

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Райна Иванова Георгиева

**Влияние на докозахексаеновата киселина и фосфолипаза A_2 върху
процесите на мембранно преструктуриране**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за придобиване на научна и образователна степен „Доктор”

Научна специалност: 4.3. Биологически науки

(шифър: 01.06.08 “Биофизика”)

Научен ръководител: доц. д-р Галя Станева

Научен консултант: проф. дбн Албена Момчилова

София, 2014 г.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

Райна Иванова Георгиева

**Влияние на докозахексаеновата киселина и фосфолипаза A_2 върху
процесите на мембранно преструктуриране**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за придобиване на научна и образователна степен „Доктор”

Научна специалност: 4.3. Биологически науки

(шифър: 01.06.08 “Биофизика”)

Научен ръководител: доц. д-р Галя Станева

Научен консултант: проф. дбн Албена Момчилова

Рецензенти:

доц. д-р Биляна Николова-Лефтерова

доц. д-р Виктория Виткова

София, 2014 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен научен семинар на секция „Липид-белтъчни взаимодействия в биологичните мембрани” на ИБФБМИ-БАН, проведен на 16.12.2013г.

Дисертационният труд съдържа 135 страници, включващи текст, 37 фигури, 7 таблици и са цитирани 210 литературни източници. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 4 научни публикации. Забелязани са 2 независими цитирания.

Защитата на дисертацията ще се състои на2014г. от часа в Заседателната зала на бл. 21, ул. „Акад. Г. Бончев”, София. Материалите, свързани със защитата, са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ-БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 105, София.

Съдържание

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	1
I. УВОД.....	2
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	5
III. МЕТОДИ.....	7
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	8
1 Влияние на степента на ненаситеност на липидните мастнокиселинни вериги върху морфологията и свойствата на домените от вида <i>rafts</i>	8
1.1 Ефект на аминокиселинола сфингозин върху физико-химичните характеристики на <i>rafts</i>	8
1.2 Сравнение между свойствата на <i>rafts</i> в присъствието на мононенаситени и полиненаситени фосфатидилхолинови видове.....	11
2 Влияние на антиоксиданта <i>n</i> -пропил галат (<i>n</i> PG) върху латералното фазово разделяне на липидите в липидни смеси, съдържащи фосфатидилхолини с различна степен на ненаситеност при <i>sn</i> -2.	15
2.1 Изследване посредством флуоресцентна микроскопия.....	15
2.2 Изследване посредством диференциална сканираща калориметрия.	17
3 Анализ на активността на ензима фосфолипаза A ₂ (phospholipase A ₂ – PLA ₂) – количествен анализ чрез газова хроматография и микроскопски наблюдения.	20
3.1 Количествено определяне на активността на PLA ₂	20
3.2 Визуализиране на действието на PLA ₂ чрез фазовоконтрастна и флуоресцентна микроскопия.	22
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	30
VI. ИЗВОДИ.....	34
VII. ПРИНОСИ.....	36
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ.....	38
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ.....	40
ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ.....	41

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На английски език:

AFM (atomic force microscopy) - атомносилова микроскопия

CHOL (cholesterol) – холестерол

DHA (docosahexaenoic fatty acid) - докозахексаенова киселина

DSC (differential scanning calorimetry) - диференциална сканираща калориметрия

EPR (electron paramagnetic resonance) – електронен парамагнитен резонанс

GUVs (giant unilamellar vesicles) - гигантски униламеларни везикули

L_β - гел фаза

L_d (liquid disordered) - течна неподредена фаза

L_o (liquid ordered) - течна подредена фаза

LPC (lysophosphatidylcholine) – лизофосфатидилхолин

MLVs (multilamellar vesicles) - мултиламеларни везикули

nPG (n-propyl gallate) – n-пропил галат

PC (phosphatidylcholine) - фосфатидилхолин

PE (phosphatidylethanolamine) – фосфатидилетаноламин

PDPC (palmitoyl-docosahexaenoyl phosphatidylcholine) – палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолин

PLA₂ (phospholipase A₂) – фосфолипаза A₂

POPC (palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine) – палмитоил-олеоил фосфатидилхолин

PS (phosphatidylserine) – фосфатидилсерин

PUFAs (polyunsaturated fatty acids) – полиненаситени мастни киселини

Rhod-PE (rhodamine phosphatidylethanolamine) – родамин фосфатидилетаноламин

SM (sphingomyelin) - сфингомиелин

SPH (sphingosine) - сфингозин

T_m (melting temperature) - температура на топене, температура на фазов преход

На български език:

ЦНС – централна нервна система

I. УВОД

Съвременната представа за клетъчната мембрана представлява динамичен липиден бислой, хетерогенен в латерално и трансверзално направление, в който са разположени различните видове мембранни протеини [1]. По отношение на латералната хетерогенност на мембраните, значителен интерес представляват един вид микродомени, известни в научната литература под наименованието *rafts*. Това са домени, обогатени на сфинголипиди (главно сфингомиелин), холестерол и специфични протеини [2]. Тези домени са обект на много изследвания през последните години, тъй като се появяват доказателства, че участват при много мембранносвързани процеси като клетъчна сигнализация [3], мембранен транспорт [4], при трансформацията на протеини [5, 6], както и редица други физиологични и патологични процеси. Формирането на *rafts* е присъщо свойство на сфингомиелина и холестерола. Следователно една смес от три липида - ненаситен вид (като яйчния фосфатидилхолин), наситен (като сфингомиелина) и холестерол имитира съвместното съществуване на две течни фази, а именно, течна подредена (*liquid ordered* - L_o) и течна не подредена (*liquid disordered* - L_d). Липидите в *rafts* притежават свойствата, характерни за L_o фаза. Формирането на домени в L_o фаза в моделните мембрани на гигантски униламеларни везикули (*giant unilamellar vesicles-GUVs*) имитира клетъчните *rafts* [7].

Положително зареденият аминокиселинен сфингозин (SPH) е включен в серията от изследвания на свойствата на *rafts* поради изброените по-долу аргументи. Той е най-често срещаната дълговерижна сфингоидна база в структурата на сфинголипидите [8]. SPH притежава една мононенаситена въглеродородна верига и има малка полярна глава (единична -ОН група). Молекулата му е положително заредена при физиологични стойности на рН. Сфинголипидите церамид, сфингозин и сфингозин-1-фосфат изпълняват важна роля при регулацията на процесите клетъчна пролиферация, оцеляване на клетките и апоптоза [9].

Освен *rafts*, обект на настоящето изследване, е също ензимът фосфолипаза A_2 (*phospholipase A₂* - PLA₂). Фосфолипаза A_2 представлява семейство от ензими, които хидролизират естерната връзка при позиция *sn*-2 в мембранните глицерофосфолипиди

като в резултат се образуват свободна мастна киселина и лизофосфолипид. За тези ензими е известно, че участват при различни клетъчни процеси, включително вътреклетъчен мембранен транспорт [10], пролиферация [11], апоптоза [12] и др. Не е случаен фактът, че всички основни групи PLA₂ са открити в астроцитите на централната нервна система (ЦНС), което несъмнено свързва тези ензими с функционирането на мозъка [13]. Установено е също така, че нарушената функция на PLA₂ в централната нервна система може да окаже негативно влияние върху паметта, което се наблюдава при патогенезата на невродегенеративните заболявания [14]. В подобни случаи ензимът има провъзпалително действие – прекомерното му активиране води до повишено отделяне на арахидонова киселина от *sn*-2 на мембранните глицерофосфолипиди. Тази мастна киселина в последствие се метаболизира до ейкозаноиди, а те от своя страна участват при възпалителните процеси [15]. Високата биологичната значимост на тези ензими налага да бъдат разкрити механизмите, посредством които те изпълняват своята роля в живите клетки.

Интерес за настоящето изследване представлява и докозахексаеновата киселина (*docosahexaenoic acid* - DHA). Ключът към разкриването на биологичното значение на DHA е вероятно уникалната структура на нейната молекула. Тя е полиненаситена мастна киселина (*polyunsaturated fatty acid* - PUFA), принадлежаща към семейството на омега-3. Има налични данни в литературата, показващи, че забележителната подвижност на веригите на DHA създава мембранна среда, която е доста тънка и течна [16], а също и много еластична [17].

За DHA е установено, че повлиява мембранната организация, особено на *raft*-домените, а по този начин и клетъчната сигнализация [18], по всяка вероятност и други мембранносвързани процеси. Тя има терапевтична стойност при лечението на невродегенеративните заболявания - например деменция [19], болест на Алцхаймер [20]. Приетите с храната ω -3 противомедуват на възпалителните ефекти на производните на арахидоновата киселина ейкозаноидите [21].

В литературата няма налични данни относно влиянието на силно неподредената мембранна среда, която създава DHA, върху активността на PLA₂. Но информацията, касаеща действието на PLA₂ върху биологичните мембрани, разкрива взаимната

зависимост между ензима и неговия липиден субстрат [22]. Важното биологично значение на *rafts*, PLA₂ и DHA, заедно с предполагаемата им взаимна връзка, мотивират нашето научно изследване.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е:

Да се изследва влиянието на аминоклкохола сфингозин и докозахексаеновата мастна киселина при sn-2 позиция в молекулата на фосфатидилхолин върху формирането на домени от типа rafts и действието на PLA₂ върху хетерогенни L_o/L_d моделни мембрани.

За осъществяването на тази цел са формулирани следните задачи:

1. Да бъде изследван ефекта на аминоклкохола сфингозин върху формирането на домени от вида rafts.

2. Посредством флуоресцентна микроскопия да бъде визуализирано L_o/L_d фазовото разделяне и да се определи температурата на смесваемост на двете течни фази в трикомпонентни липидни смеси PC/SM/CHOL в зависимост от :

- степента на ненаситеност при sn-2 на фосфатидилхолин (PC) - сравнителен анализ между олеиновата и докозахексаеновата киселина;
- температурата;
- присъствието на антиоксиданта n-пропил галат (nPG).

3. Изследване ефекта на антиоксиданта nPG върху липидни смеси, съдържащи докозахексаенова или олеинова мастна киселина, чрез диференциална сканираща калориметрия.

4. Определяне активността и действието на PLA₂ върху везикули съставени от:

- палмитоил-олеоил фосфатидилхолин (POPC);

- палмитоил-докозаhexaеноил фосфатидилхолин (PDPC);
- бинарни смеси (POPC/SM и PDPC/SM, POPC/CHOL и PDPC/CHOL);
- трикомпонентни смеси (POPC/SM/CHOL и PDPC/SM/CHOL);

5. Определяне еластичните свойства на монослойни и бислойни моделни мембранни системи, съдържащи олеинова или докозаhexaенова киселина, в присъствие и отсъствие на лизофосфатидилхолин.

III. МЕТОДИ

При изработването на дисертацията са използвани следните методи:

- 1) електроформиране на GUVs;
- 2) визуализиране на GUVs чрез оптична микроскопия – фазов контраст и флуоресценция;
- 3) микроинжектиране на PLA₂ - експерименти с GUVs;
- 4) формиране на мутиламеларни везикули;
- 5) определяне активността на PLA₂;
- 6) тънкослойна хроматография;
- 7) газова хроматография;

Данни, получени благодарение на сътрудничества в рамките на ИБФБМИ-БАН и с други институции:

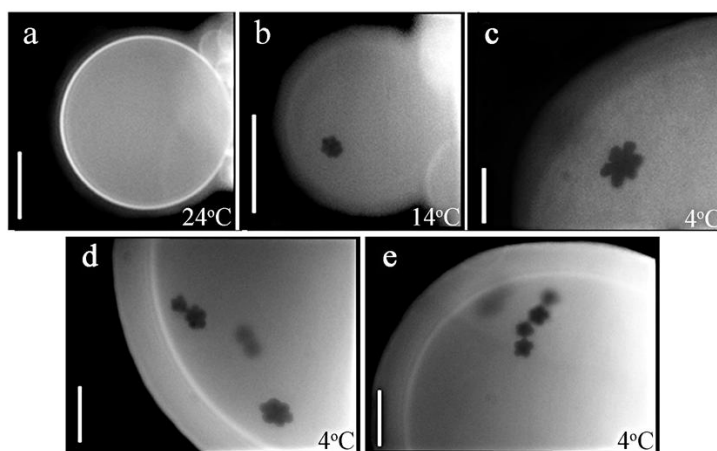
- 1) диференциална сканираща калориметрия (*differential scanning calorimetry - DSC*)
(секция «Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия» към, ИБФБМИ-БАН);
- 2) анализ на термичните флуктуации на мембрания бислой на гигантски везикули
(Институт по физика на твърдото тяло-БАН);
- 3) атомно-силова микроскопия (*atomic force microscopy – AFM*)
(Химически факултет на СУ “Св. Климент Охридски”);
- 4) метод на Langmuir
(Химически факултет на СУ “Св. Климент Охридски”);
- 5) електронен парамагнитен резонанс (*electron paramagnetic resonance -EPR*)
(CNRS, France)

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1 Влияние на степента на ненаситеност на липидните мастнокиселинни вериги върху морфологията и свойствата на домените от вида *rafts*.

1.1 Ефект на аминокиселинния алкохол сфингозин върху физико-химичните характеристики на *rafts*.

В глицерофосфолипиден матрикс, в случая от яйчен фосфатидилхолин, SPH формира гел (L_β) домени с листовидна форма (Фиг. 1). Известно е, че при флуоресцентно-микроскопските експерименти, липидният маркер родамин фосфатидилетаноламин (Rhod-PE) се разпределя предпочитателно в течната не подредена фаза, която съответно наблюдаваме като светеща. Неговата молекула се изключва от по-подредената гел фаза и нея наблюдаваме под формата на тъмни домени [23].



Фигура 1. Наблюдение посредством флуоресцентна микроскопия на фазово разделяне L_β/L_α в микронната област. Двухкомпонентната смес 80/20 PC/SPH mol/mol формира хомогенни везикули в температурния интервал 37 - 15 °C (a). Формирането на тъмни гел домени протича при 14 °C (b).

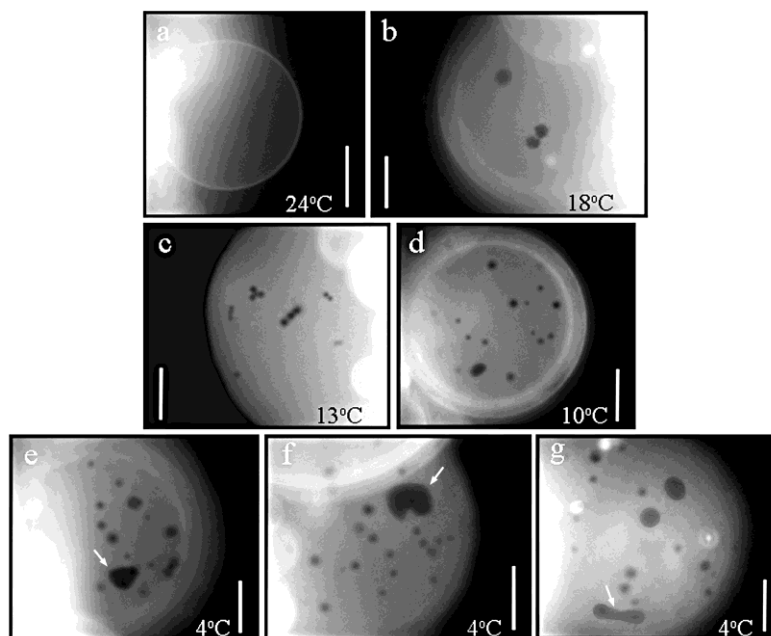
Домени с ясно обособена листовидна форма при 4 °C (c). Образуване на клъстери от два (d) и съответно четири (e) домена при 4 °C. Мащабът е 20 μm .

Тъмните листовидни домени на сфингозина съществуват в L_{β} фаза и са обкръжени от L_d фаза. За тяхното фазово състояние съдим по формата им, както и от факта, че при контакт помежду си те не се сливат, а формират клъстери. При наличието на две течни фази в мембраната, фазата с по-малка фракция формира домени с кръгла форма, тъй като това е най-изгодната от термодинамична гледна точка форма за нея.

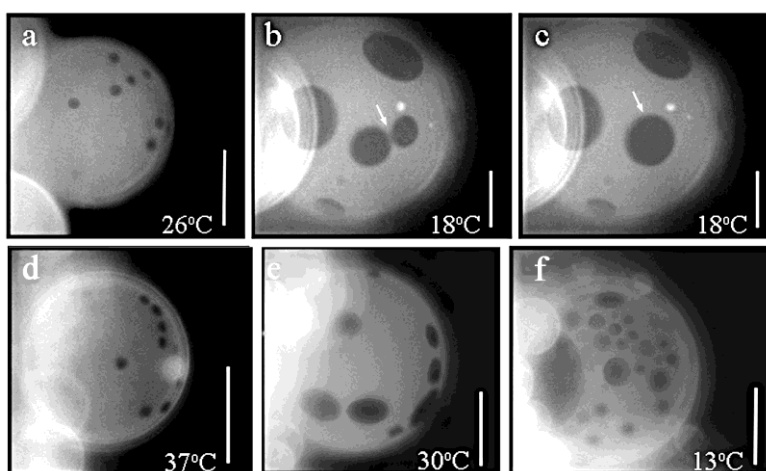
Добавянето на CHOL към смесите PC/SPH понижава температурата на формиране на гел домените - с около 4°C при всяко повишаване на съдържанието на CHOL с 10 mol% (данните не са представени).

При допълнителното усложняване на моделната система посредством добавяне на SM към трикомпонентната смес PC/SPH/CHOL, вече е налице конкуриране между SPH и CHOL за взаимодействието с SM. Конкуренцията между SPH и CHOL за взаимодействието със SM се наблюдава в случая, когато количеството на $\text{SM} < \text{SPH}$ (Фиг. 2). Свойствата на L_o фазата са доминиращи, когато количеството на $\text{SM} \geq \text{SPH}$ (Фиг. 3). В първия случай се наблюдава формиране на тъмни гелоподобни домени при температура по-висока от контролната смес без SM. Очевидно присъствието на SM води до намалена смесваемост на SPH в липидния матрикс. Предполага се, че SM и SPH сегрегират и формират гел фаза, с температура на топене по-висока от тази на чистия SM или SPH. Подобен ефект, но по-силно изразен, е демонстриран в присъствието на церамид от нашата научна група [24]. Във втория случай, когато $\text{SM} \geq \text{SPH}$, се наблюдава формирането на идеално кръгли домени в L_o фаза, които нарастват по размер чрез сливане, при температури по-високи от контролната смес без SPH.

Представените резултати показват, че SPH стимулира формирането на домени от вида *rafts*. Той увеличава фракцията и температурата на формиране на L_o фазата, но не е ясно дали като хомогенен компонент на тази фаза, подобно на SM, или под формата на гел домени в рамките на L_o . SPH и CHOL не могат да формират L_o домени по подобие на SM и CHOL.



Фигура 2. Наблюдение на фазовото разделяне в четирик компонентната смес 50/20/10/20 PC/SPH/SM/CHOL mol/mol/mol/mol. Везикулите са хомогенни в температурния интервал 37-19 °C (a). Образуване на L_{β} домени при 18 °C (b). Клъстери от два или три L_{β} домена (c). Образуване на L_o домени при 10 °C (d) и увеличаване на техния размер посредством сливане (e–f). Машабът е 20 μ m.



Фигура 3. L_o/L_d фазово разделяне в четирик компонентната смес 40/20/20/20 PC/SPH/SM/CHOL mol/mol/mol/mol (a–c). Формиране на L_o домени при 26 °C (a). Домени преди (b) и след сливане (c). L_o/L_d фазово разделяне при 30/20/30/20 PC/SPH/SM/CHOL mol/mol/mol/mol (d–f). Формиране на L_o домени при физиологична температура (d). Нарастване на броя и размера на домовете с понижаване на температурата (e и f). Машабът е 20 μ m.

Комбинираният ефект на SPH и SM (при определено молно съотношение) като сфинголипиди при формирането на *rafts* е по-слабо изразен в сравнение със същото количество само SM. Тези резултати подкрепят хипотезата, че SPH повлиява липидната организация в мембраните. По този начин, той би могъл косвено да упражнява своята биологична роля, а не само посредством директното му взаимодействие със сигнални протеини.

1.2 Сравнение между свойствата на *rafts* в присъствието на мононенаситени и полиненаситени фосфатидилхолинови видове.

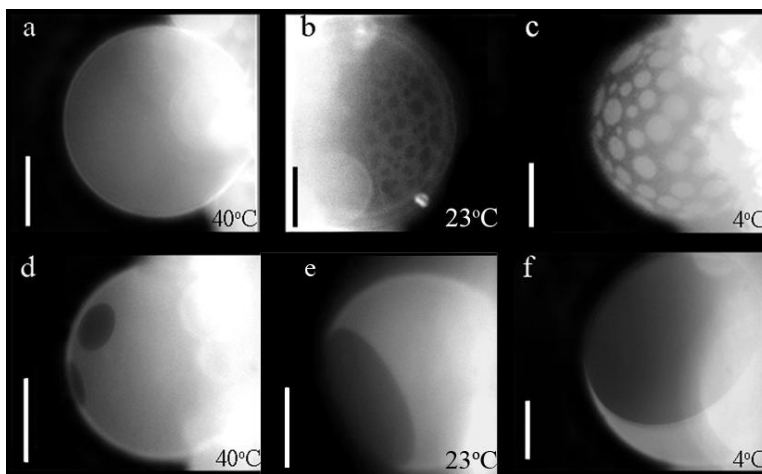
1.2.1 Изследване посредством флуоресцентна микроскопия.

Посредством флуоресцентна микроскопия са изследвани следните трикомпонентни липидни смеси: 50/25/25, 34/33/33, 40/40/20 POPC/SM/CHOL и PDPC/SM/CHOL mol/mol/mol. Разликата между тях е в основния липид. Палмитоил-олеоил фосфатидилхолина (POPC) съдържа една двойна връзка в олеиновата киселина при *sn*-2, докато докозахексаеновата киселина при същата позиция в палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолина (PDPC) съдържа шест двойни връзки. Определените температури на фазово разделяне в микронната област са представени в Табл. 1.

Трикомпонентни липидни смеси	Молни съотношения	T _m
POPC/SM/CHOL	40/40/20	(32.5 ± 3.5)°C
	34/33/33	(30.3 ± 2.6)°C
	50/25/25	(23.4 ± 2.4)°C
PDPC/SM/CHOL	40/40/20	(62.4 ± 2.3)°C
	34/33/33	(60.2 ± 1.9)°C
	50/25/25	(49.8 ± 2.0)°C

Таблица 1. Определяне на T_m на трикомпонентните смеси PC/SM/CHOL посредством флуоресцентна микроскопия.

Фазовото разделяне в трикомпонентните смеси 50/25/25 POPC(PDPC)/SM/CHOL mol/mol/mol е проследено в температурния диапазон от 65°C до 4°C и представено на Фиг. 4.



Фигура 4. Везикулите, съставени от трикомпонентните смеси 50/25/25 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol (a-c) и 50/25/25 PDPC/SM/CHOL mol/mol/mol (d-f) са наблюдавани в температурния интервал 65°C - 4°C. Везикулите от POPC/SM/CHOL са хомогенни от 65°C до 24°C (a). Появата на L_o домени протича при 23.4°C (b). Фазова перколация се наблюдава при смесите с POPC от 13°C до 4°C (c). При PDPC/SM/CHOL везикулите L_o/L_d фазовото разделяне се наблюдава от 49.8°C до 4°C (d-f). При 4°C L_o фазата заема от 1/2 до 2/3 от повърхността на мембраната (f). Машабът е 20µm.

Везикулите, съставени от трикомпонентната POPC-съдържаща смес, са хомогенни от 65°C до $(23.4 \pm 2.4)^\circ\text{C}$ (Табл.1, Фиг. 4, a). При $\sim 23.4^\circ\text{C}$ се появяват малки тъмни домени, разположени в светла фаза, които започват да нарастват постепенно чрез сливане (Фиг. 4, b). Тези тъмни домени се характеризират с идеално кръгла форма, което свидетелства за съвместното съществуване на две течни фази в рамките на мембраната - L_d и L_o . При 13-4°C (Фиг. 4, c) настъпва обръщане на фазите (фазова перколация) - много светещи L_d домени на фона на тъмна L_o фаза.

При трикомпонентната смес 50/25/25 PDPC/SM/CHOL (Табл. 1, Фиг. 4, d-f). температурата на фазово разделяне е $(49.8 \pm 2.0)^\circ\text{C}$, по-висока стойност в сравнение с POPC. С понижаване на температурата, тъмните L_o домени се сливат един с друг. При

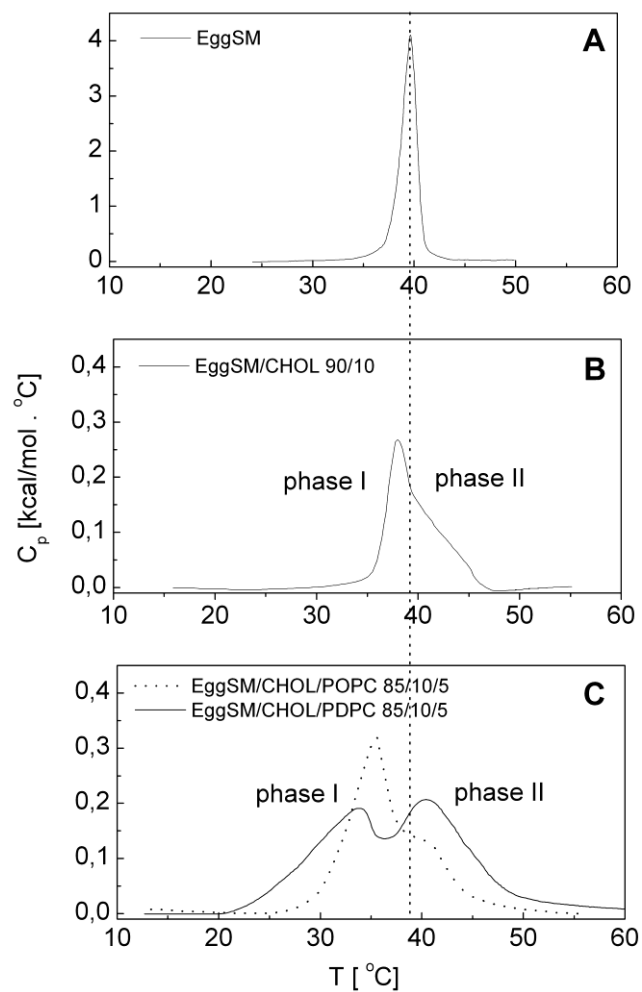
най-ниските изследвани температурни стойности (4°C), в PDPC смесите се наблюдава един голям L_o домен, заемащ 1/2 до 2/3 от повърхността на мембраната (Фиг. 4, f) за разлика от POPC/SM/CHOL, където е наблюдавана фазова перколация (Фиг. 4, c).

При повишаване на съдържанието на SM и CHOL (40/40/20 и 34/33/33 PC/SM/CHOL mol/mol/mol) нараства температурата на прехода и за двата типа PC-съдържащи смеси. В PDPC-смесите, L_o/L_d фазовото разделяне протича при двукратно по-високи температури в сравнение с POPC/SM/CHOL (Табл. 1). Наличието на DHA при *sn*-2 на фосфатидилхолин също води до формирането на L_o домени при физиологична температура за разлика от олеиновата киселина.

1.2.2 Изследване посредством диференциална сканираща калориметрия.

В изследваните трикомпонентни смеси, 85/10/5 SM/CHOL/POPC и SM/CHOL/PDPC, яйчният сфингомиелин има най-високата температура на топене ($T_m = 39.7^\circ\text{C}$). При тази температура протича високо кооперативен фазов преход (Фиг. 5, A). Фазовите преходи на POPC и PDPC са регистрирани при около - 3°C [25].

Добавянето на CHOL към SM при двукомпонентната смес понижава кооперативността на фазовия преход и измества главния преход на SM към по ниски температури (Фиг. 5, B). Освен това регистрираният преход може да бъде разделен на две ясно разграничими компоненти – по-бедна на CHOL фаза I и по-обогатена на CHOL фаза II. Присъствието на PDPC води до формирането на фаза II с по-високи T_m и ΔH и по-ниска степен на кооперативност в сравнение с мононенаситения вид POPC (Фиг. 5, C). Ефектът на POPC изглежда по-силно изразен при фаза I отколкото при фаза II при съпоставка с контролната смес SM/CHOL. POPC проявява тенденцията да взаимодейства с фаза I (бедната на CHOL фаза). PDPC повлиява и двете компоненти, което означава, че присъствието му променя до голяма степен липидното разпределение между двете фази.



Фигура 5. DSC профили на MLVs, получени от SM (A) и 90/10 SM/CHOL mol/mol (B). Сравнителен анализ на трикомпонентните смеси 85/10/5 SM/CHOL/POPC mol/mol/mol и SM/CHOL/PDPC (C).

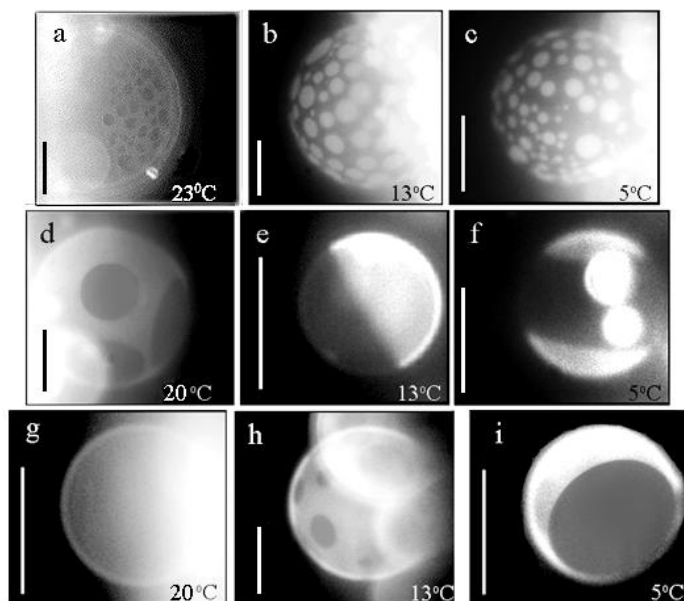
Скоростта на сканиране е $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ в температурния интервал $12\text{--}55^{\circ}\text{C}$.

2 Влияние на антиоксиданта *n*-пропил галат (*n*PG) върху латералното фазово разделяне на липидите в липидни смеси, съдържащи фосфатидилхолини с различна степен на ненаситеност при *sn*-2.

2.1 Изследване посредством флуоресцентна микроскопия.

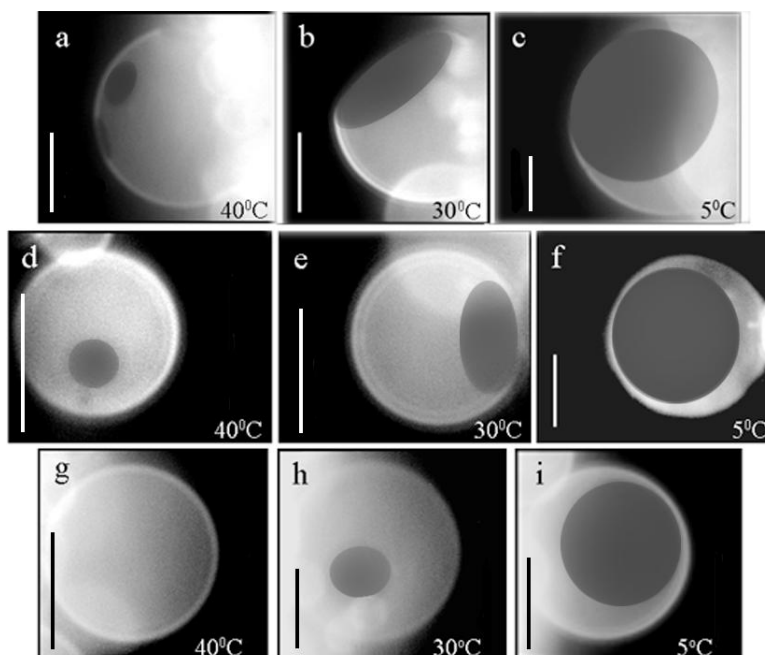
Установено е, че полиненаситените мастни киселини са по-податливи на окисление от мононенаситените видове [26]. В литературата също има данни, че тяхното окисление би могло да предизвика формирането на домени по време на флуоресцентномикроскопските наблюдения [27]. Използването на антиоксиданта *n*-пропил галат предотвратява възникването на подобни артефакти [28].

При настоящата експериментална серия е изследван с помощта на флуоресцентна микроскопия фотозащитният ефект на *n*PG върху фазовото поведение на трикомпонентните смеси 50/25/25 PC/SM/CHOL mol/mol/mol. Използвани са следните концентрации на антиоксиданта: 0.5, 1, 2, 3, 4 и 5 mM. За двата типа смеси, с POPC и PDPC, добавеният към буфера *n*PG предизвиква постепенно намаляване на T_m , когато концентрацията му е над 1 mM. *n*PG с концентрация до 1 mM не повлиява съществено T_m . При концентрация от 1 mM *n*PG се изменя фазовата морфология на везикулите, получени от POPC/SM/CHOL (Фиг. 6, d-f). Наблюдава се увеличаване на фракцията на тъмната L_o фаза и не настъпва перколация дори при ниските температури за разлика от контролната смес (Фиг. 6, a-c спрямо d-f).



Фигура 6. L_0/L_d фазово разделяне в GUVs, съставени от 50/25/25 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol - без *n*PG (a-c), и в присъствието на 1 mM (d-f) и 4 mM (g- i) *n*PG. Флуоресцентният маркер Rhod-PE е използван за визуализиране на фазовото разделяне в концентрация 1 mol %. Машабът е 20 μ m.

Подобна промяна във фазовата морфология не се открива при трикомпонентната смес с PDPC (Фиг. 7, a-f). В присъствието на 1 mM *n*PG, L_0 домените в PDPC-съдържащата смес се сливат и заемат около 1/2 от повърхността на везикулите при ниските температурни стойности (Фиг. 7, f).



Фигура 7. L_o/L_d фазово разделяне в GUVs, съставени от 50/25/25 PDPC/SM/CHOL mol/mol/mol - без nPG (a-c), и в присъствието на 1 mM (d-f) и 4 mM (g- i) nPG . Флуоресцентният маркер Rhod-PE е 1 mol %. Мащабът е 20 μ m.

nPG повлиява разпределението на везикулите по размер (*данните са представени в дисертацията*). Когато повишим концентрацията на nPG , размерът на везикулите намалява и в двата типа смеси. Този ефект е по-силно изразен при POPC/SM/CHOL.

В заключение, антиоксидантът nPG понижава температурата на фазовия преход L_o/L_d при двата вида трикомпонентни смеси, в зависимост от неговата концентрация. Този ефект е по-силно изразен в присъствието на PDPC.

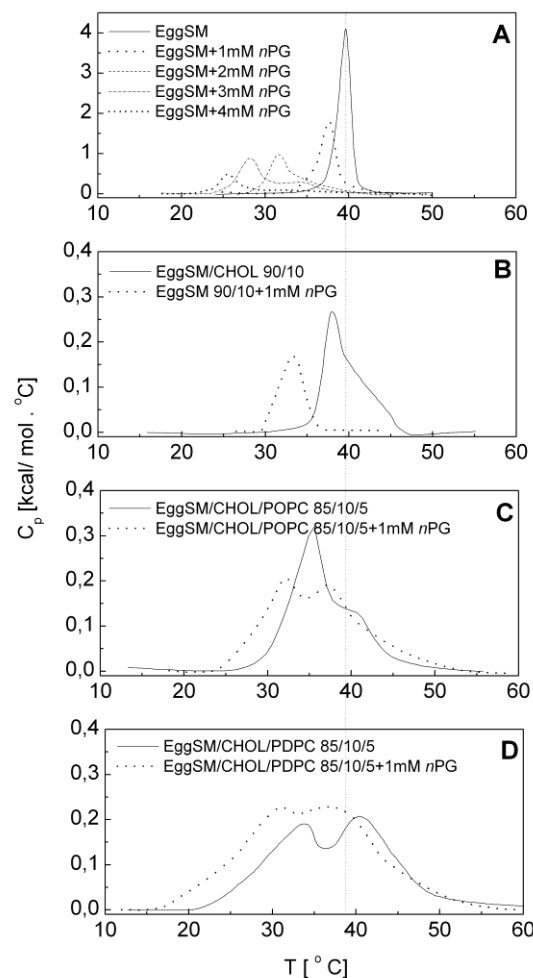
2.2 Изследване посредством диференциална сканираща калориметрия.

nPG е използван като фотопротектор при флуоресцентномикроскопските наблюдения, за да бъде изследван ефектът на ДНА в молекулата на фосфатидилхолин върху T_m на съответните липидни смеси. Тези експерименти, обаче, не са в състояние да разграничат антиоксидантните свойства на nPG от неговия ефект в качеството му на допълнителен компонент в мембраната, повлияващ фазовото поведение на липидите. За да

бъде по-добре изяснен механизмът на действие на *n*PG, са осъществени и експерименти посредством DSC. По този начин можем да изясним влиянието на *n*PG върху термотропното поведение на основните липиди и техните смеси (PC/SM/CHOL). Повишаването на концентрацията на *n*PG (от 1 до 5 mM) в буферната фаза на суспензия от мултиламеларни везикули от яйчен SM, предизвиква постепенно понижение на T_m , намаляват също енталпията и кооперативността на прехода (Фиг. 8, А). Тези резултати показват, че *n*PG е в състояние да флуидизира мембраните от SM и да инхибира напълно прехода на SM, като последният ефект се наблюдава при 5 mM *n*PG.

В присъствието на CHOL, описаният флуидизиращ ефект на *n*PG е по-силно изразен спрямо чистия сфингомиелин (Фиг. 8, В). В трикомпонентните смеси от SM/CHOL/PC, в които е налице L_o/L_d фазово разделяне, *n*PG повлиява в по-голяма степен полиненаситената (PDPC) смес в сравнение с мононенаситената (POPC) - Фиг. 8, D и C.

Следователно, *n*PG действа не само като антиоксидант, а също оказва влияние върху фазовото поведение на даден липиден вид/липидна смес. При изследваните смеси SM/CHOL/PC, ефектът на *n*PG значително се повлиява от броя на двойните връзки в молекулата на фосфатидилхолин.



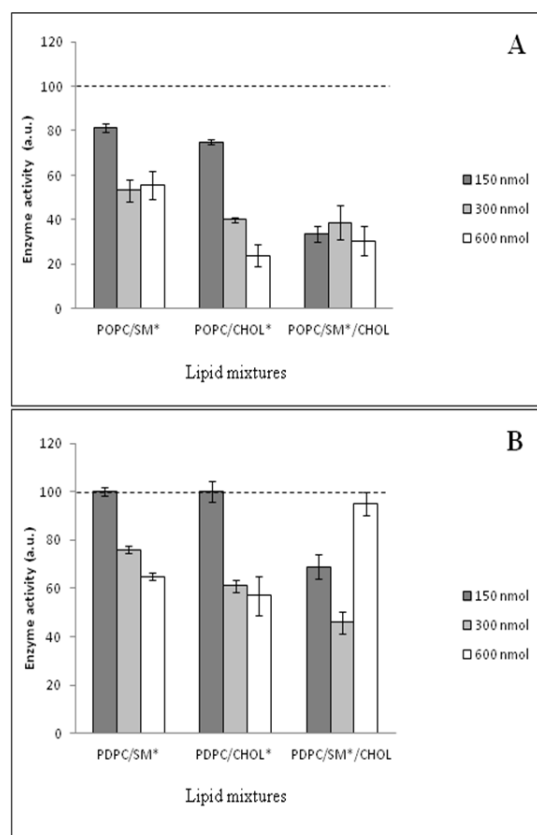
Фигура 8. DSC термограми на суспензии от MLVs, получени от яйчен SM, в зависимост от концентрацията на *n*PG (от 1 до 5 mM) (A); везикули от двукомпонентната смес 90/10 SM/CHOL mol/mol, при 1 mM *n*PG и без антиоксидант (B); трикомпонентната смес 85/10/5 SM/CHOL/POPC mol/mol/mol, при 1 mM и без *n*PG (C); трикомпонентната смес 85/10/5 SM/CHOL/PDPC mol/mol/mol, отново при 1 mM и без *n*PG (D). Скоростта на сканиране е 1°C/min в температурния интервал 12-55°C. Прекъснатите линии на графиките представят данните за липидните смеси в присъствието на *n*PG.

3 Анализ на активността на ензима фосфолипаза A₂ (phospholipase A₂ – PLA₂) – количествен анализ чрез газова хроматография и микроскопски наблюдения.

3.1 Количествено определяне на активността на PLA₂.

Анализът на активността на PLA₂ е проведен върху следните серии от мултиламеларни везикули (MLVs): субстратни везикули, приготвени от двата фосфатидилхолинови вида (POPC и PDPC); везикули от двукомпонентните смеси PC/SM, PC/CHOL както и от трикомпонентните смеси PC/SM/CHOL. Количеството на SM варира в PC/SM и PC/SM/CHOL: 150, 300 и 600 nmol. Концентрацията на POPC и PDPC е 600 nmol при всички експерименти, а тази на CHOL е 300 nmol в трикомпонентните смеси. При серията PC/CHOL съдържанието на CHOL варира отново на: 150, 300 и 600 nmol.

Първоначално е направена съпоставка между активностите на PLA₂ върху субстратни везикули, формирани от POPC и PDPC. Ензимната активност е по-висока за PDPC. Свободните мастни киселини, отделени под действие на PLA₂, са 52 % (съответстващо на специфична ензимна активност 4.84 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$), докато при везикулите от POPC количеството им е 32 % (3.02 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$). При всяка следваща серия винаги са изследвани и двата вида PC като тяхната хидролиза от PLA₂ е приета за 100%. Ензимната активност в двукомпонентните и трикомпонентните смеси е определена спрямо приетата за 100% хидролиза на чистите PC видове. Тази процедура е необходима, за да бъдат избегнати възможните артефакти при измерванията, дължащи се на инактивирането на ензима и/или стареенето на липидните разтвори. Добавянето на SM или CHOL, както и на двата липида заедно, води до понижение на ензимната активност като този ефект е по-силно изразен при смесите на POPC (Фиг. 9, А) в сравнение с тези на PDPC (Фиг. 9, В).



Фигура 9. Активност на PLA_2 на липидни смеси спрямо субстратните везикули, формирани от POPC (панел А) и PDPC (панел В). Ензимната активност върху субстратните везикули, съставени от всеки един фосфатидилхолин се приема като 100 % и е обозначена с прекъснатата линия на графиката. Липидните видове, чиито концентрации се изменят, са обозначени със звездичка. Стойностите на стандартните отклонения са изчислени на базата на три проби от всеки вид смес от три независими експеримента.

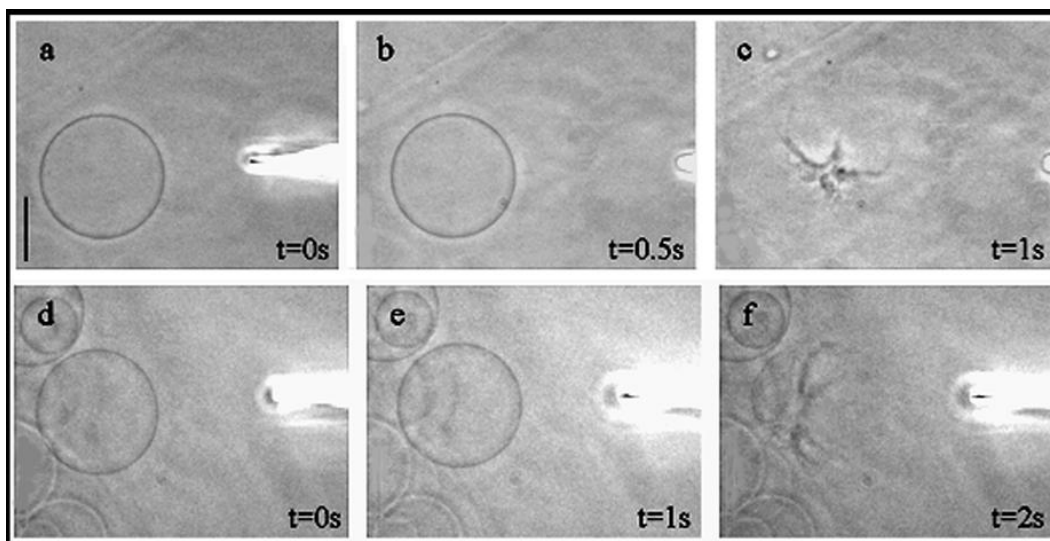
В *raft*-формиращите трикомпонентни смеси ензимната активност следва различни модели в зависимост от вида на фосфатидилхолина. Когато съотношението SM/CHOL в смесите с PDPC варира от 1/2 до 2/1, ензимната активност първоначално намалява, а след това се възстановява (Фиг. 9, В). Активността на PLA_2 при трикомпонентните смеси на POPC, обаче, не се повлиява значително от съотношението SM/CHOL (Фиг. 9, А). Разликата в моделите на инхибиране при трикомпонентните смеси вероятно се дължи на различното фазово състояние на липидния субстрат. За да бъде тествана тази хипотеза, са предприети серия от микроскопски наблюдения.

3.2 Визуализиране на действието на PLA₂ чрез фазовоконтрастна и флуоресцентна микроскопия.

3.2.1 Визуализиране на ефекта на PLA₂ върху субстратни везикули.

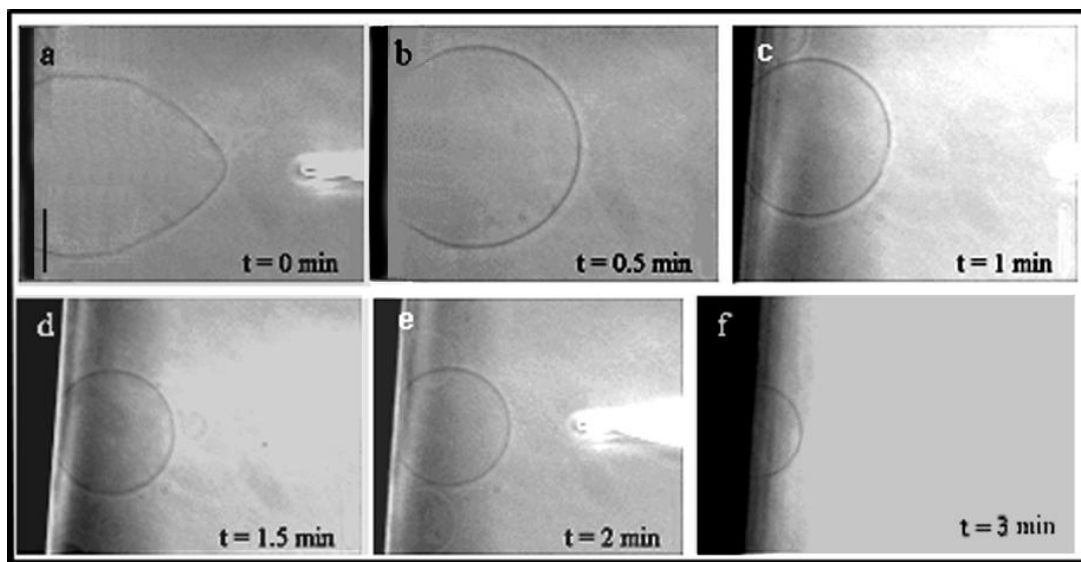
При този тип експерименти е изследван ефектът на PLA₂ върху субстратни GUVs, приготвени от три различни вида фосфатидилхолин: яйчен фосфатидилхолин (eggPC), палмитоил-олеил фосфатидилхолин (POPC) и палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолин (PDPC). Всички експерименти със субстратни везикули са осъществени при стайна температура ($t \sim 25^\circ \text{C}$).

След инжектиране на единична порция от PLA₂ ($\sim 150 \text{ pl}$, 1 mg/ml ензимна концентрация), везикулите, съставени от eggPC, се разграждат до мицели – „*vesicle burst*” (Фиг. 10, a-c). Разпадането до мицели на везикулите, приготвени от POPC, настъпва след най-малко две последователни инжектирания на ензима ($2 \times 150 \text{ pl}$) (Фиг. 10, d-f), т.е. за разрушаването на техния бислой е необходимо по-голямо количество от PLA₂ в сравнение с везикулите от eggPC. Времевият интервал между инжектирането на ензима и мицелизирането на бислоя е от порядъка на 1-2 s и за двата типа везикули. Това сходство в резултатите с двата фосфатидилхолинови вида се дължи на факта, че POPC е най-близък по химична структура до eggPC. Въпреки това, по-бързото разграждане на бислоя от eggPC би могло да се дължи на присъствието на арахидонова киселина и други по-малки фракции от полиненаситени мастни киселини.



Фигура 10. Действие на ензима PLA_2 върху субстратни везикули, приготвени от eggPC (a-c) и POPC (d-f), наблюдение в режим на фазов контраст; $t \sim 25^\circ C$. Везикула, съставена от eggPC, преди инжектиране на ензима (a) и мицелизиране на бислюя 1 s след инжектирането на PLA_2 (c). Везикула от POPC преди инжектиране на ензима (d) и разпадане на бислюя 2 s след инжектирането на PLA_2 (f).
Мащабът е $20\mu m$.

Везикулите, съдържащи PDPC, са значително по-устойчиви спрямо действието на PLA_2 за разлика от другите два типа, от eggPC и POPC. Тези везикули са изключително „течни” („меки”). Наблюдават се ясно изразени флуктуации на мембрания им бислой. При преместване на иглата във водната фаза, бислюят се увлича от движението на средата (Фиг. 11, a). Тази висока степен на флуидност се приписва на наличието на шест двойни връзки при *sn*-2 на PDPC, обуславящи формирането на тънък и неподреден липиден бислой. След инжектиране на ~ 30 порции от ензима в близост до повърхността на везикулите от PDPC, настъпва постепенно свиване на бислюя– „*vesicle shrink*” (Фиг. 11, b-f); диаметърът на везикулите намалява значително в рамките на приблизително 3-4 min.



Фигура 11. Ефект на ензима PLA_2 върху субстратни везикули, съставен от PDPC (a-f), наблюдение посредством фазовоконтрастна микроскопия; $t \sim 25^\circ\text{C}$. Везикула от PDPC, преди инжектирането на PLA_2 (a) и намаляване размера на везикулата под действие на ензима (b-f). Машабът е $20\ \mu\text{m}$.

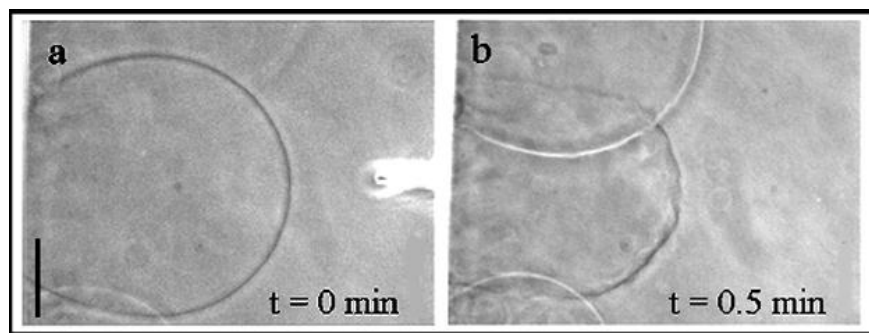
Накратко, устойчивостта на везикулите, получени от трите вида PC, спрямо действието на PLA_2 намалява в следния ред: PDPC > POPC > eggPC.

3.2.2 Ефект на PLA_2 върху хомогенния бислой на везикули, съставени от двукомпонентните смеси PC/SM.

При добавянето на SM, известен като инхибитор на PLA_2 , везикулите стават по-устойчиви спрямо ензимното действие.

Везикулите, приготвени от 50/50 eggPC/SM и POPC/SM, са стабилни след първата порция от PLA_2 . След последващи ~ 10 инжектирания, размерът на везикулите намалява за интервал от време от 3 до 5 min (*данни не са представени*), за разлика от мигновенното разпадане до мицели на субстратните везикули от eggPC и POPC (Фиг. 10).

При 50/50 PDPC/SM настъпва постепенно намаляване на размера на везикулите, което в някои случаи е съпроводено от мембранни ондулации (Фиг. 12).

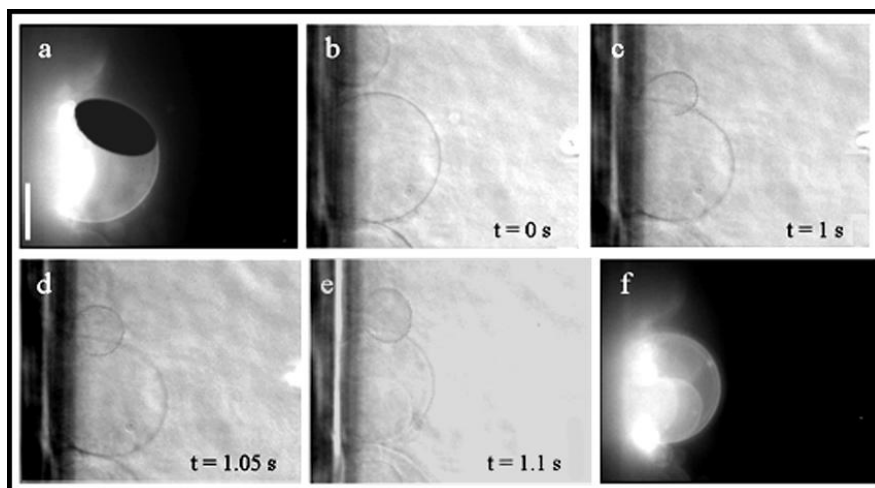


Фигура 12. Действие на PLA_2 върху везикули, съставен от двукомпонентната смес 50/50 PDPC/SM mol/mol, наблюдение чрез фазово-контрастна микроскопия; $t \sim 25^\circ\text{C}$. Хомогенен липиден бислой преди инжектиране на ензима (a) и постепенно намаляване на размера на везикулата, придружено от ондулации на мембраната след ~ 10 порции от PLA_2 (b). Мащабът е 20 μm .

Последователността на липидните смеси PC/SM, описваща устойчивостта на GUVs спрямо активността на PLA_2 , е точно както при контролните субстратни везикули: PDPC/SM > POPC/SM > eggPC/SM.

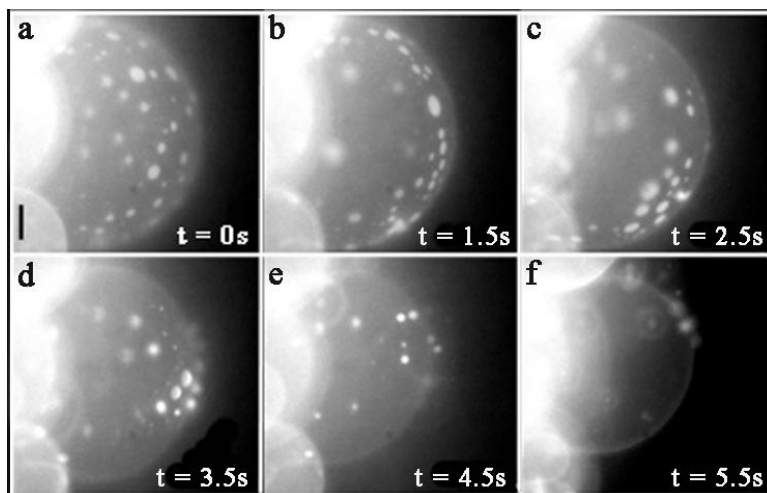
3.2.3 Действие на PLA_2 върху хетерогенния бислой на везикули, съставени от трикомпонентните смеси PC/SM/CHOL.

При наблюдение чрез флуоресцентна микроскопия везикулите от трикомпонентните смеси са хетерогенни – в равнината на мембраната съществуват едновременно две течни фази: течна-неподредена (L_d) и течна-подредена (L_o) - Фиг. 13 и 14. Везикулите от PDPC/SM/CHOL са третирани с ензима при стайна температура ($\sim 25^\circ\text{C}$). При инжектирането на PLA_2 в близост до PDPC-съдържащите везикули, е наблюдавано мигновено отделяне на L_o домен от майчината L_d везикула – явление, известно в литературата като *пъпкуване и отделяне на L_o домена (budding and fission of the L_o domain)* (Фиг. 13, b-f). В резултат се формира малка везикула в L_o фаза, видима в режим на фазов контраст, но не при наблюдение чрез флуоресценция. Майчината L_d везикула е видима и при двата режима на микроскопа (Фиг. 13, e и f).



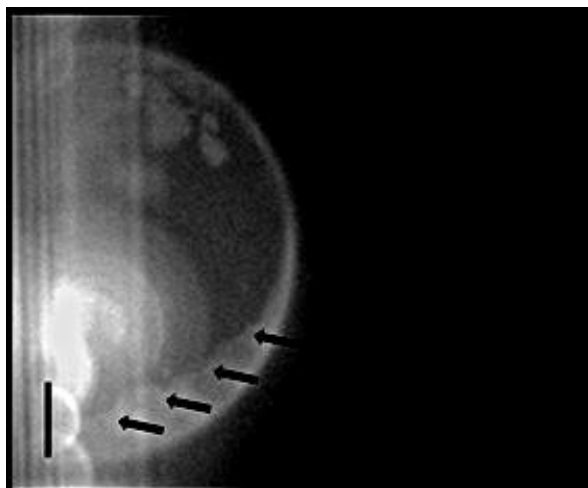
Фигура 13. Ефект на PLA₂ върху везикули, приготвени от трикомпонентната смес 50/25/25 PDPC/SM/CHOL mol/mol/mol, наблюдение посредством фазов контраст и флуоресценция; $t \sim 25^{\circ}\text{C}$. L₀/L_d хетерогенен бислой преди инжектиране на ензима (a и b), *budding and fission* на L₀ домена от майчината L_d везикула след инжектирането на PLA₂ (c-f). Мащабът е 20μm.

GUVs, приготвени от 50/25/25 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol при стайна температура имат различна фазова морфология в сравнение с PDPC/SM/CHOL. В сместа с POPC са налице светли L_d домени на тъмна L₀ фаза при стайна температура (Фиг. 14, a). При инжектирането на PLA₂ до повърхността на този тип везикули (брой на инжектиранията ~ 10), настъпва постепенното разграждане на L_d фазата (Фиг. 14, b-f). Поради различната фазова морфология на 50/25/25 POPC/SM/CHOL - светли L_d домени на тъмен L₀ фон (*фазова перколация*) – се оказва важно да бъдат проведени серия от допълнителни изследвания на трикомпонентни смеси с участието на POPC. В тези смеси променяме молните съотношения на липидните видове. Целта е да бъде постигната същата морфология на фазите както при PDPC/SM/CHOL (т.е. тъмни L₀ домени в светла L_d фаза) и да бъде установено с по-голяма точност дали ензимът предизвиква *budding and fission*, когато в трикомпонентните смеси участва POPC. Изследван е ефектът на PLA₂ върху следните две допълнителни смеси: 60/20/20 и 40/40/20 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol.



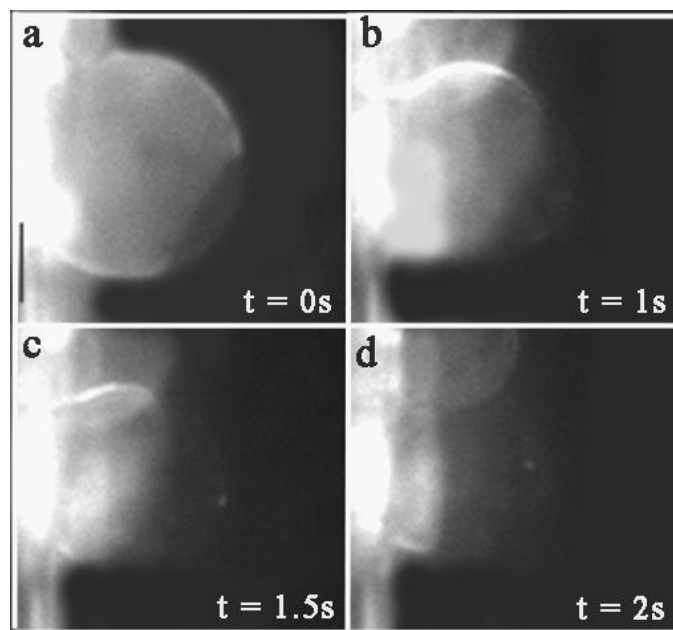
Фигура 14. Действие на PLA_2 върху везикули, приготвени от трикомпонентната смес 50/25/25 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol, наблюдение посредством флуоресценция; $t \sim 25^\circ\text{C}$. Везикула, при която е налице фазова перколация, преди инжектиране на ензима (а) и постепенно разграждане на L_d фазата след третиране с PLA_2 (b-c). Машабът е 10 μm .

При липидното съотношение 60/20/20, фазовото поведение е по-сложно. При стайна температура $\sim 25^\circ\text{C}$, съществуват едновременно двете фази, L_o и L_d , които се преливат една в друга (Фиг. 15). Добавянето на PLA_2 близо до повърхността на тези везикули отново предизвиква постепенното разграждане на L_d фазата. Също в резултат на ензимното действие, граничната повърхност L_o/L_d губи своя гладък контур и домените не изглеждат идеално кръгли (Фиг. 15).



Фигура 15. Наблюдение посредством флуоресцентна микроскопия на действието на PLA_2 върху везикули, получени от 60/20/20 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol; $t \sim 25^\circ \text{C}$. Постепенно намаляване на L_d фазата след инжектиране на ензима. Границата L_o/L_d губи своя гладък контур под действие на PLA_2 (отбелязано е с черни стрелки на фигурата). Мащабът е $10 \mu\text{m}$.

GUVs, приготвени от 40/40/20 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol са наблюдавани в температурния интервал от 40°C до 4°C . При $\sim 30^\circ\text{C}$ в техния бислой съществуват тъмни L_o домени и обкръжаваща ги светеща L_d фаза (Фиг. 16, а), т.е. тяхната фазова морфология е както при 50/25/25 PDPC/SM/CHOL mol/mol/mol. Ензимът е инжектиран при температурата на фазово разделяне (30°C), така че размерът на L_o домоените да бъде достатъчно малък, за да благоприятства тяхното отделяне от мембраната посредством пъпкуване. Но след 7 порции PLA_2 , е визуализирано само постепенното разграждане на L_d фазата (Фиг. 16, b-d).



Фигура 16. Наблюдение посредством флуоресцентна микроскопия на ефекта на PLA_2 върху везикули, съставени от трикомпонентната смес 40/40/20 POPC/SM/CHOL mol/mol/mol. L_o домен, обгърнат от светеща L_d фаза при $\sim 30^\circ\text{C}$, преди инжектиране на PLA_2 (a) и постепенно намаляване на L_d фазата в резултат на ензимното действие (b-d). Мащабът е $10\mu\text{m}$.

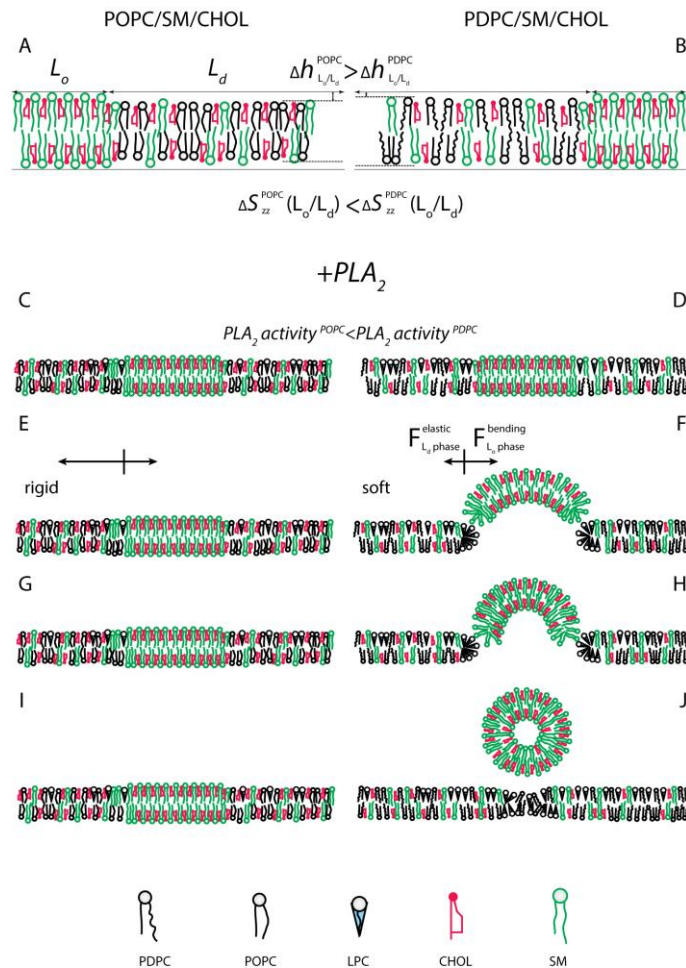
В обобщение на представените резултати от микроскопските наблюдения, можем да кажем следното: при GUVs, съставени от PDPC/SM/CHOL, протича мембранный процес *budding and fission*. Той обаче не е детектиран при POPC/SM/CHOL. Във втория тип GUVs, ензимната активност води до разграждане на L_d фазата, независимо от фазовата морфология.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на представените резултати и други научни изследвания в тази област, приемаме, че процесите на пъпкуване на L_o домените се повлияват основно от следните фактори: ензимната активност, линейното напрежение на липидните домени и еластичните свойства на мембраната, която обгражда тези домени.

В настоящата дисертация е предложен вероятен молекулен механизъм за индуцирания под действие на PLA_2 процес на пъпкуване на L_o домените в мембраните, получени от смесите на полиненаситения PDPC (PDPC/SM/CHOL) в сравнение с липсата на такъв феномен при трикомпонентните смеси с участие на мононенаситения POPC. Разликите в еластичните свойства на двата типа мембрани, заедно с вече посочените други два фактора, контролират процеса на пъпкуване според механизма, представен на Фиг. 17. Най-важният фактор, който възпрепятства процеса на пъпкуване на L_o домените в POPC/SM/CHOL везикулите е по-ниската активност на ензима PLA_2 спрямо съответните PDPC-съдържащи смеси (Фиг. 17, C и D). Въпреки това, обаче, дори след многократни инжектирания на ензима, пъпкуване на домени не се наблюдава. PDPC-смесите се характеризират с по-висока стойност на линейното напрежение на L_o домените, тъй като дори в отсъствие на ензим, домените са частично огънати (тези резултати не са показани), особено забележимо при „по-меките“ везикули. Тази висока стойност на линейното напрежение се дължи по-скоро на по-големите разлики в параметъра на подреденост на двете съвместно съществуващи фази при PDPC/SM/CHOL смесите в сравнение с POPC (*данните са част от непубликувано изследване*), отколкото разликата в L_o/L_d хидрофобното несъответствие (измерено чрез атомно-силова микроскопия) (Фиг. 17, A и B).

Колкото по-малко количество LPC генерира PLA_2 в L_d фазата, толкова по-слабо еластична е мембраната, което означава, че тези мембрани противодействат в по-голяма степен на опъването, предизвикано от огъването на L_o домените.



Фигура 17. Схема на възможен механизъм за индуцирания под действие на PLA₂ процес на пъпкуване на L₀ домените в PDPC/SM/CHOL (в дясно) в съпоставка с липсата на подобно явление при POPC/SM/CHOL (в ляво). Критичните фактори, определящи процеса на пъпкуване са: ензимната активност, линейното напрежение на L₀ домените и еластичните свойства на L_d мембраната. При POPC-съдържащите бислоеве (A) са измерени по-големи разлики в хидрофобното несъответствие между L₀ и L_d, спрямо тези с PDPC (B). Активността на PLA₂ е по-висока в мембраните с PDPC (D) в сравнение с POPC (C). По-високите стойности на линейното напрежение за L₀ домените при PDPC смесите се приписват на по-голямата разлика между параметрите на подреденост на двете ко-съществуващи фази, L₀ и L_d (A и B). POPC, POPC/LPC са по-твърди (E) от PDPC, PDPC/LPC (F). Ето защо еластичните L_d мембрани от трикомпонентните смеси на PDPC в по-слаба степен се противопоставят на пъпкуването на L₀ домените (F, H и J) за разлика от по-нееластичната L_d при POPC/SM/CHOL (E, G и I). Молекулните структури на липидните видове, участващи в състава на мембранный бислой, са схематично представени най-долу на фигурата.

По-високата активност на PLA₂ за PDPC, заедно с присъщите за този липид еластични свойства, са факторите, които стимулират пъпкуването на L_o домените. Противоположното твърдение е в сила за POPC/SM/CHOL везикулите, при които се наблюдава само постепенно намаляване на фракцията на L_d фазата (Фиг. 17, G и H, I и J). Вероятно мембранната L_d среда, обграждаща домена, може да упражнява върху него сила, която противодейства на огъването му. Посредством метода на Langmuir са изчислени модулите на еластичност при компресиране на монослойни филми, а посредством анализ на термичните флуктуации са определени модулите на огъване на гигантски везикули. От двата типа експерименти е установено, че мембраните, съдържащи PDPC и PDPC/LPC (лизофосфатидилхолин) са по-еластични (по-„меки“) от тези, които съдържат POPC и POPC/LPC (*данните са подробно представени в дисертацията*). По -„меката“ L_d мембрана при PDPC/SM/CHOL благоприятства пъпкуването на L_o домените (Фиг. 17, F). Противоположно, по-„твърдата“ мембрана при POPC/SM/CHOL възпрепятства огъването на домена и следователно процеса на пъпкуване (Фиг. 17, E).

Предложеният молекулен механизъм за процеса на пъпкуване отчита факта, че LPC се натрупва асиметрично (само във външния монослой на мембраната). Причината за това разпределение на LPC е неговата скорост на *flip-flop* - от порядъка на 1/2 до > 12 h, което надвишава значително времевата скала на нашите експерименти.

Настоящото изследване предоставя първата количествена оценка на влиянието на еластичните свойства на мембраните, обогатени на ДНА, върху активността на PLA₂, а по този начин и върху мембранните процеси на реструктуриране. Процесът на везикуляция е често наблюдавано явление в транспортните процеси в клетката, в ЦНС - при предаването на нервни стимули, т.е. при екзоцитозата на синаптични везикули. Високото количество на ДНА в мембраните на нервните клетки вероятно изменя техните еластичните свойства по такъв начин, по който стимулира процеса на везикуляция. Наскоро са публикувани данни, доказващи наличието на определени видове фосфолипаза A₂ в ЦНС. Взаимовръзката между тези ензими и физичните свойства на техния мембранен субстрат може да се окаже ключът към разкриването на субклетъчните явления, протичащи по време на различни неврофизиологични и невропатологични състояния.

БЪДЕЩИ НАСОКИ НА ЕКСПЕРИМЕНТИТЕ

Две важни възможни направления на бъдещи изследвания по представената тематика са:

- 1) изследване на ефекта на вида на полярната глава на фосфолипиди, съдържащи DHA при *sn*-2;
- 2) изследване на взаимодействието на други фосфо- и сфинголипидни видове с PLA₂.

Що се отнася до първото направление, интерес представляват фосфатидилетаноламин (PE) и фосфатидилсерин (PS), чиито молекули в ЦНС на бозайниците най-често са с две полиненаситени вериги, т.е. съдържат DHA при *sn*-1 и *sn*-2. Изследването на свойствата на мембраните от тези два фосфолипида и техните смеси би могло да обогати и затвърди предложения механизъм за PLA₂-зависимия процес на пъпкуване на L_o домените.

По отношение на второто направление, добре е да се изследва взаимодействието на сфинголипида сфингозин с PLA₂. По този начин ще има завършен вид серията от изследвания със сфингомиелин и церамид и, което е по-важно, чрез подобни изследвания ще получим по-ясна представа за ензимното действие върху хетерогенни L_β/L_d мембрани.

Подобно обогатяване на изследванията, касаещи взаимодействието между PLA₂ и нейния субстрат, както и връзката им с клетъчните домени от вида *rafts*, би могло да послужи за формулирането на нови хипотези, които клетъчните биолози и медици да тестват в търсене на разбирането за функционирането на ЦНС в норма и патология.

VI. ИЗВОДИ

1. Аминоалкохолът сфингозин стабилизира домените в L_o фаза (от вида *rafts*), като увеличава температурата на формиране и фракцията им. Сфингозинът се разпределя в L_o фракцията и проявява свойства, подобни на SM, но само в присъствието на SM.
2. Докозахексаеновата киселина при *sn*-2 в PC стимулира формирането на L_o домени при физиологична температура в сравнение с тази на олеиновата киселина в трикомпонентните смеси PC/SM/CHOL. Температурите на формиране на L_o домени в PDPC-съдържащите смеси са два пъти по-високи в сравнение с тези на POPC.
3. Антиоксидантът *n*-пропил галат (*n*PG) понижава температурата на фазовия преход за смесите и на двата молекулни вида фосфатидилхолин като ефектът му е по-силно изразен в присъствието на PDPC.
4. Измерена е по-висока активност на фосфолипаза A_2 (PLA_2) за PDPC съдържащите везикули, като тя зависи не само от степента на ненаситеност на мастната киселина при *sn*-2 на фосфатидилхолина, а също и от фазовото състояние на липидния субстрат. Присъствието на SM или CHOL, както и на двата липида заедно, води до по-голямо понижение на ензимната активност при POPC смесите в сравнение с тези на PDPC.
5. При везикулите, съставени от PDPC/SM/CHOL, PLA_2 предизвиква пъпкуване и откъсване на L_o домени от майчината L_d везикула. При POPC/SM/CHOL смесите пъпкуване не се наблюдава, а само разграждане на L_d фазата, независимо от фазовата морфология.

6. По-голямо хидрофобно несъответствие между L_o и L_d фазите е измерено при наличието на олеинова киселина в сравнение с докозахексаеновата в молекулата на фосфатидилхолина в трикомпонентните липидни смеси PC/SM/CHOL.
7. Установена е по-голяма разлика в параметрите на подреденост между двете съвместно съществуващи фази в PDPC смесите в сравнение с тези на POPC.
8. Определени са модулите на еластичност на монослойни и бислойни моделни мембранни системи, съдържащи олеинова или докозахексаенова киселина в молекулите на фосфатидилхолина, в присъствие и отсъствие на лизофосфатидилхолин. Мембраните, съдържащи PDPC и PDPC/LPC, са по-еластични от тези, които съдържат POPC и POPC/LPC.
9. Въз основа на представените резултати и наличните литературни данни е предложен възможен механизъм на пъпкуване на L_o домените, включващ следните три ключови фактора: линейно напрежение на L_o домените, активност на PLA_2 и еластични свойства на мембраната в L_d фаза.

VII. ПРИНОСИ

1. Установено е, за първи път, че положително зареденият сфинголипид, сфингозин, е способен да сегрегира и да формира листовидни гел домени. Сфингозинът стимулира формирането на домени от типа *rafts* като увеличава площта им, но той самият, в присъствие на холестерол в глицерофосфолипиден матрикс, не може да формира такива домени.
2. Визуализирано е за първи път, че докозахексаеновата киселина (DHA), включена при *sn*-2 в молекулата на фосфатидилхолин (палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолин-PDPC) стимулира формирането на *rafts* при физиологична температура в сравнение с олеиновата киселина в липидни смеси фосфатидилхолин/сфингомиелин/холестерол. Размерът на тези домени нараства при увеличаване на PDPC в сместа. Наличието на полиненаситения фосфатидилхолин в неподредената течна фаза намалява смесваемостта на сфингомиелина и холестерола за тази фаза, което води до сегрегация на все повече молекули от този вид и формиране на по-големи домени от типа *rafts* в сравнение с по-слабо ненаситените фосфатидилхолинови видове.
3. За първи път е визуализирана активността на фосфолипаза A₂ в мембрана, съдържаща домени от типа *rafts*, обкръжени от динамичната и силно неподредена мембранна среда, създадена от DHA (PDPC). Наблюдаван е процесът на пъпкуване на *rafts* от мембраните, съдържащи DHA, за разлика от тези, които съдържат олеинова киселина. Предложен е възможен механизъм за пъпкуване на *rafts*. Установено е за първи път, че пъпкуването на *rafts* се дължи на по-високото линейно напрежение на домоените, формирани в DHA матрикс, на по-високата ензимна активност в тези мембрани, както и на присъщата им по-висока

еластичност в сравнение с олеиновата киселина. Установената връзка между активността на фосфолипаза A₂, DHA и *rafts* е от значение за разкриването на ролята на ензима при процесите в централната нервна система и възпалението. Нашите научни изследвания предлагат молекулни механизми, които могат да играят роля при трансмембранната сигнализация в клетката, което би предоставило повече възможности за създаване на нови комплексни подходи за профилактика и терапия на редица патофизиологични процеси.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. Постер: *„Effect of sphingosine on domain morphology in giant vesicles ”*, P11, стр. 15.

Georgieva, R., A. Momchilova, D. Petkova, C. Tessier, G. Staneva

Младежка научна конференция - „Климентови дни”, 22-23 ноември 2010 г.

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, София, България

2. Доклад на тема: *„Investigation of the effect of antioxidant n-propyl gallate on lipid model membranes using fluorescence microscopy and differential scanning calorimetry”*

X Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 17-19 май 2011 г.

Химически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, София, България

3. Доклад на тема: *„Calorimetric study of the effect of N-propyl gallate on lipid raft mixtures differing in the degree of unsaturation at sn-2 position in phosphatidylcholines”*

(Получил ГРАМОТА за най-добре представил се млад автор към секция „Природоматематически науки”).

Секция: Природоматематически науки

Международна научна конференция посветена на 50 години от създаването на Съюза на учените в България, 2-3 юни 2011 г., Стара Загора, България

4. Постер: *„Phospholipase A2 action on heterogenous vesicles, containing docosahexaenoic fatty acid. Possible impact on neurodegenerative diseases”*, P11, стр. 15.

Georgieva, R., D. Petkova, A. Momchilova, G. Staneva,

Младежка научна конференция - „Климентови дни”, 22-23 ноември 2011 г.

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”, София, България

5. Постер на тема: *„Impact of Docosahexaenoic Fatty acid on the formation of liquid-ordered domains”*, Georgieva, R., T. Lupanova, S. Todinova, D. Petkova, A. Momchilova, G. Staneva- постерът е представен на следните две научни събития:

- **Младежка научна програма 2012- Young Scientists Program 2012 (YSP 2012), 1-4 септември 2012 г., Р-34, Коста Балена, Испания**
- **Научен конгрес 22nd IUBMB & 37th FEBS, 4-9 септември 2012 г., P05-4, Севиля, Испания**

(Спечелена стипендия от FEBS.)

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. **Georgieva, R.**, K. Koumanov, A. Momchilova, C. Tessier, G. Staneva, *Effect of sphingosine on domain morphology in giant vesicles*. Journal of Colloids and Interface Science, 350 (2), 502-510, 2010.
2. **Georgieva, R.**, T. Lupanova, S. Todinova, D. Petkova, A. Momchilova, G. Staneva, *Effect of n-propyl gallate on thermotropic behavior of lipid mixtures with different degree of unsaturation in phosphatidylcholine*. Science & Technologies, 1 (3), 11-15, 2011.
3. Lupanova, T., R. Hazarosova, **R. Georgieva**, A. Momchilova, G. Staneva, *Effect of palmitoyl-oxoaleroyl phosphatidylcholine on raft-like domain formation in giant unilamellar vesicles*. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 65 (12), 1691-1694, 2012.
4. **Georgieva, R.**, A. Momchilova, D. Petkova, K. Koumanov, G. Staneva, *Effect of n-propyl gallate on lipid peroxidation in heterogenous model membranes*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 27 (5), 4145-4149, 2013.

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Georgieva, R., K. Koumanov, A. Momchilova, C. Tessier, G. Staneva, *Effect of sphingosine on domain morphology in giant vesicles*. Journal of Colloids and Interface Science, 350 (2), 502-510, 2010.

1. Farooqui, A. A., Lipid mediators and their metabolism in the brain, Springer Science + Business Media, New York, 2011, 1-327, ISSN 978-1-4419-9939-9.

2. Silva, L. C., O. B. David, Y. Pewzner-Jung, E. L. Laviad, J. Stiban, S. Bandyopadhyay, A. H. Merrill Jr., M. Prieto, A. H. Futerman, Ablation of ceramide synthase 2 strongly affects biophysical properties of membranes, Journal of Lipid Research, 53 (3), 2012, 430-436, ISSN: 00222275.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Edidin, M., *Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers*. Nature, 2003. 4: p. 414-418.
2. Simons, K., E. Ikonen *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. 387: p. 569-572.
3. Brown, D.A., E. London *Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes*. J. Membr. Biol., 1998. 164: p. 103-114.
4. Ikonen, E., *Roles of lipid rafts in membrane transport*. Curr. Opin. Cell Biol., 2001. 13: p. 470-477.
5. Baron, G.S., K. Wehrly, D. W. Dorward, B. Chesebro, B. Caughey, *Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes*. Embo J., 2002. 21: p. 1031-1040.
6. Kakio, A., S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutsumi, K. Matsuzaki *Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raftlike membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid*. Biochemistry, 2002. 41: p. 7385-7390.
7. Dietrich, C., L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton, *Lipid rafts reconstituted in model membranes*. Biophys. J., 2001. 80: p. 1417-1428.
8. Carter, H.E., F. J. Glick, W. P. Norris, G. E. Phillips, *Biochemistry of sphingolipides. Structure of sphingosine*. J. Biol. Chem., 1947. 170: p. 285-295.
9. Maceyka, M., S. G. Payne, S. Milstien, S. Spiegel *Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate and apoptosis*. Biochim. Biophys. Acta., 2002. 1585(2-3): p. 193-201.
10. Brown, W.J., K. Chambers, A. Doody, *Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function*. Traffic, 2003. 4(4): p. 214-221.
11. Hernández, M., R. Martín, M. D. García-Cubillas, P. Maeso-Hernández, M. L. Nieto *Secreted PLA2 induces proliferation in astrocytoma through the EGF receptor: another inflammation-cancer link*. Neuro Oncol., 2010. 12(10): p. 1014-1023.
12. Dong, M., M. Johnson, A. Rezaie, J. N .M. Ilsley, M. Nakanishi, M. M. Sanders, F. Forouhar, J. Levine, D. C. Montrose, C. Giardina, D. W. Rosenberg, *Cytoplasmic phospholipase A2 levels correlate with apoptosis in human colon tumorigenesis*. Clin. Cancer Res., 2005. 11(6): p. 2265-2271.
13. Zanassi, P., M. Paolillo, S. Schinelli, *Coexpression of phospholipase A2 in rat striatal astrocytes*. Neurosci. Lett., 1998. 247: p. 83-86.
14. Forlenza, O.V., E. L. Schaeffer, W. F. Gattaz *The role of phospholipase A2 in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. J. Neural Transm., 2007b. 114: p. 231-238.
15. Khanapure, S.P., D. S. Garvey, D. R. Janero, L. G. Letts, *Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers*. Curr. Top Med Chem., 2007. 7(3): p. 311-340.
16. Holte, L.L., S. A. Peter, T. M. Sinnwell, K. Gawrisch, *²H nuclear magnetic resonance order parameter profiles suggest a change of molecular shape for phosphatidylcholines containing a polyunsaturated acyl chain*. Biophys. J., 1995. 68: p. 2396-2403.
17. Smaby, J.M., M. M. Momsen, H. L. Brockman, R. E. Brown, *Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol*. Biophys. J., 1997. 73: p. 1492-1505.
18. Soni, S.P., D. S. LoCascio, Y. Liu, J. A. Williams, R. Bittman, W. Stillwell, S. R. Wassall *Docosahexaenoic acid enhances segregation of lipids between raft and non-raft domains: ²H NMR study*. Biophys. J., 2008. 95: p. 203-214.
19. Barberger-Gateau, P., L. Letenneur, V. Desschamps, K. Peres, J. F. Dartigues, S. Renaud, *Fish, meat and risk of dementia: cohort study*. BMJ, 2002. 325: p. 932-933.
20. Morris, M.C., D. A. Evans, J. L. Bienias, C. C. Tangney, D. A. Bennett, R. S. Wilson, N. Aggarwal, J. Schneider, *Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease*. Arch. Neurol., 2003. 60: p. 940-946.
21. Simopoulos, A.P., *The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids*. Biomed Pharmacother., 2002 56(8): p. 365-379.
22. Mouritsen, O.G., T. L. Andersen, M. Weiss *Activation of interfacial enzymes at membrane surfaces*. J. Phys. Condens. Matter., 2006. 18: p. S1293-S1304.
23. Baumgart, T., S. T. Hess, W. W. Webb, *Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension*. Nature, 2003. 425: p. 821-824.

24. Staneva, G., C. Chachaty, C. Wolf, K. Koumanov, P. J. Quinn, *The role of sphingomyelin in regulating phase coexistence in complex lipid model membranes: competition between ceramide and cholesterol*. Biochim. Biophys. Acta, 2008. 1778: p. 2727-2739.
25. Litman, B.J., E. N. Lewis, I. W. Levin *Packing characteristics of highly unsaturated bilayer lipids: Raman spectroscopic studies of multilamellar phosphatidylcholine dispersions*. Biochemistry, 1991. 30(2): p. 313-319.
26. Zhou, Y., C. K. Berry, P. A. Storer, R. M. Raphael, *Peroxidation of polyunsaturated phosphatidyl-choline lipids during electroformation*. Biomaterials, 2007. 28: p. 1298-1306.
27. Ayuyan, A.G., F. S. Cohen, *Lipid peroxides promote large rafts: Effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation*. Biophys. J., 2006. 91: p. 2172-2183.
28. Zhao, J., J. Wu, H. Shao, F. Kong, N. Jain, G. Hunt, G. Feigenson, *Phase studies of model biomembranes: macroscopic coexistence of L_o+L_d , with light-induced coexistence of L_o+L_d phases*. Biochim. Biophys. Acta, 2007. 1768: p. 2777-2786.