариотните клетки са съставени от различни видове липиди. Съществуват много доказателства за свойствата на тези липиди да се организират под формата на агрегати в плоскостта на мембраните и в частност за ролята на *холестерола* и *сфинголипидите* в образуването на липидни домени наречени “*rafts*”. За да разберем основите на полиморфизма на фосфолипидите, често се налага да се изучават свойствата на синтетични фосфолипидни аналози с модифицирани мастно-киселинни вериги или полярни групи.

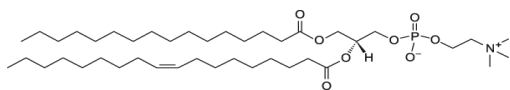
Ефект на окисления липид палмитоил-оксовалероил фосфатидилхолин (POVPC) върху формиране на домени от типа *rafts*

За да се установи как се променят латералната организация и физико-химичните характеристики на бислоя под действието на окислени липидни продукти в липиден матрикс, съдържащ мононенаситени (POPC) или полиненаситени (PDPC) мастни киселини, бяха използвани два вида **контролни** липидни смеси в съотношение (33/33/34 *mol/mol/mol*). Мембранните липидни домени от типа *rafts* в нативните биологични мембрани съдържат най-често *SM/CHOL* в съотношение 1/1 до 2/1. Разликата между липидните смеси е във вида фосфатидилхолин:

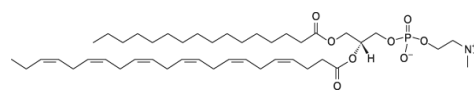
1. **POPC/SM/CHOL** - **смес**, съставена от *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*; 16:0-18:1 PC (POPC, фиг. 15), яйчен сфингомиелин (SM) и холестерол (CHOL). POPC съдържа **една двойна** връзка в *олеиновата киселина* на втора позиция в молекулата на глицерола.

2. **PDPC/SM/CHOL** - **смес**, съставена от *1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*; 16:0-22:6 PC; (PDPC, фиг. 16), яйчен сфингомиелин (SM) и холестерол (CHOL). PDPC съдържа **шест двойни връзки** в *докозахексаеновата киселина*, също на втора позиция в молекулата на глицерола.

За визуализиране на *raft*-домените в GUVs използвахме флуоресцентния липиден маркер Rhodamine-PE* (Rhod-PE*) в концентрация 1 mol %.



Фиг.15. *Palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine, 16:0-18:1 PC; POPC съдържа една ненаситена двойна връзка в олеиновата мастна киселина.*

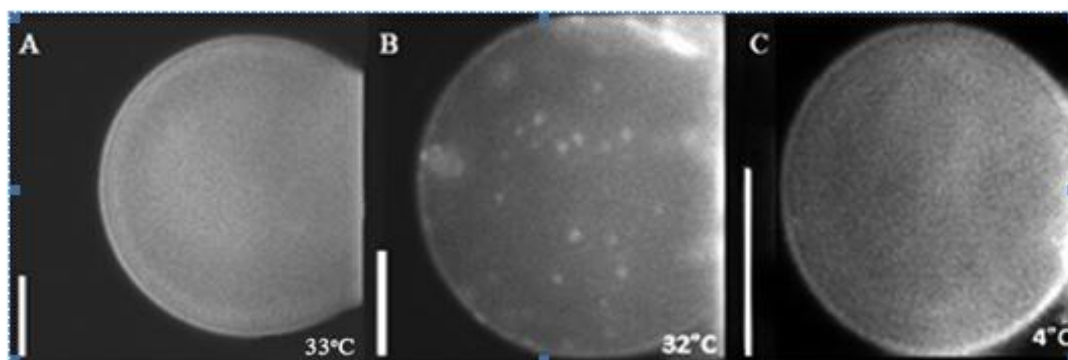


Фиг.16. *Palmitoyl-docosahexaenoic phosphatidylcholine, 16:0-22:6 PC; PDPC съдържа шест ненаситени двойни връзки в докозаhexaеновата мастна киселина.*

Към тези смеси са добавени различни концентрации на POVPC (от 0.5 до 5 mol %), за да се установи дали окислените липиди имат свойството да стимулират или потискат формирането на домени от типа *rafts*.

1. Фазово разделяне на три-компонентната контролна липидна смес от POPC/SM/CHOL (33/33/34 mol/mol/mol)

Фиг. 17 показва фазовото разделяне на липидите в контролната смес от **POPC/SM/CHOL (33/33/34 mol/mol/mol)**. Везикулите са наблюдавани в температурния интервал от 40° до 4°C, при постепенно намаляване на температурата със скорост 0.2°/мин. Резултатите показват наличие на хомогенни и правилно очертани везикули при температури между 40°-33°C. Наличието на хомогенни липозоми при наблюдение в режим на флуоресценция означава идеална смесваемост на трите използвани фосфолипида – POPC, яйчен SM и CHOL в молното съотношение 33/33/34 (фиг. 17 А). При постепенно понижаване на температурата, в тази липидна смес се наблюдава рязка промяна във фазовото поведение на сместа: от еднофазна, системата се превръща в двуфазна. При 32.3°C везикулите показват фазово разделяне от типа *Ld/Lo* (фиг. 17 В). Светлите участъци от липозомите, съответстващи на *Ld* фазата, се уголемяват и редуцират по брой. При температури от 24° до 4°C (фиг. 17 С), везикулите отново са хомогенни.



Фиг. 17. Фазово разделяне на фосфолипидите в GUVs като функция на температурата. GUVs са съставени от **POPC/SM/CHOL (33/33/34 mol/mol/mol)**. За визуализация на фазовото разделяне е използван флуоресцентният липиден аналог Rhodamine-PE*, който се локализира предимно в Ld-фазата, на която съответстват светлите участъци от везикулите. Мащаб=20μm

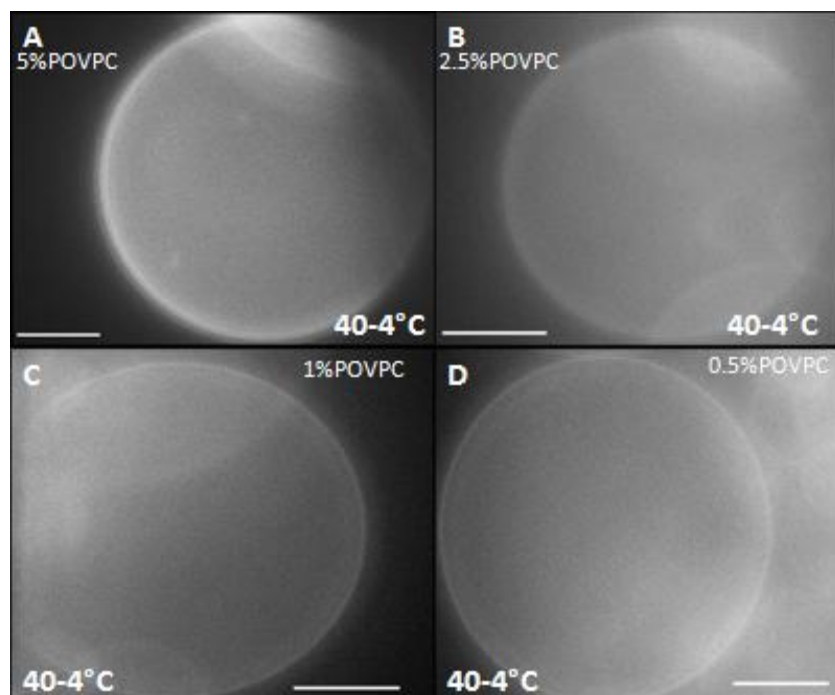
A. Наличие на хомогенност във везикулната мембрана в температурната област от 40° до 33°C

B. Фазово разделяне от типа перколация (Ld-течно неподредена в Lo-течно подредена фаза) при температури от 32° до 25°C

C. Хомогенност на мембраните под 24°C

2. Фазово разделяне на липидна смес от POPC/SM/CHOL с добавяне на различни концентрации на окислен фосфолипид POVPC

На фиг. 18 са показани резултатите получени при добавяне на окисления фосфолипид POVPC. Концентрациите от POVPC, които използвахме са обозначени на фиг. 18 както следва: **A)** 5 mol % POVPC; **B)** 2.5 mol % POVPC; **C)** 1 mol % POVPC; **D)** 0.5 mol % POVPC. Установи се, че добавянето на POVPC в различни концентрации в липидната смес от POPC/SM/CHOL води до драстична промяна в латералната организация на фосфолипидите и до премахването на Ld/Lo фазовото разделяне в цялата температурна област от 40° до 4°C. Тези резултати показват, че добавянето само на 0.5 mol % POVPC към контролната трикомпонентна смес е достатъчно количество, за да предизвика пълна смесваемост на липидите в иначе хетерогенната липидна смес, съдържаща една ненаситена двойна връзка (в POPC-сместа).



Фиг. 18. Флуоресцентна микроскопия на GUVs, съставени от **POPC/SM/CHOL** с добавяне на различни концентрации на окисления фосфолипид **POVPC**: **A** – 5 mol % POVPC; **B** – 2.5 mol % POVPC; **C** – 1 mol % POVPC; **D** – 0.5 mol % POVPC; Мащаб=20μm

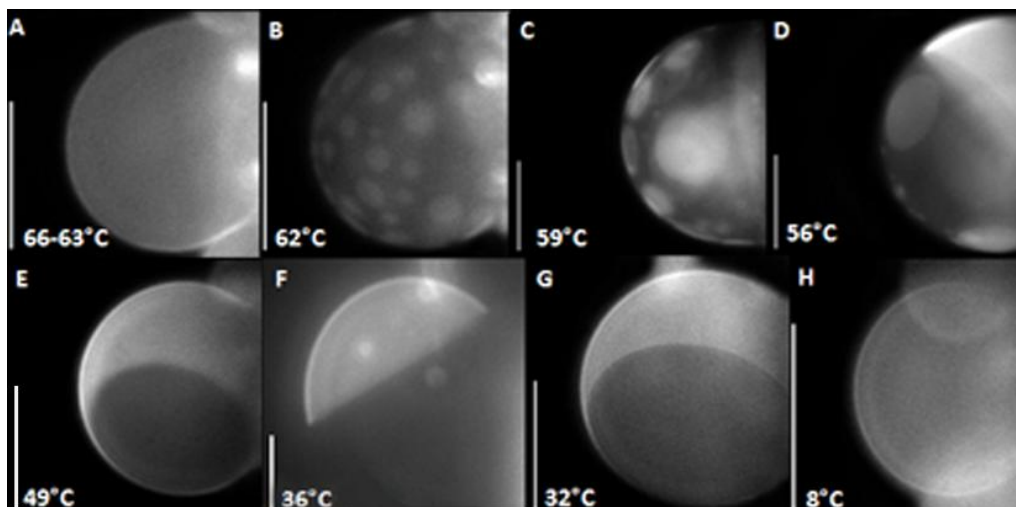
Везикулите са съставени от следните молни съотношения на фосфолипидите: **A** - POPC/POVPC/SM/CHOL 28/5/33/34; **B** - POPC/POVPC/SM/CHOL 30.5/2.5/33/34; **C** - POPC/POVPC/SM/CHOL 32/1/33/34; **D** - POPC/POVPC/SM/CHOL 32.5/0.5/33/34.

Използваният липиден флуоресцентен маркер е Rhodamine-PE*.

Само 0.5 mol % POVPC е достатъчно количество, за да превърне везикулната мембрана от хетерогенна (Ld/Lo фазовото разделяне) в хомогенна.

3. Фазово разделяне на трикомпонентната контролна липидна смес от PDPC/SM/CHOL (33/33/34 mol/mol/mol)

Фиг. 19 показва фазовото разделяне на липидите в контролната смес от PDPC/SM/CHOL (33/33/34 mol/mol/mol).



Фиг. 19. Фазово разделяне на фосфолипидите в GUVs, съставени от **PDPC/SM/CHOL (33/33/34 mol/mol/mol)**. За визуализиране на липидното фазово разделяне е използван флуоресцентният липиден аналог Rhodamine-PE*. GUVs са наблюдавани в температурния интервал 66°-4°C; Мащаб=20µm

A) Наличие на хомогенна мембрана при температури между 66°-63°C

B) Фазово разделяне на фосфолипидите от вида перколация – течно-неподредена в течноподредена фаза (Ld/Lo) при 62°C. Ld-домени се движат в равнината на мембраната и се сливат помежду си

C-D) Нарастване размера на Ld домени чрез сливане в температурната област от 60° до 50°C. Домени запазват кръглата си форма

E-G) При последващо намаляване на температурата, в интервала 49°-32°C, фазовото разделяне се променя и е от типа течноподредена в течноподредена фаза (Lo/Ld)

H) При ниски температури между 8°-4°C се наблюдават хомогенни везикули

Резултатите показват, че везикулите са хомогенни в температурния интервал от 66° до 63°C (фиг. 19 A). При 62°C се наблюдава фазово разделяне от типа перколация, течноподредена в непрекъсната течноподредена фаза (Ld/Lo), като светлите домени се сливат помежду си, движейки се в Lo-фазата (фиг. 19 B). С постепенното намаляване на температурата в температурния интервал от 60° до 50°C (фиг. 19 C и D) се забелязва уголемяване на размера на светлите неподредени Ld-домени чрез тяхното сливане. Фракцията на Ld-фазата обхваща около 1/3 до 1/2 от повърхността на целите везикули. При температури под 50°C (фиг. 19 E-G) се забелязва, че течноподредената Ld-фракция е вече доминантна в повечето везикули, фракцията на Lo-фазата намалява. Така всъщност се наблюдават движещи се течноподредени Lo-

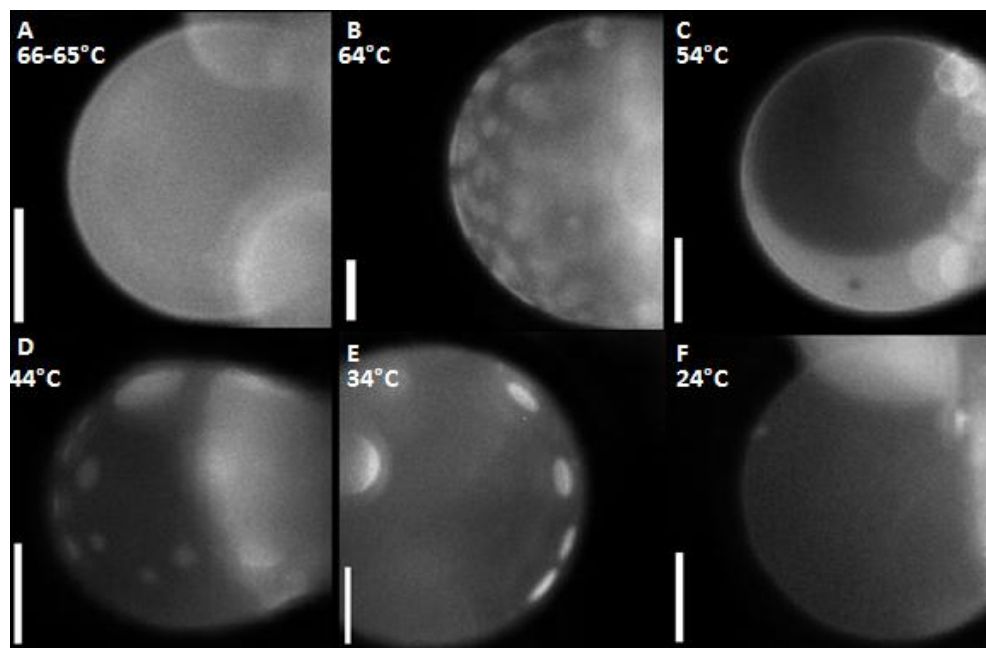
домени в *Ld*-среда, за разлика от наблюдението при температури между 62°-59°C, където се регистрира противоположното движение на *Ld*-домени в непрекъсната *Lo*-среда. При още по-ниски температури 8°-4°C (фиг. 19 Н), всички везикули се превръщат отново в хомогенни, т. е. фазово разделяне на липидите не се наблюдава.

От наблюденията върху резултатите от PDPC-сместа и тези от POPC-сместа беше установено, че температурата на фазов преход на липидите е различна – *Ld/Lo* фазово разделяне се проявява и при двете смеси, но при POPC-сместа - на 32°C, а при PDPC-сместа при 62°C. Освен това *Ld*-домениите при липидната смес с една ненаситена мастна киселина (*POPC*) са по-малки по размер, в сравнение със сместа с шест ненаситени двойни връзки (*PDPC*). С други думи влиянието, което оказва силно ненаситената мастна киселина е повишаване на температурата на фазово разделяне на използваните фосфолипиди.

4. Фазово разделяне на липидна смес от PDPC/SM/CHOL с добавяне на окислен фосфолипид POVPC

Резултатите от фазовото разделение на фосфолипидите във везикули съставени от **PDPC/SM/CHOL** с добавяне на окислен липид **POVPC** са представени на фиг. 20. Везикулите са наблюдавани в температурния интервал от 66° до 24°C. Използваната липидна смес за приготвянето им се състои от **PDPC/POVPC/SM/CHOL (28/5/33/34 mol/ mol/ mol/ mol)**. При 64°C се регистрира формиране на фазово разделяне от типа перколация (фиг. 20 А и В). Светлите *Ld*-участъци бяха подвижни и се сливаха по между си в точно-подредена *Lo*-фаза. При постепенното понижаване на температурата до 54°C (фиг. 20 С) фазовото разделяне на липидите се промени и се наблюдава формиране на големи тъмни точно-подредени *Lo*-домени на светъл фон. В температурната област от 44° до 34°C се забелязва, че фракцията на тъмната подредена фаза става все по-голяма, докато *Ld*-фазата намалява размерите си

(фиг. 20 C, D). В резултат на това под 24°C везикулите показват наличие единствено на течно-подредена фаза (Lo) (фиг. 20 F).



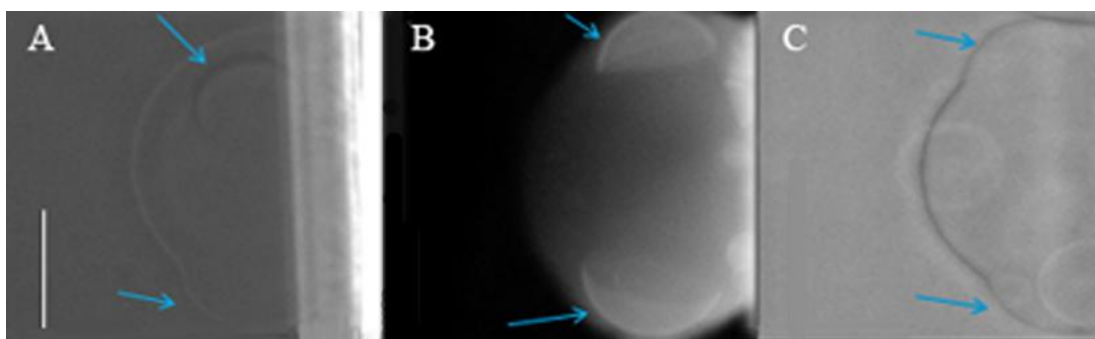
Фиг. 20. Фазово разделяне на фосфолипидите в GUVs, съставени от PDPC/POVPC/SM/CHOL (28/5/33/34 mol/mol/mol/mol). Използваният флуоресцентен липиден маркер е Rhodamine-PE*. GUVs са наблюдавани в температурния интервал 66-24°C. Мащаб=20µm

- А) Хомогенност на везикулите при температури между 66-65°C.
- В) Фазово разделяне от типа перколация (Ld/Lo), течно-неподредена в непрекъсната течно-подредена фаза при температура 64°C
- С) При 54°C фазовото разделяне се променя и е от типа течно-подредена в течно-неподредена фаза (Lo/Ld)
- Д) Фазово разделяне от типа Ld/Lo при 44°C
- Е) При 34°C светлите Ld- домени намаляват броя си
- Ф) Под 24°C светлите Ld- домени изчезват напълно и везикулите се визуализират като тъмна Lo-фаза, която се отличава слабо от общия тъмен фон

Резултатите от въвеждане на POVPC в по-ниски концентрации (0.5, 1, 2.5 mol %) са аналогични на тези, получени при 5 mol % окислен липид и затова не са показани.

При най-високата използвана от нас концентрация на POVPC (5 mol %) се забеляза, че при 36°C голяма част от домени започват да проявяват пъпкуване и впоследствие да се отделят малки везикули от първоначалната

везикула (фиг. 21). На фигурата са показани със стрелки участъците на пъпкуване на Ld-домени от непрекъснатата Lo-фаза. Фиг. 21 А и D изобразяват резултатите от наблюдения с фазово-контрастна микроскопия, а фиг. 21 В - тези в режим на флуоресценция. Изключването на Ld-фазата се осъществява в рамките на 2-3 секунди. По този начин се образуват малки „дъщерни“ везикули в Ld-фаза (видима с флуоресцентна светлина) и голяма „везикула-майка“, намираща се в Lo-фаза (видима на фазов контраст, но не в режим на флуоресценция). В резултат на този процес на пъпкуване и откъсване на Ld домени, майчината везикула намалява площта си.



Фиг. 21. Фазово-контрастна и флуоресцентна микроскопия на GUVs, показващи **пъпкуване** (budding) на домени в Ld-фаза. GUVs са съставени от PDPC/POVPC/SM/CHOL (28/5/33/34 mol/mol/mol/mol). Използван е флуоресцентният липиден маркер Rhodamine-PE*, който се локализира преференциално в Ld-течно неопоредената фаза. Посоченото пъпкуване се наблюдава при 36°C; Мащаб=20μm

А и С) Фазово-контрастна микроскопия

В) Флуоресцентна микроскопия

Важно е да се отбележи, че пъпкуване и откъсване на Ld-домени се наблюдава само при липидна смес от PDPC/SM/CHOL, когато концентрацията на окисления липид е 5 mol %. Това води до заключението, че добавянето на POVPC в концентрация 5 mol % или по-висока, в смес, съдържаща ДНА, предизвиква пъпкуване на домени в мембраната.

ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите, представени в настоящата дисертация, получени посредством различни биологични модели, показват влиянието на оксидативния стрес върху връзката между структурната организация и функционалната активност на мембранните липиди в нативни и моделни мембрани.

Експериментите с 2D и 3D клетъчните култури показват, че различните условия на отглеждане на клетките повлияват в значителна степен техния липиден състав, като най-забележими са промените в количеството на SM (50% повече в 3D клетките). Наблюдаваните промени в сфингомиелин-метаболизиращите ензими са в съответствие с промените в количеството на SM в плазмените мембрани на клетките, култивирани като монослой и матриксна култура. При 2D клетките наблюдаваме повишена активност на pSMase, хидролизираща SM и съответно свързано с това понижено количество на SM в тези клетки. При 3D клетките се отчита повишена активност на SMsynthase, участваща в синтеза на SM и съответно на това повишено количество на SM в техните плазмени мембрани. Неутралната сфингомиелиназа и церамидазата са ензими, свързани предимно с клетъчния отговор в условия на стрес. Повишената активност на тези стрес-свързани ензими в плазмените мембрани на 2D клетките вероятно показва, че при тях съществуват фактори, оказващи стресиращо влияние върху техния растеж и развитие, като например култивирането им върху твърда и „некомфортна” за тях основа.

SM и неговите метаболити имат важна роля в поддържането на клетъчната редокс хомеостаза. Тъй като съдържанието на SM се различава значително в 2D и 3D фибробластите, ние анализирахме неговата роля в чувствителността на плазмено мембранните липиди към оксидативно увреждане в двата типа клетки. Различията в количествата на ROS и GSH в 2D и 3D фибробластите водят до предположението, че условията на култивиране индуцират промени в клетъчния редокс-потенциал и по този начин влияят върху клетъчния

отговор в условия на стрес в обкръжаващата среда. Ние предполагахме, че SM играе роля на антиоксидант срещу липидното окисление и че условията на стрес (включително и външен оксидативен стрес) активират стрес-свързани ензими, като pSMase. Това води до намаление в съдържанието на SM, което от своя страна е съпроводено с повишена чувствителност на мембранните липиди към оксидативни увреждания. Нашите данни подкрепят хипотезата, че високото съдържание на SM в плазмените мембрани в 3D фибробластите има антиоксидантна роля, като предпазва фосфолипидните мастно-киселинни вериги от оксидативна атака.

От изследванията с дву и три-измерните клетъчни култури се установи, че двата главни фосфолипиди в плазмените мембрани (PC и PE) в 3D клетките съдържат по-ненаситени мастни киселини, в сравнение с 2D. Резултатите показаха, че съдържанието на PUFA (20:3 и 20:4) е по-високо в мембраните на 3D клетките. Тъй като ненаситените МК в мембранните фосфолипиди са по-чувствителни към окисление, това може да бъде предпоставка за по-висока степен на липидна пероксидация в „матриксните“ клетки. Въпреки това обаче, по-високо съдържание на липидни пероксиди отчетохме в мембраните на 2D фибробластите, чиито фосфолипидни молекули притежават по-наситени мастно-киселинни вериги. Това показва, че при 3D клетките съществуват определени фактори, които предпазват фосфолипидните мастно-киселинни вериги от оксидативни увреждания.

Използвайки NIH 3T3 фибробласти показахме ролята на външните оксидативни агенти в натрупването на свободни радикали, причиняващи увреждания в клетъчните мембрани, както и антиоксидантната роля на сфингомиелина в липидната пероксидация. При третирането на клетките с H_2O_2 количеството на отделните липидни фракции се намалява в различна степен. Инкубирането на клетките с екзогенна SMase обаче, преди оксидативната атака с H_2O_2 , води до по-забележими промени в количеството на липидните компоненти. Не само концентрацията на SM е намалена в резултат на специфичното действие на SMase, но и количеството на

останалите липидни фракции (с изключение на PI) също се редуцира много повече в условия на оксидативен стрес, в сравнение с неинкубираните със SMase фибробласти, в това число и на другият *raft* компонент - CHOL. Това наблюдение показва, че относителното съдържание на двата *raft*-липиди в плазмените мембрани на използваните NIH 3T3 фибробласти в условия на оксидативен стрес ще бъде по-малко, в сравнение в нетретираните клетки. Това предположение се потвърждава и от резултатите с изолираните липидни фракции от DRMs. Възможно е CHOL (който е по-чувствителен към оксидативни увреждания) да е значително по-оxygen, а това може да бъде причина за разрушаване на липидните микродомени и загуба на *Lo*-подреденото състояние. Друга възможност е също така част от освободените молекули на SM да се отделят от плазмената мембрана на фибробластите поради дисоцииране на микродомените и така останалите фосфолипиди стават по-чувствителни на окисление.

Защитната функция на SM срещу ROS се доказва в опитите с инкубираните NIH 3T3 клетки със SMase. Ензимът причинява силно намаление в концентрацията на мембранно-свързания SM, което е свързано със значително увеличение в количеството на липидни пероксидни продукти (както и при експериментите с 2D и 3D-клетъчни култури). В мембраните на NIH 3T3 клетките с по-ниско количество на *raft*-липиди се установява по-високо количество липидни пероксиди.

Известно е, че инкубирането на клетки с PUFA води до включването им в клетъчните фосфолипиди и неутрални липиди, а наличието на повече PUFA увеличава степента на липидно окисление [Araseki, Biosci Biotechnol Biochem. 2005,69:483 – 490]. Чувствителността към окисление се повишава при увеличаване степента на ненаситеност на МК, поради което се очаква клетки, обогатени с мастни киселини с по-висока степен на ненаситеност, да бъдат по-чувствителни към оксидативни увреждания. Нашите експерименти с контролни и *Ras*-трансформирани фибробласти обаче показаха, че концентрацията на липидни пероксиди е по-висока в двата вида клетки,

инкубирани с LA, която съдържа две двойни връзки, в сравнение с EPA (която е по-ненаситена и съдържа пет двойни връзки). Този резултат се отчита както преди, така и след влиянието на екзогенен оксидативен стрес. Възможно обяснение за този резултат може да бъде предположението, че някои омега-3 МК (като EPA и DHA), които имат „нагъната” конформация (“bent stick”), индуцират специфично структуриране на липидно-водната повърхност, което увеличава стабилността към окисление на тези молекули [Stillwell, W., SJFN, 2006; 50:107 - 113]. Тези данни показват, че определени омега-3 МК могат да предпазват мембранныя бислой от оксидативни увреждания. Възможно е също така, благодарение на високата си чувствителност към оксидативни агенти, някои молекулни видове PUFA да участват в клетъчни механизми, които инициират процеси на апоптоза, а това е от съществено значение за онкоген-експресиращите клетки. Подобни процеси могат да бъдат в основата на терапевтични проучвания за селективно третиране на патологични клетки, въз основа на специфичната им чувствителност към оксидативни увреждания.

За установяване на механизма на действие на природния антиоксидант кверцетин върху мембранните липиди ние използвахме като моделна система чернодробни плазмени мембрани от плъх. Беше установено, че молекулите на CHOL играят роля в устойчивостта на мембранните липиди към оксидативни увреждания в присъствие на кверцетин. Съдържанието на пероксиди в интактните мембрани е значително по-ниско, в сравнение с мембраните с намалено съдържание на CHOL. Това показва ясно, че количеството на CHOL в липидния бислой е от значение и изменението му може да модулира антиоксидантната ефективност на флавоновите природни продукти (като кверцетин) срещу оксидативни увреждания на мембранните липиди. Напълно възможно е този ефект да се дължи на промени в структурната организация на мембраната, поради намалена концентрация на CHOL, което пък от своя страна води до повишаване на флуидитета на бислоя. Такива промени са честа причина за дестабилизация на мембранната

структура, както и за нарушаване на аминокислотната асиметрия. В присъствие на кверцетин появата на PE във външния монослой на бислоя е изразена в по-силна степен в мембрани, които имат редуцирано съдържание на CHOL. Ние предполагахме, че повишеното акумулиране на липидни пероксиди в мембраните с намалено съдържание на CHOL е тясно свързано с процеси на флуидизиране на мембраната, разрушаване на мембранната структурна организация и дестабилизация на липидния бислой. Много вероятно е също така, флавононите молекули да осъществяват взаимодействие с липидните домени *rafts*, богати на холестерол. Следователно, би могло да се предположи, че намаленото количество на холестерола, който е основен липиден компонент в *raft*-домени, прави антиоксидантната защита по-малко ефективна.

Основното заключение от експериментите с моделни мембрани е, че добавянето на окисления липид POVPC към POPC/SM/CHOL и PDPC/SM/CHOL смеси, индуцира различен ефект върху фазовото поведение на тези смеси. POVPC премахва Ld/Lo фазовото разделяне в целия температурен интервал на наблюдение. Би могло да се предположи, че присъствието на POVPC в мембраната дестабилизира малките домени типични за сместа 33/33/34 POPC/SM/CHOL. Присъствието на POVPC в PDPC/SM/CHOL сместа води до уголемяване на *raft* домени, както и до повишаване, само с няколко градуса, температурата на смесваемост на липидите в областта на използваните от нас концентрации. Възможен механизъм за образуването на по-обширни *raft* домени от действието на окислените липиди е, че те вероятно увеличават линейното напрежение на домени в мембраната, което от своя страна води до бързото образуване на големи домени чрез сливане, особено в присъствие на ДНА. Високата стойност на линейното напрежение води и до пъпкуване на Ld-домени. Пъпкуването на мембраната от своя страна има своето физиологично значение при формирането на дъщерни везикули, например - при процесирание на белтъчни молекули в системата транс-Голджи.

ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати бяха направени следните основни изводи:

1. Култивирането на GD25 β 1A фибробласти в три-измерни условия води до увеличаване нивото на основния липиден компонент на raft-домени – сфингомиелин. Понижената активност на сфингомиелин-метаболизиращите стрес-свързани ензими показва, че 3D условията са по-благоприятни за развитието на клетките.

2. Количеството на липидни пероксиди при „матриксните” GD25 β 1A клетки е по-ниско в условия на екзогенен оксидативен стрес в сравнение с фибробластите, отглеждани в конвенционални двуизмерни условия.

3. Увеличеното количество на SM в клетките е свързано с по-ниската им чувствителност към оксидативно увреждане на мембранните липиди. Ние предполагаме, че молекулите на SM функционират като природен мембранен антиоксидант, предпазвайки фосфолипидните мастно-киселинни вериги от оксидативна атака.

4. Въпреки по-високото количество на PUFA във фосфолипидните молекули в мембраните на 3D-клетките се отчита по-ниска стойност на липидни пероксиди.

5. Понижението на количеството на CHOL в чернодробни плазмени мембрани е свързано с повишение в нивата на ROS, нарушение на асиметричното разпределение на мембранните аминофосфолипиди и намаляване на ефективността на природния антиоксидант кверцетин. Ние считаме, че концентрацията на холестерола и интегритета на мембранните raft- домени са тясно свързани с ефективността на флавоноидния антиоксидант кверцетин.

6. Присъствието на окисления фосфолипид, палмитоил-оксовалероил фосфатидилхолин (POVPC) в липидни смеси съдържащи DHA, предизвиква

формирание на по-обширни raft-домени, пъпкуване и отделяне на дъщерни везикули при физиологична температура. Ние предполагаме, че в присъствие на ДНА, окислени липиди от типа на POVPC участват във функционално значими клетъчни процеси, които са свързани с формирането на дъщерни везикули в някои субклетъчни мембранни структури.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации:

1. Stefanova N., Staneva G., Petkova D., Lupanova T., Pankov R., Momchilova A., **Cell culturing in a three-dimensional matrix affects the localization and properties of plasma membrane cholesterol**, Cell Biology International, 2009, 33: p 1079-1086

ИФ – 1.87

2. Lupanova T., Stefanova N., Petkova D., Staneva G., Jordanova A., Koumanov K., Pankov R., Momchilova A., **Alterations in the content and physiological role of sphingomyelin in plasma membranes of cells cultured in three-dimensional matrix**, Molecular and Cellular Biochemistry, 2010, 340: p 215-222

ИФ – 2.17

3. Lupanova T., Markovska T. , Petkova D., Staneva G., Ivanova L., Pankov R., Momchilova A., **Lipid peroxidation in control and ras-transformed fibroblasts after incorporation of polyunsaturated fatty acids**, Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 2010, 63: p 1163-1168

ИФ – 0.204

4. Staneva G., Lupanova, T., Chachaty C., Petkova D., Koumanov K., Pankov R., Momchilova A., **Structural organization of plasma membrane lipids isolated from cells cultured as a monolayer and in tissue-like conditions**, Journal of Colloid and Interface Science, 2011, 359: p 202-209

ИФ – 3.07

5. Lupanova T., Petkova D., Markovska T., Staneva G., Chakarov S., Skrobanska R., Pankov R., Momchilova A., **Effect of Cholesterol modulation on the antioxidant potential of Quercetin in rat liver plasma membranes**, Comptes rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 2012, 65: p 639-644

ИФ – 0.204

Забелязани цитати:

Alterations in the content and physiological role of sphingomyelin in plasma membranes of cells cultured in three-dimensional matrix, Lupanova T., Stefanova N., Petkova D., Staneva G., Jordanova A., Koumanov K., Pankov R., Momchilova A., (2010) Molecular and Cellular Biochemistry, 340 (1-2), pp. 215-222.

Bonnier, F., Knief, P., Lim, B., Meade, A.D., Dorney, J., Bhattacharya, K., Lyng, F.M., Byrne, H.J., ***Imaging live cells grown on a three dimensional collagen matrix using Raman microspectroscopy***, 2010 Analyst 135 (12), pp. 3169-3177

Участия в научни форуми:

1. Международна научна конференция “Стара Загора 2012”.
2. Еразъм студент в Университет в Упсала, Швеция, 04-07м, 2011г.
3. Международна научна конференция “Стара Загора 2011”.
4. Младежка Научна конференция „Климентови дни 2010”, Биологически факултет на СУ „Климент Охридски”.
5. Международна научна конференция „Природни науки”, 2010г., гр. Варна.
6. Международна научна конференция „Природни науки”, 2009г., гр. Варна.

Настоящият дисертационен труд е разработен във връзка с изпълнение на проект финансиран от ФНИ (ДО02-212/08).