

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство

Секция „Липид-белтъчни взаимодействия”

Русина Лъчезарова Хазаросова

**ВЛИЯНИЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ МОЛЕКУЛИ
ВЪРХУ МЕМБРАННАТА ОРГАНИЗАЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на научна и образователна степен

„ДОКТОР”

Професионално направление 4.3. Биологически науки

Научна специалност Биофизика

Научен ръководител:

проф. д-р Галя Станева

Научен консултант:

проф. дбн Албена Момчилова

Рецензенти:

.....

.....

София

2016 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширен научен семинар на секция „Липид-белтъчни взаимодействия” на ИБФБМИ – БАН, проведен на 21.04.2016 г.

Дисертационният труд съдържа 130 страници, включващи текст, 58 фигури, 6 таблици и са цитирани 193 литературни източника. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 3 научни публикации. Забелязани са 4 независими цитирания.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2016 г. от часа в Заседателната зала на бл. 21, ул. „Акад. Г. Бончев”, София. Материалите, свързани със защитата, са на разположение на интересувашите се в канцеларията на ИБФБМИ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 105, София.

Съдържание

Използвани съкращения	5
I. Увод	6
II. Цели и задачи	9
III. Методи	10
IV. Резултати и дискусия	11
1. Аминофосфолипидите подсилват формирането на домени от вида „rafts” в моделни мембрани.....	11
1.1. Изследване посредством флуоресцентна микроскопия.....	11
1.1.1. L_{β}/L_d фазово разделяне на аминокфосфолипидите в глицерофосфолипиден матрикс	11
1.1.2. Ефект на холестерола върху смесваемостта на аминокфосфолипиди в глицерофосфолипиден матрикс	12
1.1.3. Ефект на аминокфосфолипидите PE и PS върху фазово разделяне от вида L_o/L_d	13
2. Влияние на докозахексаеновата мастна киселина (DHA) върху формирането на домени от вида „rafts” в моделни мембрани.....	15
2.1. Изследване посредством флуоресцентна микроскопия.....	15
2.1.1. Формиране на домени от вида „rafts” в присъствие на докозахексаеновата мастна киселина при sn-2 позиция на фосфатидилхолин (PDPC)	15
2.1.2. Формиране на домени от вида „rafts” в присъствие на докозахексаеновата мастна киселина при sn-2 позиция на фосфатидилетаноламин (PDPE).....	16
3. Влияние на окисления фосфолипид POVPC (палмитоил-оксвалероил-фосфатидилхолин) върху мембранната организация	18
3.1. Ефект на окисления липид POVPC върху L_o/L_d фазовото разделяне в четирикомпонентната липидна смес POPC/POVPC/eggSM/Chol	18
3.2. Ефект на окисления липид POVPC върху липидни домени от вида „rafts” в четирикомпонентната смес PDPC/POVPC/eggSM/Chol.....	19

3.3. Изследване на термотропното фазово поведение на POVPC върху фазовия преход на сфингомиелина. Ефект на степента на ненаситеност на фосфатидилхолина в POVPC-съдържащи смеси: eggSM/Chol/POPC/POVPC и eggSM/Chol/PDPC/POVPC	20
4. Изследване взаимодействието на резвератрол с моделни мембрани посредством Лаурдан флуоресцентна спектроскопия ..	23
4.1. Ефект на резвератрол върху еднокомпонентни и холестерол-съдържащи POPC и PDPC везикули	23
4.2. Ефект на резвератрол върху домени в L_o фазово състояние – модел на клетъчните “rafts”	26
4.3. Ефект на Resv върху трикомпонентните смеси POPC/eggSM/Chol и PDPC/eggSM/Chol, модел на L_o/L_d ко-съществуване	27
5. Въздействие на ксилоолигозахаридите (XOS) върху структурата и организацията на чернодробните плазмени мембрани	28
5.1. Изследване подредеността на плазмено-мембранни липидни екстракти (ПМЛЕ) посредством Лаурдан флуоресцентна спектроскопия	28
5.2. Създаване на моделна мембранна система, гигантски униламеларни везикули (GUVs), съставени от ПМЛЕ. Визуализиране на домовете в тези мембрани посредством флуоресцентна микроскопия	30
V. Заключение	32
VI. Изводи	34
VII. Приноси	36
Участия в научни конференции	38
Научни публикации	41
Забелязани цитати	42
Цитирана литература	43

Използвани съкращения

Chol – холестерол

DHA – докозахексаенова киселина

DSC – диференциална сканираща калориметрия

GP – обща поляризация

GUVs – гигантски униламеларни везикули

L_β – твърда, гел фаза

L_d – точно-неподредена фаза

L_o – точно-подредена фаза

OA – олеинова киселина

PC – фосфатидилхолин

PDPC – палмитоил-докозахексаеноил-фосфатидилхолин

PDPE – палмитоил-докозахексаеноил-фосфатидилетаноламин

PE – фосфатидилетаноламин

PL – фосфолипид

POPC – палмитоил-олеоил-фосфатидилхолин

POVPC – палмитоил-оксовалероил-фосфатидилхолин

PS – фосфатидилсерин

PUFA – полиненаситени мастни киселини

Resv – резвератрол

SM – сфингомиелин

T_m – температура на фазов преход на липид (температура на топене)

XOS – ксилоолигозахариди

ПМЛЕ – плазмено-мембранни липидни екстракти

I. Увод

Хипотезата, че липидите в биологичните мембрани не са равномерно разпределени, а в области, поражда огромен интерес сред учените през последните години. Научната общност в областта на мембранологията е ориентирана към един вид микродомени, известни в научната литература под името “rafts”, които са обект на интензивен интерес поради появата на доказателства за участието им в клетъчни процеси като клетъчна сигнализация, клетъчна адхезия, мембранен транспорт и други [1, 2]. Тези домени са със специфичен липиден и белтъчен състав и молекулярна динамика [3, 4]. Концепцията за липидните рафтове е полезна не само за изясняване биологията на клетъчните мембрани, но и за някои патологични състояния като болест на Алцхаймер, атеросклероза, бактериални и вирусни инфекции, рак, автоимунни заболявания и др. [5].

Освен с латерална хетерогенност по отношение на липидния състав, плазмената бислойна мембрана се характеризира и с асиметрично разпределение на липидите между двата срещуположни монослоя [6]. Латералната организация на липидите във външния монослой на мембрания липиден бислой е сравнително добре изучена и установените микродомени от вида “rafts” вече не будят никакво съмнение. В това отношение обаче все още малко се знае за латералната организация на липидите във вътрешния слой на плазмените мембрани и способността им да образуват такива домени. Ето защо нашите усилия са насочени към изясняване ролята на аминокислотни липидите, основни липиди във вътрешния монослой на плазмените мембрани, при формиране на подредени домени.

Докозахексаеновата киселина (docosahexaenoic acid, DHA), отнасяща се към фамилията на омега-3 мастните киселини, е полиненаситена (polyunsaturated fatty acids, PUFA), локализирана главно в основните структурни фосфолипиди на плазмената мембрана: PE (фосфатидилетаноламин), PC (фосфатидилхолин) и PS (фосфатидилсерин) [7]. Тъканите, изграждащи ретината и мозъка при бозайниците, са богати на DHA [8]. Приемът на тази мастна киселина играе важна роля както за здравето на човека, така и при различни заболявания. Тя не е само източник на енергия, но също така жизненоважен структурен компонент на клетъчните мембрани и участник в много клетъчни сигнални пътища. Все

повече нарастват доказателствата за протективния ефект на ДНА, но все още не е изяснен напълно механизъмът на действие. Затова ние си поставяме за цел да изучим как присъствието на тази мастна киселина, локализирана при *sn*-2 позиция в молекулата на PE и PC, въздейства на формирането, стабилността и функциите на рафтовете в биологичните мембрани.

Фосфолипидите, съдържащи PUFA, са високо податливи на модификация от реактивни кислородни видове (ROSs) като по този начин се генерира множество биологично активни окислени фосфолипиди (oxPLs) [9, 10]. Широкият диапазон от патофизиологични процеси се приписва основно на oxPLs, подчертаващи тяхното значение при възпалителните процеси, имунния отговор, невродегенеративните заболявания и др. Предполага се, че един от начините им на действие е тяхното повлияване върху биофизичните свойства на липидната мембрана. Затова и една от целите ни е да изследваме промените в структурната организация на липидния бислой в присъствие на окисления липид палмитоил-оксовалероил-фосфатидилхолин (POVPC) [11, 12].

Освен горепосочените липиди, влизачи в състава на биологичните мембрани, обект на засилен интерес през последните години са и биологично активният фитоалексин резвератрол, както и групата на ксилоолигозахаридите. Тези вещества имат плейотропни свойства, основното от които е превенция от оксидативни увреждания.

Резвератролът (Resveratrol, Resv) е полифенолно съединение, което се синтезира при някои растителни видове в отговор на екзогенен стрес или инфекция [13]. Основните източници на Resv в диетата при човека са люспите и семената на червеното грозде, червеното вино и фъстъците [14], с благоприятен ефект при лечението на рак, сърдечно-съдови и невродегенеративни разстройства [15]. Това съединение възбужда интереса на много учени след установяването на т.нар. “френски парадокс” (въпреки приема на храни с високо съдържание на мазнини, смъртността от сърдечно-съдови заболявания във Франция е най-ниска, дължаща се на умерена консумация на червено вино) [16]. Механизъмът, чрез който резвератрол упражнява такива плейотропни ефекти, все още е неясен, поради което е необходимо да се изследва влиянието на това съединение върху мембранните липиди и тяхната структурна

организация, в частност върху регулацията на формиране на липидните домени.

Ксилоолигозахаридите (Xylooligosaccharides, XOS), които са също предмет на нашето изследване, са захари, съдържащи ксилозни остатъци, естествено присъстващи в плодовете, зеленчуците, млякото, меда и др. [17]. Съществуват все повече научни доказателства, че ксилоолигозахаридите функционират като пребиотици и имат ясно изразени подобряващи здравословното състояние възможности. Техните положителни биологични ефекти са: пребиотичен, антивъзпалителен, антиоксидантен и др. [18]. Въпреки сравнително големия брой проучвания, посветени на използването на XOS за лечение на различни патологични състояния, малко се знае за точния молекулен механизъм на действие на тези съединения върху структурата и функциите на плазмената мембрана. Затова цел на нашето изследване е установяване влиянието на XOS върху липидния състав и структура на чернодробни плазмени мембрани.

II. Цели и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се изследва влиянието на отделни липиди, изграждащи биологичните мембрани върху формирането и стабилността на домени от вида “*rafts*” в моделни мембрани и установяване ефекта на значими биологично активни съединения върху мембранната организация. За постигането на тази цел са формулирани следните задачи:

1. Изследване ефекта на аминокислотни фосфолипидите фосфатидил-етаноламин (PE) и фосфатидилсерин (PS) върху формирането на домени от вида “*rafts*”.

2. Визуализиране на L_o/L_d фазовото разделяне и определяне температурата на смесваемост на двете течни фази в рафт-съдържащи смеси (PC/SM/CHOL):

► формиране на “*rafts*” като функция от степента на ненаситеност на мастната киселина в POPC и PDPC молекули;

► формиране на “*rafts*” като функция на полярната глава (PC и PE) в DHA-съдържащи глицерофосфолипиди.

3. Изследване влиянието на окисления фосфолипид палмитоил-оксовалероил фосфатидилхолин (POVPC) върху мембранната латерална организация:

► формиране на домени от вида “*rafts*” като функция от степента на ненаситеност на мастната киселина в POPC- и PDPC-съдържащи смеси;

► термотропно поведение на POVPC върху фазовия преход на SM и върху фазовото поведение от вида L_β/L_d .

4. Изследване степента на подреденост на липидите в POPC- и PDPC-съдържащи трикомпонентни смеси (PC/SM/Chol) при различни концентрации резвератрол. Влияние на полифенола върху структурата на рафта.

5. Изследване ефекта на ксилоолигозахаридите (XOS) върху структурата и организацията на мембрани, чиито липиди са екстрахирани от черен дроб на плъхове.

III. Методи

При изработване на дисертацията са използвани следните методи:

- 1) Електроформиране на гигантски униламеларни везикули (GUVs);
- 2) Визуализиране на GUVs чрез оптична микроскопия – фазов контраст и флуоресценция;
- 3) Формиране на мутиламеларни везикули (MLVs);
- 4) Формиране на големи униламеларни везикули (LUVs);
- 5) Диференциална сканираща калориметрия;
- 6) Лаурдан флуоресцентна спектроскопия;
- 7) Изолиране на плазмени мембрани, екстрахиране на липиди и липиден анализ.

IV. Резултати и дискусия

1. Аминофосфолипидите подсилват формирането на домени от вида “rafts” в моделни мембрани

1.1. Изследване посредством флуоресцентна микроскопия

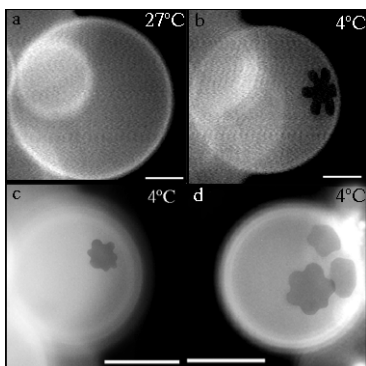
1.1.1. L_{β}/L_d фазово разделяне на аминокфосфолипидите в глицерофосфолипиден матрикс

Температурата на смесваемост на аминокфосфолипидите PE и PS в глицерофосфолипиден матрикс и морфологията на наблюдаваните домени са изследвани в бинарни липидни смеси (eggPC/eggPE и eggPC/brainPS) и трикомпонентни такива, включващи двата аминокфосфолипида – eggPC/brainPS/eggPE (табл. 1). В трите вида смеси везикулите са хомогенни при микрометричната скала в температурен интервал от 37°C до 15°C (фиг. 1, а). Под тази температура във всички смеси се наблюдават тъмни, подобни на листа домени на светъл фон (фиг. 1, b – d). Понеже тези L_{β} домени не растат чрез сливане и тяхната форма не е кръгла, всички тези характеристики отговарят на модела за съвместно съществуване на L_{β} и L_d фазово състояние на липидите в липидния бислой. Ние предполагахме, че тъмните, подобни на листа домени са резултат от самоагрегиране на PE и PS молекули. Температурите на фазово разделяне в микронната област на тези смеси са представени в табл. 1 като най-висока е температурата на фазово разделяне и най-голяма е фракцията на L_{β} домените при комбинация от двата аминокфосфолипида (фиг.1, d).

Таблица 1. Температура на фазово разделяне в микронната област на изследваните аминокфосфолипид-съдържащи смеси, $\pm$ стандартно отклонение (SD), брой на проведените експерименти $n = 3$.

Липидни смеси/молно съотношение на липидите/установено фазово разделяне на липидите	Температура на фазово разделяне в микронната област (T_m)
eggPC/eggPE 85/15 (L_{β}/L_d)	$(10.4 \pm 2.1)^{\circ}\text{C}$
eggPC/brainPS 85/15 (L_{β}/L_d)	$(8.1 \pm 2.6)^{\circ}\text{C}$
eggPC/brainPS/eggPE 70/15/15 (L_{β}/L_d)	$(13.9 \pm 2.1)^{\circ}\text{C}$
eggPC/eggPE/CHOL 65/15/20 (L_{β}/L_d)	$(4.3 \pm 1.4)^{\circ}\text{C}$
eggPC/brainPS/CHOL 65/15/20 (L_{β}/L_d)	$(7.7 \pm 1.9)^{\circ}\text{C}$

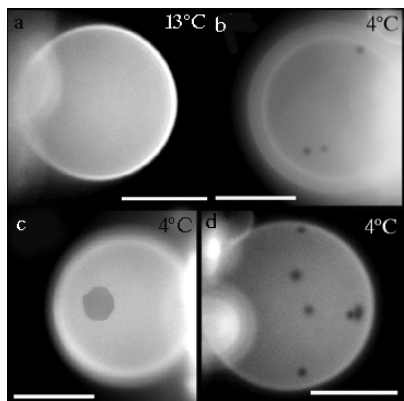
eggPC/brainPS/eggPE/CHOL 50/15/15/20 (L_{β}/L_d)	$(6.2 \pm 1.5)^{\circ}\text{C}$
eggPC/eggSM/CHOL 60/20/20 (L_o/L_d)	$(20.3 \pm 1.4)^{\circ}\text{C}$
eggPC/eggPE/eggSM/CHOL 50/10/20/20 (L_o/L_d)	$(25.1 \pm 1.8)^{\circ}\text{C}$
eggPC/brainPS/eggSM/CHOL 50/10/20/20 (L_o/L_d)	$(22.8 \pm 1.7)^{\circ}\text{C}$
eggPC/brainPS/eggPE/eggSM/CHOL 40/10/10/20/20 (L_o/L_d)	$(25.4 \pm 2.2)^{\circ}\text{C}$



Фиг. 1. Флуоресцентни микрографи на GUVs, съставени от 85/15 eggPC/eggPE (a и b), eggPC/brainPS (c) и смес, включваща двата аминокиселини – eggPC/brainPS/eggPE 70/15/15 (d). Везикулите в сместа 85/15 eggPC/eggPE са хомогенни в температурния интервал от 37° до 15°C (a). Тъмни листоподобни домени на светъл фон се наблюдават под 15°C за всички смеси (b – d). Мащаб: 20 μm .

1.1.2. Ефект на холестерола върху смесваемостта на аминокиселини в глицерофосфолипиден матрикс

Добавянето на холестерол (20 mol%) намалява температурата на формиране на листоподобните домени (табл. 1, фиг. 2) като най-голям ефект той има в четириккомпонентната смес 50/15/15/20 eggPC/brainPS/eggPE/Chol. Освен промяна в температурата на формиране на домени, Chol предизвиква промяна в тяхната морфология и размер, като и тук тези изменения са най-силно изразени, когато в сместа присъства PE (фиг. 2, b и d). Такъв ефект не се наблюдава при трикомпонентната PS-съдържаща смес (фиг. 2, c). Доказателство, че в eggPE-съдържащите смеси малките тъмни домени са домени в гел фаза, е тяхната неспособност да се сливат и да образуват по-големи такива.

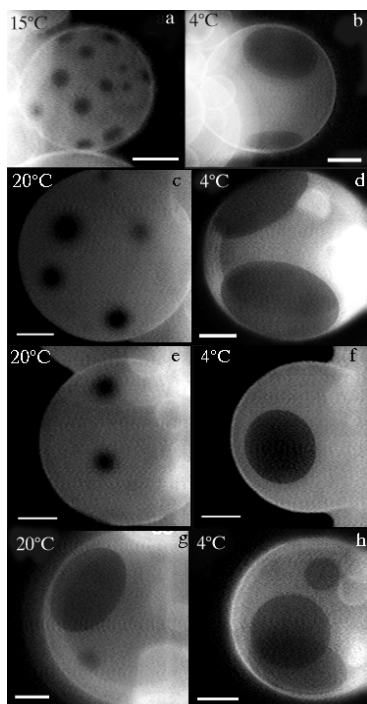


Фиг. 2. Ефект на Chol върху L_0/L_d фазово разделяне в аминоксфолипид-съдържащи смеси. GUVs, съставени от eggPC/eggPE/Chol 65/15/20 (a и b) при 13° и 4°C, eggPC/brainPS/Chol 65/15/20 (c) и eggPC/brainPS/eggPE/Chol 50/15/15/20 (d) смеси при 4°C. Добавянето на холестерол намалява температурата на формиране на гел домени, променя тяхната морфология и размер само в присъствие на eggPE в смесите (b и d). Такъв ефект не се наблюдава в 65/15/20 eggPC/brainPS/Chol смес, сравнена с

контролата без холестерол – 85/15 eggPC/brainPS. Мащаб: 20 μm .

1.1.3. Ефект на аминоксфолипидите PE и PS върху фазово разделяне от вида L_0/L_d

В контролните GUVs, съставени от 60/20/20 eggPC/eggSM/Chol смес при 20.3°C се наблюдават идеално кръгли, тъмни домени в точно-подредено състояние L_0 (табл. 1, фиг. 3, a и b). За по-добра визуализация на L_0 домени везикулите във всички изследвани смеси са показани при малко по-ниска температура в сравнение с действителната температура на L_0/L_d фазово разделяне. С намаляване на температурата (4°C) домени в L_0 фаза нарастват чрез сливане, което е характерно тяхно свойство, описващо именно фазово разделяне от вида точно в точно състояние. Добавянето към контролната смес на 10 mol% eggPE или brainPS, или в комбинация на двата аминоксфолипида повишава температурата на формиране на L_0 домени (фиг. 3, c, e, g) и така фракцията на L_0 домени при ниски температури във всички смеси (фиг. 3, d, f, h) е по-голяма спрямо контролата (фиг. 3, b). Присъствието на двата аминоксфолипида в 40/10/10/20/20 eggPC/brainPS/eggPE/eggSM/Chol смес индуцира L_0/L_d фазово разделяне при най-висока температура (табл. 1, фиг. 3, g) в сравнение с участието на всеки отделен липид. По-голяма L_0 фракция се наблюдава, когато в сместа участват и двата аминоксфолипида (фиг. 3, h) в сравнение с контролата (фиг. 3, b), но по-малка в сравнение с PE-съдържащата смес (фиг. 3, d).



Фиг. 3. Ефект на аминокфосфолипидите върху L_o/L_d фазовото разделяне. Контролните GUVs са съставени от 60/20/20 eggPC/eggSM/Chol смес (a и b). Идеално кръгли, тъмни L_o домени се появяват при 20.3°C. За яснота, визуализирането на L_o домовете са представени при малко по-ниска температура от тази на формиране (a). Размерът на домовете нараства с намаляване на температурата (4°C) (b). Формиране на L_o домени, когато към контролната смес е добавен един аминокфосфолипид: 50/10/20/20 eggPC/eggPE eggSM/Chol (c и d) и eggPC/brainPS/eggSM/Chol (e и f). Формиране на L_o домени в присъствие и на двата аминокфосфолипида: 40/10/10/20/20 eggPC/brainPS/eggPE/eggSM/Chol (g и h). Мащаб: 20 μm .

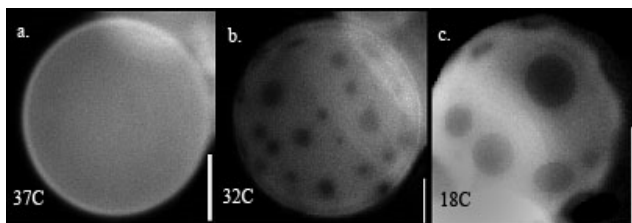
PE-смесите показват по-голяма способност да формират домени в L_o фаза в сравнение с PS-съдържащите в серията от четириккомпонентни смеси. Тъй като PE е ненаситен молекулен вид, малко вероятно е неговото директно участие в изграждането на L_o домовете в сравнение с PS (от говежди мозък), при който не би имало такова ограничение да участва във формирането на тези домени. Това предполага индиректната роля на PE във формирането на този вид домени, а именно чрез намаляване смесваемостта на SM и/или Chol в по-неподредената фаза (L_d), което води до създаването на по-голяма фракция на L_o домовете. Така повече SM ще бъде включен във формирането на домени от вида „rafts”.

2. Влияние на докозахексаеновата мастна киселина (DHA) върху формирането на домени от вида “rafts” в моделни мембрани

2.1. Изследване посредством флуоресцентна микроскопия

2.1.1. Формиране на домени от вида “rafts” в присъствие на докозахексаенова мастна киселина при *sn-2* позиция на фосфатидилхолин (PDPC)

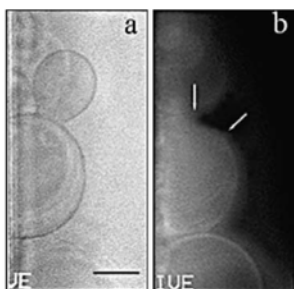
За изследване влиянието на DHA върху формирането на домени от вида “rafts” в моделни мембрани най-напред е разгледана трикомпонентната контролна смес eggPC/eggSM/Chol 34/33/33. Везикулите в тази смес са хомогенни в интервала от 37 до 18°C (резултатите не са представени). Фазово разделяне от вида L_o/L_d е установено при 18°C. Добавянето на 10 mol% PDPC (съдържащ при *sn-1* позиция палмитинова мастна киселина (C16:0), а при *sn-2* позиция – докозахексаенова мастна киселина (C22:6)) към контролната смес (PDPC/eggPC/eggSM/Chol 10/24/33/33) води до повишаване на температурата на формиране на L_o домени с 14°C в сравнение с контролната смес, т.е. първите малки, тъмни L_o домени се формират при 32°C (табл. 2, фиг. 4, b) и тяхната фракция при 18°C (фиг. 4, c) е по-голяма в сравнение с контролната смес при същата температура (табл. 2).



Фиг. 4. L_o/L_d фазово разделяне в сместа PDPC/eggPC/eggSM/Chol 10/24/33/33. Присъствието на PDPC в четирикомпонентната смес води до повишаване на температурата на формиране на домени във фаза L_o . Везикулите са хомогенни в температурния диапазон между 45 и 33°C (a). L_o домени се формират при 32°C (b). Домените в L_o фаза нарастват чрез сливане помежду си при намаляване на температурата (c). Мащаб: 10 μ m.

При увеличаване молните проценти на PDPC в четирикомпонентната смес (без промяна в моларните съотношения между eggSM и Chol) се наблюдава както още по-висока

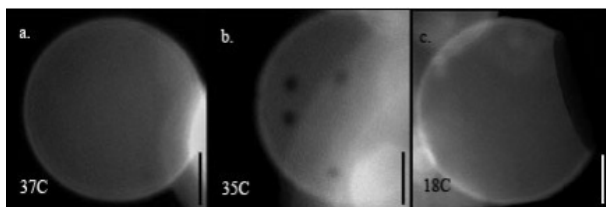
температура на формиране на L_o домените, така и поява на явлениято „пъпкуване” – огъване и откъсване на L_o домен от везикулата-майка. Пъпкуването на тези домени е благоприятствано в случаите, когато линейното напрежение на тези домени е голямо. Основните причини за повишено линейно напрежение са по-изразеното хидрофобно несъответствие и/или голямата разлика във вискозитета между двете съществуващи фази (фиг. 5, табл. 2).



Фиг. 5. Флуоресцентна микрография на GUVs, съставени от PDPC/eggSM/Chol 34/33/33 при 37°C. Пъпкуване на домен в L_o фаза, показан в режим на фазов контраст (a) и в режим на флуоресценция (b). Мащаб: 10 μm .

2.1.2. Формиране на домени от вида “rafts” в присъствие на докозахексаеновата мастна киселина при *sn-2* позиция на фосфатидилетаноламин (PDPE)

Присъствието на 10 mol% PDPE в четирикомпонентната смес PDPE/eggPC/eggSM/Chol 10/24/33/33 също води до повишение на температурата на формиране на L_o домените (фиг. 6, табл. 2). Температурата на смесваемост на двете течни фази L_o и L_d е 35°C (фиг. 6, b), която е с цели 17°C по-висока спрямо контролата и с 3°C по-висока спрямо PDPC-съдържащата смес (табл. 2).



Фиг. 6. L_o/L_d фазово разделяне в PDPE/eggPC/eggSM/Chol 10/24/33/33 смес. В тази смес везикулите са хомогенни в температурната област от 45 до 36°C (a). L_o домени се формират при 35°C (b). Увеличаване размера на L_o домените като функция на температурата (c). Фракцията на L_o домените заема 1/4 до 3/8 от повърхността на везикулата при 18°C (c). Мащаб: 10 μm .

И тук при увеличаване процентното съдържание на PDPE се наблюдава както по-висока температура на фазово разделяне (табл. 2), така и пъпкуване на L_o домени (резултатите не са представени).

Таблица 2. Температура на фазово разделяне (в микронната област) на изследваните PDPC- и PDPE-съдържащи смеси (влияние на DHA и вида на полярната глава).

Смеси	T_{L_o/L_d} [°C]	ΔT_{DHA} $T_{DHA - \text{липид}} - T_{\text{контрол}}$ L_o/L_d [°C]	$\Delta T_{\text{ПОЛ. ГЛАВА}}$ $T_{PE} - T_{PC}$ L_o/L_d [°C]
eggPC/eggSM/CHOL 34/33/33	18 °C	-	-
PDPC/eggPC/eggSM/CHOL 10/24/33/33 17/17/33/33 34/0/33/33	32 °C 44 °C 67 °C (пъпкуване)	<u>14 °C</u> 26 °C 49 °C	<u>3 °C</u>
PDPE/eggPC/eggSM/CHOL 10/24/33/33 17/17/33/33	35 °C Пъпкуване на L_o домени	<u>17 °C</u>	
PDPC/PDPE/eggSM/CHOL 24/10/33/33	Пъпкуване на L_o домени, нестабилни везикули	-	-

Както при PDPC, така и при PDPE-съдържащите смеси при увеличаване на процентното им съдържание се установява систематично повишаване на температурата на фазово разделяне спрямо контролата. Следователно, DHA стимулира в значителна степен формирането на домени от вида „rafts”. От съществено значение за формирането на рафтове обаче е и полярната глава на глицерофосфолипида, към която е прикрепена тази мастна киселина. Както се вижда от табл. 2, PDPE-сместа (съдържаща 10 mol% PDPE) формира L_o домени при по-висока температура спрямо 10 mol% PDPC ($\Delta T \approx 3^\circ\text{C}$). Следователно, фосфатидилетаноламинът стимулира в по-голяма степен формирането на домени от вида „rafts” в сравнение с фосфатидилхолина. Общо може да се каже, че механизмът, по който DHA участва в процеса на рафт формиране,

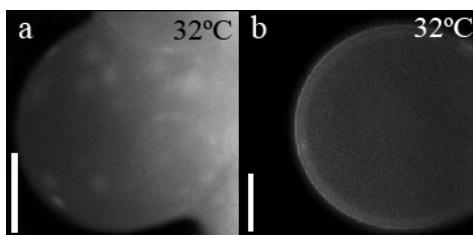
не е директен – чрез основно структурно включване в рафт домените, а косвен – чрез изместване на Chol от по-малко подредената фаза. В нашите изследвания установихме и явлението пъпкуване, което се наблюдава при PDPE-съдържащите смеси при по-ниски молни проценти, което потвърждава отново факта, че значение за това явление има и видът на полярната глава.

3. Влияние на окисления фосфолипид POVPC (палмитоил-оксвалероил-фосфатидилхолин) върху мембранната организация

Физичните свойства и структурната организация на моделни мембрани, съдържащи окисления липид POVPC, са изследвани чрез флуоресцентна микроскопия на GUVs. Като контроли са използвани GUVs, съставени от два вида смеси: POPC/eggSM/Chol и PDPC/eggSM/Chol в съотношение 1/1/1. Двете трикомпонентни смеси се различават по основния липид: палмитоил-олеоил фосфатидилхолина (POPC) съдържа една двойна връзка в олеиновата киселина, а палмитоил-докозахексаеноил фосфатидилхолина (PDPC) съдържа шест двойни връзки в докозахексаеновата мастна киселина.

3.1. Ефект на окисления липид POVPC върху L_o/L_d фазовото разделяне в четирикомпонентната липидна смес POPC/POVPC/eggSM/Chol

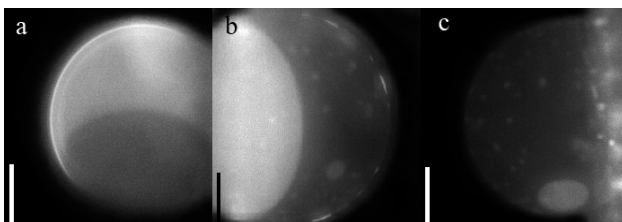
В трикомпонентната контролна смес 34/33/33 POPC/eggSM/Chol под 32°C се наблюдава формиране на малки светли домени, които се намират в L_d фаза, на тъмен фон (L_o фаза) (резултатите не са представени). С понижаване на температурата фракцията на L_d фазата в GUVs намалява до пълното ѝ изчезване, а фракцията на L_o фазата достига 100%. При добавяне само на 0.5 mol% POVPC към контролата настъпва промяна във фазовата морфология на мембранный бислой като функция на температурата. Везикулите показват хомогенност – липса на L_o/L_d фазово разделяне в целия температурен интервал на изследване. На фиг. 7 са показани флуоресцентни микрографии на GUVs, съставени съответно от контролната смес (фиг. 7, а) и четирикомпонентната, съдържаща 0.5 mol% POVPC (POPC/POVPC/eggSM/Chol 33.5/0.5/33/33) (фиг. 7, b).



Фиг. 7. Ефект на POVPC върху двуфазната област от вида L_o/L_d . GUVs, съставени от контролната 1/1/1 POPC/eggSM/Chol смес в температурната област на двуфазно съществуване $32^\circ - 25^\circ\text{C}$ (a). Присъствието само на 0.5 mol% POVPC (33.5/0.5/33/33 POPC/POVPC/eggSM/Chol) води до премахване на фазовото разделяне в цялата температурна област от 45 до 4°C (b). Мащаб: $10\ \mu\text{m}$.

3.2. Ефект на окисления липид POVPC върху липидни домени от вида “rafts” в четирик компонентната смес PDPC/POVPC/eggSM/Chol

При PDPC-съдържащата контролна смес при физиологична температура фракцията на L_o домена заема $1/3$ до $1/2$ от повърхността на везикулата (фиг. 8, a).

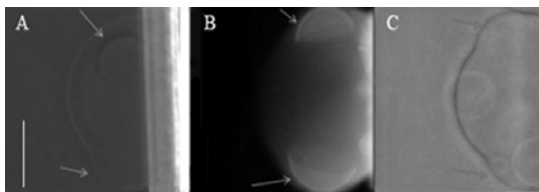


Фиг. 8. Изследване влиянието на окисления липид POVPC при две различни моларни концентрации (2.5 mol% и 5 mol%) върху L_o/L_d фазовото разделяне в микронната област. GUVs, съставени от трикомпонентната липидна смес PDPC/eggSM/Chol 34/33/33 проявяват фазово разделяне в температурния интервал от $62^\circ - 4^\circ\text{C}$ (a). При 37°C се наблюдават сравнително големи домени, от $1/3$ до $1/2$ от повърхността на везикулата (a). L_o/L_d фазово разделяне се наблюдава в цялата температурна област на изследване при добавянето на 0.5 (данните не са показани), 2.5 (b) и 5 (c) mol% POVPC. По-високото процентно съдържание на POVPC води до намаляване на фракцията на светлите домени (L_d фаза) и съответно до увеличаване на L_o , както е показано в b и c при 37°C . Мащаб: $10\ \mu\text{m}$.

При добавяне съответно на 2.5 и 5 mol% POVPC фракцията на L_d домовете намалява за сметка на увеличаването на L_o фракцията,

както е показано на фиг. 8 (b и c) при 37°C. Ефектът на POVPC в тези везикули доведе до леко повишаване на температурата на формиране на домените, както и нарастване на L_o фракцията.

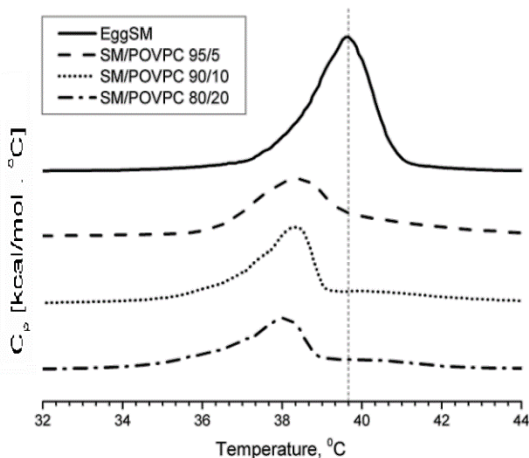
От гореописаните резултати може да се направи заключението, че ефектът на POVPC върху POPC-смесите е да намалява L_o/L_d фазовото разделяне за разлика от тези на PDPC, в които се наблюдава повишаване на температурата на смесваемост на двете течни фази. POVPC също така стимулира процеса на пъпкуване на L_d домените във везикули, съставени от 28/5/33/34 PDPC/POVPC/eggSM/Chol смеси при физиологична температура (фиг. 9). Появата на това явление се дължи на по-късата мастно-киселинна верига в молекулата на POVPC. Изглежда, че тя е активната молекула, контролираща линейното напрежение между двете ко-съществуващи фази.



Фиг. 9. Пъпкуване на L_d домени (сиви стрелки) във везикули, съставени от 28/5/33/34 PDPC/POVPC/eggSM/Chol, наблюдавани чрез фазов контраст (A и C) и флуоресценция (B).

3.3. Изследване на термотропното фазово поведение на POVPC върху фазовия преход на сфингомиелина. Ефект на степента на ненаситеност на фосфатидилхолина в POVPC-съдържащи смеси: eggSM/Chol/POPC/POVPC и eggSM/Chol/PDPC/POVPC

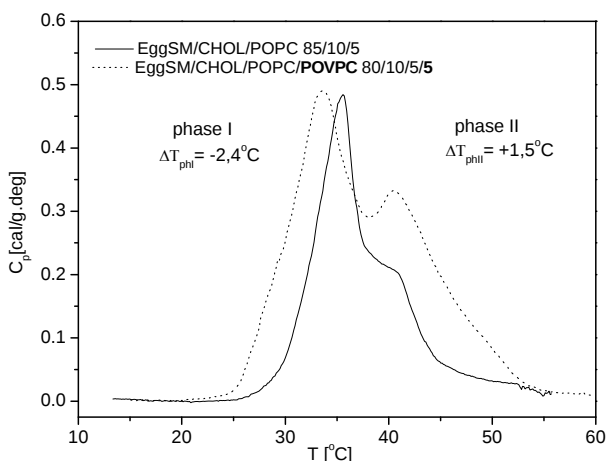
В изучаваните смеси яйчният сфингомиелин (eggSM) е липидът с най-висока температура на топене ($T_m = 39.7^\circ\text{C}$), претърпяващ високо кооперативен преход с енталпия 7.9 kcal/mol (фиг. 10). Присъствието на POVPC в SM бислой предизвиква втечняване на липидния бислой, както се вижда на фиг. 10. Температурата и енталпията на фазовия преход на бинарните смеси eggSM/POVPC постепенно намаляват с увеличаване концентрацията на окисления липид, а кооперативността на прехода намалява при увеличаване на процентното съдържание на POVPC.



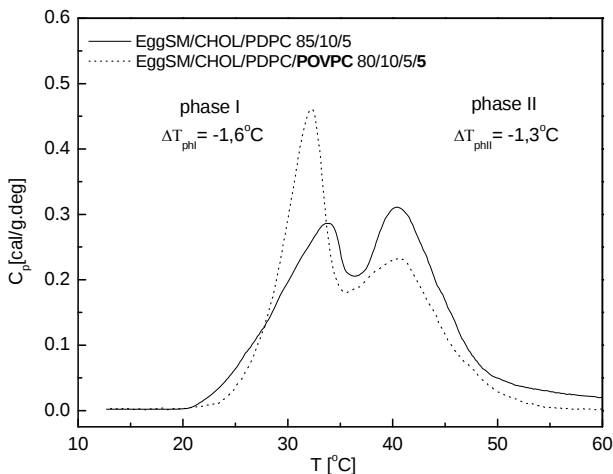
Фиг. 10. Термотропно поведение на POVPC върху фазовия преход на яйчен сфингомиелин. Изследвани са 5, 10 и 20 mol% POVPC. Температурното сканиране е извършено със скорост 0.1°C/min в температурната област от 12 до 60°C.

За изследване ефекта на окисления липид върху хетерогенни липидни мембрани в експерименталната работа са използвани четириккомпонентните смеси 80/10/5/5 eggSM/Chol/POPC/POVPC и eggSM/Chol/PDPC/POVPC с различна степен на ненаситеност в молекулата на фосфатидилхолина. При фазов преход в контролната трикомпонентна смес 85/10/5 eggSM/Chol/POPC са идентифицирани две фази: ниско-температурна, обогатена на POPC (34.9°C, фаза I) и високо-температурна, обогатена на Chol (37.8°C, фаза II) (фиг. 11). Присъствието на POVPC (фиг. 11) повлиява в по-голяма степен структурата на фаза I, отколкото тази на фаза II и понижава в значителна степен кооперативността на целия преход. Окисленият липид предизвиква отместване на фаза I към по-ниските температурни стойности, като намалява температурата на фазов преход на структура I с 2.4°C. Противоположна тенденция се наблюдава за фаза II: температурата на преход се отмества към по-високите стойности (+1.5°C). Енталпията на прехода нараства за двете фази в присъствие на POVPC, като разликата е по-съществена за фаза II. POVPC намалява температурата на преход на двете ко-съществуващи фази в PDPC сместа в сравнение с контролната (eggSM/Chol/PDPC (85/10/5 mol/mol)) (фиг. 12). Сравнявайки фигури 11 и 12, може да се обобщи, че POVPC предизвиква промени в по-голяма степен в структурата на фаза II в POPC сместа в сравнение с неговия ефект върху PDPC-съдържащата. Този факт вероятно е в основата на промененото разпределение на Chol между

двете фази за POPC сместа, водейки до намалено съдържание на Chol във фаза I и съответно по-високо такова за фаза II. Така се формира фаза (II), чиято температура на топене и енталпия са по-високи в сравнение с контролната смес. Както се вижда на фиг. 11, средното отместване на температурата на топене за фаза II е $+1.5^{\circ}\text{C}$ за 5 mol% POVPC, но поради уширяването на прехода не малка фракция от тази фаза се топи в интервала $43 - 53^{\circ}\text{C}$ за разлика от контролната смес, при която преходът е почти завършен. Ефектът на POVPC в PDPC-съдържащата смес е коренно различен (фиг. 12). Фаза II се отмества към по-ниските температури -1.3°C , както впрочем се случва за фаза I в двата вида четириккомпонентни смеси.



Фиг. 11. Термотропно поведение на POVPC (5 mol%) върху фазовия преход гел-течно състояние на сместа eggSM/Chol/POPC (85/10/5 mol/mol). Температурното сканиране е извършено със скорост $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ в температурната област от 12° до 60°C .



Фиг. 12. Термотропно поведение на POVPC (5 mol%) върху фазовия преход гел-течно състояние на сместа eggSM/Chol/PDPC (85/10/5 mol/mol). Температурното сканиране е извършено със скорост 0.1°C/min в температурната област от 12° до 60°C.

Тези резултати предполагат различен механизъм на действие на окисления липид POVPC в мононенаситените (eggSM/Chol/POPC/POVPC) и полиненаситените (eggSM/Chol/PDPC/POVPC) смеси по отношение на холестерола. Би могло да се предположи, че POVPC намалява смесваемостта на Chol за eggSM/POPC микрообкръжението, а я увеличава в eggSM/PDPC смеси.

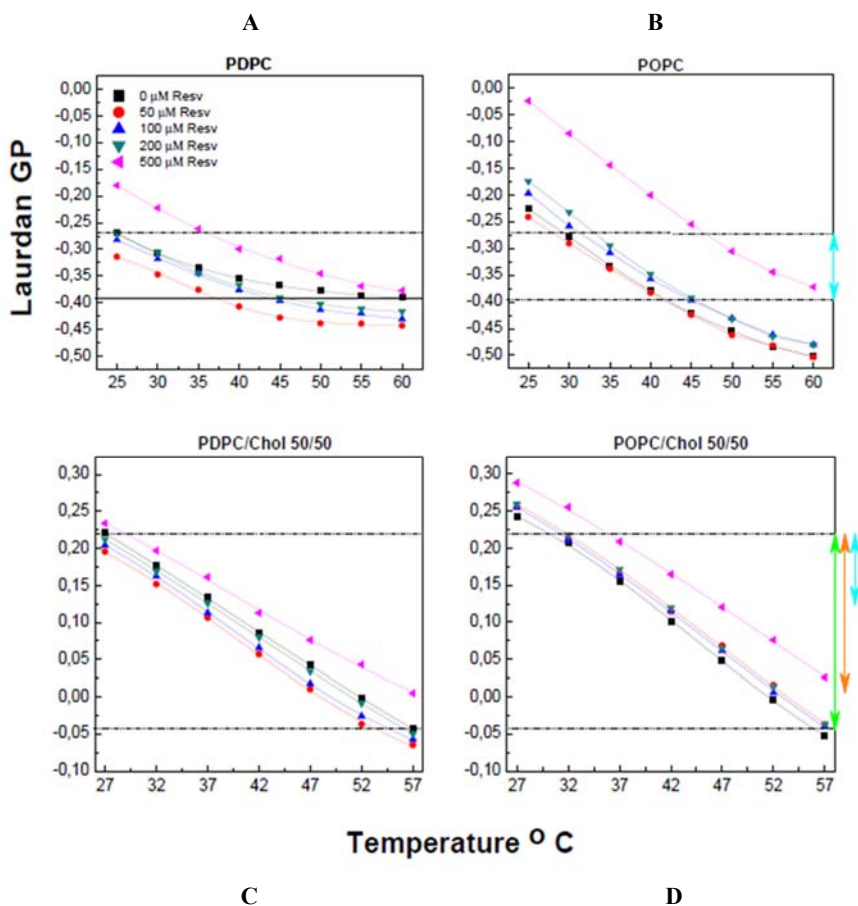
4. Изследване взаимодействието на резвератрол с моделни мембрани посредством Лаурдан флуоресцентна спектроскопия

4.1. Ефект на резвератрол върху еднокомпонентни и холестерол-съдържащи POPC и PDPC везикули

При концентрации на Resv от 50 до 500 μ M POPC везикулите показват постепенно нарастване на GP стойностите на Лаурдановата молекула, което означава, че полифенолът повишава подредеността на системата, т.е. има втвърдяващ ефект (фиг. 13, В). Обаче при PDPC везикулите (фиг. 13, А) GP стойностите са систематично по-ниски в сравнение с тези на POPC. От тук следва, че полифенолът е в състояние допълнително да флуидизира полиненаситения липиден бислой. Най-силно изразен флуиди-

зиращ ефект Resv има при 50 μM . При максимална концентрация 500 μM полифенолът проявява и втвърдяващ ефект, доказателство за което са по-високите GP стойности на Лаурдан спрямо контролата без Resv. Добавянето на Chol към POPC и PDPC везикулите премахва разликите в степента на ненаситеност между двата PC вида относно тяхната молекулна подреденост в бислоя. При изследване ефекта на Resv върху двата вида PC/Chol 50/50 установихме следните особености: 1) Chol намалява разликите в подреждането на липидите в двата вида PC везикули в присъствие на различни концентрации Resv в сравнение с еднокомпонентните POPC и PDPC везикули (фиг. 13, C, D); 2) Resv повлиява специфично подреждането на POPC и PDPC молекулите поради разликата в степента на ненаситеност на мастните киселини при двата глицерофосфолипиди. При POPC смесите полифенолът има само втвърдяващ ефект, а при PDPC – флуидизиращ и втвърдяващ в зависимост от съотношението липид/Resv. В PDPC/Chol 50/50 смес флуидизираният ефект е максимален при 50 μM , а втвърдяващият започва от 100 μM и е максимален при 500 μM .

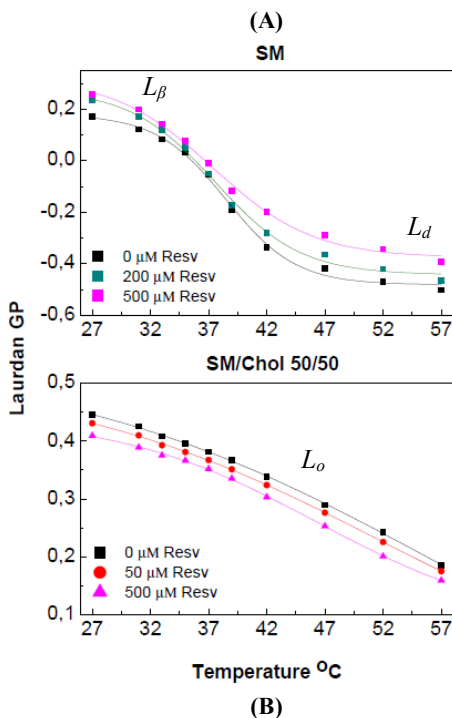
В едно- и двуконпонентните POPC-съдържащи везикули Resv има само подреждащ ефект, докато в PDPC-съдържащите полифенолът има подреждащ или флуидизиращ такъв в зависимост от неговата концентрация.



Фиг. 13. GP на Лаурдан като функция на температурата в контролни и третирани с 50, 100, 200 и 500 μM резвератрол PDP C (A) и POP C (B) везикули. Втвърдяващ ефект на резвератрол в POP C везикулите (фиг. B); флуидизиращ и втвърдяващ ефект на полифенола в PDP C везикулите (фиг. A). GP на Лаурдан като функция на температурата в отсъствие и присъствие на Resv в PDP C/Chol (C) и POP C/Chol (D) 50/50 смеси. Изцяло подреждащ ефект на Resv при POP C/Chol смеси, втечняващ и втвърдяващ ефект при PDP C/Chol везикулите в зависимост от концентрацията на полифенола.

4.2. Ефект на резвератрола върху домени в L_o фазово състояние – модел на клетъчните “rafts”

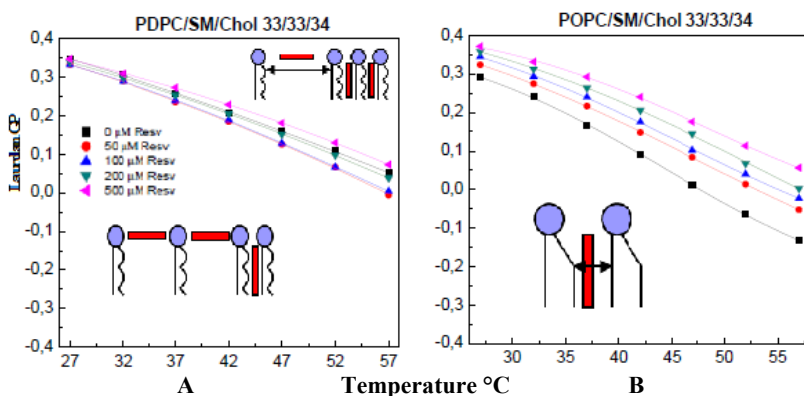
За изследване ефекта на резвератрол върху L_o домени разгледахме най-напред влиянието му върху чисти SM везикули и установихме намаляване на T_m с увеличаване на процентното съдържание на полифенола. Добавянето на 50 mol% Chol към eggSM везикули значително повишава GP стойностите и премахва фазовия преход $L_\beta \rightarrow L_d$, така мембраната се намира изцяло в течно-подредено L_o фазово състояние (фиг. 14). При добавяне на Resv, с последващо увеличаване на концентрацията му, се наблюдава намаляване на GP стойностите като функция на температурата, което означава, че полифенолът има способността да намалява подредеността на липидите в тези домени.



Фиг. 14. Ефект на Resv върху температурната зависимост на Лаурдан GP в бинарната смес eggSM/Chol 50/50. Типична сигмоидална крива, съответстваща на фазовия преход $L_\beta \rightarrow L_d$ при eggSM везикули (A) Повишаване на GP стойностите, премахване на фазовия преход $L_\beta \rightarrow L_d$ и поява на L_o фаза при 50 mol% Chol (B).

4.3. Ефект на Resv върху трикомпонентните смеси POPC/eggSM/Chol и PDPC/eggSM/Chol, модел на L_o/L_d ко-съществуване

Добавянето към бинарната eggSM/CHOL смес (намираща се в L_o фазово състояние) на POPC или PDPC с цел допълнително усложняване на моделната система предизвиква поява на съвместно съществуване на двете течни фази L_o и L_d . Изследвани са GP стойностите на Лаурдан на трикомпонентни липидни смеси POPC/eggSM/Chol и PDPC/eggSM/Chol 33/33/34 в присъствие и отсъствие на Resv. В POPC-съдържащи везикули с увеличаване концентрацията на Resv се наблюдава систематично повишаване на GP стойностите (фиг. 15, B), което означава, че полифенолът и тук има само втвърдяващ ефект. Отново Resv намалява или повишава подредеността на липидите в зависимост от концентрацията на полифенола при PDPC смесите (фиг. 15, A).



Фиг. 15. Температурна зависимост на Лаурдан GP стойностите в нетретиран и третиран с Resv POPC/eggSM/Chol и PDPC/eggSM/Chol 33/33/34 везикули. Нарастване на GP стойностите успоредно с увеличаване концентрацията на полифенола в POPC-съдържащите смеси (B). Повишаване или намаляване на GP стойностите в PDPC-съдържащи везикули в зависимост от Resv концентрация (A).

Резултатите, получени от настоящата експериментална работа, ясно показват, че биоактивното съединение Resv влияе по различен начин върху подредеността на липидите в двата вида PC смеси. В POPC-съдържащите (POPC, POPC/Chol и POPC/eggSM/Chol) везикули полифенолът при всички концентрации има само

подреждащ ефект и може да се разглежда като „пълнител” („filler”), разположен успоредно на липидните молекули, запълващ разстоянието между тях. Обаче при PDPC-съдържащите везикули Resv проявява втечняващ и втвърдяващ ефект, т.е. може да играе роля на „разделител” („spacer”) и „пълнител” в зависимост от неговата концентрация. При почти всички PDPC-съдържащи смеси полифенолът има изразен флуидизиращ ефект при ниските Resv концентрации, което предполага по-вероятно разположение на молекулата на Resv в областта на полярните глави или хоризонтално-опъната конформация, успоредна на мембранната равнина. При по-високите Resv концентрации се предполага, че се увеличава вероятността за вертикална, изправена конформация на молекулата. Така с увеличаване на концентрацията на полифенола се засилва ефектът на „пълнител”, т.е. подредеността на системата нараства, като най-силно тя е изразена при 500 μM .

5. Въздействие на ксилоолигозахаридите (XOS) върху структурата и организацията на чернодробните плазмени мембрани

5.1. Изследване подредеността на плазмено-мембранны липидни екстракти (ПМЛЕ) посредством Лаурдан флуоресцентна спектроскопия

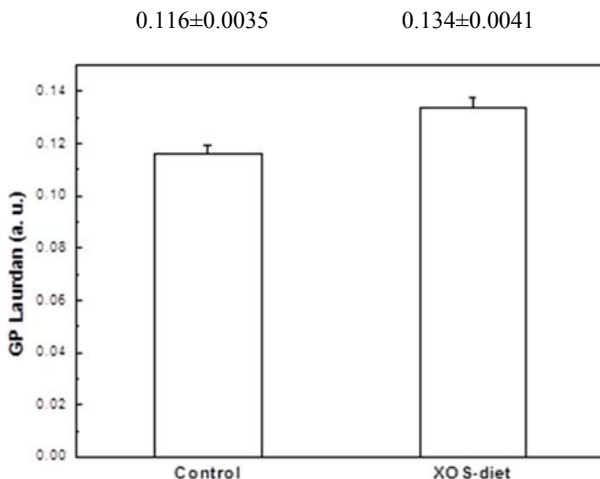
В настоящата работа ние анализирахме най-напред промените в някои специфични липидни съотношения в плъштите чернодробни плазмени мембрани след прием на ксилоолигозахариди, които са отговорни за поддържането на физико-химичните свойства на мембранныя бислой. Приемът на този пребиотик води основно до повишаване нивата на сфингомиелина и понижаване нивата на холестерола (табл. 3).

Таблица 3. Промени в липидните съотношения в чернодробни плазмени мембрани след хранене на експерименталните животни без (контрола) и със XOS. * $P < 0.001$

Съотношения	Контрола	Третирани с XOS животни
SM/PC	0.279 $\pm$ 0.011	0.413 $\pm$ 0.013*
Chol/PL	0.368 $\pm$ 0.014	0.295 $\pm$ 0.017*

Посредством Лаурдан флуоресцентна спектроскопия установихме, че GP стойностите на чернодробните плазмени

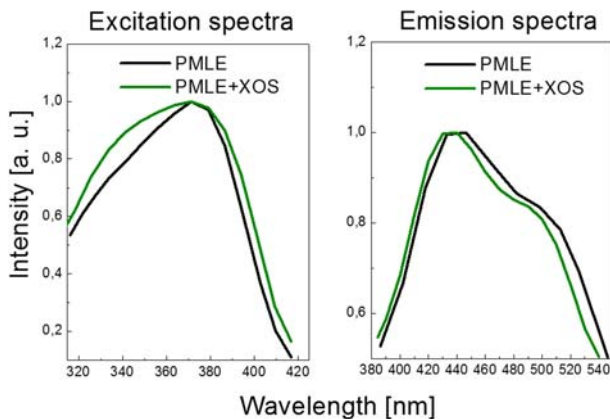
мембрани на контролните и приемащи XOS плъхове се доближават до 0.1, които отговарят на липидни мембрани, намиращи се в точно-неподредената (L_d) фаза (фиг. 16). Наблюдава се слабо повишаване на Лаурдан GP стойностите след прием на XOS, което е индикация за намалена флуидност на мембрания бислой, т.е. плазмено-мембранните липидни екстракти на приемащи XOS плъхове са по-подредени в сравнение с контролните.



Фиг. 16. Промени в Laurdan GP на плъши чернодробни плазмени мембрани след прием на XOS, средни стойности $\pm$ SD ($n = 10$). $P < 0.001$.

Повишените GP стойности на Лаурдан в чернодробните плазмени мембрани на приемащи XOS плъхове отговаря на повишеното SM/PC моларно съотношение, което е показател за по-подреден мембранен бислой. За изясняване на разликите в измерените GP стойности на фиг. 17 са представени спектърът на възбуждане и емисионният спектър на Лаурдановата молекула в липидните екстракти. Спектърът на възбуждане на контролата показва широк пик при 370 nm, а този при третирани с XOS животни – при 360 nm. Докато емисионният спектър на контролните животни показва два пика – единият при 440 nm, а другият при 500 nm, то при приемащите XOS животни те са при 435 nm и 490 nm. Спектърът на емисия на Лаурдан в липидни екстракти на приемащи XOS животни показва цялостно отместване към синята област на спектъра, което е знак за намаляване на степента на хидратация на тези липидни бислоеве, т.е. те са по-подредени от контролните. Цялостното отместването на спектъра към ниските

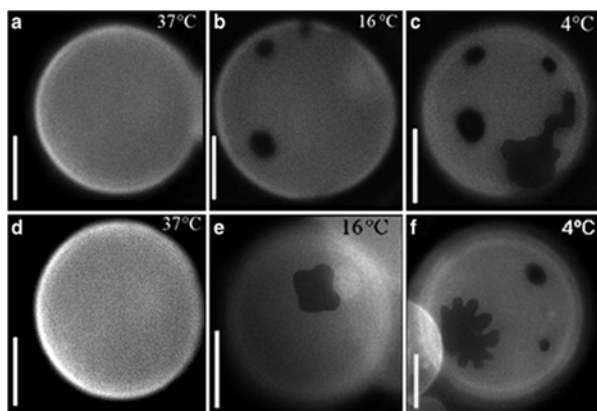
дължини на вълните съответства на по-високите нива на SM и съответно по-ниските такива на Chol (табл. 3).



Фиг. 17. Спектър на възбуждане и емисия на Лаурдан при стайна температура, включен в липидни мембрани, екстрахирани от плъщи чернодробни плазмени мембрани (PMLE – plasma membrane lipid extracts). Черната крива съответства на контролата, а зелената – на прием на ксилоолигозахариди (XOS).

5.2. Създаване на моделна мембранна система, гигантски униламеларни везикули (GUVs), съставени от ПМЛЕ. Визуализиране на домени в тези мембрани посредством флуоресцентна микроскопия

Визуализирането на фазовото поведение на липидни екстракти, получени от контролни и приемащи XOS плъхове, е извършено чрез флуоресцентна микроскопия (фиг. 18). Докато при контролните везикули първите малки тъмни кръгли L_o домени се наблюдават при 18°C (фиг. 18, b), (а при по-ниска t° и домени с неправилна форма – фиг. 18, c), то при тези, съставени от липидни екстракти на хранени с XOS животни, те се наблюдават при доста по-ниска температура (фиг. 18, f). Обратно на това, при XOS най-напред се наблюдава поява на домени с неправилна форма (L_β домени) (фиг. 18), а по-късно L_o домени.



Фиг. 18. Визуализиране фазовото разделяне на GUVs, приготвени от липидни екстракти от чернодробни плазмени мембрани на стандартно хранени (контрола) (a – c) и приемащи XOS плъхове (d – f). Контролните везикули са хомогенни в температурния интервал от 37°C до 19°C (a). Първите тъмни кръгли L_o домени се наблюдават при $18.4 \pm 2.1^\circ\text{C}$. Тези домени са представени при 16°C за по-добра визуализация (b). L_β домени с неправилна форма се появяват при $9.3 \pm 1.4^\circ\text{C}$. При 4°C се наблюдава съвместно съществуване и на двата вида домени (L_β и L_o) (c). Везикулите, съставени от липидни екстракти от чернодробни плазмени мембрани на приемащи XOS плъхове показват хомогенност в интервала от 37°C до 23°C. L_β домоените се появяват при $22.1 \pm 1.8^\circ\text{C}$ (подобни на листа домени) и нарастват при по-ниски температури в сравнение с контролата (e и f). Формирането на L_o домоените в липидни екстракти от чернодробни плазмени мембрани на приемащи XOS плъхове се наблюдава също при по-ниски температури ($6.4 \pm 1.6^\circ\text{C}$) в сравнение с нетретираните животни (18.4°C). Като при контролата и тук при 4°C се наблюдава съвместното съществуване на двата вида домени (f). Мащаб: 20 μm .

Появата на по-големи гел домени при по-висока температура при GUVs, съставени от липидни екстракти на хранени с XOS животни, се дължи на по-високите нива на SM спрямо контролата. Обаче при L_o домоените зависимостта е обратна и се дължи на конкуренцията на други липиди (церамид и сфингозин) с Chol за SM за формиране на гел домени при по-висока температура. Така ще остане по-малко SM за формиране на домени в L_o фаза [19, 20].

V. Заключение

Представената експериментална работа демонстрира влиянието на аминокислотни липиди, ДНА-съдържащите глицерофосфолипиди и окисления липид POVPC върху формирането на домени от вида „rafts”. Освен горепосочените липиди, влизащи в състава и влияещи върху организацията на биологичните мембрани, обект на нашето изследване бяха двете биологично активни съединения резвератрол и ксилоолигозахаридите. Биоактивно е това съединение, което оказва позитивно въздействие върху биохимичните процеси и физиологични функции на човешкия организъм. Понастоящем, със своите плейотропни свойства, тези вещества играят важна роля за укрепване и поддържане здравето на човека, но механизмът им на действие на молекулно ниво е все още неясен.

Аминокислотни липидите подсилват в значителна степен формирането на рафтове, като PE показва по-голяма способност да формира такива домени в сравнение с PS. Това се дължи на факта, че PE е ненаситен молекулен вид и е малко вероятно да участва директно в изграждането на L_o домовете. Стерични ограничения обаче за включването на PS във формирането на тези домени не се очакват. Предполага се индиректна роля на PE във формирането на този вид домени, а именно чрез намаляване смесваемостта на SM и/или Chol в по-неподредената фаза (L_d), което води до създаването на по-голяма фракция на L_o домовете. Така повече SM се включва при формирането на „rafts”. Това свойство на аминокислотни липидите да повишават фракцията на L_o домовете може да бъде възприето като „трик” в природата, чрез който се компенсира ниското съдържание на SM във вътрешния (цитоплазмен) монослой на клетъчната плазмематна мембрана с цел да се запази способността на липидите да формират домени в L_o фаза.

ДНА от фамилията на PUFA има способността да формира рафтове в микронната област в сравнение с ОА, в нанометричната такава, при физиологична температура. Така можем да заключим, че степента на ненаситеност на мастната киселина при *sn*-2 позиция на глицерофосфолипидите е способна да контролира размера на домовете. Полярната глава на полиненаситения глицерофосфолипид допълнително повлиява размера на домовете. PDPE стимулира в по-голяма степен формирането на макроскопични домени от вида „rafts” в сравнение с PDPC. Формирането на течни

домени с размери в микронната скала предполага високо линейно напрежение между двете ко-съществуващи фази, което индуцира явлението пъпкуване (огъване и откъсване на L_o домена). Това явление бе наблюдавано при увеличаване концентрацията на PC- и PE-съдържащи ДНА и в комбинация от двата липида. Освен ДНА, значение за поява на това явление има и полярната глава. PDPE в сравнение с PDPC стимулира в по-голяма степен процеса на пъпкуване на L_o домени.

Окислените липиди, поради атипичната им структура (къси ацилни вериги), участват в клетъчното увреждане чрез промяна в основните физични свойства и структурна организация на мембраните. POVPC променя латералната организация на мембранните липиди. Окисленият липид облагодиятства в по-голяма степен формирането на области от мембраната в течно-подредено състояние, когато обкръжаващата среда е богата на POPC в сравнение с PDPC. PDPC-съдържащата среда обаче спомага за протичането на процеси в клетката като мембранното везикулиране, за разлика от POPC.

Resv променя липидното подреждане диференцирано в зависимост от природата на липидния матрикс. Взаимодействието на биологично активното съединение с мембранный бислои зависи от степента на ненаситеност на мастната киселина в PC молекулата, съдържанието на SM и/или Chol, както и отношението липид/полифенол.

При изследване въздействието на ксилоолигозахариди в качеството им на пребиотици върху плъщи чернодробни плазмени мембрани ние установихме промяна в състава, структурата и физико-химичните свойства на липидния бислои. Повишени сфингомиелинови и понижени холестеролови нива бяха намерени при сравнение с контролните условия. Липидният бислои бе реконструиран посредством биомиметични системи, съставени от плазмено-мембранный липиден екстракт от черен дроб на плъхове, хранени с ксилоолигозахариди и при контролни условия. Визуализирано е фазовото разделяне на липидите, определена е формата, размерите и динамиката на рафт-домени. Определен е флуидитетът на мембраните. Посредством тези експерименти ние показахме корелация между хранене, липиден състав, структура и организация на мембраните.

VI. Изводи

1. Аминофосфолипидите PE и PS увеличават температурата на смесваемост на двете ко-съществуващи фази L_o/L_d и увеличават фракцията на L_o домените. PE (яйчен) има по-голям ефект в сравнение с PS (от говежди мозък). Тъй като PE (яйчен) е полиненаситен вид, се предполага, че този аминофосфолипид може да подсилва формирането на L_o домени чрез изместване на свободния сфингомиелин или холестерол от течната-неподредена фаза (L_d) към подредената такава (L_o).
2. Докозахексаеновата мастна киселина при *sn*-2 позиция на глицерофосфолипидите PDPC и PDPE повишава температурата на формиране на домени от вида “*rafts*” като от гледна точка на полярната глава PE подсилва в по-голяма степен формирането на L_o домени в сравнение с PC. При физиологична температура ДНА-съдържащите глицерофосфолипиди формират рафтове с микрометрични размери в неподреден липиден матрикс в сравнение с ОА-съдържащите глицерофосфолипиди, при които се формират неподредени нанодомени в подреден липиден матрикс. В PDPC- и PDPE-съдържащи смеси при високи концентрации се наблюдава явлението пъпкуване на домени за разлика от ОА-съдържащите фосфатидилхолини. Значение за този процес има не само ненаситената мастна киселина, но и полярната глава. Процесът пъпкуване на домени е присъщ за домени с високо линейно напрежение.
3. Окисленият липид POVPC повлиява в по-голяма степен формирането на рафтове в смеси, съдържащи мононенаситени PC (ОА), отколкото полиненаситените видове (ДНА). В POPC-съдържащи смеси POVPC премахва L_o/L_d фазовото разделяне в микронната област, увеличавайки фракцията на L_o фазата, а в PDPC-съдържащите смеси окисленият липид засилва слабо L_o/L_d фазовото разделяне.
4. Биологично активното съединение резвератрол повлиява по различен начин липидната подреденост в ОА-съдържащ

матрикс (POPC/SM/Chol) и DHA-матрикс (PDPC/SM/Chol). Резвератролът повишава подредеността в ОА-съдържащ матрикс и обратно – понижава я в DHA-такъв при физиологична концентрация на полифенола и температура. Резвератролът отменя фазовия преход на сфингомиелина към ниските температури и флуидизира рафтовете.

5. Приемът на ксилоолигозахариди променя структурата и организацията на мембрания бислой на плъщи чернодробни плазмени мембрани основно поради повишението на нивото на SM и понижението на Chol. Тази промяна е свързана с увеличаване на GP стойностите на молекулата на Лаурдан поради нарастване фракцията на подредените домени, което показва по-плътено опаковане на липидите в тези мембрани.

VII. Приноси

1. Установено е за първи път, че аминоксфополипидите фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин стимулират формирането на домени от вида „rafts”. Ролята на аминоксфополипидите да увеличат фракцията на L_o домени може да се разглежда като „трик” в природата за компенсиране ниското съдържание на SM във вътрешния слой на плазмената мембрана, за да се запази способността на липидите да формират такива домени.
2. За първи път е установена корелация на степента на ненаситеност на мастните киселини в молекулата на фосфатидилхолина и размера на L_o домени. За първи път е установен ефектът на полярната глава при полиненаситените глицерофосфополипиди (докозахексаенова мастна киселина (DHA) при *sn*-2 позиция на PC и PE) за формирането на рафтове. PE увеличават фракцията на рафтовете при физиологична температура. DHA-съдържащите глицерофосфополипиди стимулират процесите на пъпкуване на домени от мембраните. Тези научни изследвания допринасят за изясняването на механизмите на действие на полезните омега-3 мастни киселини върху човешкия организъм.
3. За първи път е установено, че окисленият липид POVPC в зависимост от природата на липидния матрикс – дали е поли- или мононенаситен, повлиява в различна степен размера и динамиката на рафтовете. Тези научни изследвания разкриват механизмите на действие на окислените липиди в условия на оксидативен стрес в човешкия организъм.
4. Установено е за първи път, че биоактивното съединение резвератрол повлиява диференцирано подредеността на липидите в зависимост от степента на ненаситеност на мастната киселина при *sn*-2 позиция в молекулата на фосфатидилхолина, присъствието на сфингомиелин и холестерол. Това научно изследване допринася за установяване способността на резвератрола да модулира мембранната организация, което може да повлияе на функциите на определени сигнални белтъци, независимо

дали те се намират в подредените домени или в неопределения липиден матрикс. Изследваните ефекти на този полифенол на ниво мембрани могат да послужат като база за изясняване механизма на действие, който е от значение за разбирането на фармакологичното действие на това биоактивно съединение.

5. За първи път е показано, че приемът на пребиотици като ксилоолигозахаридите въздейства на състава, структурата и организацията на мембрания бислой на плъщи чернодробни плазмени мембрани. Тези научни факти допринасят за изясняване на специфичните молекулни механизми, лежащи в основата на благоприятните ефекти на пребиотиците върху организма на гостоприемника и за развитието на комплексни терапевтични подходи за подобряване здравето на човека.

Участия в научни конференции

1. Постер на тема: “Aminophospholipids indirectly reinforce the raft formation in model membranes”

Hazarosova, R., G. Staneva, D. Petkova, K. Koumanov, A. Momchilova
Youth Science Conference “Kliment’s days”, November 22 – 23, 2010,
Sofia University, Bulgaria

2. Доклад на тема: “Aminophospholipids indirectly reinforce the raft formation in model membranes”

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

IIth Training seminar at OP “Human Resources Development”, Grant
BG051PO001-3.3.04/42, 2010 – 2011, 25 January 2011

3. Постер на тема: “Effect of cholesterol on the phase separation of aminophospholipids: elucidation of the role of aminophospholipids in the formation of lipid rafts in model membranes”

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

International Scientific Conference dedicated to 50 anniversary of the
UNION of SCIENTISTS in Stara Zagora, 2th – 3th June 2011, Bulgaria

4. Постер на тема: “Impact of omega-3 fatty acid on the formation of raft-like domains in model membranes”

Hazarosova, R., H. Krasteva, A. Momchilova, D. Petkova, G. Staneva

Youth Science Conference “Kliment’s days”, November 22 – 23, 2011,
Sofia University, Bulgaria.

5. Постер на тема: “Effect of cholesterol on the phase separation of aminophospholipids: Role of aminophospholipids on the formation of lipid rafts in model membranes”

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

Youth Science Conference “Kliment’s days”, November 22 – 23, 2012,
Sofia University, Bulgaria.

6. Постер на тема: “Effect of palmitoyl-oxo-valeroyl phosphatidylcholine on raft-like domain formation in giant unilamellar vesicles”

Lupanova, T., R. Hazarosova, R. Georgieva, G. Staneva, A. Momchilova
22nd International Scientific Conference of the UNION of SCIENTISTS
in Stara Zagora, 7th – 8th June 2012, Bulgaria

7. Доклад на тема: “Effect of palmitoyl-oxo-valeroyl-phosphocholine on the membrane organization”

Hazarosova, R., S. Todinova, A. Momchilova, G. Staneva

Scientific workshop for young scientist and graduate students,
Biomedicine and Quality of Life, 2 October 2014, Sofia

8. Доклад на тема: “Intake of xylooligosaccharides alters the structural organization of liver plasma membrane bilayer”

Hazarosova, R., G. Staneva, D. Petkova, R. Georgieva, R. Pankov, R. Skrobanska, A. Momchilova

Ith National Conference of Biotechnology, 17 – 18 October, 2014, Sofia
University, Bulgaria

9. Доклад на тема: “Docosaehaenoic fatty acid stimulates the raft-like domain formation. Comperative analysis between phosphatidylcholine and ethanolamine”

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

IVth Scientific workshop of physical chemistry, 15 – 17 April 2015, Sofia

10. Постер на тема: “Interaction of resveratrol with model membranes”

Hazarosova, R., G. Staneva, A. Momchilova, K. Koumanov, D. Petkova

Smart and green interfaces: Fundamentals and diagnostics, COST Action
MP1106: Smart and green interfaces – from single bubbles and drops to
industrial, environmental and biomedical applications (SGI), 29 –
31.10.2015, Sofia, Bulgaria

11. Постер на тема: “Xylooligosaccharides change the structural organization of liver plasma membranes”

Hazarosova, R., G. Staneva, D. Petkova, R. Georgievaq R. Pankov, R. Skrobanska, A. Momchilova

XVth International Congress of Medical Sciences for students and young doctors, 12 – 15 May 2016, Sofia

12. Постер на тема: “Resveratrol modulates the lipid ordering in model membranes”

Hazarosova, R., D. Petkova, G. Staneva, K. Koumanov, A. Momchilova

41st FEBS Congress (16th FEBS Young Scientists' Forum), 31 August – 8 September 2016, Kuşadası, Turkey

Научни публикации

1. **Hazarosova, R.**, A. Momchilova, K. Koumanov, D. Petkova, G. Staneva (2015). “Role of Aminophospholipids in the Formation of Lipid Rafts in Model Membranes”, J Fluorescence 25:1037 – 1043
2. Georgieva, R., C. Chachaty, **R. Hazarosova**, C. Tessier, P. Nuss, A. Momchilova, G. Staneva (2015). “Docosahexaenoic acid promotes micron scale liquid-ordered domains. A comparison study of docosahexaenoic versus oleic acid-containing phosphatidylcholine in raft-like mixtures”, Biochim Biophys Acta 1848:1424 – 1435
3. Staneva, G., D. Petkova, **R. Hazarosova**, R. Georgieva, R. Pankov, R. Skrobanska, A. Momchilova (2013). “Intake of Xylooligosaccharides Alters the Structural Organization of Liver Plasma Membrane Bilayer”, Food Biophysics 9:138 – 144

Забелязани цитати

1. Georgieva, R., C. Chachaty, R. Hazarosova, C. Tessier, P. Nuss, A. Momchilova, G. Staneva (2015). “Docosahexaenoic acid promotes micron scale liquid-ordered domains. A comparison study of docosahexaenoic versus oleic acid-containing phosphatidylcholine in raft-like mixtures.” *Biochim Biophys Acta* 1848:1424–1435

Santos, G., M. Diaz, N. V. Torres (2016). “Lipid Raft Size and Lipid Mobility in Non-raft Domains Increase during Aging and Are Exacerbated in APP/PS1 Mice Model of Alzheimer's Disease. Predictions from an Agent-Based Mathematical Model”, *Front Physiol.* 7:90

Emendato, A., R. Spadaccini, A. D. Santis, D. Picone (2016). “Preferential interaction of the Alzheimer peptide A β -(1-42) with Omega-3-containing lipid bilayers: Structure and interaction studies”, *FEBS Lett.* 590:582 – 91

Levental, R., J. Lorent, X. Lin, A. Skinkle, M. Surma, E. Stockenbojer, Alemayehu A. Gorfe, I. Levental (2016). “Polyunsaturated lipids regulate membrane domain stability by tuning membrane Order”, *Biophysical Journal* 110, 1800 – 1810

2. Staneva, G., D. Petkova, R. Hazarosova, R. Georgieva, R. Pankov, R. Skrobanska, A. Momchilova (2013). “Intake of Xylooligosaccharides Alters the Structural Organization of Liver Plasma Membrane Bilayer”, *Food Biophysics* 9:138 – 144

Singh, R. D., J. Banerjee, A. Arora (2015). “Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides”, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5:19 – 30

Цитирана литература

1. Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes", *Nature* 397: 569 – 572
2. Brown, D. A. and E. London (1997). "Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 1 – 7
3. Jacobson, K., O. G. Mouritsen and R. G. Anderson (2007). "Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics", *Nat Cell Biol* 9: 7 – 14
4. Pike, L. J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function", *J Lipid Res* 47: 1597 – 98
5. Simons, K. and R. Ehehalt (2002). "Cholesterol, lipid rafts and disease", *J Clin Invest* 110: 597 – 03
6. Bretscher, M. (1972). "Asymmetrical lipid bilayer structure of biological membranes", *Nat. New Biol.* 61:11 – 12
7. Emmelot, P. and R. P. van Hoeven (1975). "Phospholipid unsaturation and plasma membrane organization", *Chem. Phys. Lipids* 14: 236 – 246
8. Salem, N. J, H.-Y. Kim and J. A. Yergey (1986). "Docosahexaenoic Acid: Membrane Function and Metabolism", *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods* Academic Press, New York 319 – 351
9. Fu, P. and K. G. Birukov (2009). "Oxidized phospholipids in control of inflammation and endothelial barrier", *Transl. Res.* 153(4): 166 – 76
10. Deigner, H. P. and A. Hermetter (2008). "Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology", *Curr. Opin. Lipidol*, 19(3): 289 – 94
11. Leitinger, N., T. R. Tyner, L. Oslund, C. Rizza, G. Subbanagounder, H. Lee, P. T. Shih, N. Mackman, G. Tigyi, M. C. Territo, J. A. Berliner, D. K. Vora (1999). "Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of

- monocytes and neutrophils”, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12010 – 12015
12. Watson, A. D., N. Leitinger, M. Navab, K. F. Faull, S. Hörkkö, J. L. Witztum, W. Palinski, D. Schwenke, R. G. Salomon, W. Sha, G. Subbanagounder, A. M. Fogelman and J. A. Berliner (1997). “Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo”, *J. Biol. Chem.* 272: 13597 – 13607
 13. Pervaiz, S. (2003). “Resveratrol: from grapevines to mammalian biology”, *FASEB J.* 17:1975 – 1985
 14. Signorelli, P., R. Ghidoni (2005). “Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises”, *J. Nutr. Biochem.* 16:449 – 466
 15. Neves, A.R., M. Lucio, J.L. Lima, S. Reis (2012). “Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery and membrane interactions”, *Curr. Med. Chem.* 19:1663 – 1681
 16. Baur, J.A. and D.A. Sinclair (2006). “Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence.” *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:493 – 506
 17. Vazquez, M.J., J.L. Alonso, H. Dominguez, J.C. Parajo (2000). “Xylooligosaccharides: manufacture and applications”, *Trends Food Sci Technol* 11:387 – 93
 18. Moure, A., P. Gullón, H. Domínguez, J.C. Parajó (2006). “Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosaccharides as food additives and nutraceuticals”, *Process Biochem.* 41:1913 – 1923
 19. Staneva, G., A. Momchilova, C. Wolf, P.J. Quinn, K. Koumanov (2009). “Membrane microdomains: Role of ceramides in the maintenance of their structure and functions”, *Biochimica Biophysica Acta* 1788:666 – 675
 20. Georgieva, R., K.Koumanov, A. Momchilova, C. Tessier, G. Staneva (2010). “Effect of sphingosine on domain morphology in giant vesicles”, *Journal of Colloid and Interface Science* 350:502 – 510